



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto del hipotiroidismo en el metabolismo
lipídico de la coneja adulta**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Yazmín Carrillo Portillo

Directora de tesis
Dra. Estela Cuevas Romero

Tlaxcala, Tlax.

Posgrado CTBC



Septiembre 2012

Maestría en
Ciencias Biológicas



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto del hipotiroidismo en el metabolismo
lipídico de la coneja adulta**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

Yazmín Carrillo Portillo

Directora de tesis
Dra. Estela Cuevas Romero

Comité tutorial

Dr. Francisco Castelan

Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre 2012



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Yazmín Carrillo Portillo** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto del hipotiroidismo en el metabolismo lipídico de la coneja adulta”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 23 DE 2012

DRA. LYDIA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ

DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO

DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA

DR. FRANCISCO CASTELÁN

DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



La presente tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Estela Cuevas Romero en el laboratorio de Endocrinología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Para el desarrollo de este proyecto se contó con el financiamiento de CONACyT (367031-YC y 106226-EC).

Agradecimientos

Al posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, por permitir mi formación como Maestra en Ciencias Biológicas así como por las facilidades brindadas para la realización del proyecto de tesis.

Al CONACyT por financiar mis estudios durante los dos años de maestría (367031-YC).

A mi maestra la Dra. Estela Cuevas Romero, por enseñarme que los sueños no tienen límite. Así como por su paciencia, esfuerzo y dedicación para la realización de este proyecto.

Al Dr. Francisco Castelán por sus enseñanzas y valiosos comentarios que enriquecieron este proyecto.

A la Dra. Lidya Sumiko Morimoto Martínez por sus aportaciones y comentarios que mejoraron notablemente este trabajo.

A la Dra. Dora Luz Corona Quintanilla por sus acertadas sugerencias y correcciones.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo por sus valiosas aportaciones.

Agradecimientos a título personal

A mis padres el Prof. Gaudencio Carrillo Robles y Profa. Brígida Portillo Acatitla por apoyarme incondicional. Gracias por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, por que con su apoyo y aliento hoy he logrado uno de mis más grandes anhelos.

A mi esposo José I. por su apoyo, amor y confianza.

A mis hermanas (o) Verónica, Berenice y Omar por sus palabras de aliento cuando sentía que ya no podía.

A los tres angelitos que ya no están con nosotros, pero que desde donde están me han dado fortaleza para seguir adelante.

A la familia Carrillo Moctezuma, Portillo Jiménez y Pérez Tepato por su afecto y apoyo incondicional para mí y mi familia.

A Faviola por brindarme su amistad. Espero que seguir contando con tú amistad!

A mis compañeras (o) de laboratorio: Yadira, Arely, Rosalía, Adriana, Raúl por su amistad y apoyo, por todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos.

A Verónica García Villamar y Laura Hernández Aragón por permitirme aprender junto a ellas las técnicas de Western blot e inmunohistoquímica.

RESUMEN

El tejido adiposo blanco está constituido por células llamadas adipocitos. Dichas células almacenan lípidos en forma de triglicéridos, producen ácidos grasos y glicerol y secretan adipocinas. En condiciones normales, los adipocitos se encuentran rodeados de células polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos). Las cuales cumplen diversas funciones: regulan la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, participan en la formación de nuevos vasos sanguíneos, producen moléculas pro-inflamatorias, degradan fragmentos de tejido adiposo necrotizado y secretan moléculas anti-inflamatorias. Así mismo las células polimorfonucleares tienen receptores a hormonas tiroideas y presentan desyodasas tipo III. En humanos, la deficiencia de hormonas tiroideas, conocida como hipotiroidismo, se relaciona con el aumento del peso corporal (obesidad), dislipidemias y con la disminución en el funcionamiento del sistema inmunitario. En la parte metabólica, las hormonas tiroideas regulan la expresión de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la síntesis de colesterol. Estudios en animales con hipotiroidismo inducido farmacológicamente, también demuestran una acumulación de grasa corporal y niveles altos de lípidos en sangre. Sin embargo, se desconoce si el hipotiroidismo produce cambios en las características histológicas del tejido adiposo blanco y, si al igual que en la obesidad, promueve la infiltración de células polimorfonucleares en los adipocitos. **METODOLOGÍA.** Se utilizaron conejas jóvenes (7-12 meses de edad) de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), divididas en dos grupos: controles (n=7) e hipotiroideas (n=7, tratadas con metimazol 0.02%, durante 30 días). Se les midieron concentraciones hormonales (T3, T4, TSH y leptina; mediante quimioluminiscencia y ELISA) y parámetros metabólicos (colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL; mediante métodos enzimáticos). Además, se midió el área de la vesícula de triglicéridos en adipocitos viscerales y se cuantificó el número de células polimorfonucleares por adipocito (tinción de HE). Así mismo, se evaluó el número de macrófagos pro y anti inflamatorios en el tejido adiposo. Los resultados fueron analizados con la prueba U de Mann Whitney y t de Student según fue el caso. **RESULTADOS.** En comparación con las conejas controles, las conejas tratadas con metimazol mostraron: 1) menores niveles de T3 y T4, y mayores niveles de TSH; 2) mayor tamaño de tirocitos; 3) mayores concentraciones de colesterol, HDL y LDL. Variables como peso corporal, niveles de triglicéridos, VLDL y leptina, fueron similares en ambos grupos; 4) además presentaron mayor área de adipocitos; 5) mayor número de células polimorfonucleares por adipocito; 6) mayor número de macrófagos pro-inflamatorios (CD68); y 7) menor número de macrófagos anti-inflamatorios (CD163). **CONCLUSIÓN.** El hipotiroidismo en las conejas incrementó los niveles de lípidos en sangre, el tamaño de los adipocitos, y promovió la infiltración de células polimorfonucleares y macrófagos pro-inflamatorios. Los resultados obtenidos en el presente estudio contribuyen al entendimiento del papel de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo lipídico y el comportamiento de las células polimorfonucleares en el tejido adiposo. Proyecto financiado por CONACyT (367031-YC y 106226-EC).

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Metabolismo lipídico	1
1.2. Tejido adiposo blanco	3
1.2.1 Adipogénesis	6
1.2.2 Tejido adiposo y células del sistema inmunitario	7
1.3 Hormonas tiroideas	10
1.3.1 Alteraciones de la función tiroidea en humanos	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Hormonas tiroideas y niveles de lípidos en sangre	14
2.2 Hormonas tiroideas e histología del tejido adiposo	14
2.3 Hormonas tiroideas y sistema inmunitario	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
Predicciones:	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. METODOLOGÍA	19
6.1 Sujetos de estudio	19
6.2 Grupos experimentales	19
6.3 Inducción de hipotiroidismo	19
6.4 Medición de parámetros metabólicos	20
6.5 Análisis histológico de los adipocitos	21
6.6 Inmunodetección de macrófagos en cortes de tejido adiposo	22
6.7 Análisis estadístico	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Inducción de hipotiroidismo	24

7.2 Perfil lipídico-----	26
7.3 Histología de adipocitos viscerales-----	26
7.4 Niveles de leptina-----	31
8. DISCUSIÓN-----	32
9. CONCLUSIONES-----	41
10. PERSPECTIVAS-----	41
11. REFERENCIAS-----	42
12. GLOSARIO-----	51
13. PUBLICACIONES-----	55

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo lipídico

El metabolismo de lípidos comienza con la digestión de las grasas ingeridas en la dieta, su transporte a través de las lipoproteínas, su posterior almacenamiento (ver lipogénesis) y su movilización (ver lipólisis) cuando son necesarias para la obtención de energía. La digestión de las grasas inicia en la boca con la masticación, donde la lipasa lingual comienza la hidrólisis de los triglicéridos. Posteriormente, en el estómago los triglicéridos se mezclan con los jugos gástricos formando una sustancia denominada quimo. Este último pasa al intestino delgado (duodeno) en donde se mezcla con los jugos pancreáticos (sales biliares, lipasa pancreática) permitiendo la hidrólisis total de los triglicéridos en moléculas de ácidos grasos y glicerol (ver revisión de Iqbal y Hussain 2009). Dichas moléculas penetran la pared de los enterocitos¹ por difusión, en su interior los ácidos grasos y glicerol son re-esterificados formando nuevamente triglicéridos. Los cuales pasan al torrente sanguíneo en donde son captados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) las cuales se encargan de transportarlos al tejido adiposo (ver revisión de Iqbal y Hussain 2009).

El colesterol, al igual que los triglicéridos tiene dos orígenes uno dietético y otro endógeno. El colesterol dietético necesita de la acción de las lipasas linguales, pancreáticas y de la enzima colesterol esterasa que separa el ácido graso y el colesterol. Sin embargo, la absorción del colesterol es más lenta que la de los triglicéridos. Posteriormente, el colesterol es transportado en sangre vía lipoproteínas². Las cuales son de cuatro tipos: quilomicrones³ (QM), VLDL⁴, lipoproteínas de baja densidad (LDL⁵) y lipoproteínas de alta densidad (HDL⁶). Las lipoproteínas están formadas por fosfolípidos y una o más proteínas denominadas apoproteínas. Las LDL, VLDL y HDL se sintetizan en el hígado; mientras que los

¹ Ver glosario

² Ver glosario

³ Ver glosario

⁴ Ver glosario

⁵ Ver glosario

⁶ Ver glosario

quilomicrones se producen en el intestino delgado. La función de las LDL es transportar esteres del colesterol desde el hígado hacia los órganos periféricos. Mientras que, las VLDL transportan triglicéridos del hígado hacia otros tejidos. Finalmente las HDL participan en el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado para su eliminación. En el hígado, el colesterol se utiliza principalmente para la secreción biliar (colesterol libre o sales biliares). Otra fuente importante de colesterol es la que se sintetiza en el hígado a partir de la acetil CoA, la cual es transformada a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esta reacción es limitante y constituye la clave para regular la velocidad de síntesis del colesterol endógeno (ver revisión de Iqbal y Hussain 2009).

Así podemos decir que el balance energético es el equilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. Dicho balance está ligado con la regulación del peso corporal, ya que cuando el gasto es similar a la ingesta, el peso se mantiene constante, mientras que si el gasto es inferior, la energía es almacenada en forma de grasa. En mujeres y hombres, la acumulación de tejido adiposo y el metabolismo de lípidos son diferentes (Sugiyama y Agellon 2012). En mujeres el depósito de grasa se localiza en la región glúteo-femoral-abdominal, mientras que en los hombres en la región abdominal. Esta distinta distribución entre géneros se acompaña de diferencias en la funcionalidad de cada depósito (almacenamiento y movilización grasa; Sugiyama y Agellon 2012). Así mismo las preferencias de alimentos en la dieta y la edad pueden ser factores para el incremento del peso corporal, el contenido de grasa corporal y el riesgo de trastornos metabólicos. Una posible explicación a estas diferencias relacionadas con el sexo, son los cambios fisiológicos y los niveles de hormonas sexuales particularmente los niveles séricos de estrógenos (Sugiyama y Agellon 2012). Sugiriendo que las hormonas sexuales tienen un papel importante en la regulación del destino metabólico de los nutrientes. Esto es debido a la acción de los estrógenos sobre la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos. Los estrógenos regulan la expresión de receptores LDL en el hígado y los niveles ARNm de apolipoproteína M (presente en las HDL; ver revisión de Faulds y cols. 2011).

1.2. Tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco está constituido por células llamadas adipocitos. Cada célula adiposa tiene un núcleo periférico y una vesícula que contiene triglicéridos (unilocular) y ocupa el resto de la célula. Alrededor de los adipocitos hay tejido intercelular o estroma (matriz extracelular) formado por fibras de colágeno⁷ (tipo III), fibroblastos⁸, preadipocitos⁹, células madre mesenquimales¹⁰, terminales nerviosas autonómicas y vasos sanguíneos (cada adipocito es alimentado por un vaso sanguíneo; Figura 1). El tejido adiposo ejerce diversas funciones: 1) almacena lípidos en forma de triglicéridos; 2) produce ácidos grasos y glicerol (lipólisis); y 3) secreta adipocinas¹¹ (ver revisión de Vázquez-Vela y cols. 2008).

Almacenamiento de triglicéridos. El almacenamiento de lípidos lo lleva a cabo mediante dos procesos metabólicos: la lipogénesis a partir de ácidos grasos y la liponeogénesis a partir de glucosa. Para la lipogénesis, los triglicéridos ingeridos en la dieta son transportados por los quilomicrones y las VLDL al tejido adiposo. Posteriormente, éstos son degradados en ácidos grasos y glicerol por la enzima lipoproteína lipasa (LPL)¹² presente en los vasos sanguíneos que rodean a los adipocitos. De la sangre, los ácidos grasos son introducidos al adipocito a través de proteínas transportadoras de ácidos grasos (Fat Acid Transport Protein, FATP). Una vez en el interior, los ácidos grasos son esterificados y convertidos a triglicéridos para su almacenamiento (Figura 2). Para la liponeogénesis, la glucosa ingresa a la célula a través de transportadores de glucosa (GLUT4), cuya translocación a la membrana del adipocito es favorecida por la insulina. En el citoplasma del adipocito, la glucosa es convertida a ácidos grasos, y éstos en triglicéridos (Figura 2; ver revisión de Vázquez-Vela y cols. 2008).

Lipólisis. Los triglicéridos almacenados en la vacuola lipídica son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol. Dicho proceso es regulado por el sistema nervioso simpático (adrenalina y epinefrina), involucrando la activación de receptores β -adrenérgicos e incrementando los niveles de AMPc (nucleótido cíclico 3'-5' monofosfato de adenosina).

⁷ Ver glosario

⁸ Ver glosario

⁹ Ver glosario

¹⁰ Ver glosario

¹¹ Ver glosario

¹² Ver glosario

Esto promueve la activación de la lipasa sensible a hormonas (LSH)¹³, la cual hidroliza a los triglicéridos almacenados. Los ácidos grasos son liberados al citoplasma, donde una parte de ellos entra a la mitocondria para ser metabolizados a través de la β -oxidación¹⁴; mientras que el resto es liberado al torrente sanguíneo y transportados por la albúmina sérica a otros tejidos, como hígado, músculo y páncreas, entre otros, para la producción de energía. Por su parte, el glicerol es utilizado en la síntesis de glucosa hepática (Figura 2; ver revisión de Bickel y cols. 2009).

Secreción de adipocinas. El tejido adiposo secreta leptina, adiponectina, resistina, serpina, apelina, adiposina, aromatasas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), omentina, visfátina, hepcidina, vaspina, angiotensinógeno y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Dichas moléculas participan en diversos procesos fisiológicos, como la regulación de la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, la regulación energética, el metabolismo de lípidos y la inmunidad (Figura 2; ver revisión de Vázquez-Vela y cols. 2008).

Las funciones antes descritas son reguladas por hormonas como la insulina¹⁵, los glucocorticoides¹⁶, los estrógenos¹⁷, la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y las hormonas tiroideas (ver revisión de Vázquez-Vela y cols. 2008). La insulina estimula la actividad de la LPL e inhibe la acción de la LSH. Mientras que los glucocorticoides y los estrógenos inhiben la lipogénesis al disminuir la actividad de la LPL y estimulan la lipólisis al incrementar la actividad de la LSH. También las catecolaminas y la TSH estimulan la lipólisis al aumentar la concentración de AMPc intracelular. Las hormonas tiroideas estimulan la lipólisis al incrementar la expresión de receptores adrenérgicos (ver revisión de Vázquez-Vela y cols. 2008).

¹³ Ver glosario

¹⁴ Ver glosario

¹⁵ Ver glosario

¹⁶ Ver glosario

¹⁷ Ver glosario

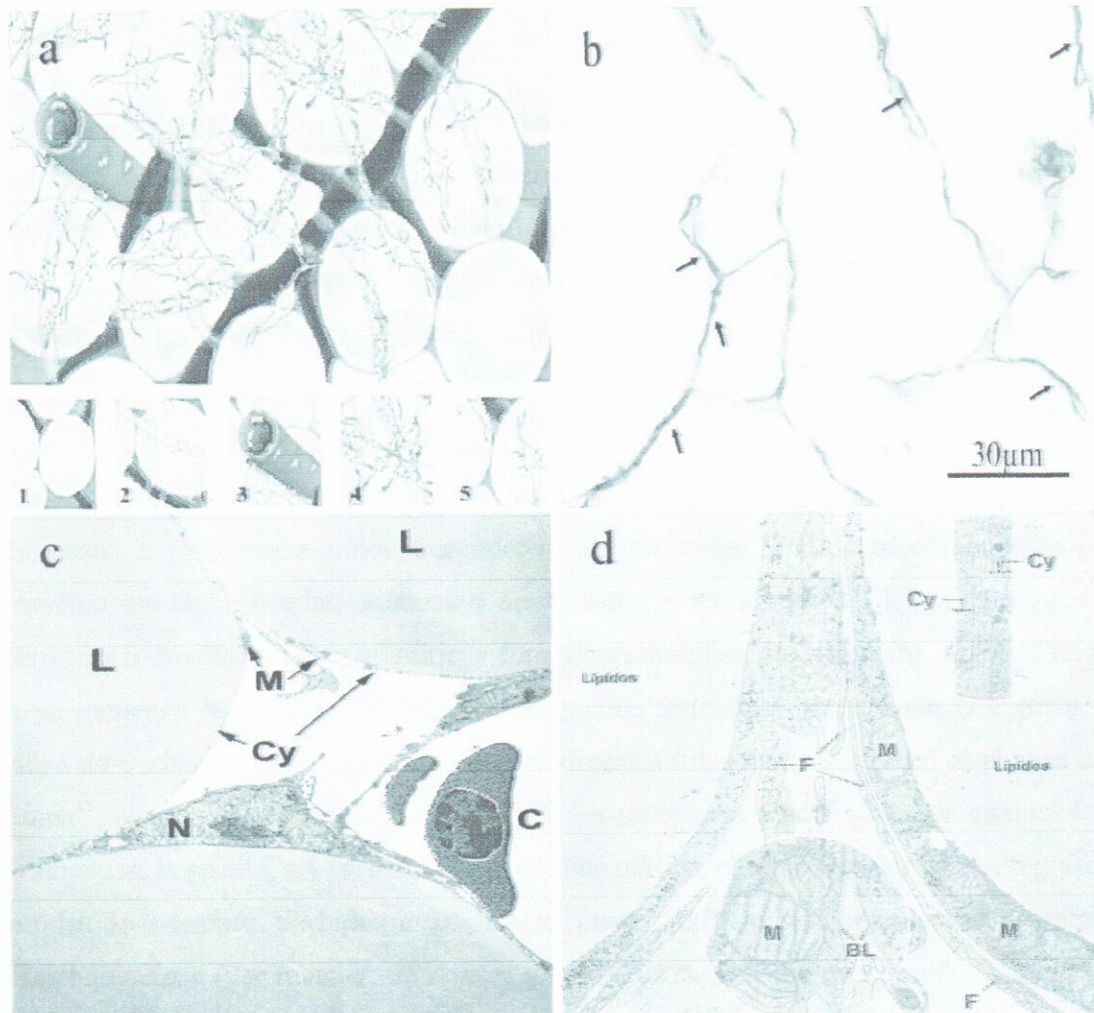


Figura 1. a) Tejido adiposo rodeado de: (1) adipocitos (2) matriz extracelular, (3) vasos sanguíneos, (4) células mesenquimales y (5) preadipocitos. b) Fotografías que ilustran marcaje de tubulina (flecha negra) en la membrana de los adipocitos de conejas controles. c) Fotografía electrónica de adipocitos en los que se observan las membranas (M), los lípidos (L), el núcleo (N) y el citoplasma (Cy) y d) Fotomicrografía electrónica en la que se observa dos adipocitos contiguos. En el citoplasma de los adipocitos hay mitocondrias (M). En el círculo superior se observa el citoplasma (Cy) delgado de dos adipocitos contiguos. En el círculo inferior, las células están separadas de manera orientada, la lamina basal externa (BL) de los adipocitos aparece como una capa individual bien definida. Modificada de Vázquez-Vela y cols. 2008

1.2.1 Adipogénesis

En humanos, la formación de tejido adiposo comienza durante el desarrollo embrionario, aproximadamente en la sexta semana de gestación. Aunque, su ontogenia varía de una especie a otra. Los adipocitos se originan de una célula mesenquimática que se diferencia primero a adipoblasto¹⁸, luego a preadipocito y finalmente a adipocito (Figura 3). Prenatalmente, las células mesenquimáticas (pluripotentes) dan origen a los adipoblastos, y éstos, a su vez, a preadipocitos. Los preadipocitos se desarrollan hasta convertirse en adipocitos maduros durante la lactancia y el resto de la vida. La transformación de preadipocitos a adipocitos se realiza en cuatro etapas: 1) Los preadipocitos disminuyen su talla y comienzan a presentar algunos marcadores de adipocitos. 2) Los preadipocitos inician nuevamente su ciclo celular, aumentan su tamaño y su número. 3) Los preadipocitos comienzan a redondearse hasta adquirir la forma característica del adipocito. Además en esta etapa ya expresan la enzima LPL. 4) Los adipocitos formados incrementan la expresión y actividad de enzimas o proteínas implicadas en diversas rutas metabólicas, tal es el caso de la perilipina¹⁹, el receptor de insulina, el GLUT4, los receptores adrenérgicos, la enzima ácido graso sintetasa, la acetil CoA carboxilasa, la enzima málica, el transportador de ácido graso, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, entre otros. Así también, comienzan a secretar diversas adipocinas (ver revisión de Avram y cols. 2007). Se sabe que la diferenciación del adipocito es regulada por hormonas tiroideas, hormona estimulante de la tiroides, glucocorticoides, insulina, hormona de crecimiento y factores de transcripción, como el receptor tipo gama activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), la proteína tipo 1 de unión al elemento regulador del esterol (SREBP-1; ver revisión de Avram y cols. 2007).

¹⁸ Ver glosario

¹⁹ Ver glosario

1.2.2 Tejido adiposo y células del sistema inmunitario

En condiciones normales, el tejido adiposo puede estar infiltrado por células polimorfonucleares (neutrófilos²⁰, basófilos²¹, eosinófilos²², linfocitos²³, monocitos²⁴ y macrófagos²⁵). Estas células llegan al tejido adiposo a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, y se alojan en la matriz extracelular. Allí, tales células cumplen diversas funciones: 1) regulan la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, 2) participan en la formación de nuevos vasos sanguíneos, 3) producen moléculas pro-inflamatorias como el factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial vascular, citocinas (TNF, IL-1, IL-6), enzimas proteolíticas y metabolitos (óxido nítrico²⁶ y prostaglandinas²⁷), 4) degradan fragmentos de tejido adiposo necrotizado, y 5) secretan moléculas anti-inflamatorias (IL-2, IL-4, IL-10; ver revisión de Suganami y Ogawa 2010).

El número de células polimorfonucleares infiltradas en el tejido adiposo puede verse aumentado en algunas patologías como la obesidad²⁸, donde hay infiltración de linfocitos T²⁹, linfocitos B³⁰, eosinófilos, células natural killer³¹ y macrófagos (Michaud y cols. 2012, McDonnell y cols. 2012, Viardot y cols. 2012). En personas obesas hay hipertrofia de los adipocitos, y una subsecuente hipoxia, que conlleva a la liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-10, IL-6, interferón-gamma-IFN- γ ³², IL-1, factor migratorio de macrófagos-MIF³³, leptina y visfatina) por los adipocitos (Sheu y cols. 2008). Estas citocinas son detectadas por las células polimorfonucleares, las cuales comienzan a expresar moléculas de adhesión que les permiten unirse al endotelio y migrar hacia el tejido adiposo (Figura 4; ver revisión de Maury y Brichard 2010).

²⁰ Ver glosario

²¹ Ver glosario

²² Ver glosario

²³ Ver glosario

²⁴ Ver glosario

²⁵ Ver glosario

²⁶ Ver glosario

²⁷ Ver glosario

²⁸ Ver glosario

²⁹ Ver glosario

³⁰ Ver glosario

³¹ Ver glosario

³² Ver glosario

³³ Ver glosario

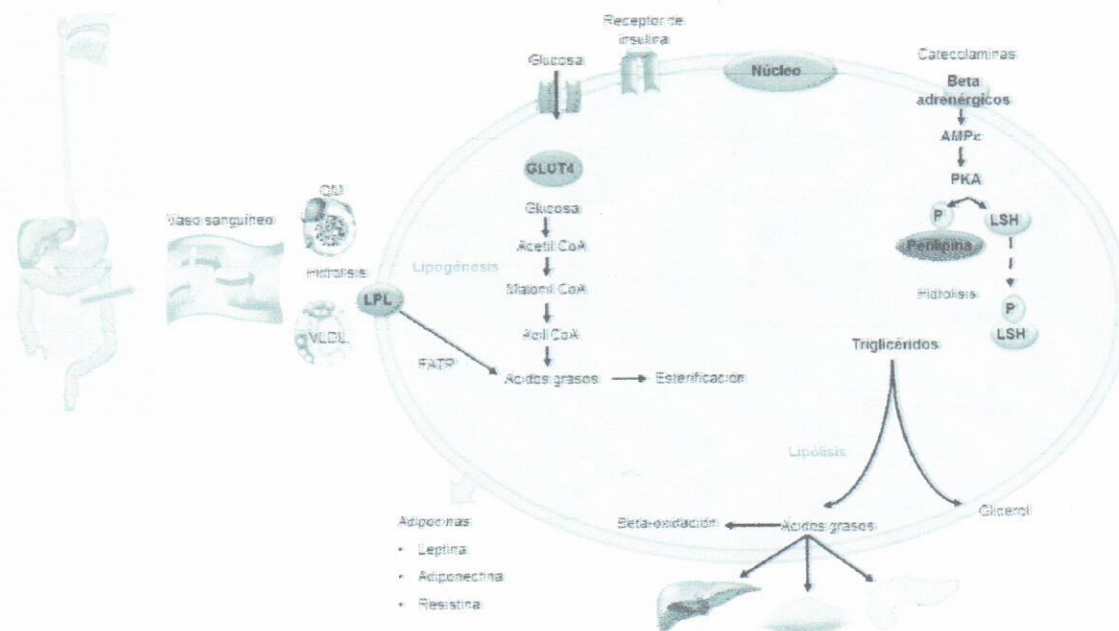


Figura 2. Estructura de un adipocito y procesos metabólicos de lipogénesis y lipólisis. Abreviaturas: QM: quilomicrones, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, LPL: lipoproteína lipasa, FATP: Proteína transportadora de ácidos grasos, LSH: lipasa sensible a hormonas, P: fosforo, PKA: proteína quinasa A, AMPc: nucleótido cíclico 3'-5' monofosfato de adenosina. Modificada de Vázquez-Vela 2008.

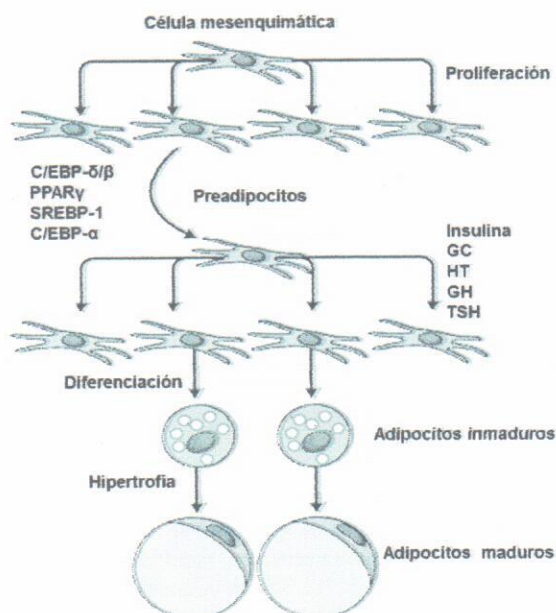


Figura 3. Adipogénesis. La célula madre mesenquimática se diferencian primero a adipoblasto, luego a preadipocitos y finalmente a adipocitos. En dichos procesos participan factores reguladores y diversas hormonas. Abreviaturas: PPAR γ : receptor tipo gama activado por proliferadores de peroxisomas, SREBP-1: proteína tipo 1 de unión al elemento regulador del esteroil, GC: glucocorticoides, HT: hormonas tiroideas, GH: hormona de crecimiento y TSH: hormona estimulante de la tiroides. Modificada de Avram 2007.

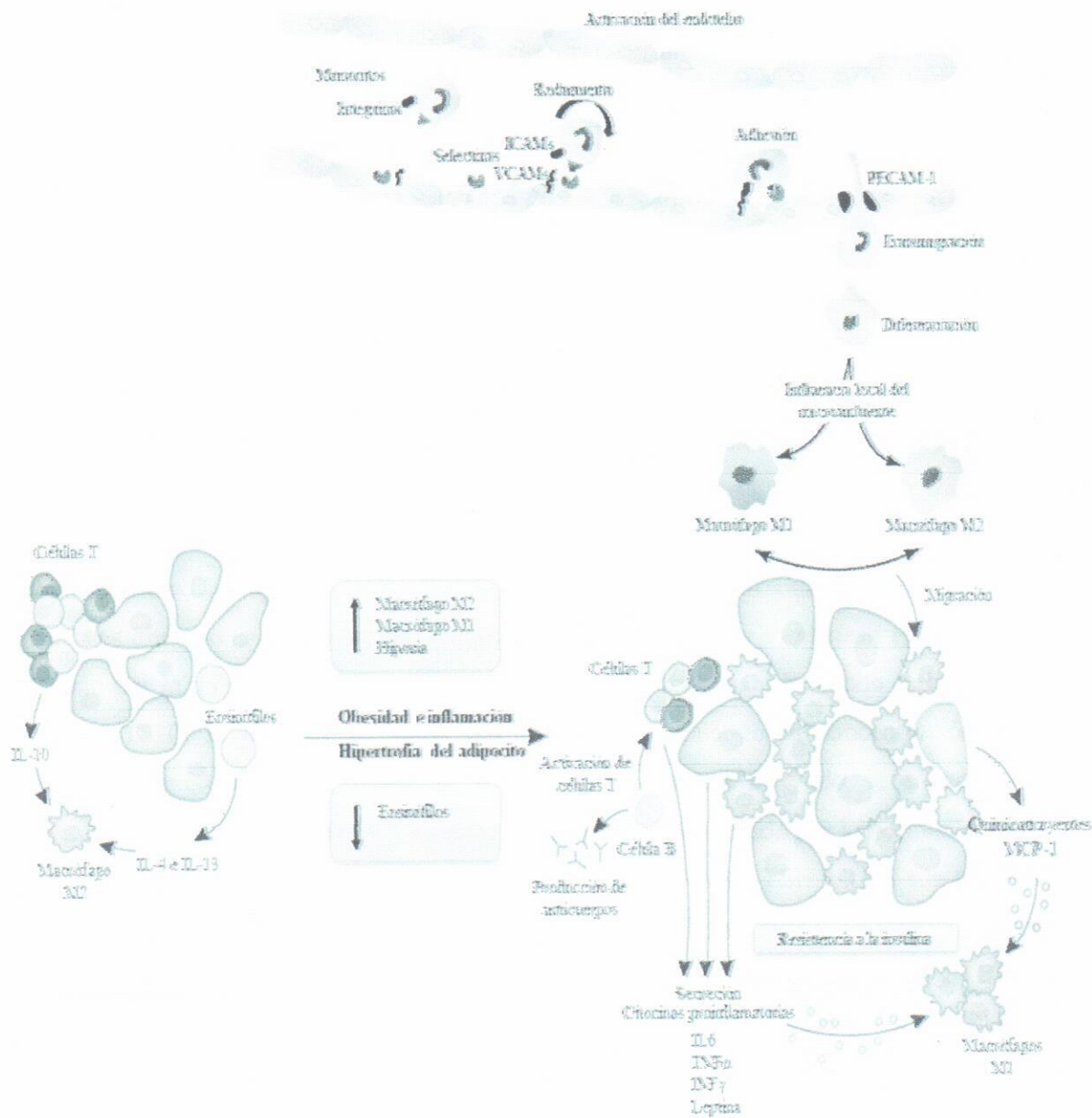


Figura 4. Mecanismo de infiltración de células polimorfonucleares al tejido adiposo en personas obesas. La infiltración de células polimorfonucleares al tejido adiposo inicia con la acumulación excesiva de lípidos que conduce a la hipertrofia de los adipocitos, hipoxia, secreción de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-10, INF- γ , IL-1), quimioatrayentes (MCP-1) y la expresión de NF-kB. Lo anterior favorece la activación del endotelio (expresión de ICAM-1 y VCAM-1) y la trans migración celular del endotelio al tejido adiposo. Ambos eventos (tejido adiposo y endotelio) crean un círculo vicioso que favorece la infiltración de células polimorfonucleares a los adipocitos. Modificad de Maury y Brichard 2010.

1.3 Hormonas tiroideas

La tiroides es una glándula endocrina situada en la región anterior del cuello. Se compone de dos lóbulos laterales conectados por un puente de tejido llamado istmo tiroideo. La tiroides está constituida por unidades esféricas estrechamente agrupadas llamadas tirocitos. Cada tirocito está rodeado por una sola capa de células foliculares y lleno de material proteico tipo coloide. El coloide está formado por una glucoproteína denominada tiroglobulina, la cual está formada por diferentes azúcares (galactosa, manosa, fructosa, N-acetil-glucosamina y ácido siálico), aminoácidos tirosina y yodo (proveniente de la dieta) (ver revisión de Deshpande y Venkatesh 1999). La síntesis de hormonas tiroideas depende de la concentración de yodo en las células foliculares, el cual se obtiene de la ingesta en la dieta. El yodo ingerido es transportado hasta las células foliculares, donde se captura, almacena y transforma en yoduro. La transformación de yodo a yoduro se lleva a cabo mediante la acción de tiroperoxidasas, lactoperoxidasas, cloroperoxidasas y mieloperoxidasas. Posteriormente, el yoduro es liberado hacia el coloide (ver revisión de Deshpande y Venkatesh 1999). La captura de yodo por la glándula tiroides está mediada por la tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH), la cual es secretada por la hipófisis. Cuando la concentración de yodo disminuye en la glándula tiroides, la TSH activa la captura de yodo, la endocitosis y la secreción de hormonas tiroideas. La secreción de TSH es controlada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH), secretada por el hipotálamo. Los niveles de TSH y TRH son regulados, a su vez, por los niveles de las hormonas tiroideas T3 (triiodotironina) y T4 (tetrayodotironina) en sangre. Los niveles bajos de hormonas tiroideas inducen la secreción de TSH y TRH, y por el contrario, los niveles elevados de hormonas tiroideas suprimen la secreción de TSH y TRH (Figura 5a; ver revisión de Bouknight 2003). El transporte de las hormonas tiroideas es a través de la sangre por proteínas plasmáticas como la albúmina, alfa globulina y transtirrenina. De manera que la mayor parte de T3 y T4 circulan en sangre en su forma unida y una pequeña proporción en su forma libre (ver revisión de Power y cols. 2000).

La desyodación es la transformación metabólica más importante de las hormonas tiroideas. Esta reacción es catalizada por enzimas denominadas desyodasas que son capaces de eliminar iones yodo de las moléculas de T3 y T4. Las desyodasas son de tres tipos: las

desyodasas tipo I y II que catalizan la pérdida de un ion yoduro en la posición 5' del anillo fenólico de la molécula de T4 formando T3. La desyodasa tipo I se expresa en hígado, tejido adiposo blanco y riñón; mientras que, la enzima tipo II se expresa en sistema nervioso central, hipófisis, tejido adiposo (blanco y pardo) y placenta. Por su parte, la desyodasa tipo III produce T3 inactiva, conocida como T3 reversa, a partir de T4 y genera diyodotirosina a partir de T3, eliminando el yodo de la posición 3 del anillo tirosil. La desyodasa tipo III se expresa en placenta, sistema nervioso central y células del sistema inmune (Figura 5b; ver revisión de Bianco y Kim 2006).

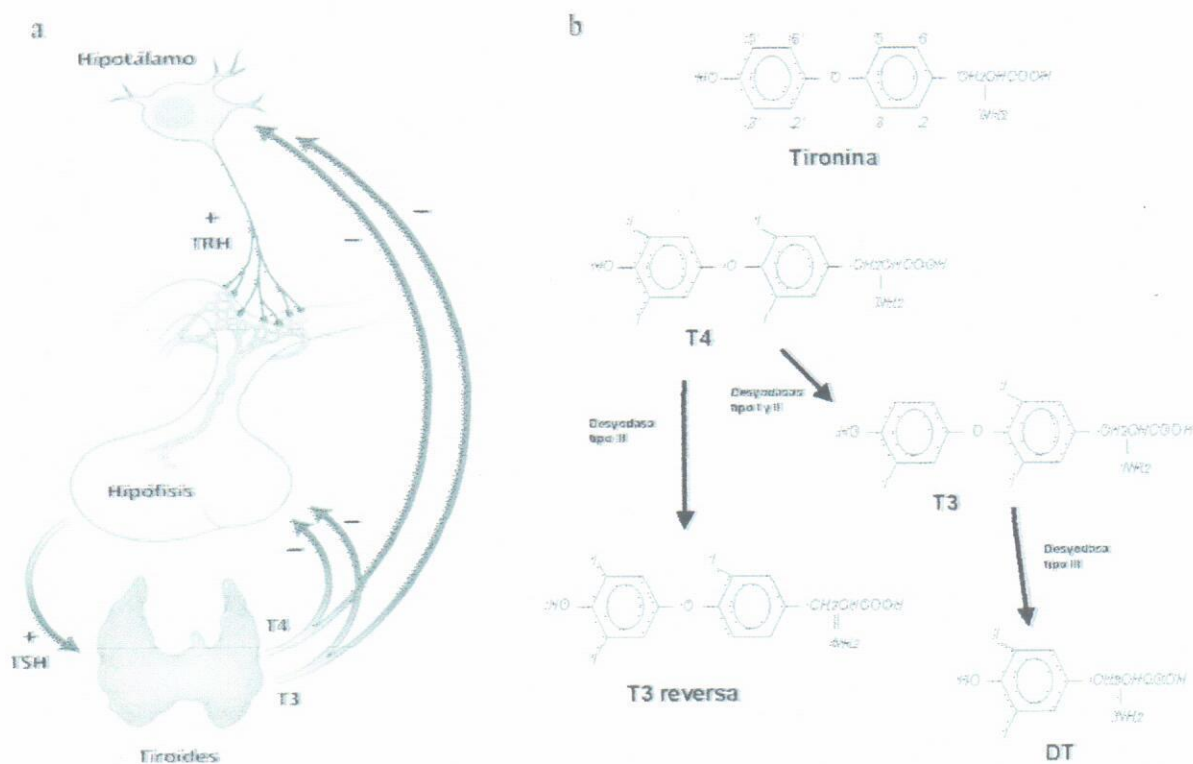


Figura 5. a) Regulación de la función tiroidea. Bajos niveles de triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4) estimulan la liberación de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), secretada por el hipotálamo, ésta a su vez, estimula a las células tirotrópicas de la hipófisis para que secreten tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH estimula a las células foliculares de la tiroides para la síntesis y liberación de T3 y T4 al torrente sanguíneo (Modificado de Bouknight 2003). b) Metabolismo de las hormonas tiroideas. La desyodación es catalizada por enzimas desyodasas (I, II y III) que eliminan iones yodo de las moléculas de T4 y T3. Las desyodasas I y II eliminan un ion yoduro en la posición 5' del anillo fenólico de la molécula de T4 produciendo T3. Por su parte, la desyodasa III produce T3 inactiva (T3 reversa) a partir de T4 y genera diyodotirosina (DT) a partir de T3, eliminando el yodo de la posición 3 del anillo tirosil (Modificado de Bianco y Kim 2006).

Las hormonas tiroideas participan en el desarrollo, crecimiento y metabolismo. Con relación al metabolismo, las hormonas tiroideas: 1) incrementan la expresión del gen que codifica para la apolipoproteína AI³⁴; 2) aumentan el número de receptores de LDL³⁵ en los hepatocitos; 3) aceleran la acción de la enzima HMG-CoA³⁶ reductasa, favoreciendo la síntesis de colesterol; y 4) participan en la diferenciación de los preadipocitos. Mientras que en el metabolismo de carbohidratos, las hormonas tiroideas regulan la expresión del GLUT4³⁷, glucosa-6 fosfatasa³⁸, piruvato carboxilasa³⁹ (Ness y cols. 1998, Rochon y cols. 2003, López y cols. 2007, Obregón 2008). Dichas acciones se llevan a cabo mediante la activación de receptores específicos que unen a hormonas tiroideas (TRs), los cuales pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares. La estructura de éstos, consta de cinco dominios (A/B, C, D, E y F) localizados entre el amino y el carboxilo terminal, y cada dominio se relaciona con una función en particular. Existen dos tipos de TRs: TR α y TR β . Del gen TR α existen diferentes isoformas incluyendo TR α 1, TR $\Delta\alpha$ 1, TR α 2, TR $\Delta\alpha$ 2 y TR α 3 mientras que del gen TR β están las isoformas TR β 1 TR β 2 TR β 3 y TR $\beta\Delta$ 3 (ver revisión de Cheng y cols. 2010). La isoforma TR α 1 se expresa en músculo esquelético y tejido adiposo blanco y los TR α 2 sólo se expresan en cerebro. La isoforma TR β 1 se encuentra en cerebro, hígado y riñón; mientras que, los TR β 2 se presentan exclusivamente en pituitaria e hipotálamo. Las hormonas tiroideas se unen a los TRs. Dicho complejo hormona-receptor, a su vez, se une a los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) presentes en algunos genes. Tal unión regula la liberación de co-represores y la unión de factores co-activadores del complejo hormona-TRs, lo que promueve la acetilación de las histonas y la transcripción del gen en cuestión (ver revisión de Cheng y cols. 2010). Las hormonas tiroideas también actúan sobre receptores localizados en membrana plasmática, citoplasma y mitocondrias. La hormona se une al receptor y promueve cascadas de señalización, que finalizan en la modulación de iones sodio, calcio, potasio, transporte de glucosa y regulación del metabolismo de fosfolípidos, entre otras funciones (ver revisión de Davis y cols. 2008).

³⁴ Ver glosario

³⁵ Ver glosario

³⁶ Ver glosario

³⁷ Ver glosario

³⁸ Ver glosario

³⁹ Ver glosario

1.3.1 Alteraciones de la función tiroidea en humanos

Existen diversas patologías asociadas a la alteración en la síntesis de T3 y T4. El exceso de ellas se conoce como hipertiroidismo y el déficit se denomina hipotiroidismo.

Hipertiroidismo. Se caracteriza por el aumento en la síntesis y liberación de hormonas tiroideas y por una disminución de los niveles de TSH (hipertiroidismo clínico). Éste puede ser debido a diversas causas, la más común, la enfermedad de Graves (enfermedad autoinmune causada por anticuerpos que se dirigen contra el receptor de TSH) provocando así una mayor formación de T3 y T4. Sin embargo, existe otra patología tiroidea conocida como hipertiroidismo subclínico que se caracteriza por una concentración baja de TSH con niveles normales de T3 y T4 (Biondi y cols. 2005).

Hipotiroidismo. Se caracteriza por concentraciones bajas de hormonas tiroideas y una elevación en los niveles TSH. Se conocen tres probables causas: 1) hipotiroidismo primario (pérdida o atrofia del tejido tiroideo); 2) hipotiroidismo secundario (disminución de la estimulación de la glándula por un defecto en la secreción de TSH) y 3) hipotiroidismo terciario (defecto en la secreción hipotalámica de la TRH; ver revisión de Kostoglou-Athanassiou y Ntalles 2010). El hipotiroidismo es más frecuente en mujeres que en hombres (ver revisión de Little 2006). Esto debido a que las mujeres presentan variaciones en las concentraciones de estrógenos durante toda su vida. Lo que la hacen más susceptible a modificaciones en su respuesta inmunológica. Así mismo, la edad es un factor importante ya que en el envejecimiento, la glándula tiroidea presenta cambios anatómicos y fisiológicos como disminución en su peso, en el almacenamiento de yodo y la síntesis de hormonas, reflejando una alteración en los niveles de hormonas tiroideas y TSH en sangre. Mientras que, la presencia de los anticuerpos anti-tiroglobulina, anti-tiroperoxidasa o anti-TSH es originada por la infiltración de linfocitos en la glándula tiroidea como respuesta a una reacción inflamatoria y/o por infecciones virales o bacterianas (ver revisión de Little 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 Hormonas tiroideas y niveles de lípidos en sangre

Las hormonas tiroideas regulan diversos genes relacionados con el metabolismo de lípidos, tal es el caso de los receptores LDL, la Apo AI, la lipasa hepática, los receptores adrenérgicos, la Acetil CoA, el péptido natriurético A, la enzima colesterol 7 alfa-hidrolasa. Por lo anterior, pacientes con hipotiroidismo clínico presentan niveles altos de colesterol, triglicéridos y LDL, y bajos niveles de HDL (Park y cols. 2009, Ambrosi y cols. 2010). Dichas alteraciones en el metabolismo de lípidos también han sido observadas en pacientes con hipotiroidismo subclínico (Teixeira y cols. 2008, Baldini y cols. 2009, Díaz-Olmos y cols. 2010, Tagami y cols. 2010, Lu y cols. 2011), lo que sugiere que pequeñas variaciones en los niveles de hormonas tiroideas son suficientes para que se afecte el metabolismo lipídico.

Modelos animales con hipotiroidismo clínico, inducido mediante la extracción de la glándula tiroidea (tiroidectomía), o bien, por la administración de fármacos como el metimazol y el propiltiouracilo, muestran alteraciones en el metabolismo de lípidos. En ratas y conejos machos, el hipotiroidismo aumenta los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos, LDL y VLDL, mientras que disminuye HDL (Dariyerli y cols. 2003, Chen y cols. 2004, Messarah y cols. 2010).

2.2 Hormonas tiroideas e histología del tejido adiposo

En humanos, la deficiencia de hormonas tiroideas induce acumulación de tejido adiposo blanco (obesidad), por lo que el hipotiroidismo favorece el aumento de peso. Aunque, no todas las personas obesas muestran alteraciones en los niveles de hormonas tiroideas, existen diversos reportes que muestran una correlación positiva entre los niveles de TSH y el índice de masa corporal (IMC) en personas obesas (Lu y cols. 2011). También en animales, el hipotiroidismo incrementa el peso corporal (Chen y cols. 2004). Este aumento en el peso corporal se ha relacionado con un aumento en la cantidad de tejido adiposo visceral.

En humanos, biopsias de tejido adiposo de pacientes con hipotiroidismo muestran una menor expresión de receptores beta-adrenérgicos (Wahrenberg y cols. 1986, Richelsen y Sørensen 1987), que como vimos anteriormente, participan en la lipólisis (Richelsen y Sørensen 1987). En ratas con hipotiroidismo farmacológico hay una mayor expresión de lipoproteína lipasa (PLP), lo que favorece la acumulación de triglicéridos en los adipocitos y el aumento en el tamaño de los mismos (Hansson y cols. 1983, Ibrahim y cols. 1984). Además, el hipotiroidismo reduce la expresión de receptores beta-adrenérgicos, lo que a su vez, conlleva a una menor expresión de la LSH (Germack y cols. 2000), y a un aumento en el tamaño de los adipocitos (Elgadi y cols. 2010).

2.3 Hormonas tiroideas y sistema inmunitario

Estudios en humanos y modelos animales sugieren que existe una relación recíproca directa entre las hormonas tiroideas y el sistema inmunológico (De Vito y cols. 2011). Se ha reportado que durante infecciones o después de una cirugía, los niveles plasmáticos de T3 se reducen; mientras que, los niveles de T4 y TSH se mantienen normales. Este fenómeno se conoce como síndrome eutiroideo (Boelen y cols. 2011). Así se ha reportado que pacientes con hipotiroidismo tiene mayor susceptibilidad a infecciones en piel, uñas y faringe provocadas por *Cándida albicans* (Coleman y Hay 1997), también presentan alta prevalencia de *Helicobacter pylori* lo que provoca gastritis y úlceras pépticas (Bugdaci y cols. 2011). Otros datos que apoyan la relación entre las hormonas tiroideas y las células del sistema inmunológico son: la confirmación de que dichas células tienen receptores de hormonas tiroideas (Brisson-Lougarre y Blum 1985) y el reporte de que estas células presentan desyodasas tipo III, es decir, pueden degradar a la T2, y producir diyodotirosina o T3 reversa (Boelen y cols. 2008).

Así mismo se ha reportado la infiltración de células polimorfonucleares en otros tejidos, tal es el caso de la tiroides (Buchanan y Lee 2001), el tracto reproductivo (ver revisión de Horne y cols. 2008), el páncreas (Ehres y cols. 2007), el hígado (Kawanishi y cols. 2012) y el riñón (Bonita y cols. 2003) a causa de infecciones. Sin embargo, se desconoce si el hipotiroidismo afecta la infiltración de células polimorfonucleares en el tejido adiposo.

3. JUSTIFICACIÓN

- En humanos, el hipotiroidismo clínico o subclínico incrementa los niveles de colesterol, triglicéridos y LDL (Baldini y cols. 2009, Tagami y cols. 2010). En animales se ha reportado algo similar a los humanos (Dariyerli y cols. 2003, Chen y cols. 2004).
- En humanos, el hipotiroidismo clínico (Ambrosi y cols. 2010) o subclínico (Lu y cols. 2011) induce obesidad. Efectos similares han sido observados en ratones machos hipotiroideos (Elgadi y cols. 2010), donde el tamaño del adipocito es mayor.
- Existe una relación entre las hormonas tiroideas y el sistema inmunológico (De Vito y cols. 2011). Se ha reportado que en casos de infecciones o cirugías se observa un hipotiroidismo transitorio (síndrome eutiroideo; De Vito y cols. 2011).
- Las células polimorfonucleares tienen receptores de hormonas tiroideas (Brisson-Lougarre y Blum 1985) y presentan desyodasas tipo III (Boelen y cols. 2008).
- El hipotiroidismo induce la infiltración de células polimorfonucleares en otros tejidos, tal es el caso de la tiroides y el oviducto (Buchanan y Lee 2001, Horne y cols. 2008). Sin embargo, se desconoce si el hipotiroidismo induce la infiltración de células polimorfonucleares al tejido adiposo.
- Dado que los estudios que analizan el efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo se han realizado en machos. Es importante realizar estudios utilizando hembras ya que se ha reportado que el metabolismo es diferente entre hombres y mujeres. Estas últimas tienen estrógenos que regulan genes relacionados con metabolismo (Faulds y cols. 2011). Por lo cual el presente estudio es importante ya que a través de este podrían explicarse las diferencias metabólicas observadas entre hombres y mujeres, y con ello mejorar los tratamientos farmacológicos para las diferentes enfermedades metabólicas.
- Así mismo no hay estudios que analicen el papel que juegan las hormonas tiroideas sobre la infiltración de células polimorfonucleares al tejido adiposo. Dicho estudio abre la posibilidad para estudiar con mayor detalle la relación entre hipotiroidismo y células polimorfonucleares en el tejido adiposo.

4. HIPÓTESIS

En la coneja adulta, el hipotiroidismo altera los niveles de lípidos en sangre y modifica las características histológicas de los adipocitos viscerales.

Predicciones:

En comparación con las conejas controles, las conejas hipotiroideas tendrán:

- Menores niveles de hormonas tiroideas, mayores niveles de TSH y mayor área de tirocitos.
- Mayor concentración de lípidos sanguíneos.
- Mayor peso corporal.
- Mayor área de la vesícula de triglicéridos en los adipocitos.
- Mayor número de células polimorfonucleares infiltradas en los adipocitos.
- Menor número de macrófagos anti-inflamatorios (CD163) y mayor número de pro-inflamatorios (CD68).
- Mayor concentración de leptina.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del hipotiroidismo sobre los niveles de lípidos en sangre y las características histológicas del tejido adiposo blanco en la coneja adulta.

5.2 Objetivos específicos

- Inducir el hipotiroidismo en las conejas.
- Medir los niveles de lípidos en sangre.
- Determinar el peso corporal.
- Determinar el tamaño de la vesícula de triglicéridos en adipocitos viscerales.
- Cuantificar el número de células polimorfonucleares infiltradas en los adipocitos.
- Cuantificar los macrófagos pro y anti-inflamatorios infiltrados en los adipocitos.
- Medir los niveles de leptina.

6. METODOLOGÍA

6.1 Sujetos de estudio

Se utilizaron conejas jóvenes de la raza Chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*) de 7-13 meses de edad, alojadas en jaulas de acero inoxidable de 50 x 60 x 40. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Durante el desarrollo de los experimentos, las conejas permanecieron en condiciones controladas, ciclo luz/oscuridad (16/8 h), temperatura de (22 ± 2 °C), mantenidas con alimento purina con acceso controlado (160 g diarios) y agua *ad libitum*.

6.2 Grupos experimentales

Para el proyecto, las conejas se dividieron en dos grupos: las controles (sin tratamiento; n=7) y las hipotiroideas (n=7). El grupo de las hipotiroideas se trató con un bociógeno (que más adelante se explicará) para reducir los niveles de hormonas tiroideas. Al finalizar el tratamiento se retiró el alimento a los animales 12 horas antes de la cirugía. Los animales de ambos grupos fueron pesados en una balanza y el peso se reporta en kilogramos. Tanto, conejas controles como hipotiroideas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico aplicado vía intraperitoneal. Posteriormente, se procedió a la extracción de sangre y tejidos (ver más adelante).

6.3 Inducción de hipotiroidismo

La inducción de hipotiroidismo se llevó a cabo con el fármaco anti-tiroideo Metimazol⁴⁰, el cual fue administrado a través del agua que consumen las conejas. La concentración fue de 0.02% (Al-jama 2004) durante treinta días. Para comprobar que las conejas tuvieran hipotiroidismo, se midió la concentración de T3 total, T4 total y TSH en sangre. Para ello se extrajo sangre por punción cardiaca. Esta se dejó reposar durante 45 min,

⁴⁰ Ver glosario

después se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min. El suero fue separado y congelado a una temperatura de 20°C bajo cero, posteriormente se descongelaron 50 µl de suero y las mediciones se realizaron por duplicado. Para la medición de T3 total, T4 total y leptina, las muestras fueron enviadas a los laboratorios CARPERMOR donde se analizaron mediante técnicas de quimioluminiscencia⁴¹ con un analizador de Architect de Abbott laboratorios. Mientras, para la medición de TSH las muestras de suero fueron medidas por la técnica de ELISA⁴², utilizando un kit de TSH Streptavidin Coated Plate (Cayman chemical). También, evaluamos la efectividad del tratamiento a través de la medición del tamaño de los tirocitos, para ello se extrajo la glándula tiroides que se pesó en fresco y se introdujo en solución salina, posteriormente, se cubrió con fijador de Bouin durante 24 h. El tejido fue deshidratado utilizando una serie de alcoholes de graduación ascendente, aclarado con xileno, e introducido en parafina líquida (50-55 °C). Posteriormente, la tiroides fue colocada en un recipiente rectangular con parafina que fue dejada secar a temperatura ambiente. Después se cortó la tiroides con un micrótopo a 7 micrómetros. Los cortes de tiroides fueron teñidos con la tinción tricrómica de Masson. Una vez teñidos, los cortes se colocaron en un microscopio y con el objetivo de 40x, a través de una cámara digital profesional, se tomaron fotografías (diez campos por laminilla). Las imágenes fueron introducidas al programa Axio Vision 4.3 para la medición del área de los tirocitos. El criterio fue medir las células que se encontraron dentro de los ocho cuadros centrales de la cuadrícula. Para ello se utilizó una cuadrícula de 24 cuadros (4.5 x 5 cm; Figura 6a).

6.4 Medición de parámetros metabólicos

Los parámetros metabólicos medidos en suero fueron colesterol, triglicéridos y HDL por espectrofotometría. Las muestras se analizaron a través de un espectrofotómetro y se realizó por duplicado. Las determinaciones de triglicéridos se realizaron con el método enzimático glicerol oxidasa-cinasa, colesterol con el método enzimático colesterol oxidasa-esterasa, HDL mediante un método precipitante, que está diseñado para uso conjuntamente

⁴¹ Ver glosario

⁴² Ver glosario

con el método descrito anteriormente de colesterol. Una vez conociendo la concentración de triglicéridos totales (TGT) (que circulan mayoritariamente en las VLDL) se pudo estimar el colesterol asociado a las VLDL (C_{VLDL}) según la fórmula: $[C_{VLDL}] = 0.2 \times [TGT]$ con lo cual el colesterol asociado a LDL se calculó a través de la fórmula de Friedewald la cual es: $[C_{LDL}] = [C_{TOTAL}] - [C_{HDL}] - [C_{VLDL}]$.

6.5 Análisis histológico de los adipocitos

Después de sacrificar los animales y extraer la sangre inmediatamente se extrajo tejido adiposo de la región pélvica (la parte más rostral del útero) y se trató por métodos histológicos convencionales. Los cortes de tejido adiposo fueron teñidos con tinción hematoxilina eosina. Una vez teñidos, los cortes fueron colocados en un microscopio con el objetivo de 40x y 100x, fotografiados con una cámara digital profesional (diez campos por laminilla). Las imágenes fueron introducidas al programa Axio Vision 4.3 para la medición del área de los adipocitos. Se utilizó una cuadrícula de 24 cuadros (4.5 x 5 cm), de los cuales se midieron los adipocitos de los ocho cuadros centrales (Figura 6b). Así mismo, se cuantificó el número de células polimorfonucleares infiltradas en los adipocitos a las cuales se les midió en área.

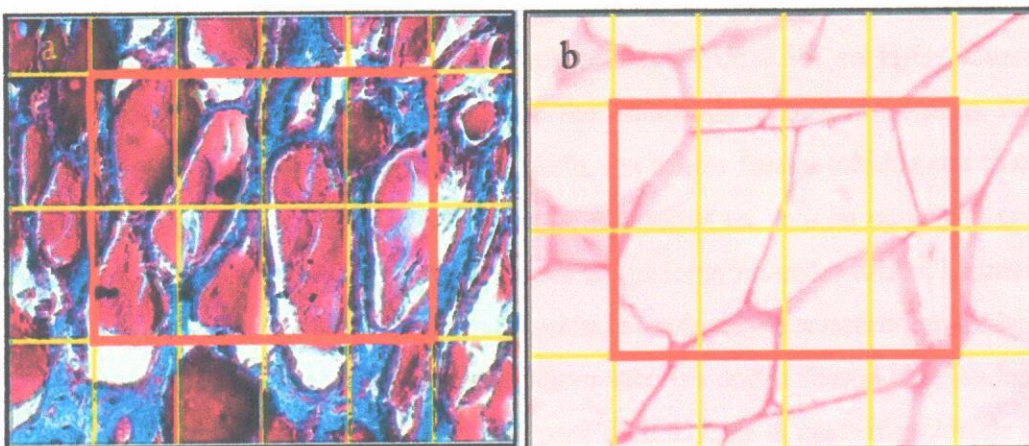


Figura 6. Medición del área de tirocitos (a) y adipocitos (b).

6.6 Inmunodetección de macrófagos en cortes de tejido adiposo

Los cortes de tejido adiposo fueron desparafinados en xilol y alcoholes de graduación ascendente, después se incubaron en una solución de citrato de sodio (10 mM, pH 6) durante 3 noches a 4°C. Al cuarto día, los cortes se colocaron en un microondas durante 2 minutos y 10 minutos (Potencia 10) para exponer los antígenos. Inmediatamente los cortes fueron lavados con PBS y se incubaron en una solución de H₂O₂ al 3% durante 30 minutos. Después se realizaron lavados en PBS. Enseguida, los cortes fueron incubados en solución de bloqueo (suero de burro y suero de cabra) al 5% durante 1 hora (el suero usado en la solución de bloqueo dependió del animal del que provenía el segundo anticuerpo). Los cortes se lavaron con solución de PBS-tritón y se incubaron con los anticuerpos primarios (CD163 para macrófagos anti-inflamatorios y CD68 para macrófagos pro-inflamatorios) diluidos a una concentración de 1:200 durante 3 noches a 4°C. Cabe mencionar que el CD68 es un marcador de actividad fagocítica y que la presencia de CD68 positivo se ubica en adipocitos maduros (Canello y cols. 2005). Mientras que el CD163 es un marcador de macrófagos maduros anti-inflamatorios (Axelsson y cols. 2006). Pasado el tiempo, los cortes se lavaron con PBS-tritón y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado (donkey anti-goat IgG-B y goat anti-mouse IgG-B; Santa cruz) diluido a una concentración de 1:250. Los cortes se lavaron con PBS- tritón y PBS. Se incubaron durante 1 hora con el complejo abidina biotina (ABC; 1:200). Por último, la peroxidasa se reveló usando el cromógeno diaminobencidina (DAB) a una concentración de 0.3% en H₂O₂. Cuando las células adquirieron un color café, la reacción fue finalizada mediante lavados de PBS. Posteriormente, se eligieron dos cortes por laminilla, los cuales fueron teñidos con tinción de Mayer durante cinco minutos, pasado este tiempo, los cortes se lavaron con agua corriente hasta que las células no positivas a los anticuerpos adquirieron un color azul. Finalmente los cortes se deshidrataron en alcoholes de concentración ascendente, se aclararon con xileno y se montaron con cyto seal 60. Cuando el cyto seal estuvo seco los cortes fueron observados en un microscopio (Zeiss) y fotografiados con una cámara digital. Para la cuantificación de células anti-inflamatorias (CD163) y pro-inflamatorias (CD68) se fotografiaron diez campos por

laminilla (100x). Cada campo con un área de 7819 μm^2 . Posteriormente las imágenes fueron introducidas al programa Axio Vision 4.3 donde se marcaron las células positivas y negativas.

6.7 Análisis estadístico

Los valores de hormonas tiroideas, de TSH, áreas de adipocitos, número de células polimorfonucleares, número de macrófagos y niveles de lípidos sanguíneos fueron analizados mediante pruebas de U de Mann-Whitney y t-Student según fue el caso. La distribución de frecuencias de áreas de tirocitos y adipocitos se analizó por medio de χ^2 . Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como significancia estadística. Los valores son mostrados como medias \pm error estándar (EE), o porcentaje en el caso de los histogramas.

7. RESULTADOS

7.1 Inducción de hipotiroidismo

Para el establecimiento de inducción de hipotiroidismo, las 14 conejas se dividieron en dos grupos: control (n=7) y tratadas (n=7). En la medición de hormonas, se encontró que en comparación con las conejas controles, las conejas tratadas con el fármaco metimazol tuvieron menores niveles de T3 total y T4 total; mientras que, los niveles de TSH fueron significativamente mayores (Tabla 1). Así mismo, se muestran el rango mínimo y máximo de cada hormona. Con respecto al peso de la glándula tiroides y la medición del área de los tirocitos, se obtuvo que en las conejas controles el peso promedio de la glándula tiroides fresca fue de 0.11 ± 0.003 g y en las conejas tratadas de 0.25 ± 0.02 g. Es decir el peso de las conejas hipotiroideas fue el doble en comparación con las conejas controles.

En el análisis histológico, los tirocitos de las conejas controles se caracterizaron por ser pequeños, alargados y el coloide fue abundante (Figura 7a y 7b); mientras que en las conejas con hipotiroidismo presentaron un mayor tamaño, de forma ovalada y con escaso coloide (Figura 7c y 7d). Sin embargo, para el área de los tirocitos no se encontraron diferencias significativas entre las conejas controles y las hipotiroideas (3535.7 ± 1142.6 vs. 5002.9 ± 929.6 ; Figura 8a). Pero en la distribución de frecuencias de rangos de áreas se encontró que las conejas hipotiroideas tuvieron mayor porcentaje de tirocitos en los rangos entre $2000-3999 \mu\text{m}^2$, $8000-9999 \mu\text{m}^2$ y rangos superiores a $10000 \mu\text{m}^2$, en comparación con las conejas controles (Figura 8b).

Hormona	Controles (n=7)	Tratadas con MMI (n=7)	Rango mínimo y máximo
T3 total (pg/dl)	8.1 ± 0.5	$5.8 \pm 0.4^{**}$	4.6 – 7.6
T4 total ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	2.2 ± 0.1	$1.5 \pm 0.1^{**}$	1.1 – 2.0
TSH ($\mu\text{UI}/\text{dl}$)	1.1 ± 0.2	$3.2 \pm 0.9^*$	1.0 – 7.6

Tabla 1. Niveles promedio \pm EE de hormonas tiroideas y TSH en conejas controles y tratadas con metimazol. Los valores fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

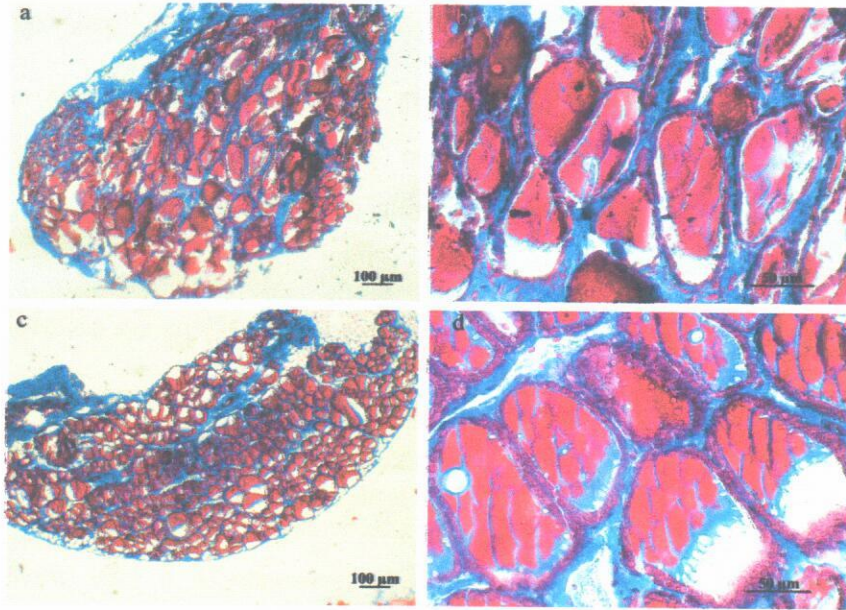


Figura 7. Fotografías de cortes de glándula tiroides teñidos con tricrómica de Masson de conejas control (a y b) e hipotiroideas (c y d).

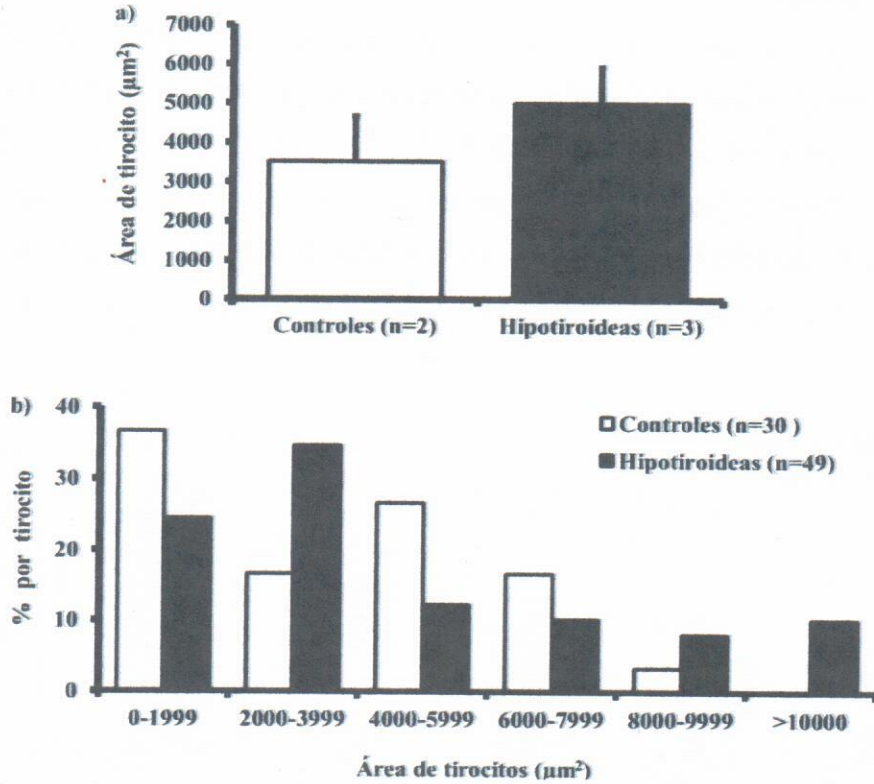


Figura 8. a) Área promedio \pm EE y b) porcentaje de distribución por rangos del área de los tirocitos en conejas controles e hipotiroideas. Nota: Los datos no pudieron ser analizados estadísticamente.

7.2 Perfil lipídico

En las conejas hipotiroideas, los niveles de colesterol total, HDL y LDL fueron significativamente mayores que en las conejas control. Mientras que, los niveles de triglicéridos y VLDL fueron similares en ambos grupos (Figura 9).

7.3 Histología de adipocitos viscerales

Peso corporal. El peso corporal de los animales fue similar entre las conejas control e hipotiroideas (4.2 ± 0.1 Kg y 4.1 ± 0.1 Kg, respectivamente).

Área de la vesícula de triglicéridos en adipocitos. El tejido adiposo de las conejas controles (Figura 10a) e hipotiroideas (Figura 10c) mostró un aspecto reticulado. Los adipocitos del grupo control (Figura 10b) se mostraron delimitados, a diferencia de los adipocitos del grupo hipotiroideo, en el cual se observaron deformes y en algunos adipocitos se apreció la infiltración de células polimorfonucleares (Figura 10d). Al medir el área de la vesícula de triglicéridos de los adipocitos, se encontró que las vesículas fueron significativamente más grandes en las conejas hipotiroideas en comparación con las controles (5007.9 ± 574.2 vs. 3195.9 ± 388.9 ; Figura 11a). Esto se corroboró al realizar y comparar los porcentajes por rango de área en donde se encontró que las conejas hipotiroideas tuvieron significativamente mayor porcentaje de adipocitos en los rangos de $2000-3999 \mu\text{m}^2$ y de $6000 \mu\text{m}^2$ a más de $10000 \mu\text{m}^2$ en comparación con las conejas controles (Figura 11b).

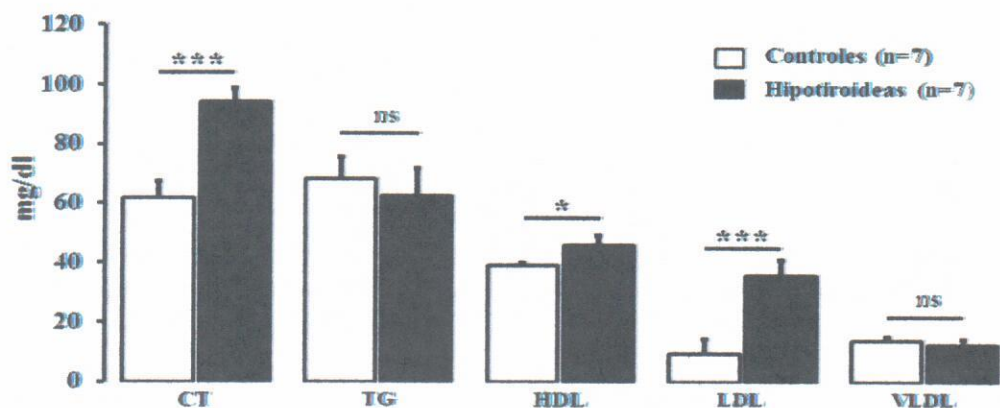


Figura 9. Perfil de lípidos en conejas controles e hipotiroideas. Los datos están expresados como media \pm error estándar y fueron analizados con la prueba t de Student * $p < 0.05$ y *** $p < 0.0001$, ns, no significativo.

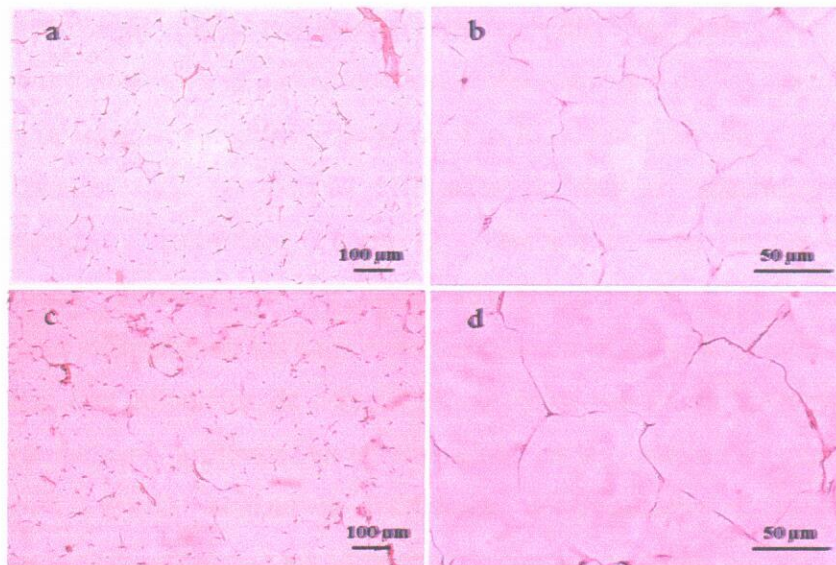


Figura 10. Fotografías representativas de cortes de tejido adiposo teñidos con hematoxilina-eosina provenientes de coneja control (a y b) e hipotiroidea (c y d).

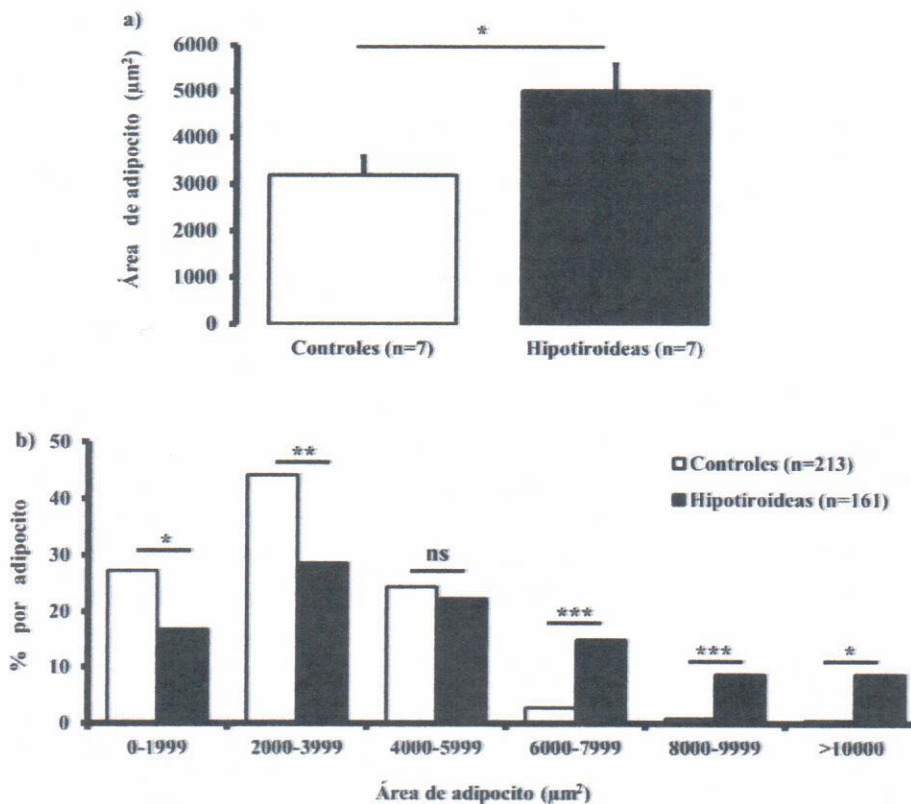


Figura 11. a) Área promedio \pm EE y b) porcentaje de distribución por rangos de área de la vesícula de triglicéridos en los adipocitos de conejas controles e hipotiroideas. El área fue comparada con la prueba t-Student, mientras que los porcentajes con chi cuadrada. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$, ns, no significativo.

Cuantificación de células polimorfonucleares infiltradas. Referente a la infiltración de células polimorfonucleares en los adipocitos, se encontró que dichas células presentaron diversas formas (alargadas, redondas y amorfas). Por lo que se procedió a identificar el tipo celular, encontrándose que las células infiltradas podrían ser macrófagos, leucocitos, linfocitos, mastocitos y neutrófilos (Figura 12). También se observó que dichas células formaban “coronas” alrededor de los adipocitos (Figura 13). El número de células polimorfonucleares infiltradas en los adipocitos fue contado en aquellas células a las cuales se les midió el área. Los adipocitos de conejas hipotiroideas mostraron un mayor número de células polimorfonucleares infiltradas en comparación con las conejas controles (3.2 ± 0.4 vs 1.6 ± 0.1 ; Figura 14a). Al realizar la distribución de frecuencias de rangos de células polimorfonucleares se encontró que los adipocitos de conejas controles tuvieron de 0-1 células polimorfonucleares. Mientras que, los adipocitos de conejas hipotiroideas tuvieron significativamente mayor número de células polimorfonucleares a partir del rango de 2-3 y más de 4 (Figura 14b). Al correlacionar el área de la vesícula de triglicéridos de adipocitos de conejas controles ($r=0.21$, $p<0.0017$) e hipotiroideas ($r=0.36$, $p<0.0001$) con el número de células polimorfonucleares se encontró una correlación positiva, es decir, a mayor área mayor número de células polimorfonucleares.

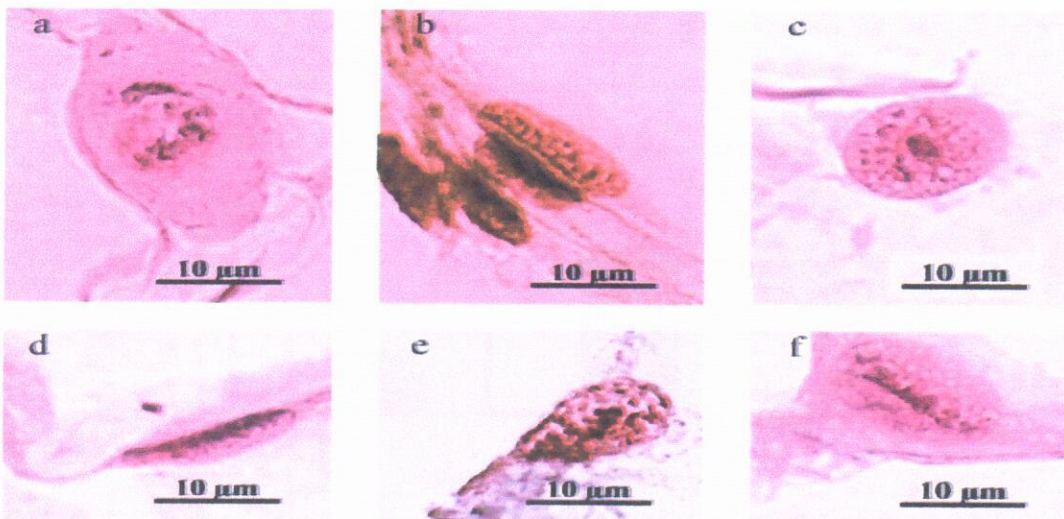


Figura 12. Células polimorfonucleares infiltradas en los adipocitos. a) Macrófago, b) leucocito, c) linfocito, d) leucocito, e) mastocito y f) neutrófilo.

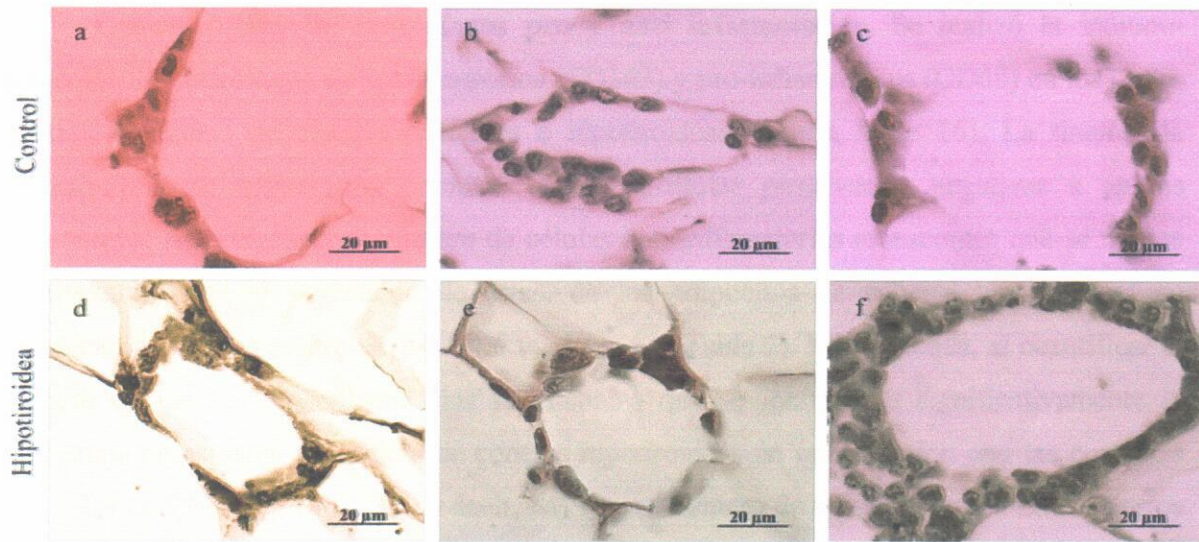


Figura 13. Fotografías de adipocitos teñidos con hematoxilina/eosina de conejas controles (adipocitos controles a, b y c) e hipotiroideas (adipocitos hipotiroideos d, e y f) en los cuales se observa que las células polimorfonucleares forman coronas alrededor de ellos.

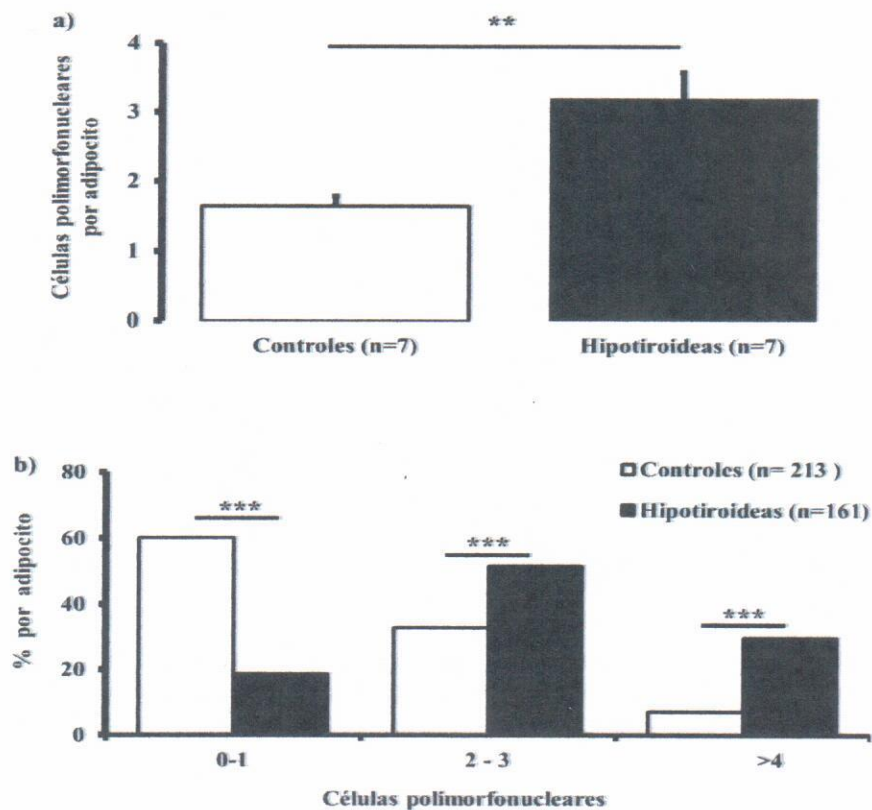


Figura 14. a) Número de células polimorfonucleares promedio \pm EE y b) porcentaje de distribución por rangos de número de células polimorfonucleares por adipocito de conejas controles e hipotiroideas. El promedio fue comparado con la prueba t-Student, mientras que los porcentajes con chi cuadrada. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$.

Cuantificación de macrófagos pro y anti inflamatorios. Se realizó la inmunodetección de macrófagos anti-inflamatorios (CD163) y pro-inflamatorios (CD68) en los cortes de tejido adiposo de conejas controles e hipotiroideas (Figura 15 y 16). La tinción de hematoxilina de Mayer nos permitió observar células positivas y negativas a ambos anticuerpos. Al cuantificar el número de células anti-inflamatorias se encontró que se reduce significativamente el porcentaje de estas, en los adipocitos de conejas hipotiroideas en comparación con las controles (44 ± 4.6 vs. 57 ± 4.7 ; Tabla 2). Mientras que, al cuantificar el número de células pro-inflamatorias se encontró que se incrementa significativamente el porcentaje de estas en adipocitos de conejas hipotiroideas en comparación con las controles (51 ± 3.4 vs. 29 ± 2.7 ; Tabla 2). Es decir, hay mayor número de macrófagos pro-inflamatorios y un menor número de anti-inflamatorios en adipocitos de conejas hipotiroideas.

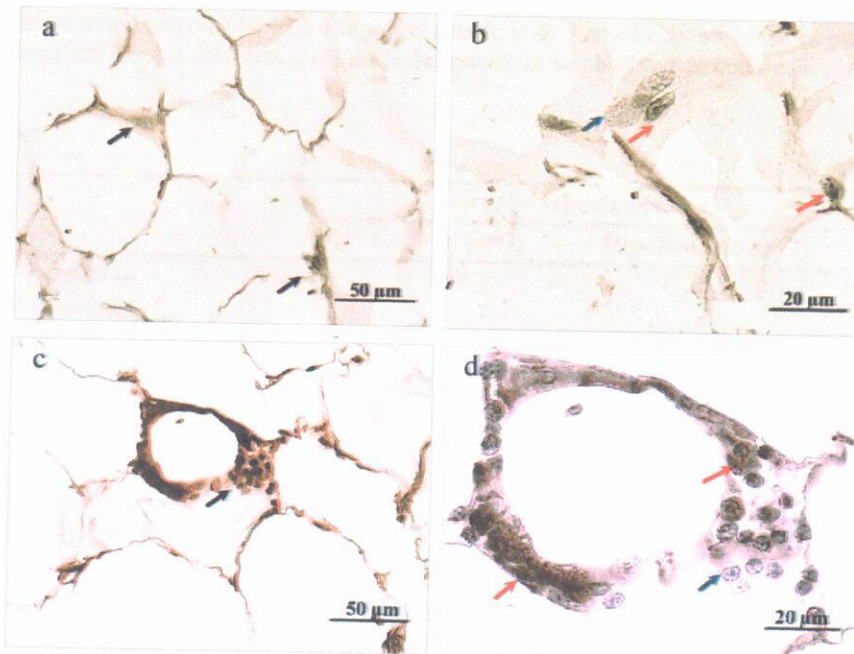


Figura 15. Fotografías que ilustran el marcaje de macrófagos anti-inflamatorios con el anticuerpo anti-CD163 en tejido adiposo de conejas controles (a y b) y conejas hipotiroideas (c y d). Los células positivas se pueden observar en color café oscuro (flecha roja), mientras que los células negativas se observan de color café claro (flecha azul).

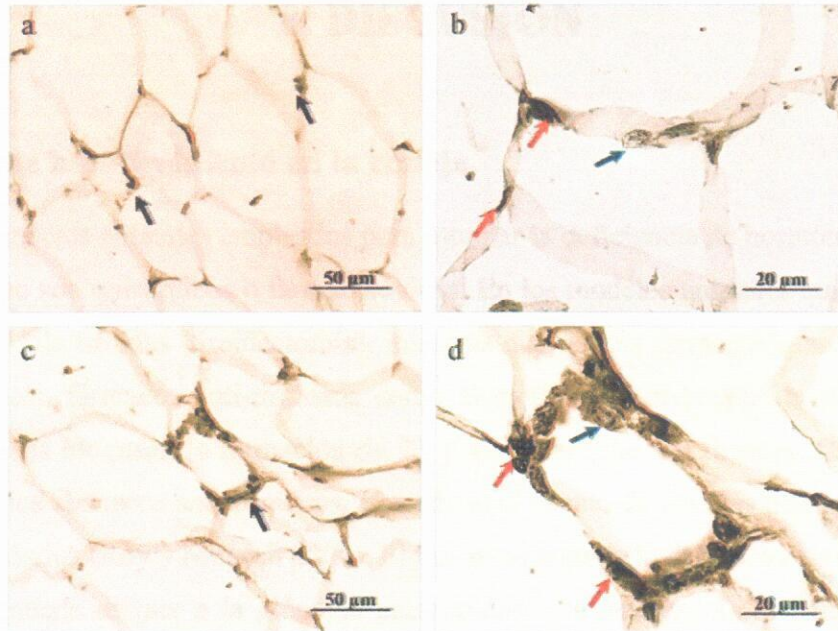


Figura 16. Fotografías que ilustran marcaje de macrófagos pro-inflamatorios con el anticuerpo anti-CD68 en tejido adiposo de conejas controles (a y b) e hipotiroideas (c y d). Las células positivas se pueden observar en color café oscuro (flecha roja), mientras que los células negativas se observan de color café claro (flecha azul).

	Grupos experimentales		P
	Control (n=7)	Hipotiroideo (n=7)	
Número total de células polimorfonucleares	264	263	
% de macrófagos anti-inflamatorios +	57 ± 4.7	44 ± 4.6	0.0213*
% de macrófagos anti-inflamatorios -	43 ± 4.7	56 ± 4.6	0.0213*
Número total de células polimorfonucleares	313	285	
% de macrófagos pro-inflamatorios +	29 ± 2.8	51 ± 3.4	0.0004***
% de macrófagos pro-inflamatorios -	71 ± 2.7	49 ± 3.5	0.0005***

Tabla 2. En esta tabla se muestra que los adipocitos de conejas hipotiroideas tuvieron menor porcentaje de macrófagos anti-inflamatorios y mayor porcentaje de macrófagos pro-inflamatorios. Los datos están expresados como media ± error estándar y fueron analizados con las pruebas U de Mann-Whitney y t de Student según fue el caso *P<0.05 y ***p<0.0001.

7.4 Niveles de leptina

Los niveles de leptina fueron similares en conejas controles e hipotiroideas (1.5 ± 0.17 vs. 1.4 ± 0.11).

8. DISCUSIÓN

Inducción de hipotiroidismo en la coneja

Los modelos animales empleados para estudiar la deficiencia de hormonas tiroideas en el metabolismo son quirúrgicos o farmacológicos. En los modelos animales quirúrgicos se les extrae la glándula tiroidea (tiroidectomía); mientras que, en los farmacológicos, los animales son tratados con fármacos anti-tiroideos como el metimazol, el propiltiuracilo o la tiurea. Dichos fármacos bloquean la formación de T3 y T4 en la glándula tiroidea. Cabe mencionar que de todos los fármacos anti-tiroideos, el metimazol es uno de los más usados y con menos efectos secundarios (Roy y Mugesh 2005). El inconveniente de la tiroidectomía es que durante la cirugía se puede extraer a la glándula paratiroides⁴³, la cual regula los niveles de calcio (Vanderlei y cols. 2012), lo que implica que los efectos de la cirugía se vean sumados a la falta de hormonas tiroideas y paratiroides. Por lo anterior, en nuestro estudio la inducción de hipotiroidismo se realizó mediante administración del fármaco anti-tiroideo Metimazol, el cual fue administrado en el agua de bebida a una concentración de 0.02% durante 30 días, como ya ha sido reportado por otros estudios (Al-jamal 2004). Dicho tratamiento disminuyó significativamente los niveles de T3 total y T4 total, y aumentó los niveles de TSH. Tal como ha sido reportado por otros autores (Dariyerli y cols. 2003, Al-jamal 2004). Aunque el peso de la glándula tiroidea fue similar en conejas controles e hipotiroideas, si se observó que los tirocitos de los animales tratados alcanzaron rangos de mayor área, es decir, fueron más grandes. La falta de diferencias estadísticas pudo deberse a que el número de tiroideas analizadas fue pequeño en ambos grupos (control e hipotiroideo). Ya que en ratas y conejos se ha descrito que el hipotiroidismo incrementa el peso de la glándula tiroidea y provoca hipertrofia de los tirocitos (Soukup y cols. 2001, Amara y cols. 2010).

⁴³ Ver glosario

Hipotiroidismo y metabolismo de lípidos en conejas

En humanos, el hipotiroidismo promueve la elevación de los niveles de colesterol, triglicéridos, LDL y Apo B (Baldini y cols. 2009, Tagami y cols. 2010). Estas mismas alteraciones han sido reportadas en conejos hipotiroideos (Chen y cols. 2004). En el presente estudio encontramos que las conejas hipotiroideas tuvieron mayores niveles de colesterol total, HDL y LDL que el grupo control. Mientras que, los niveles de triglicéridos y VLDL fueron similares en ambos grupos. Nuestros resultados estuvieron acorde con otros reportes que mostraron un aumento en los niveles séricos de colesterol y LDL en conejos tratados con fármacos anti-tiroideos como metimazol o propiltiouracilo (Chen y cols. 2004). Estos efectos son consecuencias de la acción de las hormonas tiroideas sobre sus receptores nucleares (TR α y TR β) y la activación de receptores de membrana (Davis y cols. 2008). Así, la activación de estos receptores reduce la expresión de receptores LDL en hígado (López y cols. 2007, Shin y Osborne 2003), induce la expresión de la enzima HMG CoA reductasa (Ness y cols. 1998) encargada de la síntesis de colesterol, y disminuye la expresión de la enzima lipasa hepática que se encarga de degradar a las HDL en el hígado (Tan y cols. 1998). Respecto a los niveles de triglicéridos y VLDL, estos no se incrementaron en las conejas hipotiroideas. Posiblemente, los niveles de triglicéridos circulantes no se incrementaron debido a que están siendo almacenados en el tejido adiposo. Lo cual explica el incremento del área de la vesícula de triglicéridos en los adipocitos de conejas hipotiroideas. Mientras que, los niveles de VLDL se mantuvieron constantes debido a la normalidad en los niveles de triglicéridos.

Sabemos por estudios en humanos que las mujeres presentan mayor prevalencia de hipotiroidismo (Little 2006, Park y cols. 2009), y que esta condición hormonal se relaciona con múltiples anormalidades en los lípidos (Baldini y cols. 2009, Tagami y cols. 2010), mayor prevalencia de enfermedades metabólicas como síndrome metabólico, diabetes mellitus y dislipidemias (Baldini y cols. 2009, Park y cols. 2009, Tagami y cols. 2010). Además, las mujeres presentan una mayor prevalencia de enfermedades metabólicas, sobre todo antes de la menopausia, y que después de la menopausia, la prevalencia de estos padecimientos se iguala entre hombres y mujeres (Sugiyama y Agellon 2012). Por lo que es posible que el metabolismo entre mujeres y hombres sea diferente (Sugiyama y Agellon 2012). Sin embargo,

la mayoría de los estudios en animales han sido realizados en machos, tratando de evitar la interferencia de los niveles hormonales de las hembras (Salter y cols. 1991). A este respecto, dentro de los pocos estudios realizados en hembras, se ha descrito que los estrógenos afectan al metabolismo en general, regulando los niveles de insulina y glucosa de ratas (Morimoto y cols. 2010), favoreciendo el metabolismo de las LDL (Hermenegildo y cols. 2001) y la lipólisis (Stubbins y cols. 2011).

La importancia de estudiar las alteraciones metabólicas con relación al hipotiroidismo en las hembras, radica en que las hormonas tiroideas regulan los niveles de estrógenos y sus receptores en diversos tejidos (Freyschuss y cols. 1991) y los estrógenos favorecen la síntesis de hormonas tiroideas en la glándula tiroidea (Lima y cols. 2006). Es decir, existe una interconexión entre las hormonas tiroideas y los estrógenos. Así nuestro estudio se suma a los pocos trabajos realizados en hembras, usando como modelo a la coneja, la cual resulta ser un buen modelo de estudio, con niveles de estrógenos constantes (fase de proestro temprano) mientras no haya cópula, en un ciclo de luz/oscuridad controlado (Tsiligianni y cols. 2004). En este sentido, nuestro trabajo es pionero en el uso de la coneja hembra para estudiar metabolismo.

Hipotiroidismo e histología de adipocitos

En nuestro estudio, el peso corporal fue similar en conejas controles e hipotiroideas. Este resultado está acorde a lo reportado por otros autores (Soukup y cols. 2001, Amara y cols. 2010). Respecto a este punto, es posible que aunque aumenta el tejido graso, el peso de los animales no se ve aumentado ya que disminuye el peso de tejidos metabólicos, reproductivos y músculo esquelético (Armada-Días y cols. 2001, Soukup y cols. 2001). De manera que hay una compensación entre la ganancia y la pérdida de peso. La ganancia de tejido adiposo se comprobó a través del tamaño de la vesícula de triglicéridos de los adipocitos, donde los animales hipotiroideos tuvieron mayor área que los controles. Lo que sugiere que los adipocitos están en proceso de atrofia (Chehab 2008). En este sentido, se conoce que tanto en humanos como en animales, la obesidad y el hipotiroidismo incrementan el número - hiperplasia- y el tamaño de los adipocitos -hipertrofia- (Elgadi y cols. 2010, O'Connell y cols.

2010), lo que conlleva al aumento del peso corporal (O'Connell y cols. 2010) o una mayor circunferencia de cintura (Baldini y cols. 2009). El mecanismo propuesto por el cual las hormonas tiroideas favorecen la acumulación de tejido adiposo visceral es que reducen la expresión de receptores beta-adrenérgicos, involucrados en la lipólisis (Germack y cols. 2000), disminuyen la acción del AMPc, por lo cual no puede activarse la proteína kinasa (Armstrong y cols. 1974), disminuyen la expresión de proteína kinasa, la cual fosforila a la LSH, reducen la acción del péptido natriurético A que estimula a la LSH (Polak y cols. 2007). De manera que se disminuye la hidrólisis de los triglicéridos y se aumenta su almacenamiento en los adipocitos (Wahrenberg y cols. 1986). Así mismo, incrementan la actividad de la enzima acetyl-CoA carboxylase favoreciendo la síntesis de ácidos grasos (Huang y Freake 1998) y aumentan la actividad de la lipoproteína lipasa favoreciendo la acumulación de triglicéridos en los adipocitos (Saffari y cols. 1992). A su vez la TSH muestra acciones sobre la lipólisis. La TSH incrementa los niveles de AMPc, estimula la fosforilación de perilipina y LSH promoviendo así la lipólisis (Gagnon y cols. 2010).

Hipotiroidismo e infiltración de células polimorfonucleares en adipocitos

En el presente estudio encontramos que las conejas hipotiroideas tuvieron un mayor número de células polimorfonucleares infiltradas en los adipocitos en comparación con las conejas controles, y que dicho número se correlacionó con el tamaño del adipocito. A nuestro conocimiento, no existen reportes al respecto, por lo que el presente trabajo es el primero en reportar la infiltración de células polimorfonucleares en adipocitos de conejas con hipotiroidismo inducido. Sólo podemos apoyarnos en observaciones hechas en humanos y animales obesos, donde los adipocitos muestran una alta infiltración de macrófagos (Canello y cols. 2005, Michaud y cols. 2012). En este sentido, se sabe que la expansión del tejido adiposo produce señales de comunicación como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y el factor estimulante de colonias (CSF-3) que inducen la infiltración de macrófagos en dicho tejido (Canello y cols. 2005). La hipoxia en el tejido adiposo, consecuencia del crecimiento de los adipocitos, induce la producción de citocinas pro-inflamatorias y la infiltración de células polimorfonucleares (O'Rourke y cols. 2011). Dentro de las citocinas

quimioatrayentes de células polimorfonucleares están el TNF α , leptina e IL6 (Sheu y cols. 2008). Se desconoce si las hormonas tiroideas regulan la expresión de TNF α e IL6, MCP-1. Sin embargo, se conoce que las hormonas tiroideas inhiben la actividad del factor inhibitorio del macrófago (Al-Abed y cols. 2011).

La infiltración de células polimorfonucleares ha sido reportada en otros tejidos como útero, oviducto, hígado, páncreas y tiroides. En útero y oviducto, la infiltración de células polimorfonucleares aumenta durante las infecciones y se ha relacionado con la infertilidad (ver de revisión Horne y cols. 2008).

La infiltración de células polimorfonucleares en el tejido adiposo en animales hipotiroideos podría deberse a la acción directa de las hormonas tiroideas sobre las propias células inmunitarias. Dicha propuesta se basa en la existencia de receptores a hormonas tiroideas en los linfocitos (Brisson-Lougarre y Blum 1985). Así como la presencia de desyodasas tipo tres en las células inmunitarias (Boelen y cols. 2008, 2011). Además, se ha reportado que la T3 incrementa las especies reactivas al oxígeno en células mononucleares, lo que provoca daño a la membrana celular y en consecuencia muerte celular (Magsino y cols. 2000). Ya que las hormonas tiroideas reducen la expresión de la proteína Bcl-2 (proteína encargada de bloquear la muerte celular, evitando la contracción citoplásmica, condensación nuclear, desorganización de la membrana plasmática y ruptura del ADN) (Mihara y cols. 1999). Así mismo, se ha visto que, la producción de especies reactivas de oxígeno favorece la migración en diversos tipos celulares, incluidos los monocitos y leucocitos a diversos tejidos (Marino y cols. 2006). Con nuestros resultados y apoyados en estos trabajos, podemos proponer, que las hormonas tiroideas actúan indirectamente sobre la infiltración de células polimorfonucleares en el tejido adiposo, al incrementar las especies reactivas de oxígeno y en consecuencia inducir la migración de células polimorfonucleares a los adipocitos.

Hipotiroidismo e infiltración de macrófagos en adipocitos

En cuanto a la presencia de macrófagos pro-inflamatorios (CD68 positivos) y anti-inflamatorios (CD163 positivos) en el tejido adiposo, se encontró que en comparación con las

controles, las conejas hipotiroideas tuvieron un mayor número de macrófagos pro-inflamatorios y menor número de macrófagos anti-inflamatorios por adipocito. Dado que no hay reportes con quien comparar nuestros resultados, nos apoyaremos en estudios realizados en otros tejidos. Así tenemos que, en estudios realizados en tejido pulmonar y peritoneal de rata se encontró que el hipotiroidismo disminuye la capacidad fagocítica de los monocitos, macrófagos y leucocitos (Starling y Weese 1985, Liu y Ng 1991). Esto podría explicar por qué observamos mayor número de células pro-inflamatorias en los adipocitos de conejas hipotiroideas, al disminuir la capacidad fagocítica de los macrófagos se requiere de un mayor número de estos para contrarrestar el proceso inflamatorio en los adipocitos (Canello y cols. 2005).

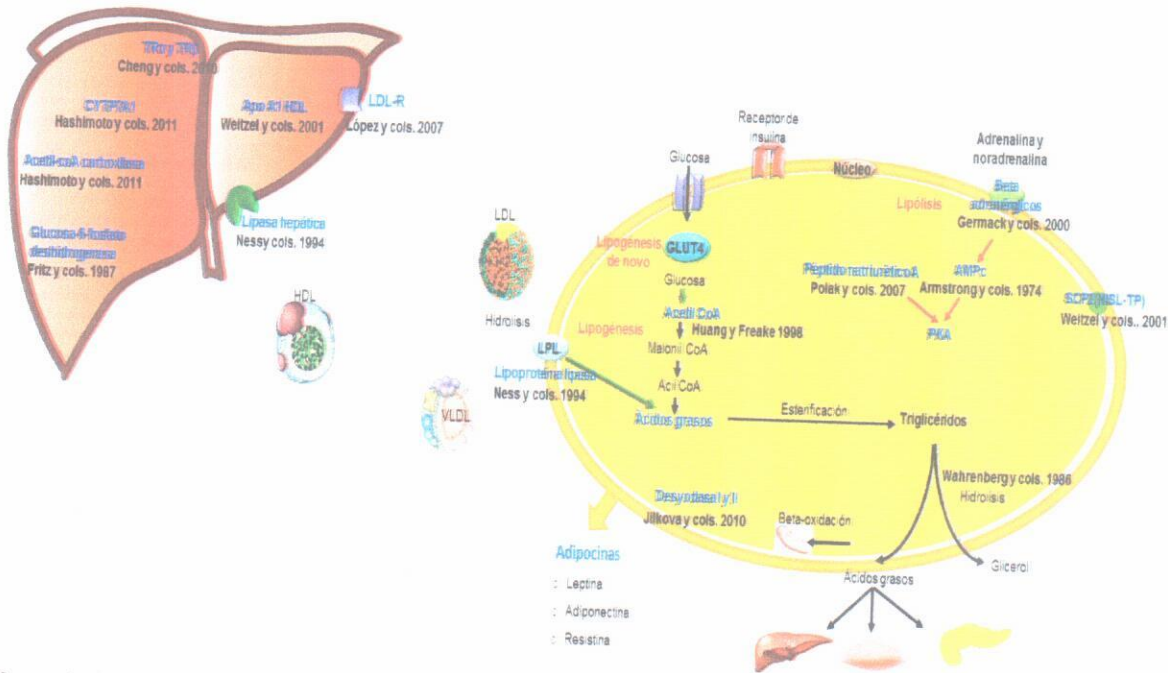
Hipotiroidismo y niveles de leptina

Como ya se mencionó anteriormente, el adipocito libera algunas citocinas quimioatrayentes de células polimorfonucleares como el $TNF\alpha$, leptina e IL6 (Sheu y cols. 2008). Particularmente, la liberación de leptina por el adipocito aumenta conforme aumenta el tamaño del adipocito (ver revisión de Vázquez-Vela y cols. 2008). En el presente estudio, se determinaron los niveles de esta citocina, encontrando que su concentración fue similar en ambos grupos. Estos resultados están acorde con lo reportado en ratas, donde el hipotiroidismo no afecta los niveles de leptina (Karakoc y cols. 2004). Sin embargo, en otros estudios en perro se ha reportado que el hipotiroidismo incrementa los niveles de leptina (Mazaki -Tovi y cols. 2010). Por lo anterior, podríamos decir, que aunque el tamaño de la vesícula de triglicéridos del adipocito fue significativamente mayor en conejas hipotiroideas vs. las conejas controles, aún no se altera la secreción de leptina. De manera que la infiltración de células polimorfonucleares en el tejido adiposo de las conejas hipotiroideas podría deberse a otras citocinas quimioatrayentes como $TNF\alpha$ o IL6, no evaluadas en el presente estudio.

Los resultados encontrados en el presente estudio podrían ser relevantes para explicar las diferencias metabólicas observadas entre hombres y mujeres, y con ello mejorar los tratamientos farmacológicos para las diferentes enfermedades metabólicas. También abre la posibilidad para estudiar con mayor detalle la relación entre hipotiroidismo y células

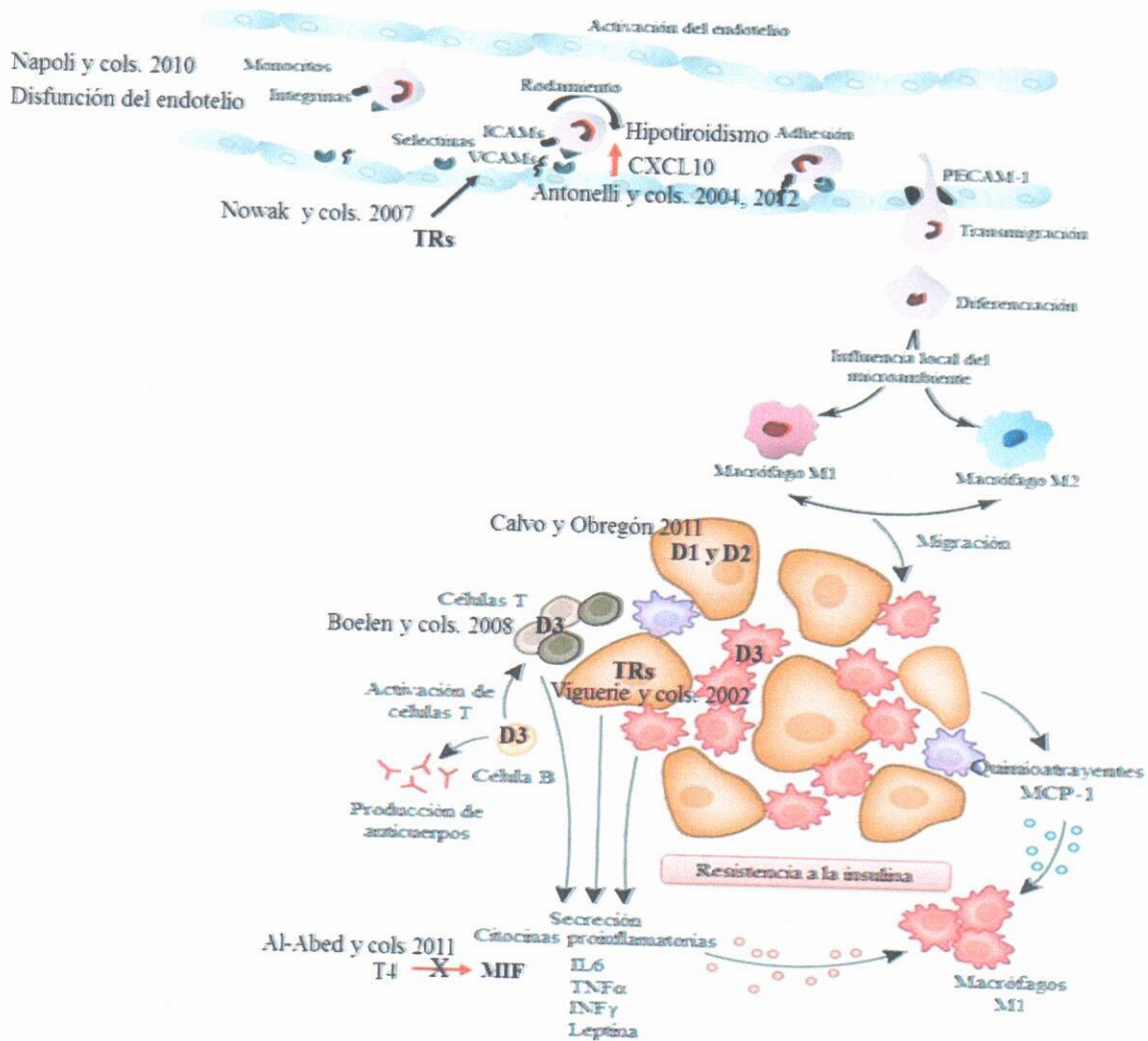
polimorfonucleares en el tejido adiposo. Respecto a este último punto nosotros proponemos que las hormonas tiroideas inducen la infiltración de células polimorfonucleares al tejido adiposo a través de que las hormonas tiroideas regulan la expresión y actividad de quimiocinas y moléculas de adhesión que favorecen la migración de dichas células al tejido adiposo.

MODELO DEL EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS



Efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de los lípidos. Las hormonas tiroideas regulan la expresión y actividad de diversos genes que participan en el metabolismo de lípidos. De manera que al disminuir dichas hormonas se afecta el metabolismo lipídico. En hígado, las hormonas tiroideas disminuyen el número de receptores LDL en hígado por lo cual aumenta la concentración LDL en sangre, reducen la actividad de la lipasa hepática que degrada a las HDL provenientes de los tejidos por lo que incrementan los niveles de HDL circulantes, incrementa la actividad de *CYP7A1* enzima limitante en la síntesis de colesterol endógeno por lo cual incrementan los niveles de colesterol. Mientras que en el tejido adiposo las hormonas tiroideas favorecen la acumulación de tejido adiposo visceral porque reducen la expresión de receptores beta-adrenérgicos, involucrados en la lipólisis, disminuyen la acción del AMPc, por lo cual no puede activarse la proteína quinasa, disminuyen la expresión de proteína quinasa, la cual fosforila a la LSH, reducen la acción del péptido natriurético A que estimula a la LSH. De manera que se disminuye la hidrólisis de los triglicéridos y se aumenta su almacenamiento en los adipocito. Así mismo, incrementan la actividad de la enzima acetyl-CoA carboxylase favoreciendo la síntesis de ácidos grasos y aumentan la actividad de la lipoproteína lipasa favoreciendo la acumulación de triglicéridos en los adipocitos.

MODELO DEL EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LA INFILTRACIÓN DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES EN EL TEJIDO ADIPOSO



Efecto de las hormonas tiroideas sobre la infiltración de células polimorfonucleares. Dado que existen datos que apoyan la relación entre las hormonas tiroideas y las células del sistema inmunológico como son: la confirmación de que dichas células tienen receptores de hormonas tiroideas y el reporte de que estas células presentan desyodasas tipo III. En el tejido adiposo, las hormonas tiroideas pueden regular la infiltración de células polimorfonucleares a los adipocitos. Esto a través de que las hormonas tiroideas regulan la expresión y actividad de citocinas y quimioatrayentes. Así se ha reportado que durante el hipotiroidismo existe disfunción del endotelio e incrementan los niveles circulantes de CXCL9, CXCL10 y CXCL11. Mientras que, en tejido adiposo aumentan la secreción de leptina, MIF, IL6, IL8 e interferón gamma.

9. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con metimazol utilizado disminuyó los niveles de T3 total y T4 total y aumentó los niveles de TSH.
2. El hipotiroidismo afectó el metabolismo de lípidos, incrementando los niveles de colesterol total, HDL y LDL.
3. La deficiencia de hormonas tiroideas incrementó el tamaño de la vesícula de triglicéridos de los adipocitos viscerales.
4. Los adipocitos de conejas hipotiroideas presentaron una mayor infiltración de células polimorfonucleares.
5. Las células polimorfonucleares infiltradas en el tejido adiposo son anti-inflamatorias (CD163) y pro-inflamatorias (CD68).
6. La deficiencia de hormonas tiroideas no afectó las concentraciones de leptina.

10. PERSPECTIVAS

Debido a que todavía no está claro el mecanismo por el cual las hormonas tiroideas inducen la infiltración de células polimorfonucleares en los adipocitos. Se propone indagar más sobre los mecanismos moleculares que posiblemente pudieran favorecer dicho proceso. Sugiriendo el análisis del efecto del hipotiroidismo sobre la expresión de moléculas quimioatrayentes.

11. REFERENCIAS

- Al-Abed Y, Metz CN, Cheng KF, Aljabari B, VanPatten S, Blau S, Lee H, Ochani M, Pavlov VA, Coleman T, Meurice N, Tracey KJ, Miller EJ (2011)** Thyroxine is a potential endogenous antagonist of macrophage migration inhibitory factor (MIF) activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 8224-8227
- Al-jamal JA (2004)** Effect of different thyroid states on mitochondrial porin synthesis and hexokinase activity in developing rabbit brain. *J Biochem*, 135: 253-258
- Amara IB, Bouaziz H, Guermazi F, Zeghal N (2010)** Effect of selenium on hypothyroidism induced by methimazole (MMI) in lactating rats and their pups. *Acta Biol Hung*, 61: 145-157
- Ambrosi B, Masserini B, Iorio L, Delnevo A, Malavazos AE, Morricone L, Sburlati LF, Orsi E (2010)** Relationship of thyroid function with body mass index and insulin-resistance in euthyroid obese subjects. *J Endocrinol Invest*, 33: 640-643
- Armada-Días L, Carvalho JJ, Breitenbach MM, Franci CR, Moura EG.** Is the infertility in hypothyroidism mainly due to ovarian or pituitary functional changes? *Braz J Med Biol Res*, 2001: 1209-1215
- Armstrong KJ, Stouffer JE, Van Inwegen RG, Thompson WJ, Robison GA (1974)** Effects of thyroid hormone deficiency on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and control of lipolysis in fat cells. *J Biol Chem*, 249: 4226-4231
- Avram MM, Avram AS, James WD (2007)** Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol*, 56: 472-492
- Axelsson J, Møller HJ, Witasp A, Qureshi AR, Carrero JJ, Heimbürger O, Bárány P, Alvestrand A, Lindholm B, Moestrup SK, Stenvinkel P (2006)** Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *Am J Kidney Dis*, 48: 916-925
- Baldini M, Colasanti A, Orsatti A, Airaghi L, Mauri MC, Cappellini MD (2009)** Neuropsychological functions and metabolic aspects in subclinical hypothyroidism:

- the effects of L-thyroxine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33: 854-859
- Bianco AC, Kim BW (2006)** Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*, 116: 2571-2579
- Bickel PE, Tansey JT, Welte MA (2009)** PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, 179: 419-440
- Biondi B, Palmieri EA, Klain M, Schlumberger M, Filetti S, Lombardi G (2005)** Subclinical hyperthyroidism: clinical features and treatment options. *Eur J Endocrinol*, 152: 1-9
- Boelen A, Boorsma J, Kwakkel J, Wieland CW, Renckens R, Visser TJ, Fliers E, Wiersinga WM (2008)** Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection. *Thyroid*, 18: 1095-1103
- Boelen A, Kwakkel J, Fliers E (2011)** Beyond low plasma T3: local thyroid hormone metabolism during inflammation and infection. *Endocr Rev*, 32: 670-693
- Bonita RE, Rose NR, Rasooly L, Caturegli P, Burek CL (2003)** Kinetics of mononuclear cell infiltration and cytokine expression in iodine-induced thyroiditis in the NOD-H2h4 mouse. *Exp Mol Pathol*, 74: 1-12
- Bouknight AL (2003)** Thyroid physiology and thyroid function testing. *Otolaryngol Clin North Am*, 36: 9-15
- Buchanan MA, Lee D (2001)** Thyroid auto-antibodies, lymphocytic infiltration and the development of post-operative hypothyroidism following hemithyroidectomy for non-toxic nodular goitre. *J R Coll Surg Edinb*, 46: 86-90
- Bugdaci MS, Zuhur SS, Sokmen M, Toksoy B, Bayraktar B, Altuntas Y (2011)** The role of *Helicobacter pylori* in patients with hypothyroidism in whom could not be achieved normal thyrotropin levels despite treatment with high doses of thyroxine. *Helicobacter*, 16: 124-130
- Brisson-Lougarre A, Blum CJ (1985)** [Specific receptors for triiodothyronine in nuclei isolated from normal human polynuclear neutrophils]. *C R Acad Sci III*, 300: 287-292

- Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K (2005)** Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54: 2277-2286
- Coleman R, Hay RJ (1997)** Chronic mucocutaneous candidosis associated with hypothyroidism: a distinct syndrome? *Br J Dermatol*, 136: 24-29
- Chehab FF (2008)** Obesity and lipodystrophy--where do the circles intersect? *Endocrinology*, 149: 925-934
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ (2010)** Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*, 31: 139-170
- Chen WJ, Lin KH, Lai YJ, Yang SH, Pang JH (2004)** Protective effect of propylthiouracil independent of its hypothyroid effect on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits: PTEN induction and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation*, 110: 1313-1319
- Dariyerli N, Andican G, Catakoglu AB, Hatemi H, Burçak G (2003)** Hyperuricemia in hypothyroidism: is it associated with post-insulin infusion glycemic response? *Tohoku J Exp Med*, 199: 59-58
- Davis PJ, Leonard JL, Davis FB (2008)** Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*, 19: 211-218
- Deshpande V, Venkatesh SG (1999)** Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochim Biophys Acta*, 1430: 157-178
- De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P, Davis FB, Davis PJ (2011)** Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid*, 21: 879-890
- Díaz-Olmos R, Nogueira AC, Penalva DQ, Lotufo PA, Benseñor IM (2010)** Frequency of subclinical thyroid dysfunction and risk factors for cardiovascular disease among women at a workplace. *Sao Paulo Med J*, 128: 18-23
- Ehnes JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-**

- Delarche F, Donath MY (2007) Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*, 56: 2356-2370
- Elgadi A, Zemack H, Marcus C, Norgren S (2010)** Tissue-specific knockout of TSHr in white adipose tissue increases adipocyte size and decreases TSH-induced lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 393: 526-530
- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ (2011)** The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol*, 212: 3-12
- Freyschuss B, Sahlin L, Eriksson HA (1991).** Regulatory effects of growth hormone, glucocorticoids, and thyroid hormone on the estrogen receptor level in the rat liver. *Steroids*, 56: 367-374
- Gagnon A, Antunes TT, Ly T, Pongsuwan P, Gavin C, Lochnan HA, Sorisky A (2010)** Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism*, 59: 547-553
- Germack R, Starzec A, Perret GY (2000)** Regulation of beta 1- and beta 3-adrenergic agonist-stimulated lipolytic response in hyperthyroid and hypothyroid rat white adipocytes. *Br J Pharmacol*, 129: 448-456
- Hansson P, Nordin G, Nilsson-Ehle P (1983)** Influence of nutritional state on lipoprotein lipase activities in the hypothyroid rat. *Biochim Biophys Acta*, 753: 364-371
- Hermenegildo C, García-Martínez MC, Tarín JJ, Llácer A, Cano A (2001).** The effect of oral hormone replacement therapy on lipoprotein profile, resistance of LDL to oxidation and LDL particle size. *Maturitas*, 38: 287-295
- Horne AW, Stock SJ, King AE (2008)** Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction*, 135: 739-749
- Huang C, Freake HC (1998)** Thyroid hormone regulates the acetyl-CoA carboxylase PI promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 249: 704-708
- Ibrahim RE, Maglad MA, Adam SE, Mirghani TE, Wasfi IA (1984)** The effect of altered thyroid status on lipid metabolism in Nubian goats. *Comp Biochem Physiol* 77: 507-512

- Iqbal J, Hussain MM (2009)** Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E1183-E1194
- Karakoc A, Ayvaz G, Taneri F, Toruner F, Yilmaz M, Cakir N, Arslan M (2004)** The effects of hypothyroidism in rats on serum leptin concentrations and leptin mRNA levels in adipose tissue and relationship with body fat composition. *Endocr Res*, 30: 247-255
- Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K (2012)** Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain Behav Immun*, 26: 931-941
- Kostoglou-Athanassiou I, Ntalles K (2010)** Hypothyroidism - new aspects of an old disease. *Hippokratia*, 14: 82-87
- Lima LP, Barros IA, Lisbôa PC, Araújo RL, Silva AC, Rosenthal D, Ferreira AC, Carvalho DP (2006)**. Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids*, 71: 653-659
- Little JW (2006)**. Thyroid disorders. Part II: hypothyroidism and thyroiditis. *Oral Surg Oral Med & Oral Pathol & Oral Radiol Endod*, 102: 148-153
- Liu WK, Ng TB (1991)** Effect of methimazole-induced hypothyroidism on alveolar macrophages. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 60: 21-26
- Lopez D, Abisambra Socarrás JF, Bedi M, Ness GC (2007)** Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta*, 1771: 1216-1225
- Lu L, Wang B, Shan Z, Jiang F, Teng X, Chen Y, Lai Y, Wang J, Xue H, Wang S, Li C, Liu H, Li N, Yu J, Shi L, Hou X, Xing Q, Bai X, Teng W (2011)** The correlation between thyrotropin and dyslipidemia in a population-based study. *J Korean Med Sci*, 26: 243-249
- Magsino CH Jr, Hamouda W, Ghanim H, Browne R, Aljada A, Dandona P (2000)** Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism*, 49: 799-803
- Marino F, Guasti L, Cosentino M, De Piazza D, Simoni C, Piantanida E, Cimpanelli M, Klersy C, Bartalena L, Venco A, Lecchini S (2006)** Thyroid hormone regulation of cell migration and oxidative metabolism in polymorphonuclear leukocytes: clinical

- evidence in thyroidectomized subjects on thyroxine replacement therapy. *Life Sci*, 78: 1071-1077
- Maury E, Brichard SM (2010)** Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 314: 1-16
- Mazaki-Tovi M, Feuermann Y, Segev G, Klement E, Yas-Natan E, Farkas A, Kol A, Shamay A (2010)**. Increased serum leptin and insulin concentrations in canine hypothyroidism. *Vet J*, 183: 109-114
- Messarrah M, Boumendjel A, Chouabia A, Klibet F, Abdennour C, Boulakoud MS, Feki AE (2010)** Influence of thyroid dysfunction on liver lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Exp Toxicol Pathol*, 62: 301-310
- Michaud A, Drolet R, Noël S, Paris G, Tchernof A (2012)** Visceral fat accumulation is an indicator of adipose tissue macrophage infiltration in women. *Metabolism*, 61: 689-698
- Mihara S, Suzuki N, Wakisaka S, Suzuki S, Sekita N, Yamamoto S, Saito N, Hoshino T, Sakane T (1999)** Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1378-1385
- McDonnell ME, Ganley-Leal LM, Mehta A, Bigornia SJ, Mott M, Rehman Q, Farb MG, Hess DT, Joseph L, Gokce N, Apovian CM (2012)** B Lymphocytes in Human Subcutaneous Adipose Crown-Like Structures. *Obesity (Silver Spring)* [En prensa]
- Morimoto S, Morales A, Zambrano E, Fernandez-Mejia C (2010)** Sex steroids effects on the endocrine pancreas. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 122: 107-113
- Ness GC, Lopez D, Chambers CM, Newsome WP, Cornelius P, Long CA, Harwood HJ Jr (1998)** Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression. *Biochem Pharmacol*, 56: 121-129
- Obregon MJ (2008)** Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid*, 18: 185-195
- O'Connell J, Lynch L, Cawood TJ, Kwasnik A, Nolan N, Geoghegan J, McCormick A, O'Farrelly C, O'Shea D (2010)** The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLoS One*, 5: 9997

- O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Olivas AS, Mitra P, Larison WG, Cheang EC, Varlamov O, Corless CL, Roberts CT Jr, Marks DL (2011)** Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*, 54: 1480-1490
- Park HT, Cho GJ, Ahn KH, Shin JH, Hong SC, Kim T, Hur JY, Kim YT, Lee KW, Kim SH (2009)** Thyroid stimulating hormone is associated with metabolic syndrome in euthyroid postmenopausal women. *Maturitas*, 62: 301-305
- Polak J, Moro C, Klimcakova E, Kovacikova M, Bajzova M, Vitkova M, Kovacova Z, Sotornik R, Berlan M, Viguerie N, Langin D, Stich V (2007)** The atrial natriuretic peptide- and catecholamine-induced lipolysis and expression of related genes in adipose tissue in hypothyroid and hyperthyroid patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E246-E251
- Power DM, Elias NP, Richardson SJ, Mendes J, Soares CM, Santos CR (2000)** Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *Gen Comp Endocrinol*, 119: 241-255
- Richelsen B, Sørensen NS (1987)** Alpha 2- and beta-adrenergic receptor binding and action in gluteal adipocytes from patients with hypothyroidism and hyperthyroidism. *Metabolism*, 36: 1031-1039
- Rochon C, Tauveron I, Dejoux C, Benoit P, Capitan P, Fabricio A, Berry C, Champredon C, Thieblot P, Grizard J (2003)** Response of glucose disposal to hyperinsulinaemia in human hypothyroidism and hyperthyroidism. *Clin Sci (Lond)*, 104: 7-15
- Roy G, Muges G (2005)** Anti-thyroid drugs and thyroid hormone synthesis: effect of methimazole derivatives on peroxidase-catalyzed reactions. *J Am Chem Soc*, 127: 15207-15217
- Saffari B, Ong JM, Kern PA (1992)** Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats. *J Lipid Res*, 33: 241-249
- Salter AM, Hayashi R, al-Seeni M, Brown NF, Bruce J, Sorensen O, Atkinson EA, Middleton B, Bleackley RC, Brindley DN (1991).** Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor

- and on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activities in rat liver. *Biochem J*, 276: 825-832
- Soukup T**, Zacharová G, Smerdu V, Jirmanová I (2001) Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiol Res*, 50: 619-626
- Shin DJ**, Osborne TF (2003) Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *J Biol Chem*, 278: 34114-34118
- Sheu WH**, Chang TM, WJ Lee, HC Ou, CM Wu, LN Tseng, HF Lang, CS Wu, CJ Wan, TI Lee (2008) Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. *Obesidad (Silver Spring)*, 16: 1033-1038
- Starling JR**, Weese JL (1985) Lysosomal enzyme activity in pulmonary alveolar macrophages, peritoneal macrophages, and blood mononuclear leukocytes in the hypothyroid rat. *J Surg Res*, 39: 413-419
- Stubbins RE**, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP (2011) Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *Eur J Nutr*, [En prensa]
- Suganami T**, Ogawa Y (2010) Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*, 88: 33-39
- Sugiyama MG**, Agellon LB (2012) Sex differences in lipid metabolism and metabolic disease risk. *Biochem Cell Biol*, 90: 124-141
- Tagami T**, Tamanaha T, Shimazu S, Honda K, Nanba K, Nomura H, Yoriko SU, Usui T, Shimatsu A, Naruse M (2010) Lipid profiles in the untreated patients with Hashimoto thyroiditis and the effects of thyroxine treatment on subclinical hypothyroidism with Hashimoto thyroiditis. *Endocr J*, 57: 253-258
- Tan KC**, Shiu SW, Kung AW (1998) Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2921-2924

- Teixeira Pde F, Reuters VS, Ferreira MM, Almeida CP, Reis FA, Buescu A, Costa AJ, Vaisman M (2008)** Lipid profile in different degrees of hypothyroidism and effects of levothyroxine replacement in mild thyroid failure. *Transl Res*, 151: 224-231
- Tsiligianni T, Saratsi A, Besenfelder U, Anastasiadis A, Vainas E, Saratsis P, Brem G (2004)** The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. *Theriogenology*, 61: 989-995
- Vanderlei FA, Vieira JG, Hojaij FC, Cervantes O, Kunii IS, Ohe MN, Santos RO, Abrahão M (2012)** Parathyroid hormone: an early predictor of symptomatic hypocalcemia after total thyroidectomy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 56: 168-172
- Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR (2008)** White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*, 39: 715-728
- Viardot A, Heilbronn LK, Samocha-Bonet D, Mackay F, Campbell LV, Samaras K (2012)** Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes Metab Res Rev*, 28: 447-454
- Wahrenberg H, Engfeldt P, Arner P, Wennlund A, Ostman J (1986)** Adrenergic regulation of lipolysis in human adipocytes: findings in hyper- and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 63: 631-638

12. GLOSARIO

1. **Enterocitos.** Células epiteliales del intestino delgado encargadas de absorber diversas moléculas alimenticias y transportarlas al interior del organismo.
2. **Lipoproteínas.** Moléculas formadas por una fracción proteica denominada apolipoproteínas (Apo) y una fracción lipídica, cuya función es transportar lípidos en el plasma.
3. **Quilomicrones.** Lipoproteínas sintetizadas en el epitelio del intestino. Su función es transportar triglicéridos, fosfolípidos y colesterol desde el intestino delgado hacia los diferentes tejidos periféricos (tejido adiposo y músculo).
4. **VLDL.** Lipoproteínas de muy baja densidad son moléculas sintetizadas por el hígado que transportan triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos principalmente hacia los tejidos extra-hepáticos.
5. **LDL.** Lipoproteínas de baja densidad. Su función es transportar colesterol a los diferentes tejidos.
6. **HDL.** Lipoproteínas de alta densidad. Estas partículas se caracterizan por su alto contenido de colesterol y fosfolípidos. Así como apoproteínas AI y AII. Su función es transportar el colesterol de la sangre y de los tejidos al hígado para su eliminación.
7. **Colágeno.** Molécula proteica que forma fibras de colágena.
8. **Fibroblastos.** Célula encargada de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular.
9. **Preadipocitos.** Célula que se diferencia en adipocito, por ello presenta la maquinaria enzimática típica del adipocito.
10. **Células madre mesenquimales.** Células con morfología estrellada o fusiforme en estado indiferenciado a partir de las cuales se originan diversos tipos celulares, por ejemplo el tejido conectivo.
11. **Adipocinas.** Proteínas secretadas por el tejido adiposo.

12. **Lipoproteína lipasa.** Enzima clave en la hidrólisis de triglicéridos provenientes de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad que descompone triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol, liberándolos al tejido adiposo.
13. **Lipasa sensible a hormonas.** Enzima que cataliza la conversión de los triglicéridos en ácidos grasos libres.
14. **β -oxidación.** La β oxidación consiste en la liberación de dos átomos de carbono (en forma de acetil-CoA) del extremo carboxílico de la molécula, oxidándose el carbono beta del ácido graso. Es el proceso principal por el cual los ácidos grasos generan energía.
15. **Insulina.** Hormona peptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas.
16. **Glucocorticoides.** Los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) son secretados por las células de las capas fascicular y reticular de la corteza suprarrenal.
17. **Estrógenos.** Hormonas sexuales esteroideas producidas por los ovarios y en menor cantidad por las glándulas adrenales.
18. **Adipoblasto.** Célula indiferenciada capaz de replicarse activamente y que puede dar lugar a un preadipocito.
19. **Perilipina.** Proteína que se localiza en la membrana de la vesícula de triglicéridos de los adipocitos.
20. **Neutrófilos.** Son células esféricas que se caracterizan por tener un núcleo segmentado, citoplasma rico en gránulos y citoesqueleto muy desarrollado.
21. **Basófilos.** Son células de 12 micras de diámetro. Estos se componen de aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso, inclusiones de glucógeno y citoplasma lleno de gránulos.
22. **Eosinófilos.** Los eosinófilos se componen de un núcleo bilobulado.
23. **Linfocitos.** Son células pequeñas de 7 a 15 micrómetros. Se componen de un núcleo esférico, citoplasma delgado, mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y proteínas específicas denominadas proteínas de cúmulo de diferenciación (CD). Los linfocitos se clasifican en tres tipos celulares: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK (Natural killer).

24. **Monocitos.** Los monocitos son células grandes (15-20 μm), poseen un núcleo arrifionado, citoplasma abundante con vacuolas blanquecinas. Estos dan origen a los macrófagos.
25. **Macrófagos.** Son células del sistema inmunitario, que se localizan en los tejidos.
26. **Óxido nítrico.** Molécula altamente inestable que se oxida rápidamente en presencia de oxígeno convirtiéndose en dióxido de nitrógeno.
27. **Prostaglandinas.** Sustancias del grupo de ácidos grasos insaturados, cuyo precursor es el ácido araquidónico.
28. **Obesidad.** Enfermedad crónica inflamatoria caracterizada por la acumulación excesiva de tejido adiposo y el incremento en las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, interleucina 1 β (IL-1 β), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor inhibitorio de la migración del macrófago (MIF) e interferón gamma (IFN γ).
29. **Linfocitos T.** Células con núcleos ovoides que ocupan la mayoría del espacio intracelular. Dichas células coordinan la respuesta celular inmune constituyendo el 70% del total de los linfocitos que segregan proteínas o citoquinas.
30. **Linfocitos B.** Células de las cuales depende la inmunidad mediada por anticuerpos con actividad específica de fijación de antígenos.
31. **Células Natural Killer.** Son un tipo de linfocito perteneciente al sistema inmunitario. Morfológicamente son prácticamente indistinguibles a los linfocitos grandes excepto por los gránulos que contienen.
32. **Interferón-gamma-IFN- γ .** También llamado interferón inmunitario o de tipo II, es un tipo de citoquina producida por los linfocitos T, células naturales killer (NK) y adipocitos, cuya función más es la activación de los macrófagos.
33. **Factor migratorio de macrófagos-MIF.** Es una citocina con potente actividad proinflamatoria ya que tiene la capacidad de inducir la secreción de moléculas como: TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, moléculas de adhesión y quimiocinas.
34. **Apolipoproteína AI.** Componente principal de las HDL.

35. **Receptores de LDL.** Son proteínas de 840 aminoácidos que se encuentran en la superficie celular de los tejidos, reconocen la apoproteína B100 que está incrustada en la capa de fosfolípidos exterior de las partículas de LDL.
36. **Enzima HMG-CoA.** Enzima que regula la síntesis de colesterol.
37. **GLUT4.** Proteína transportadora de glucosa tipo 4, se expresa mayormente en tejido adiposo, músculo y corazón, su función es regulada por la insulina.
38. **Glucosa-6 fosfatasa.** Enzima que cataliza la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato dando como resultado glucosa y un grupo fosfato.
39. **Piruvato carboxilasa.** Enzima que cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato.
40. **Metimazol.** Compuesto heterocíclico que contiene un grupo tioureleno utilizado como fármaco antitiroideo. Se ha sugerido que lleve a cabo su efecto inhibitorio sobre la función tiroidea por bloqueo de la tiroperoxidasa (TPO), enzima encargada de catalizar la unión de yodo a un residuo tirosil de la tiroglobulina.
41. **Quimioluminiscencia.** Técnica analítica empleada para la detección sensible de analitos. Presenta la ventaja de estabilidad de los compuestos quimioluminiscentes, bajo límite de detección y elevada especificidad. Su fundamento es la utilización de la quimioluminiscencia, la cual se produce mediante la generación de especies electrónicamente excitadas en el transcurso de diversas reacciones químicas que, en general, implican oxidación. Uno de los productos intermedios o finales de estas reacciones es quimioluminiscente y, por tanto, emite radiaciones electromagnéticas al desactivarse, pasando de estado excitado a estado fundamental.
42. **ELISA.** Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés. Técnica analítica en el cual un antígeno se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como un cambio de color. La aparición de color permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.
43. **Paratiroides.** La paratiroides es una glándula situada en el cuello, por detrás de los lóbulos tiroideos. Dicha glándula regula la concentración de calcio y fósforo en la sangre.

13. PUBLICACIONES

curso internacional bases biológicas de la conducta

Efecto del hipotiroidismo en la expresión de receptores de insulina y transportadores de glucosa en el tejido adiposo blanco de la coneja adulta

Yazmín Carrillo-Portillo¹, Francisco Castelán² y Estela Cuevas-Romero²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala


²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

La alimentación es un proceso biológico que requiere de múltiples y complejas pautas conductuales, las cuales son imprescindibles para la obtención de la energía necesaria para el adecuado funcionamiento de los órganos y tejidos, y por ende para la sobrevivencia de los organismos. La fuente principal de energía para la mayoría de los animales es la glucosa, la cual ingresa a las células de los tejidos a través de transportadores de glucosa localizados en la membrana celular. En los mamíferos, la glucosa es obtenida a través de los alimentos, o bien, sintetizada de novo a partir de otros compuestos como son los aminoácidos. La entrada de glucosa a la célula es regulada por la hormona insulina, que promueve la formación de transportadores de glucosa. Posteriormente, la glucosa puede ser degradada a piruvato mediante glucólisis con obtención de energía, almacenada en forma de glucógeno (células hepáticas y musculares) o convertida a ácidos grasos y triglicéridos (tejidos hepático y adiposo). El exceso de glucosa favorece la acumulación de tejido adiposo, principalmente visceral, el cual se asocia con diversas enfermedades, tales como: la diabetes, la obesidad y la hipertensión. Recientemente, estas enfermedades han sido relacionadas con los niveles de las hormonas tetrayodotironina y triyodotironina (sintetizadas y almacenadas en la glándula tiroidea) y de la hormona estimulante de la tiroidea (TSH, secretada por la adenohipófisis). Así, las personas con deficiencia de hormonas tiroideas o hipotiroidismo presentan problemas metabólicos como acumulación de tejido adiposo visceral y alteración de los lípidos sanguíneos presentando niveles altos de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como de bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL). En modelos animales, se ha descrito que las hormonas tiroideas son capaces de regular la síntesis de diversas enzimas que participan en el metabolismo lipídico. En este estudio, estamos interesados en investigar el efecto que pudiera tener el hipotiroidismo en la entrada de glucosa a las células adiposas, analizando la expresión de transportadores de glucosa y receptores de insulina en dichas células, así como su acumulación de triglicéridos.

METODOLOGÍA. Se utilizarán conejas adultas (8-12 meses) de la raza chinchilla (*Oryctolagus cuniculus*), divididas en dos grupos: control (sin tratamiento; n=10) e hipotiroideo (n=10, tratadas con metimazol 0.02%, durante 30 días). Después de este tiempo, los animales serán sacrificados con una sobredosis de anestésico para la extracción de sangre y tejido adiposo. En suero se medirán niveles de T3 total, T3 libre, T4 total, T4 libre y TSH a través de técnicas de quimioluminiscencia, los valores obtenidos serán analizados con la prueba t de Student. Del tejido adiposo se extraerán dos trozos, uno se utilizará para la tinción de tricrómica de Masson (medición de áreas de la vesículas de triglicéridos y cuantificación de la densidad de adipocitos), y el otro trozo se utilizará para la expresión de receptores de hormonas tiroideas, receptores de insulina y transportadores de glucosa -GLUT4- mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida (Western blot). Las tinciones serán fotografiadas y analizadas con el programa de Axion vision Rel 4.3.

6 -9 de octubre de 2010

Ciudad de Tlaxcala, México



curso internacional bases biológicas de la conducta

Los valores de las áreas y el número de adipocitos serán comparadas mediante pruebas “t” de student y chi cuadrada, respectivamente. Las bandas de proteína de los diferentes receptores y transportadores serán cuantificadas mediante densitometría.

CONCLUSIÓN. Se pretende que los resultados obtenidos en el presente estudio permitan ayudar en el entendimiento de los mecanismos fisiológicos involucrados en el efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de los adipocitos en las hembras.
Proyecto financiado por CONACyT (E.C. 106226).



¿AFECTA EL HIPOTIROIDISMO DE MANERA DIFERENTE EL METABOLISMO DE HEMBRAS Y MACHOS?

Carrillo-Portillo Y¹, Cruz-Lumbreras SR², Castelán F³, Nicolás-Toledo L³, Rodríguez-Antolín J³ Cuevas E³
¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala ²Doctorado en Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Tlaxcala ³Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5, s/n CP 90070

Las hormonas tiroideas (tetrayodonironina, T4; y triyodotironina, T3) son sintetizadas y almacenadas en la glándula tiroides. En humanos, la deficiencia de estas hormonas (hipotiroidismo) favorece la acumulación de tejido adiposo visceral, aumenta los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y disminuye los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL). Con respecto al metabolismo de carbohidratos y proteínas los datos son contradictorios, pues algunos estudios reportan que el hipotiroidismo aumenta los niveles de glucosa, insulina y ácido úrico, mientras que otros encuentran que los disminuye. Sin embargo, los estudios clínicos no diferencian el efecto del hipotiroidismo en el metabolismo entre hombres y mujeres, asumiendo que este es igual, a pesar de que los estrógenos también regulan el metabolismo. Resultados similares han sido observados en modelos animales de hipotiroidismo, aunque solo en machos, dejando a un lado a las hembras. Por ello se requieren estudios que permitan comprender qué papel juegan las hormonas tiroideas en el metabolismo y en el desarrollo de enfermedades metabólicas en las hembras. **METODOLOGÍA.** Se utilizaron conejas chinchilla adultas, divididas en dos grupos: control (sin tratamiento; n=5) y tratado con Metimazol (n=5, usado para inducir hipotiroidismo, al 0.02%, durante 30 días). Al final del tratamiento, los animales fueron pesados y sacrificados con una sobredosis de anestésico para la extracción de sangre, glándula tiroides y tejido adiposo visceral. Para determinar la eficacia del tratamiento en la inducción de hipotiroidismo se midieron: T3 total, T4 total, T3 libre y T4 libre en suero, así como el área de los tirocitos teñidos con tricrómica de Masson. Se analizaron diversos parámetros bioquímicos en suero para determinar el efecto del hipotiroidismo en el metabolismo de lípidos (leptina, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y lipoproteína de muy baja densidad -VLDL), de carbohidratos (glucosa e insulina) y de proteínas (ácido úrico). También se midió el área de las vesículas de triglicéridos en adipocitos teñidos con hematoxilina-eosina. Tanto los parámetros bioquímicos como las áreas fueron comparados en ambos grupos mediante pruebas de U de Mann-Whitney. **RESULTADOS.** Se encontró que el tratamiento con Metimazol disminuyó significativamente los niveles de T3 libre y T3 total, pero no modificó el tamaño de los tirocitos. Los niveles de colesterol, HDL y LDL, así como el tamaño de los adipocitos fueron significativamente mayores en las conejas hipotiroideas vs. conejas controles. Mientras que el peso corporal y los niveles de triglicéridos, VLDL, leptina, glucosa, insulina y ácido úrico fueron similares en ambos grupos. **CONCLUSIÓN.** El tratamiento con Metimazol utilizado fue eficaz para inducir hipotiroidismo. El hipotiroidismo afectó el metabolismo de lípidos, pero no el metabolismo de carbohidratos y proteínas, así mismo favoreció la acumulación de triglicéridos en tejido adiposo. Es posible que el hipotiroidismo afecte el metabolismo lipídico de manera diferente en machos y en hembras, ya que en estas últimas, a diferencia de los machos, no aumenta los niveles de triglicéridos y VLDL, y aumenta la concentración de HDL. Agradecemos el apoyo a PROMEP (proyecto a C.E. UATLX-PTC-085) y a CONACyT (beca de Maestría a C.Y. 367031).



¿PUEDE EL HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO PROTEGER DE ENFERMEDADES METABÓLICAS Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN MUJERES ADULTAS?

Cruz-Lumbreras SR^{1,2}, Carrillo-Portillo Y³, Castelán F, Martínez-Gómez M^{3,4}, Cuevas-Romero E³

¹ Doctorado en Ciencias Naturales, UAT. ² Facultad de Ciencias de la Salud, UAT. ³ Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UAT. ⁴ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5, s/n CP 90070

En el hipotiroidismo subclínico (HSC), los niveles de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) se encuentran en el rango normal alto o superiores y de las hormonas tiroideas (triiodotironina, T3 y tetrayodotironina, T4) normales. Su prevalencia es mayor en mujeres, especialmente a mayor edad. Es posible que con el HSC no presenten síntomas; aunque en algunos casos se observa disminución de energía, ganancia de peso, irritabilidad, ansiedad, entre otros. Además, se ha descrito una relación con obesidad, hipertensión, dislipidemias, mayor riesgo cardiovascular (RCV), y puede progresar a hipotiroidismo clínico (HC; TSH alta, T3 y T4 bajas). Aún con TSH >2.5 mUI/L es factible encontrar anticuerpos anti-TSH o anti-peroxidasa que deriven en HC. En sujetos mayores de 60 años, los efectos del HSC sobre el metabolismo y el riesgo cardiovascular son controversiales, ya que algunos estudios encuentran relación con parámetros metabólicos e infartos; mientras que otros no. A pesar de que la población mexicana tiene una alta predisposición a padecer dislipidemias y obesidad, existen pocos reportes de la prevalencia de HSC y no existe ningún estudio acerca de la relación entre HSC y enfermedades metabólicas y RCV, lo cual es el objetivo del presente trabajo. **METODOLOGÍA.** El estudio se realizó en 141 mujeres (50-93 años) otomíes en Ixtenco, Tlaxcala, a las que se les determinó: 1) HSC (determinación de T3, T4 y TSH), 2) obesidad (circunferencia de cintura), 3) hipertensión arterial (presión arterial >140/90 mmHg y/o hipertensión diagnosticada), 4) diabetes (glucosa sérica ≥ 126 mg/dl y/o diabetes diagnosticada), 5) insulina y resistencia a la insulina (RI: índice HOMA), 6) dislipidemias (colesterol total, triglicéridos y HDL), 7) síndrome metabólico (criterio según ATP-2005), y 8) riesgo cardiovascular (escala de Framingham) e índices aterogénicos (LDL/HDL, colesterol total/HDL y colesterol total/triglicéridos). Se aplicaron correlaciones entre las variables y chi cuadrada para los porcentajes. **RESULTADOS.** Encontramos que: 1) con TSH >4.9 mUI/L, la prevalencia de HSC fue de 13%, mientras que con TSH >2.5 mUI/L fue de 39%; 2) con TSH >4.9 mUI/L, la prevalencia de HSC fue similar en todas las décadas (10-15%); con TSH >2.5 mUI/L, la prevalencia de HSC fue mayor en el grupo 50-59 años (52%) y >80 años (61%); 3) independientemente del límite superior de TSH, las mujeres con HSC mostraron niveles de TSH significativamente superiores, y T4 libre, T4 total índices T4 total/TSH y T4 libre/TSH menores, lo que refleja una disfunción de la glándula tiroides; 4) no se encontraron diferencias en los valores promedio de los parámetros evaluados ni en las prevalencias de obesidad, dislipidemias, diabetes, hipertensión, síndrome metabólico, RCV e índices aterogénicos entre las mujeres eutiroides y con HSC; 5) solo con valores de TSH >4.9 mUI/L, se encontró una menor resistencia a la insulina (RI). **CONCLUSIÓN.** Nuestros resultados muestran que el HSC no se relaciona con parámetros metabólicos y cardiovasculares, a excepción de la resistencia a la insulina, la cual fue menor en mujeres con HSC. Nuestros resultados son similares a otros estudios que no encuentran asociación entre HSC y estos parámetros clínicos, y están en discrepancia con estudios que sostienen una asociación. Este es el primer estudio que muestra que el HSC disminuye la RI, sugiriendo una posible protección para el desarrollo de diabetes. Proyecto financiado por PROMEP (UATLX-PTC-085) a EC.