

ACCION DE LA TRH SOBRE HIPOFISIS DE RATA EN CULTIVOS ORGANOTIPICOS. I. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y ESTEREOLOGICO DE LAS CELULAS TIREOTROPAS.

(THE ACTION OF TRH ON RAT HYPOPHYSIS IN ORGANOTYPICAL CULTURES. I. ULTRAESTRUCTURAL AND STEREOLOGICAL STUDY OF TYREOTROPH CELLS).

por

García García, J*, L. Jiménez Reina*, J. Adame Marín*, A. Blanco Rodríguez** y G. Bernal Valls*

* Departamento de anatomía humana. Facultad de medicina. Universidad de Córdoba (España).

**Departamento de histología y anatomía patológica. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba (España).

Palabras clave: Animales de laboratorio. Fisiología. Hormonas. Citología. Estereología.

Keywords: Laboratory animals. Physiology. Hormones. Cytology. Stereology.

Summary

We have made an ultrastructural study of tyreotroph cells, in organotypical cultures of the hypophysis, in the presence of TRH, at different doses and cultivation times.

The data obtained permits us to conclude that in our experimental conditions the TRH stimulates the liberation and synthesis of TSH in tyreotroph cells. This increase appears to be doses-time and intensity related. Stereological data confirms the increase in the liberation and synthesis of TSH by the action of TRH.

Resumen

Hemos realizado un estudio ultraestructural y estereológico de las células tireotropas, en cultivos organotípicos de hipófisis de rata,

Recibido para publicación el 9-1-1985.

GARCIA ET AL.: TRH SOBRE HIPOFISIS EN CULTIVOS. I.

en presencia de TRH a diferentes dosis y tiempos de cultivo. En nuestras condiciones experimentales la TRH estimula la liberación y síntesis de las células TSH. Este incremento parece tener una relación con dosis-tiempo-intensidad de la respuesta. Los datos estereológicos confirman el incremento en la liberación y síntesis de la TSH por acción de la TRH.

Es ampliamente conocido que la hormona liberadora de la tireotropina (TRH) produce la liberación y síntesis de TSH por parte de las células tireotropas adenohipofisarias. La administración de TRH en distintas condiciones experimentales produce un aumento de los niveles séricos de TSH¹ y modificaciones ultraestructurales de las células tireotropas, que se traducen fundamentalmente por un aumento de la actividad emiocítica y cambios en el retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi. En los primeros momentos, tras la administración de TRH, se presenta un aumento de la liberación granular^{2,3}. Tras estos primeros minutos comienzan a aumentar las cisternas del RER y los sáculos del complejo de Golgi^{2,3,4,5,6}. Los estudios morfométricos revelan que, tras la administración de TRH, la superficie del RER de las células tireotropas alcanza su máximo a los 20 minutos⁷: 10 minutos después que la zona del complejo de Golgi.

Cuando se realiza una administración larga de TRH se produce sobre las células tireotropas una extensión evidente de la zona del complejo de Golgi, un desarrollo y dilatación del RER y una disminución en el tamaño y número de los gránulos de secreción^{8,9}. Este tratamiento largo puede dar lugar a las llamadas células de la tiroidectomía, que tardarían varias horas¹⁰ y aun varios días¹¹ en llegar a este punto.

La adición de TRH in vitro provoca sobre las células tireotropas adenohipofisarias cambios morfológicos similares a los que se han descrito in vivo; es decir: exocitosis acentuada, de tal manera que en el espacio intercelular aparece, con frecuencia, una sustancia osmiófila, hipertrofia del RER y del complejo de Golgi, con marcada formación de gránulos¹².

Estudiaremos, por tanto, mediante el análisis ultraestructural y estereológico, las modificaciones de las células tireotropas de cultivos organotípicos hipofisarios, utilizando distintas dosis de TRH y sus efectos en tiempos diferentes para tratar de profundizar, desde el punto de vista ultraestructural, en la correlación dosis-respuesta.

Material y métodos

Se usan hipófisis de ratas Wistar, de ambos sexos, cuyos pesos oscilan entre 200 y 250 g. El procedimiento fue como se describe previamente¹³. Tras una hora de precultivo en medio 199, las hipófisis se colocan de forma tal que cada una de ellas tenga como control su correspondiente mitad. Las dosis de TRH usadas son de 100, 250 y 500 ng, por ml de medio de cultivo; y los tiempos de estudio, de 15, 30, 45, 60 y 75 minutos.

Las piezas se fijaron en glutaraldehído al 2 % y se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1 %. Se deshidrataron en acetona y se embelieron en araldita. Los cortes ultrafinos se tiñeron por la doble coloración de Reynolds.

Además del estudio ultraestructural de las tireotropas hemos realizado su estudio estereológico siguiendo el procedimiento de Weibel y Bolender¹⁴. Para ello utilizamos micrografías aumentadas a 8883x y 15837x para cuantificar distintos parámetros estereológicos, como son las densidades de volumen de la célula, del núcleo, del RER y del complejo de Golgi.

Resultados

Respuesta a la TRH. Datos ultraestructurales.

a) Con 100 ng de TRH observamos un aumento de la actividad emiocítica de las células tireotropas, con imágenes de exocitosis (fig. 1). Las cisternas del RER se hacen muy evidentes y dilatadas y aun llegan a formar a modo de evaginaciones celulares (fig. 2). El complejo de Golgi, si bien es patente y de disposición yuxtannuclear, no presenta grandes dilataciones de los sáculos. A los 60 minutos disminuye la actividad celular y a los 75 minutos son similares a los controles.

b) Con 250 ng de TRH las células aparecen aumentadas de tamaño y no son evidentes los signos de exocitosis (suponemos que por producirse antes de los 15 minutos que nosotros estudiamos). El RER aparece dilatado, con material de baja densidad electrónica y con sus cisternas comunicando entre sí frecuentemente (fig. 3). El complejo de Golgi es manifiesto, está dilatado y presenta gránulos en formación. En su proximidad hay gránulos inmaduros y vesículas espiculadas (figs. 4 y 5).

c) Con 500 ng de TRH las células tireotropas están ya muy aumentadas de tamaño (fig. 6), poseen gran número de gránulos de secreción y no

se observan imágenes de extrusión granular. Son abundantes las cisternas dilatadas de retículo, que al igual que observábamos anteriormente forman a modo de evaginaciones citoplasmáticas (fig. 7) con pocos gránulos de secreción. Con esta dosis el complejo de Golgi aparece muy dilatado, tiende a tomar una forma circular (fig. 8) y en relación a su cara CIS hay abundantes vesículas espiculadas y gránulos inmaduros, así como mitocondrias.

Respuesta a la TRH. Datos estereológicos.

a) Volumen celular.

Existen incrementos muy significativos del volumen celular con todas las dosis de TRH usadas, si bien los picos se presentan a los 15 minutos de cultivo con 500 ng, lo que supone un aumento del 354 % en relación a los controles (véase la gráfica I). Hacia los 75 minutos, los valores del volumen celular se van aproximando a los valores de los controles.

b) Volumen nuclear.

Aumenta con las tres dosis de TRH (gráfica II) aunque no llega a representar aumentos significativos en relación a los controles. El valor máximo llega a $56.83 \pm 21.77 \mu^3$, con 500 ng de TRH.

c) Volumen y superficie del RER.

El volumen del retículo aumenta en todos los casos, en relación a los controles, hasta los 60 minutos de cultivo. A los 15 minutos es cuando alcanza los valores máximos (pico de $226.0 \pm 28.0 \mu^3$) (gráfico III).

Por lo que respecta a la superficie del RER (gráfico IV), no presenta aumentos significativos en ningún momento ni con ninguna de las dosis de TRH usadas.

d) Volumen y superficie del complejo de Golgi.

El volumen del complejo de Golgi (gráfica V) se incrementa significativamente para 250 y 500 ng de TRH y alcanza sus picos entre los 15 y 45 minutos (máximo de $58.3 \pm 17.2 \mu^3$). Cabe señalar que a los 75 minutos presenta prácticamente los mismos valores que los controles.

La superficie del complejo de Golgi (gráfico VI) muestra aumentos significativos a los 45 y 60 minutos, con 250 y 500 ng de TRH. A los 15 minutos de cultivo alcanza el pico máximo, con $151.6 \pm 49.0 \mu^2$.

Discusión

La TRH produce en cultivos organotípicos de hipófisis, sobre las células tireotropas, una mayor liberación y síntesis de TSH, que viene reflejada por las modificaciones ultraestructurales que hemos descrito.

Ya con 100 ng de TRH por ml de cultivo, observamos no sólo procesos de exocitosis, sino un aumento de la actividad celular¹⁵. Por tanto, todas las dosis de TRH que hemos usado originan un aumento de la liberación granular^{2,3}. Sobre el RER y complejo de Golgi la TRH provoca evidentes signos de actividad celular^{4,5,6}. Las modificaciones en uno u otro órgano se producen, en nuestras condiciones, de un modo sinérgico: no es anterior en el complejo de Golgi, como se describe previamente⁷. En el complejo de Golgi son muy manifiestos los datos ultraestructurales de formación de gránulos¹².

En algún momento la actividad desencadenada por la TRH en nuestras condiciones experimentales, sobre las cisternas del RER (que llegan a formar a modo de evaginaciones citoplasmáticas), nos ha llevado a pensar que éstas sean el origen de las grandes dilataciones de retículo formadas tras la estimulación larga^{8,9} de estas células y que constituyen las llamadas células de la tiroidectomía.

De los datos estereológicos concluimos que la correlación dosis-respuesta no se mantiene de forma directa. Lo que sí se aprecia, a medida que aumenta la dosis, es que los valores celulares se mantienen más elevados a medida que transcurre el tiempo. También hay que destacar el retorno a las condiciones iniciales, a los 75 minutos de cultivo. Según esto, podemos afirmar que la TRH provoca sobre las células TSH, *in vitro*, un incremento de la actividad a medida que aumenta la dosis, en relación a un tiempo de cultivo dado.

Fig. 1. Imágenes de exocitosis.

Fig. 2. Dilataciones de las cisternas del RER, que forman a modo de evaginaciones citoplasmáticas.

Fig. 3. Cisternas del RER dilatadas y comunicadas entre sí.

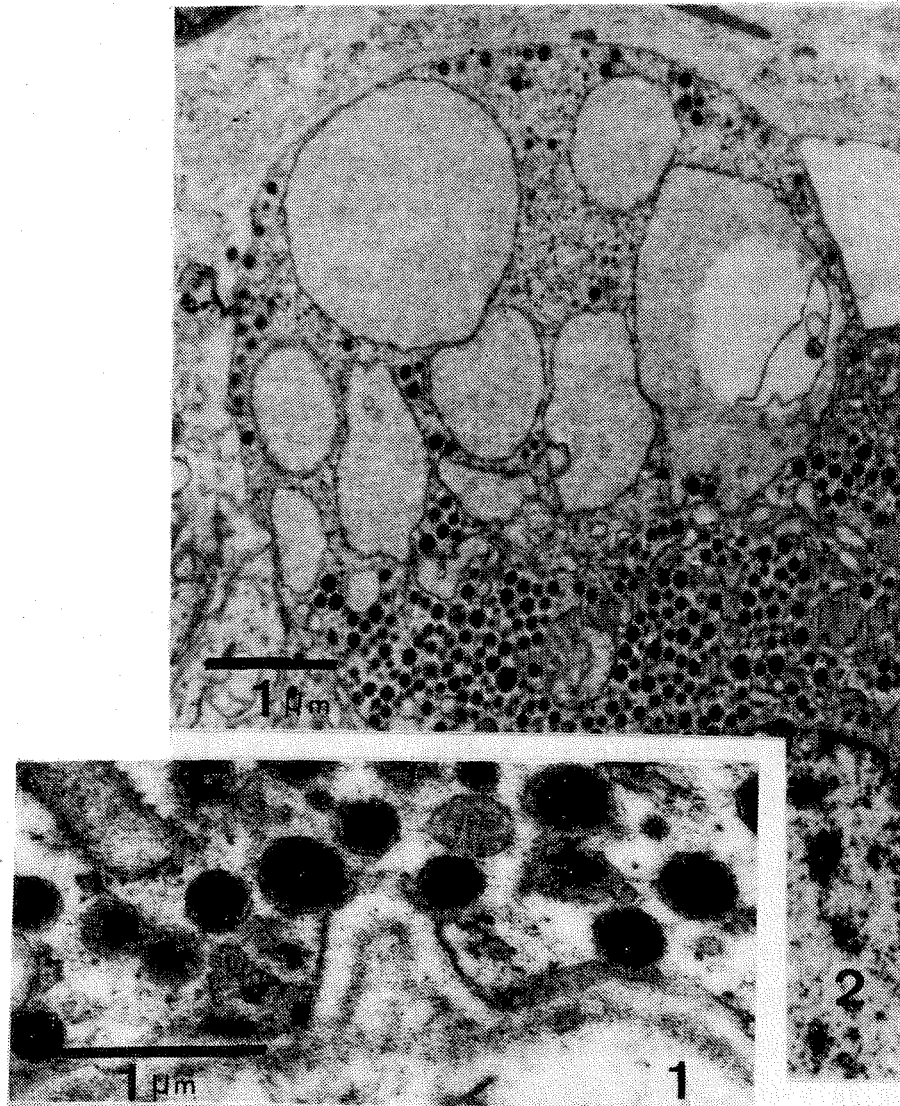
Fig. 4. Complejo de Golgi dilatado y con gran cantidad de formas granulares inmaduras y vesículas espiculadas.

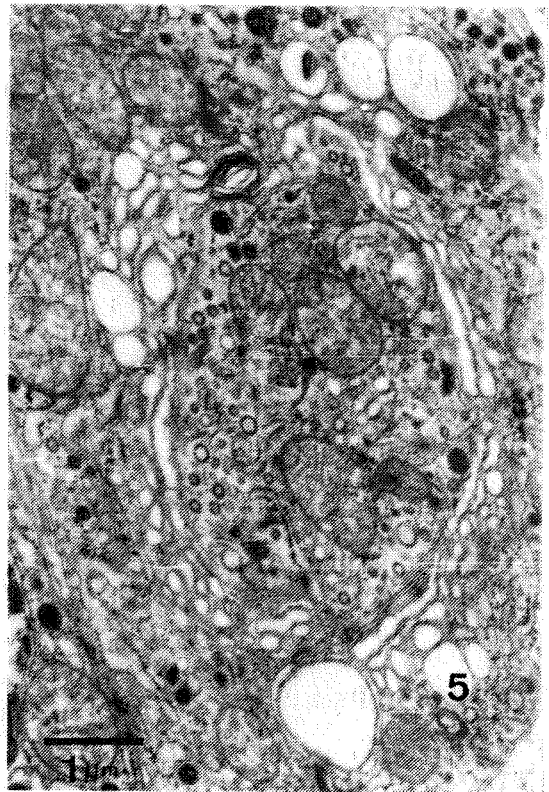
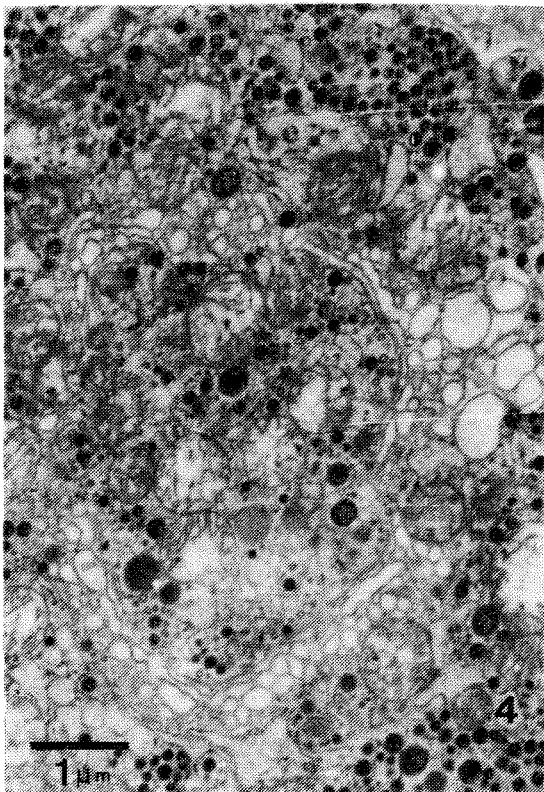
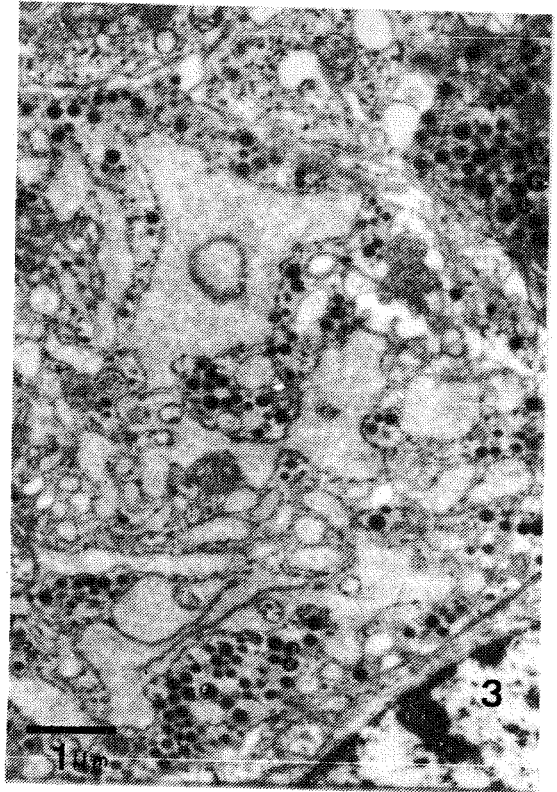
Fig. 5. Igual que figura 4.

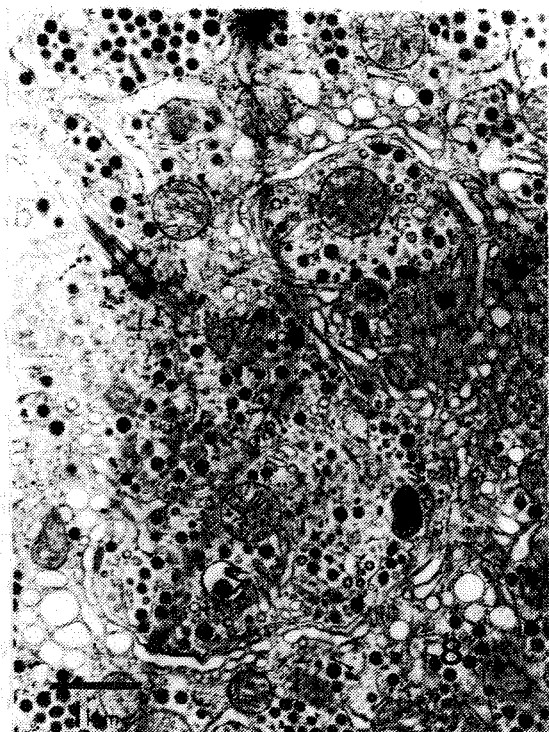
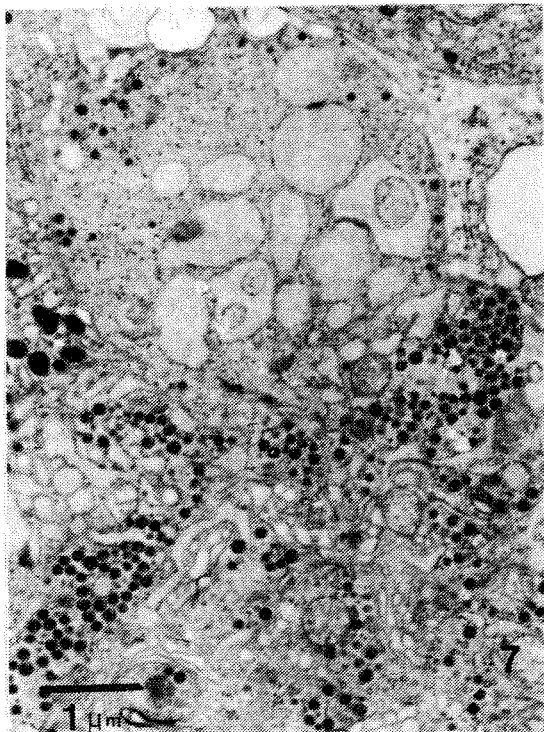
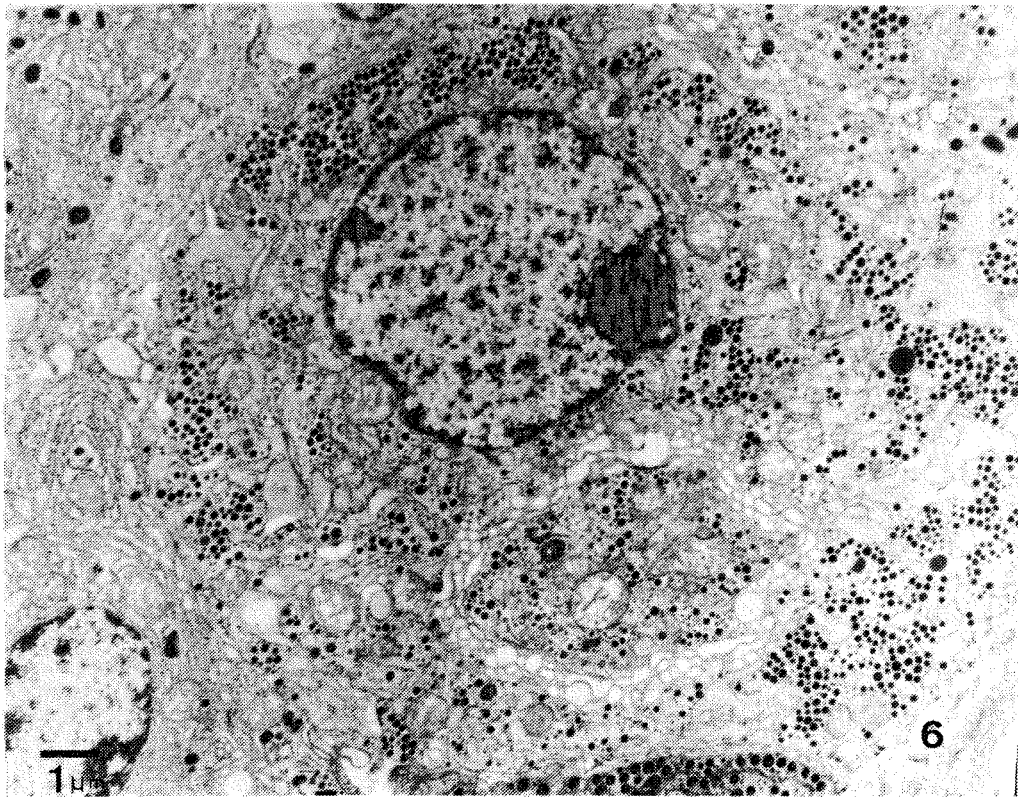
Fig. 6. Célula tireotropa de gran tamaño.

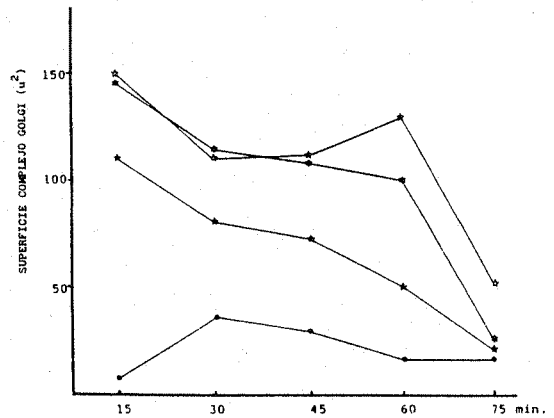
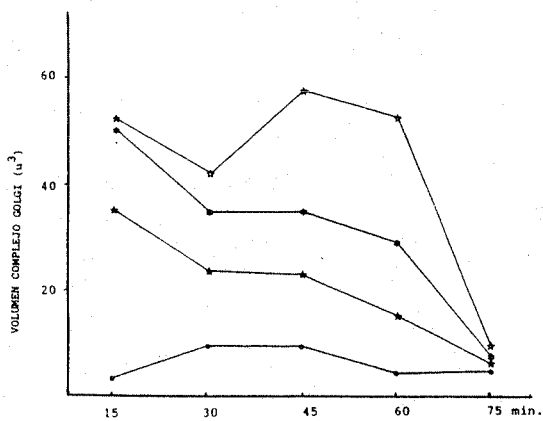
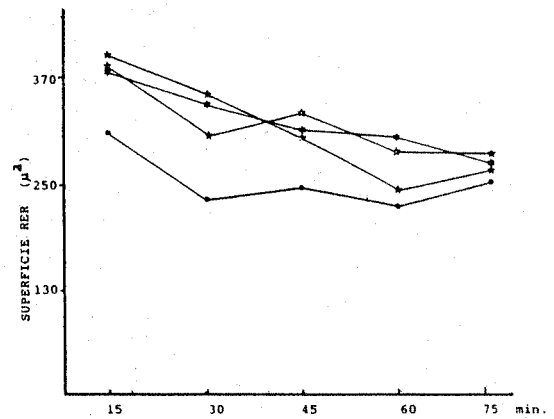
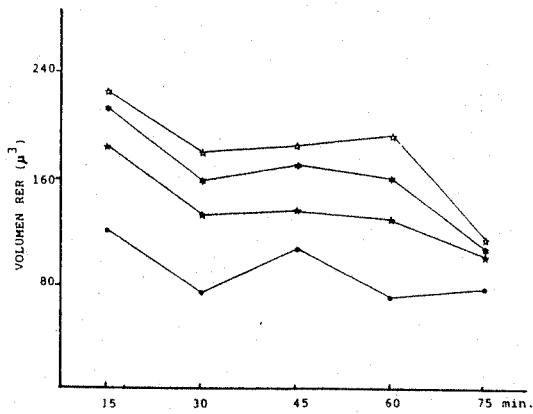
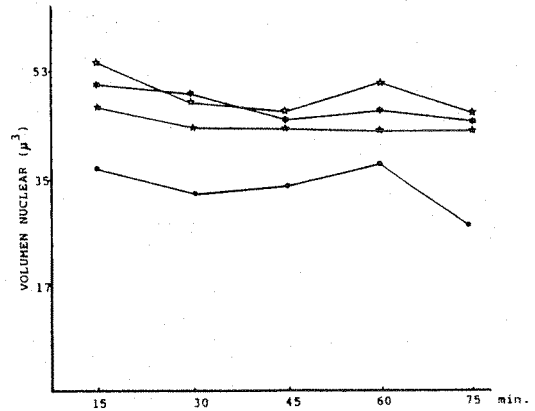
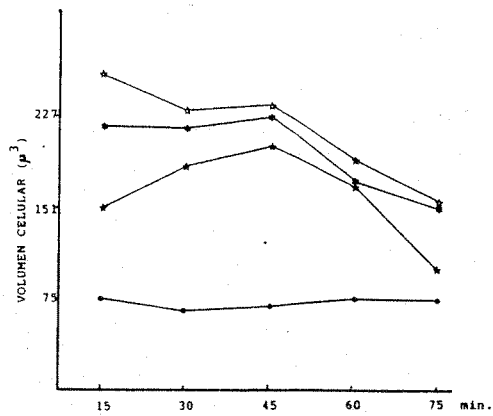
Fig. 7. Dilataciones del RER, en forma de evaginación citoplasmática.

Fig. 8. Golgi de forma circular con abundantes gránulos inmaduros y vesículas espiculadas.









GRAFICAS I y II
III y IV
V y VI

—●— Control
—★— Dosis 100 ng TRH/ml de medio
—*— Dosis 250 ng " " " "
—☆— Dosis 500 ng " " " "

Bibliografía

1. Chen, H.J. and J. Meites. Effects of biogenic amines and TRH on release of prolactin and TSH in the rat. *Endocrinology*, 96, 10-14 (1975).
2. Moguilevsky, J.A., S. Cuervo-Rocha, J. Christot and D. Zambrano. The effect of thyrotropin releasing factor on different hypothalamic areas and the anterior pituitary gland: A biochemical and ultrastructural study. *J. Endocr.*, 56, 99-109 (1973).
3. Wilbur, D.L., J.A. Yee and J.E. Rague. Hypophysal portal vascular infusion of TRH in the rat: An ultrastructural and radioimmunoassay study. *Am. J. Anat.*, 151, 272-283 (1978).
4. Labrie, F. Control protein synthesis in anterior pituitary gland. *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology*, 6th Symposium, pp. 301-334 (1973).
5. García J., J.L. Lancho Alonso y L. Jiménez. Modificaciones ultraestructurales de las células tireotropas adenohipofisarias por acción de la TRH. *An. Anat.*, 30, 213-225 (1981).
6. García, J., J. Jiménez y G. Bernal. Estudio comparativo morfológico y estereológico de las células tireotropas y mamotropas tras la administración de TRH. *An. Anat.*, 32, 31-45 (1983).
7. Okino, H., S. Matsui, S. Shioda, Y. Nakai and K. Kurosuni. Ultrastructural and morphometric studies on the rat pituitary thyrotrophs and thyroid follicular cells following administration of thyrotropin releasing hormone. *Archivum Histologicum Japonicum*, 42, 482-505 (1979).
8. Strattmann, I.E., C. Ezrin, K. Kolvcs and E.A. Sellers. Effects of TRH on the fine structure and replication of TSH and prolactin cells in the rat. *Z. Zellforsch.* 145, 23-37 (1973).
9. Tixier-Vidal, A., C. Tougard, B. Dufy and J.D. Vicent. Morphological, functional and electrical correlates (E.E. Müller and R.M. MacLeod, eds.), 1, 211-251 (1982).

10. Zambrano, D., S. Cuervo-Rocha and I. Bergmann. Ultrastructure of rat pituitary gonadotrophs following incubation of the gland with synthetic LH-RH. *Cell Tiss. Res.*, 150, 179-192 (1974).
11. Shiino, M. Morphological changes of pituitary gonadotrophs following treatment with LH-RH or TRH in vitro. *Cell Tiss. Res.*, 202, 399-406 (1979).
12. Pawlikowski, M., M. Karasek and J. Kunert-Radek. Influence of thyrotropin releasing hormone and dibutyryl cyclic adenosine 3'5' monophosphate on ultrastructure of adenohypophysis in organ culture. *Endokrinologie*, 66, 306-312 (1975).
13. Tixier-Vidal, A. Ultrastructure of anterior pituitary cells in culture. In: *The Anterior Pituitary (Ultrastructural and Biological Systems)* Vol. 7. (A. Tixier-Vidal and M.G. Farquhar eds.). pp. 181-224. Academic Press. New-York (1975).
14. Weibel, E.R. and R.P. Bolender. Stereological techniques for electron microscopic morphometric. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopic (Biological Applications)* t. 3. pp. 237-296. (M.A. Hayat, eds.) Van Nostrand Reinhold Company. London (1973).
15. Convey, E.M., H.A. Tucker, V.G. Smith and J. Zolman. Bovine prolactin, growth hormone, thyroxine and glucocorticoid response to thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 92, 471-476 (1973).