



PROBIOL

Programa de Posgrado en Biología

Trabajo de Tesis para optar al grado de

“Doctora en Ciencias Biológicas”

Lic. Gisela Érika Pennacchio



Universidad Nacional de Cuyo

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU,

CCT- CONICET, MENDOZA

Mendoza – 2016

“Efecto del hipertiroidismo en la regulación hipotalámica de la
secreción de prolactina durante la gestación y la lactancia de
ratas”

Lic. Gisela Érika Pennacchio

Directora: Dra. Graciela Alma Jahn

Codirectora: Dra. Susana Ruth Valdez

Mendoza – 2016

Dedicado a mi gran amor, dueño de mis sueños...

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerles a mis padres que me dieran siempre su apoyo y los medios para ir detrás de mis sueños y poder conquistarlos. A mis hermanos y cuñada, por la enorme paciencia.

Quiero agradecerle a la Dra. Graciela A. Jafin por haberme brindado un lugar y la oportunidad de poder formar parte de su grupo de trabajo, aún recuerdo la tarde en que fui a verla para poder realizar mi tesina, gracias por darme la oportunidad y creer en mí, gracias por la formación, la paciencia y por todas las horas dedicadas. Un especial agradecimiento a mi co-directora a la Dra. Susana R. Valdez, por haberme ensañado gran parte de lo que hoy manejo, gracias por haberme dado las herramientas para poder desarrollar un trabajo con total libertad y confianza, por muchos años de paciencia, congresos compartidos, almuerzos y largos días de trabajo. Quiero agradecerle a la Dra. Marta Soaje por estar siempre para escucharme y salvar todas las preguntas, predispuesta a tomarse todo el tiempo para explicar cada una de mis dudas y permitir hacer volar mi imaginación en el mundo de la ciencia. No puedo olvidarme de mi gran compañero el Dr. Jaun Pablo Mackern por estar siempre brindando su apoyo y alentándome a seguir adelante, me contagia su entusiasmo a creer que se puede, más que un compañero un gran amigo. Quiero agradecerle a Norma Carreño que por años me espero con ricos mates por las mañanas, a Elisa que con su compañía hace que los días tengan otro color. Un especial agradecimiento a las amigas que encontré en este camino a Mayra, una persona excelente, que siempre me brindó su apoyo y conocimiento y lo mejor de todo su gran amistad. A Ivonne una pequeña gran persona que pese a todo siempre esta con una sonrisa cálida y dulce. A Mage increíble personita que me apoyó siempre hasta en los últimos momentos de mi tesis. A Esteban, mi gran amigo de los buenos mates y consejos. A Guille, Flavia, Paola, Martín G, Flavia B, Jorge, Analía, Vický, Laura Gomez, Marina, Patricia, Jaun, Diego, a todos los que de alguna manera formaron parte de los buenos momentos en el Instituto. A los investigadores que día a día reafirmar que vale la pena seguir adelante: Teo, Mariella, Mariel, Laura V. Rubén.

Por último agradecer a todos los del IMBECU y a las personas que integran PROBIOOL

A todos y cada uno... GRACIAS....

ABREVIATURAS UTILIZADAS

3V: tercer ventrículo
ARC: núcleo arcuato
C/EBP: proteína de unión al potenciador de la caja CAAT
CL: cuerpo lúteo
CoA: co-activadores
CoR: co-represores
DA: dopamina
DIO1, DIO2 y DIO3: deiodinasas yodotironina tipos I, II y III respectivamente.
DUL ó LBD: dominio de unión al ligando
E₂: estrógeno
EM: eminencia media
ERs: elementos de respuesta a hormonas
FS: células folículo-estrelladas
FSH: hormona folículo-estimulante
GH: hormona de crecimiento
GnRH: hormona liberadora de las gonadotrofinas
HMB; hipotálamo medio basal
HTs: hormonas tiroideas
JAK: quinasa Janus
LH: hormona luteinizante
LP: lactógeno placentario
MAPK: map kinasa
MCT10: transportador 10 monocarboxilado
MCT8: transportador 8 monocarboxilado
MIT: monoiodotironina
NPV: núcleo paraventricular
NSQ: núcleo supraquiasmático
NTL: núcleo tuberal
OATP1C1: transportador de hormonas tiroideas
P₄: progesterona
PeV: núcleo periventricular
PHDA: sistema dopaminérgico perihipofisial.
PI3K: fosfatidil inositol 3 kinasa
PRL: prolactina
RE: receptor de estrógeno
RP₄: Receptor de P₄
RPRL: receptor de PRL
RTs: receptores tiroideos
RT α : isoforma del receptor tiroideo alfa
RT β : isoforma del receptor tiroideo beta
RXR: receptores retinoides X

SNC: sistema nervioso central

Sp1/Sp3: factor de transcripción

STAT: Transductor de señal y activador de transcripción

T₃: triyodotironina

T₄: tiroxina

TH: tirosina Hidroxilasa

TIDA: sistema dopaminérgico tuberoinfundibular.

TRH: hormona liberadora de tirotrófina

TSH: hormona estimulante de la glándula tiroides

TSH-R: receptor de TSH

RESUMEN

El hipertiroidismo (HiperT) compromete la fertilidad femenina afectando el ciclo, embarazo y lactancia. La prolactina (PRL) es clave en las adaptaciones fisiológicas para una gestación y lactancia exitosa. Diversos estudios demuestran que el HiperT afecta la secreción de PRL.

Hipótesis: El HiperT afecta la actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas, que regulan la secreción de PRL.

Objetivo: Determinar los mecanismos por el cual el HiperT afecta la secreción de PRL al final de la gestación y durante la lactancia en la rata.

Metodología: Se indujo HiperT por inyección diaria de T₄ subcutáneo (sc) desde ocho días antes del inicio de la gestación hasta el sacrificio en los días 19, 20 y 21 de gestación y 2 de lactancia. Se midió la expresión hipotalámica del mRNA (PCR en tiempo real) y proteína (*Western blot*), de tirosina hidroxilasa (TH), receptor de prolactina, miembros de la vía de señalización de PRL (STAT5, SOCS, CIS), receptores de estrógeno (RE α), progesterona (RP), tiroideos (RTs) y retinoides (RXR), sus moduladores (CoA1, CoA2, NCoR1 y NCoR2), deiodinasas (DIO1, DIO3) y transportadores de hormonas tiroideas (MCT8, MCT10, OATP1C1). Además se evaluó por Inmunofluorescencia la expresión hipotalámica de RTs en neuronas TH+.

Resultados: El HiperT provocó un adelanto del pico pre-parto de PRL, redujo los niveles de PRL durante la lactancia, aumentó la expresión de TH (mensajero y proteína) y p-TH, y alteró el patrón de expresión de RE α , RP, RPRL y miembros la vía de señalización de PRL a un patrón indicativo de sensibilidad aumentada a PRL. También afectó a la expresión de RTs, RXR, CoAs y NCoRs. Finalmente pudimos identificar neuronas dopaminérgicas que expresan RTs.

Conclusiones: El HiperT afecta directamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas al final de la gestación, haciendo que las mismas pierdan refractariedad a la PRL y mantengan activo el retrocontrol negativo corto de PRL, comprometiendo así la lactancia.

Índice

Capítulo 1: Introducción

1.1	Introducción General.....	1
1.2	Control hormonal de la Reproducción y Gestación.....	2
1.3	Sistema hipotálamo-hipofisiario en la reproducción.....	3
1.3.1	Prolactina.....	3
1.3.1.1	Receptores de Prolactina.....	8
1.3.2	Control neuroendócrino de la secreción de PRL.....	11
1.3.3	Dopamina: “Principal inhibidor de la secreción de PRL”.....	11
1.3.4	El mecanismo de feedback corto en las neuronas dopaminérgicas está sujeto a regulación dependiendo de los estados fisiológicos y del ambiente hormonal.....	15
1.4	Hormonas ováricas.....	16
1.4.1	Estrógeno.....	17
1.4.1.1	Receptores de estrógeno.....	18
1.4.2	Progesterona.....	20
1.4.2.1	Receptores de Progesterona.....	21
1.5	Hormonas Tiroideas.....	24
1.5.1	Fisiología y síntesis de las HTs.....	24
1.5.2	Receptores de HTs.....	25
1.5.3	Regulación de la secreción y acciones de las HTs.....	27
1.6	Hormonas Tiroideas y Reproducción.....	33
Capítulo 2: Objetivos.....		36
2.1	Hipótesis.....	36
2.2	Objetivos Generales.....	36
2.3	Objetivos Específicos.....	36/37
Capítulo 3: Materiales y Métodos Generales.....		38
3.1	Animales y modelos experimentales.....	38

3.2	Determinaciones de concentraciones hormonales.....	40
3.3	Aislamiento de ARN.....	40
3.4	Síntesis de ADNc.....	41
3.5	PCR en tiempo real.....	41
3.6	Receptores de Hormonas Tiroideas Expresión de tirosina hidroxilasa, RP, RE y de las isoformas del receptor de la hormona tiroidea por <i>Western blot</i>	44
3.7	Expresión de fosfo-tirosina hidroxilasa, STAT5, CIS y RTβ1 por Western blot.....	44
3.8	Condiciones de incubación y anticuerpos utilizados para la determinación de la expresión de las distintas proteínas.....	45
3.9	Inmunofluorescencia	46
3.10	Análisis estadístico.....	48
	Capítulo 4: Resultados	49
4.1.2	Efecto del hipertiroidismo sobre las hormonas tiroideas circulantes al final de la gestación y en el posparto temprano.....	51
4.1.3	Efecto del hipertiroidismo en niveles circulantes de PRL y hormonas ováricas al final de la gestación.....	52
4.1.4	Efecto del Hipertiroidismo sobre la expresión de la enzima TH al final de la gestación.....	52
4.1.5	Efecto del hipertiroidismo sobre la expresión de RPRL, STAT5b y miembros de la familia SOCS-CIS en el HMB al final de la gestación.....	54
4.1.6	Efecto del HiperT sobre la expresión del RE y RP al final de la gestación.....	56
4.1.7	Efecto del HiperT sobre los niveles de hormonas circulantes y la expresión de TH, RPRL, STAT5 y los miembros de la familia SOCS-CIS en el HMB en lactancia temprana.....	58
	Discusión.....	59
4.2	Efecto del hipertiroidismo sobre puntos de regulación de la acción de las hormonas tiroideas.....	64
4.2.1	Efecto del HiperT sobre la expresión de los Receptores Tiroideos en el HMB al final de la gestación.....	66

4.2.2 Efecto del HiperT sobre la expresión de los comoduladores en el HMB al final de la gestación.....	68
4.2.3 Efecto del HiperT sobre la expresión de los transportadores y deiodinasas en el HMB al final de la gestación.....	69
4.2.4 Efecto del HiperT sobre la expresión de los RTs, comoduladores, transportadores y deiodinasas en el HMB en la lactancia temprana (L2).....	70
Discusión.....	71
4.3 Localización de los receptores tiroideos en el HMB por inmunofluorescencia.....	74
4.3.1 Localización de la expresión del RT α 1 en HMB al final de la gestación de la rata.....	74
4.3.2 Localización de la expresión del RT β 1 en HMB al final de la gestación de la rata.....	76
4.3.3 Localización de la expresión del RT β 1 y STAT5 en HMB al final de la gestación de la rata.....	77
Discusión.....	78
Capítulo 5: Conclusiones Generales	80
Bibliografía	84

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL:

Las patologías tiroideas son frecuentes en mujeres de edad fértil y están implicadas en una gran variedad de desórdenes reproductivos. En la mujer el hipertiroidismo (HiperT) no tratado produce irregularidades menstruales y aumento de nacimientos prematuros (Thomas & Reid 1987, Becks & Burrow 1991) mientras que el hipotiroidismo (HipoT) está asociado con irregularidades menstruales, fertilidad subnormal, elevadas tasas de aborto y con hiperprolactinemia. En la rata, el HiperT inducido por dosis diarias altas de T₄ (1 mg/kg/día) produce alteraciones en el ciclo y en la secreción preovulatoria de hormonas (Freeman *et al.* 1976, Jahn *et al.* 1995), parto prematuro causado por un adelanto en la luteólisis, mayor número de crías que el promedio, ausencia casi total de lactancia (a pesar de que la lactogénesis es normal) y alteraciones en el parto y la conducta maternal (Rosato *et al.* 1992). Ratas tratadas con una dosis menor de T₄ (tetrayodotironina, 0.1 mg/kg/día) pueden mantener la lactancia pero las camadas tienen una tasa reducida de crecimiento, causada por un bloqueo parcial del reflejo de eyección láctea e involución prematura de la glándula mamaria (Varas *et al.* 2002).

La prolactina (PRL) es fundamental en la reproducción femenina y participa de manera protagónica en las adaptaciones fisiológicas del organismo maternal necesarias para lograr una gestación y lactancia exitosa. En las últimas décadas se han profundizado los estudios de las acciones de PRL a nivel del sistema nervioso central (SNC) ya que comanda la regulación neuroendocrina de los procesos reproductivos. Tanto el HiperT como el HipoT afectan la secreción de PRL. Dado que TRH es un factor liberador de PRL conocido, es muy probable que los cambios en PRL observados tanto en el HiperT como en el HipoT sean secundarios a cambios en TRH hipotalámica producidos por el exceso o déficit de hormonas tiroideas (HTs). Sin embargo, no se puede descartar que las HTs también afecten la actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas que regulan la secreción de PRL hipofisaria.

Las HTs, triyodotironina (T₃) y T₄ participan en diversos procesos fisiológicos, tienen una participación esencial en el mantenimiento del metabolismo basal del organismo y son requeridas para el normal funcionamiento de casi todos los tejidos. Las HTs controlan varios aspectos del desarrollo y la homeostasis, intervienen en la diferenciación y crecimiento de tejidos, principalmente favoreciendo el crecimiento y desarrollo del cerebro durante la vida fetal participando en la neurogénesis, el crecimiento axonal y dendrítico, la sinaptogénesis, la migración neuronal, la mielinización y la muerte

neuronal (Chan & Kilby 2000, Kohrle 2000). También intervienen en el crecimiento de los huesos y órganos reproductivos en los primeros años de vida.

Las etiologías más comunes de las patologías o enfermedades tiroideas se deben a deficiencias en el aporte dietario de yodo (para el HipoT), alteraciones patológicas de la tiroides que afectan la producción de hormonas tiroideas o patologías autoinmunes que producen anticuerpos que estimulan o inhiben la función de la glándula. También existen diversas condiciones en donde el aporte de yodo y el funcionamiento de la glándula tiroidea son normales, pero existe un defecto en la transducción de la señal de las HTs. El efecto general de estas hormonas consiste en regular la transcripción nuclear de un gran número de genes, mediada por los receptores de las hormonas tiroideas (RTs), presentes en la mayoría de los tejidos, siendo el resultado neto un aumento generalizado de la actividad funcional de todo el organismo o de casi todos los tejidos corporales. La regulación espacio-temporal de la expresión de cada una de las isoformas de dichos receptores, es crítica para el desarrollo adecuado de la anatomía y función de las diversas regiones del cerebro y médula espinal.

Durante el desarrollo de un individuo hay etapas fundamentales que pueden predisponer a determinadas patologías en la vida adulta, siendo de suma importancia el periodo de vida intrauterina y la fase de lactancia. Por ejemplo la malnutrición materna durante el embarazo y/o la lactancia puede llevar a enfermedades metabólicas en la vida adulta del lactante (Bonomo *et al.* 2008). Por otro lado, el periodo de transición que existe entre el final de la gestación y el comienzo de la lactancia es un proceso crucial, ya que en esta etapa el cerebro materno debe sufrir adaptaciones para desarrollar un comportamiento materno adecuado y alcanzar los niveles hormonales de PRL adecuados para lograr una lactancia exitosa. Las patologías tiroideas tienen efectos directos y profundos sobre la fisiología materna y el desarrollo fetal. Además, los efectos que tienen sobre el transcurso de la gestación y la eficiencia de la lactancia impactan sobre el desarrollo del lactante que pueden ocasionar déficits cognitivos y problemas de salud en la vida adulta.

1.2 CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCIÓN Y GESTACIÓN

La gestación comprende múltiples procesos que tienen como objetivo el desarrollo y crecimiento de uno o más miembros de la misma especie de los progenitores. Se denomina gestación al período que transcurre entre la implantación en el útero del óvulo fecundado y el momento del parto. Comprende todos los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo fetal en el interior del útero materno, así como los cambios fisiológicos, metabólicos e incluso morfológicos que se producen en la madre encaminados a proteger, nutrir y permitir el desarrollo del feto (Russell *et al.* 2001), como son la interrupción de los ciclos menstruales o el desarrollo de las glándulas mamarias para la lactancia, así como también adaptaciones neurológicas del cerebro materno para desarrollar una apropiada conducta

maternal. Muchas de estas adaptaciones involucran cambios en las funciones del cerebro maternal que conducen a las fluctuaciones hormonales características de la gestación, fluctuaciones hormonales que a su vez, participan en los cambios funcionales del cerebro. Por ejemplo, se producen cambios en la respuesta al estrés, en comportamientos de ingesta de alimentos, etc. Es necesario que la madre ajuste su metabolismo a los requerimientos necesarios para posibilitar un adecuado crecimiento de la unidad feto-placentaria y preparar el organismo materno para la futura lactancia. Esto se logra gracias a la acción de diversas hormonas esteroidales y peptídicas implicadas en el proceso reproductivo. Las hormonas peptídicas son producidas por la glándula pituitaria y las esteroideas son liberadas por los ovarios durante el ciclo sexual. En diferentes momentos luego de la fertilización, algunas hormonas esteroideas son secretadas por la placenta o por el embrión/feto y membranas extraembrionarias anexas. Una adaptación crucial del organismo materno es la de los sistemas de regulación de la secreción de PRL, durante la gestación y la lactancia (Grattan 2002). La PRL es la hormona rectora de la lactancia, que tiene roles clave en la diferenciación mamaria durante la gestación, y sobre todo en el control de la producción de leche después del parto. Por lo tanto, la presencia de niveles circulantes adecuados de PRL es fundamental para una gestación, y especialmente una lactancia exitosa.

La gestación en la rata dura aproximadamente 22 días, durante los cuales la secreción de las hormonas sufre cambios; durante la primera mitad de la gestación, la hipófisis anterior materna secreta PRL y en la segunda mitad la placenta es la encargada de proveer los lactógenos placentarios (LPs). Los niveles séricos de PRL varían durante la gestación y estas variaciones pueden describirse o categorizarse en tres etapas: temprana, media y tardía (Figura 1.1). En la rata la estimulación vagino-cervical inducida por la copulación dispara la secreción bifásica de PRL durante los primeros diez días de preñez con un patrón que muestra un pico diurno y otro nocturno, estos picos son los encargados de mantener la funcionalidad del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona (P_4) en la primera mitad de la preñez (Butcher *et al.* 1972). La segunda fase de la secreción de PRL ocurre alrededor de la mitad de la preñez (8/10 días), aquí el evento está asociado con la aparición de los LPs. Los LPs son estructuralmente homólogos a la PRL (Voogt *et al.* 1982, Voogt 1984) y tienen acciones similares a ella uniéndose a los receptores de PRL, manteniendo la función lútea, la diferenciación mamaria y activando el sistema de inhibición de la secreción de PRL (Demarest *et al.* 1983a, Demarest *et al.* 1983b, Tonkowicz & Voogt 1984, Lee & Voogt 1999). Dos formas de los LPs han sido identificadas en la rata, el lactógeno placentario-I (rLP-I) y el II (rLP-II). El rLP-I está presente desde el día 8 de gestación alcanzando niveles circulantes máximos alrededor del día 13, (Robertson *et al.* 1982) y podría estar involucrado en el fin de la secreción bifásica de PRL (Tonkowicz & Voogt 1983) mientras que el rLP-II se detecta cerca del día 10 de gestación y alcanza niveles máximos poco antes del parto (Robertson & Friesen 1981). Ambos LPs se unen a los receptores de PRL (RPRL) activando el

feedback corto de PRL a nivel hipotalámico, que inhibe la secreción de PRL hipofisaria; Sin embargo a partir del día 15 de gestación esta inhibición está comandada por P_4 , con una escasa participación del rLP-II (Jahn *et al.* 1986). La tercera fase de la secreción de PRL durante la gestación ocurre al final de la gestación unas 24 a 36 horas previas al parto, cuando suceden distintos cambios en los mecanismos que controlan la secreción de PRL.

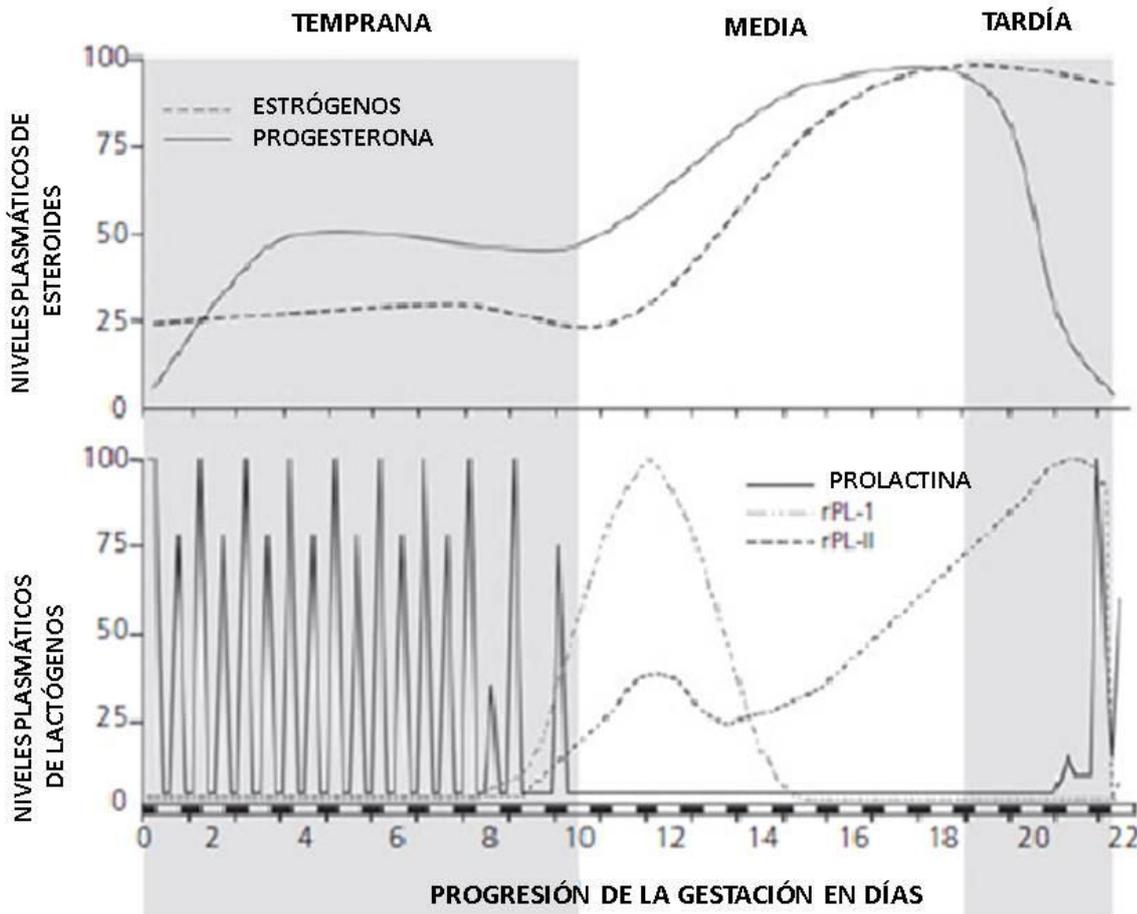


Figura 1.1: Diagrama representativo de los cambios de las hormonas reproductivas durante la gestación en la rata. A) Esteroides ováricos. B) Hormonas lactogénicas, prolactina (PRL), lactógenos placentarios I (rPL-I) y lactógenos palcentarios II (rPL-II) (Grattan *et al.* 2008).

El ovario secreta hormonas, principalmente estrógeno (E_2) y P_4 , que actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis (glándula pituitaria) para regular la secreción de hormonas de estos tejidos, que a su vez, regulan la producción de las hormonas ováricas, estableciéndose un eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Las hormonas ováricas regulan las funciones del sistema reproductivo, los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual y maternal. De estas funciones depende el éxito del desarrollo folicular, ovulación, fertilización y eventualmente el desarrollo embrionario. Los niveles de estrógeno van incrementando a lo largo de la gestación, con un pico cerca del parto (Bridges 1984). Por el

contrario los niveles de P₄ son altos a lo largo de toda la gestación, con una caída rápida a niveles basales aproximadamente 24 horas previas al parto (Bridges 1984).

1.3 SISTEMA HIPOTÁLAMO-HIPOFISIARIO EN LA REPRODUCCIÓN

La participación del SNC y la relación directa entre hipotálamo e hipófisis en la regulación de la reproducción en la especie humana han sido muy bien demostradas. En un comienzo se sugirió un centro sexual en el cerebro, capaz de regular las funciones reproductivas (Hohlweg y Junkmann, 1932), postulándose primero a la hipófisis como “glándula maestra”, pero luego el hipotálamo pasó a tener el rol protagónico. Los primeros estudios en la neuroendocrinología demostraron la importancia de áreas de hipotálamo como la eminencia media (EM), (Harris 1937), de la conexión entre el hipotálamo e hipófisis (Markee & Sawyer 1949) y de los factores estimuladores e inhibidores de la función hipofisaria (Guillemin & Schally 1961), dejando así el rol del hipotálamo como el centro de control. A continuación se hará mención a las principales hormonas que tienen un rol destacado durante la gestación y en la lactancia regulada a través del sistema hipotálamo-hipofisario.

1.3.1 PROLACTINA

La PRL es una de las hormonas hipofisarias más importantes en los procesos reproductivos que se encuentra bajo control hipotalámico. Es secretada principalmente por los lactotropos (células de la glándula hipofisaria anterior) y está involucrada en muchos procesos biológicos incluida la lactancia y la reproducción. La PRL es codificada por un solo gen *PRL* (Figura 1.2), conservado en todos los vertebrados y localizado en el cromosoma 6 en humanos. Aunque en un principio se pensó que el gen de *PRL* tenía cinco exones y cuatro intrones, se ha descrito un exón no codificante adicional (Truong *et al.* 1984, Hiraoka *et al.* 1991). PRL pertenece a una gran familia de proteínas, relacionadas por su homología estructural y solapamiento de propiedades biológicas. Inicialmente, la familia estaba compuesta por PRL, GH y LPs, pero luego se amplió para incluir proteínas similares a PRL, proteínas relacionadas con la PRL, proliferinas, y proteínas relacionadas con proliferina. Los diferentes miembros de la familia PRL / GH / LP se expresan con un patrón espacio temporal específico de cada tipo celular que los produce. El gen que codifica a PRL, codifica una prohormona con un extremo N-terminal de 28 a 30 residuos. Después de la escisión proteolítica la PRL madura en roedores y humanos está compuesta por 197 y 199 aminoácidos respectivamente.

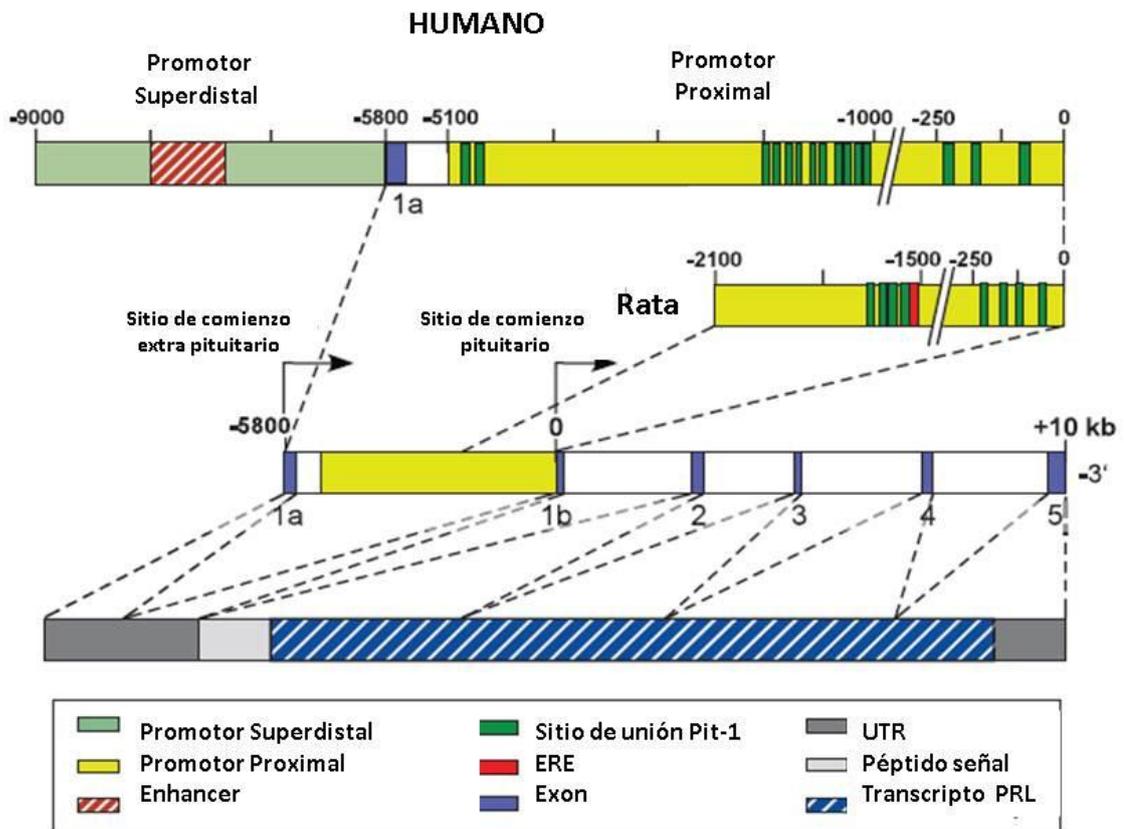


Figura 1.2: Diagrama de los promotores del gen de prolactina en el humano y en la rata y el RNAm transcrito. Las flechas indican los sitios de comienzo de la transcripción para el promotor proximal pituitario y el promotor superdistal extrapituitario (único para los humanos).

La PRL tiene varias isoformas con distintas actividades biológicas. La principal isoforma es la PRL de 23 KDa que consiste de 199 aminoácidos (Freeman *et al.* 2000), posee una fuerte homología estructural con la hormona de crecimiento y con el lactógeno placentario, y pertenece a una gran familia de citoquinas hematopoyéticas de proteínas caracterizadas por una estructura 3D que comprende cuatro hélices α antiparalelas (Horseman & Yu-Lee 1994). Existen varias variantes de PRL en plasma y en la hipófisis, como resultado de modificaciones post-traduccionales, incluida la fosforilación, glicosilación, sulfatación y deaminación (Freeman *et al.* 2000). También se ha identificado la isoforma de 16 KDa, que ha tomado relevancia por sus efectos inhibidores en la angiogénesis y tumorigénesis. Dicha isoforma es un producto derivado de escisión de la PRL nativa por catepsina D o metaloproteasas, en el bucle largo que conecta la tercer y cuarta hélice (Clapp *et al.* 2006). La variante de PRL 16 KDa contiene sólo la parte N -terminal de la proteína madura y por lo tanto ha perdido la capacidad de unirse al receptor.

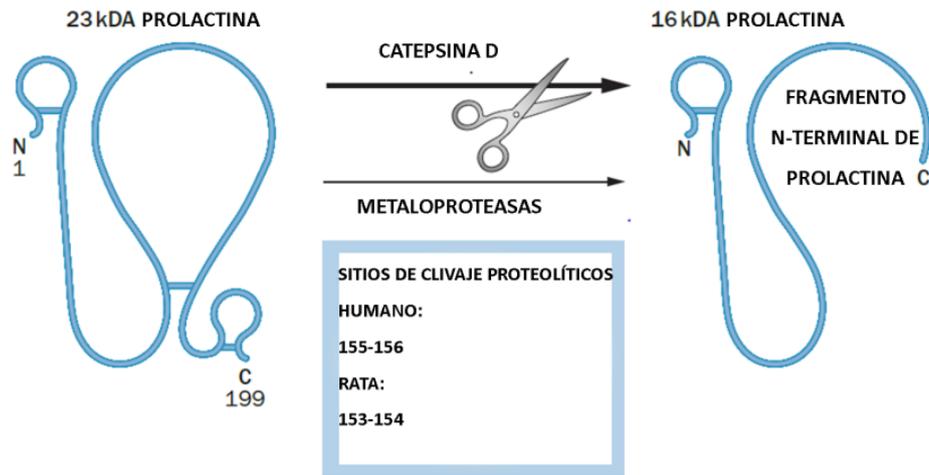


Figura 1.3: Diagrama representativo de prolactina y sus isoformas con los sitios de clivajes para su modificación por catepsina D o metaloproteasas en la rata y humano. (Bernard *et al.* 2015)

Además existen PRL de 14 kDa y 22 kDa, que también derivan del clivaje de PRL de 23 kDa, que pueden ocurrir en el medio extracelular intersticial en la proximidad de los capilares sanguíneos, lo que es sugerente de que existen mecanismos de regulación específica para cada tejido. La variante de 16 kDa se produce en varios tejidos, como retina, miocardio y glándula mamaria (Lkhider *et al.* 2004, Macotela *et al.* 2006), es capaz de unirse a células endoteliales y tiene propiedades antiangiogénicas que llevaron a postularla como “vasoinhibidor” (Clapp *et al.* 2006). Además de estas PRLs, podemos encontrar en circulación dos formas adicionales, referidas como la ‘big PRL’ y la ‘bigbig PRL’ (también llamada macroprolactina), con pesos moleculares que superan los 100 kDa, pero de actividad biológica mínima *in vivo* y sin función patológica (Fahie-Wilson & Smith 2013). Si bien los lactotrofos son la principal fuente de PRL, otros órganos y tejidos también poseen capacidad de sintetizarla y secretarla. Esta PRL se denomina extrapituitaria (PRLe), puede sintetizarse en varios tejidos y órganos, y es regulada por mecanismos diferentes a los de la PRL de origen pituitario (PRLp) (Marano & Ben-Jonathan 2014). La diferencia entre la PRLe y la PRLp es que el mRNA de la PRLe contiene 150 pb adicionales. Sin embargo las estructuras de ambas prolactinas son idénticas y ambas pueden unirse al RPRL. Los principales sitios de síntesis y secreción de PRLe son la glándula mamaria, decidua, ovario, próstata, testículos, linfocitos, células endoteliales y cerebro (Ben-Jonathan *et al.* 1996). Hay otras fuentes de PRLe como los folículos de la piel y el pelo, tejido adiposo, y la cóclea (Brandebourg *et al.* 2007, Langan *et al.* 2010, Marano *et al.* 2013). La función de la PRLe parece ser autocrina, como por ejemplo en las células de la glándula mamaria donde actúa induciendo la diferenciación celular al final de la gestación (Chen *et al.* 2012).

La PRL posee alrededor de 300 acciones, entre las que podemos mencionar la producción de leche en mamíferos, la osmo-regulación en peces, comportamiento de nidación en aves como así también el crecimiento y la metamorfosis de anfibios (de Vlaming *et al.* 1979, Bole-Feysot *et al.* 1998). Posee múltiples roles reproductivos pero también numerosos roles en la homeostasis del organismo. Debido a éstos múltiples roles y fuentes de PRL, Bern y Nicoll le sugirieron el nombre de omnipotina o versatilina. Las acciones más estudiadas son sobre la glándula mamaria, en especial sobre la síntesis de la leche y su acción luteotrófica en algunos roedores. Las acciones a nivel mamario son fundamentales para la reproducción de los mamíferos. Tanto es así, que la hipoprolactinemia lleva a una lactancia deficiente que compromete la supervivencia de las crías. En la rata sus acciones luteales son fundamentales para mantener la gestación. También, se ha demostrado que la secreción de PRL varía a lo largo de la vida de muchos mamíferos y dentro de ellos la rata es uno de los más estudiados. Las variaciones son importantes para entender su rol en el ciclo reproductivo. En las ratas hembras pre-puberales los niveles séricos de PRL son bajos hasta el día 37 de edad y luego comienzan a modificarse hasta que se establece el ciclo estrual. Durante éste, la secreción de PRL se caracteriza por un pico en el proestro (Sar & Meites 1968), el cual puede reaparecer o no en el estro. También la secreción está elevada en la pseudopreñez y en la primera parte de la preñez (en forma de dos picos diarios) (Kwa & Verhofstad 1967), y al final de la misma mostrando un aumento progresivo en los niveles séricos en momentos previos al parto. En el posparto y durante la lactancia sus niveles permanecen altos mientras dure el estímulo de la succión.

Es necesario destacar que la PRL proviene fundamentalmente de la hipófisis anterior y es indispensable para la gestación y la lactancia de la rata. Durante la preñez, a través de su unión a los RPRL, actúa sobre las células del cuerpo lúteo (CL) del ovario para estimular la secreción de P_4 y sobre las células del tejido mamario promoviendo la proliferación y diferenciación del mismo, junto con otras hormonas. En la lactancia la PRL actúa sobre las células epiteliales de la glándula mamaria estimulando la síntesis de varios componentes de la leche e inhibiendo la involución mamaria. Además se ha demostrado más recientemente que durante la gestación y la lactancia la PRL actúa en el SNC, participando en la modulación de las funciones hipotalámicas relacionadas con el comportamiento materno y con el establecimiento de la lactancia. La PRL, junto con otras hormonas lactogénicas como los LPs, son importantes en la reorganización y coordinación neuronal para lograr las adaptaciones neuroendocrinas y comportamentales del cerebro materno en gestación y durante la transición hacia la lactancia (Grattan *et al.* 2001a, Grattan *et al.* 2001b, Bridges & Grattan 2003).

1.3.1.1 RECEPTORES DE PRL

La acción de PRL es mediada por su unión a receptores de transmembrana, (RPRL), que pertenecen a la superfamilia de receptores hematopoyéticos de citoquinas (Bole-Feysot *et al.* 1998), que pueden ser fosforilados por proteínas citoplasmáticas. La estructura de los miembros de esta superfamilia es única y comprende un dominio extracelular con dos puentes disulfuros esenciales para la unión con su ligando y el dominio intracelular que traduce la señal. Este dominio intracelular o citoplasmático contiene dos regiones (*Box1* y *Box2*) altamente conservadas en los receptores de citoquinas (Kelly *et al.* 1991). La región *Box1* está compuesto por 8 aminoácidos, es rico en prolina y residuos hidrofóbicos y adopta una configuración plegable que reconoce específicamente el mecanismo de transducción por tirosina quinasas (Lebrun *et al.* 1994, Tanner *et al.* 1995). La región *Box2* está mucho menos conservada que la región *Box1* y consiste en residuos hidrofóbicos cargados negativamente seguido por residuos cargados positivamente. El gen del *RPRL* está ubicado en el cromosoma 5 en humanos y en el 2 en la rata (Arden *et al.* 1990, Hu *et al.* 1999). En mamíferos el *RPRL* contiene por lo menos 10 exones, y tras distintos cortes y empalmes alternativos surgen distintas isoformas. Todas las isoformas tienen un dominio extracelular idéntico, pero la porción intracelular varía para cada una de las variantes, que puede ser larga, intermedia o corta (Kline *et al.* 1999, Hu *et al.* 2001) (Figura 1.4). Además de las diferentes isoformas unidas a la membrana existe una forma soluble denominada proteína de unión a PRL, que contiene sólo el dominio extracelular, y puede ser generado por *splicing* alternativo o por clivaje directamente del receptor de membrana. La expresión del *RPRL* está regulada de manera diferencial en los distintos tejidos bajo distintos promotores, por ejemplo: el gen del *RPRL* en la rata posee tres promotores, PI, PII y PIII, el promotor PI es gónada específico, el PII es hígado específico y el PIII es ubicuo y puede ser activado por C/EBP y Sp1/Sp3.

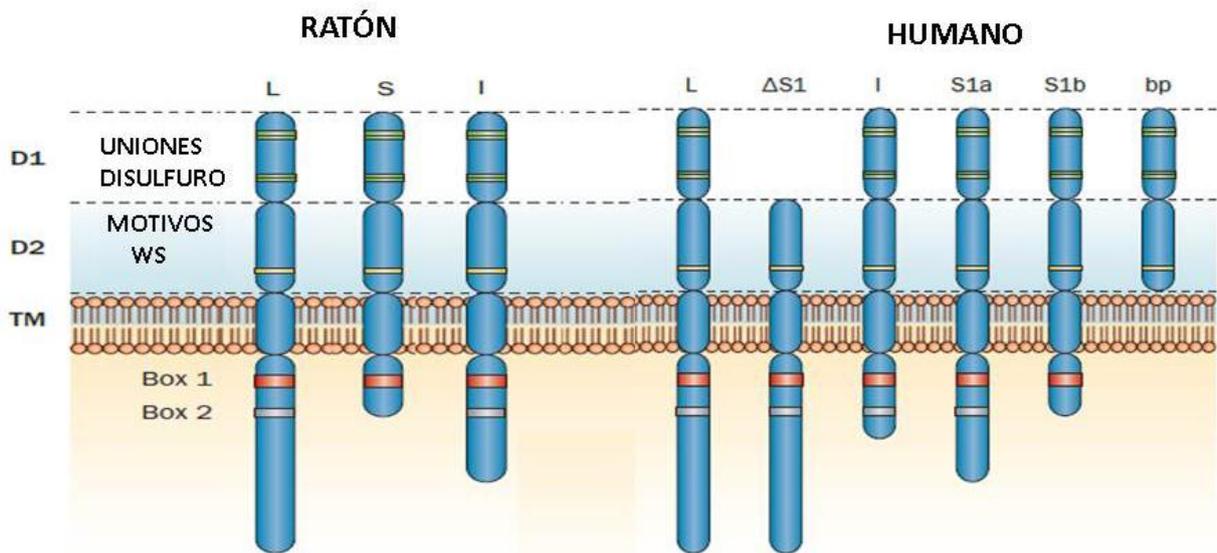


Figura 1.4: Receptor de prolactina (RPRL) en ratón y humano. La proteína del RPRL consiste de un dominio extracelular que comprende dos sitios de unión (D1 y D2) y un dominio transmembrana que está conservado entre las especies y un dominio citoplasmático de longitud y composición variables. Características tales como un enlace disulfuro y un motivo triptófano-serina así como los *Box 1* y *Box 2* se encuentran conservados. Múltiples isoformas que han sido identificados en roedores y humanos resultan del empalme alternativo de un transcrito primario de ARNm. Las formas larga, corta e intermedia han sido caracterizadas, así como una forma soluble del receptor representada únicamente por el dominio extracelular que contiene el sitio de unión a PRL. Abreviaciones: bp: sitio de unión a prolactina; D1, dominio de unión 1; D2, dominio de unión 2; I, isoforma intermedia; L, isoforma larga; S, isoforma corta; TM, dominio transmembrana; WS, motivos triptófano serina. (Bernard *et al.* 2015).

La unión de PRL a su receptor activa varias vías de señalización, que incluyen JAK-STAT, MAPK, y la PI3K. La activación de estas cascadas da como resultados finales: diferenciación, proliferación, supervivencia y secreción. Dicha activación es a través del receptor largo de prolactina (RPRL largo) que activa muchas quinasas, pero la principal y la más estudiada es la vía JAK-STAT, donde la unión con el ligando lleva a la fosforilación, por la quinasa JAK2, de residuos de tirosina en la parte intracelular del receptor, lo que ocasiona la dimerización del mismo, concomitantemente se autofosforilan los sitios SH2 de JAK2, donde JAK esta constitutivamente unida al receptor. Este paso es crítico ya que lleva al reclutamiento y fosforilación de miembros citoplasmáticos, denominados STAT, de la vía que activan la transducción de la señal (Goffin *et al.* 2002). Por otro lado, también se ha descrito la activación de la familia Src de tirosina quinasas, necesaria para la proliferación inducida por PRL (Fresno Vara *et al.* 2001, Garcia-Martinez *et al.* 2010). En tercer lugar podemos nombrar la activación de la fosfatidilinositol 3 fosfato-quinasa (PI3K)/AKT, vía de las MAPK y serina/treonina quinasa (Figura 1.5). La activación de estas vías induce la transcripción de genes que

responden a PRL, como los genes que codifican proteínas involucradas en la proliferación (como la ciclina D1) y en la diferenciación celular. La activación de cualquiera de estas vías tiene como destino el núcleo celular donde se activan los genes blanco de PRL, que a su vez, en las neuronas hipotalámicas hipofisotropas, participan en la regulación de la secreción de la propia PRL, como por ejemplo el gen de la enzima tirosina hidroxilasa (TH).

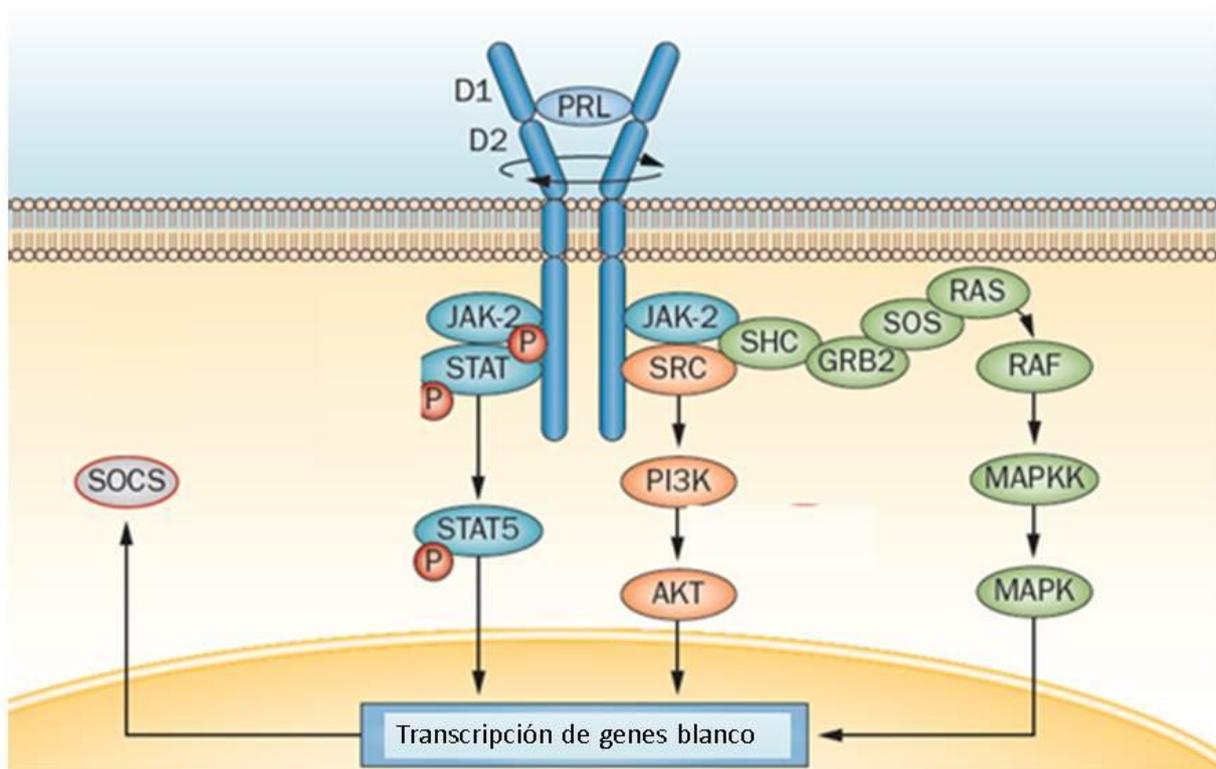


Figura 1.5: Principales cascadas de señalización desencadenadas por PRL cuando se une a la isoforma larga de receptor. El receptor existe predominantemente como un monómero, que dimeriza con la unión a PRL, formando un homodímero. Las principales vías involucran la tirosina quinasa JAK-2, la cual activa STAT5. La vía MAPK es otra importante cascada activada por PRL, que involucra a SHC/GRB2/SOS/RAS/RAF como intermediarios *upstream* de MAPK quinasa. El reclutamiento de PI3K conduce a la activación de AKT y la fosforilación de PTEN que regula negativamente esta vía. Abreviaciones: Grb2 receptor de factor de crecimiento 2; JAK-2 Janus kinase 2; MAPK protein quinasa activada por mitógenos; P fosfato; PI3K fosfatidil inositol 3 fosfato, RAF (intermediario del virus del fibrosarcoma de la rata), RAS (intermediario del sarcoma de rata); SOCS supresor de señalización de citoquinas, Src proto oncogen tirosina quinasa; STAT, transductor de señal y activador de la transcripción. (Bernard *et al.* 2015)

1.3.2 CONTROL NEUROENDÓCRINO DE LA SECRECIÓN DE PRL

A diferencia de las demás hormonas hipofisarias, que están sujetas a un control estimulatorio hipotalámico, la PRL está sujeta a un control tónico inhibitorio, ejercido fundamentalmente por el neurotransmisor dopamina (DA), que es producido por neuronas dopaminérgicas hipotalámicas. En animales en estadios fisiológicos distintos a la gestación o la lactancia, la secreción de PRL es principalmente controlada por el retrocontrol corto negativo que actúa a nivel hipotalámico. Un incremento en los niveles de PRL resulta en la activación de las tres poblaciones de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (DeMaria *et al.* 1999) colectivamente referidas como: neuronas neuroedocrinas dopaminérgicas (NEDA) que actúan inhibiendo la secreción de PRL hipofisaria. Las poblaciones que constituyen las neuronas NEDA incluye a las neuronas dopaminérgicas tuberoindundibulares (TIDA), las tuberohipofiseales (THDA) y las periventriculares hipofisiales (PHDA), ubicadas en el núcleo arcuato (ARC) y periventricular (PeV). Estos grupos neuronales expresan tirosina hidroxilasa (TH), enzima reguladora limitante de la síntesis de DA, la cual constituye el punto de control de la vía biosintética de las catecolaminas. La TH es una enzima inducible, cuya actividad está regulada por fosforilación/defosforilación dependiente de AMP cíclico; este y otros mecanismos alteran su tasa de síntesis y degradación. Por consiguiente, existe una correlación directa entre el grado de expresión ó actividad de la TH con el grado de activación de las neuronas dopaminérgicas.

1.3.3 DOPAMINA: PRINCIPAL INHIBIDOR DE LA SECRECIÓN DE PRL.

Después de las demostraciones de una regulación inhibitoria de PRL en los años cincuenta, la búsqueda del factor inhibidor de PRL fue muy controversial. Como las hormonas hipotalámicas hipofisotropas identificadas hasta la fecha eran péptidos, la expectativa era que el “factor inhibidor de PRL” también lo fuera. El rol de las catecolaminas en la regulación de la secreción de PRL se reconoció tempranamente (Barraclough & Sawyer 1959), pero se supuso que las catecolaminas eran neurotransmisores que actuaban en el hipotálamo para regular la liberación de otras hormonas hipotalámicas que eran las que actuaban sobre la hipófisis (Kanematsu & Sawyer 1973). Luego, la presencia de terminales nerviosos dopaminérgicos en la EM (Fuxe 1963), llevó a la propuesta realizada por McLeod de que la dopamina (DA) podría ser liberada a los sistemas portales hipofisarios y así actuar como una hormona hipotalámica. Posteriormente se demostró que agonistas dopaminérgicos eran efectivos en suprimir la secreción de PRL *in vivo*, y que la DA podía inhibir la secreción de PRL en glándulas pituitarias aisladas. También se demostró la presencia de receptores de DA en los lactotropos (células de la hipófisis anterior) (Mansour *et al.* 1990) y que ratones que carecían del receptor dopaminérgico D2 eran hiperprolactinémicos (Kelly *et al.* 1997, Saiardi *et al.*

1997), lo que claramente demostró que la DA es el principal actor en la regulación de la secreción de PRL.

Las principales neuronas dopaminérgicas que controlan la secreción de PRL están localizadas en el núcleo ARC del hipotálamo. Como mencionamos previamente, las neuronas NEDA, divididas en tres subpoblaciones basadas en la anatomía de sus proyecciones, están formadas por las TIDA, THDA y las PHDA (Freeman *et al.* 2000). Las neuronas TIDA surgen del arcuato dorsomedial y proyectan a la zona externa de la EM (Bjorklund *et al.* 1973) donde entran en íntimo contacto con los capilares de los vasos porta largos. A través de éstos, la DA es transportada desde las neuronas TIDA hasta la hipófisis anterior. Las otras dos poblaciones poseen sus cuerpos celulares ligeramente más cercanos al área rostral. Las neuronas THDA residentes en el núcleo arcuato rostral proyectan al lóbulo intermedio y lóbulo posterior de la glandula hipofisiaria (Fuxe 1963, Holzbauer & Racke 1985). Las neuronas PHDA se originan en el núcleo periventricular (PeV) con axones que terminan exclusivamente en el lóbulo intermedio (Goudreau *et al.* 1992). Las neuronas TIDA serían las que producen la regulación clásica de la secreción de PRL a través de la liberación de DA a los vasos portales, mientras que las THDA y las PHDA contribuyen a la regulación basal de la secreción de PRL, a través del transporte de DA a la hipófisis por los vasos portales cortos desde la neurohipófisis (Peters *et al.* 1981). Si bien son anatómicamente distintas, se considera que las tres subpoblaciones tienen actividad similar en la regulación de la secreción de PRL (van den Pol *et al.* 1984). Los vasos portales llevan los factores hipotalámicos a la hipófisis, donde estos actúan regulando la función de los diferentes tipos celulares hipofisarios; entre ellos la DA que inhibirá la secreción de PRL por los lactotrofos.

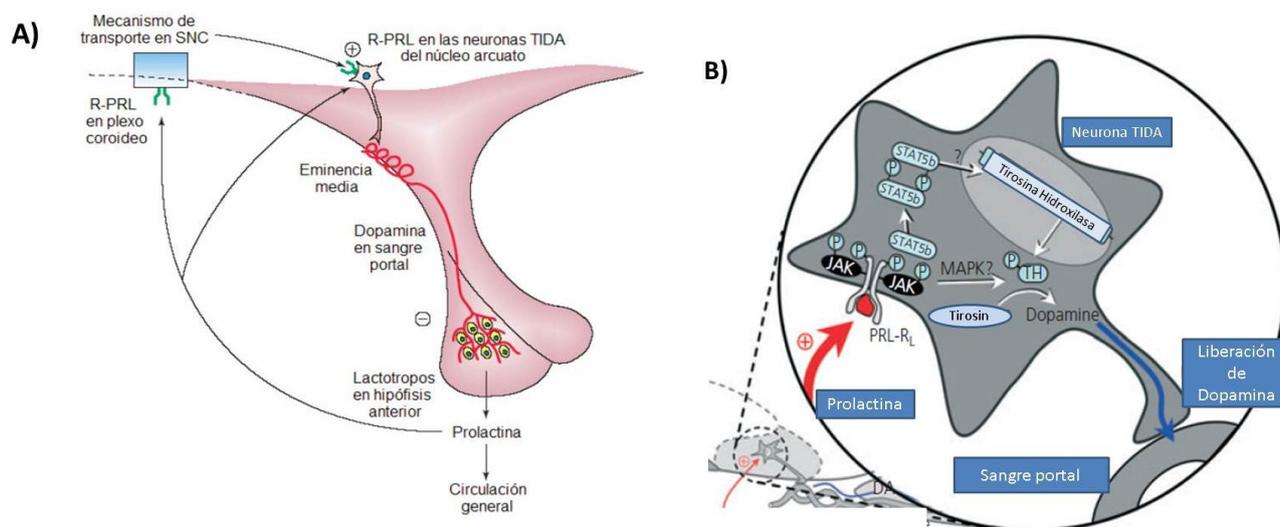


Figura 1.6: Regulación de la secreción de PRL. A) La secreción de PRL desde la hipófisis está sujeta a un control tónico inhibitorio desde el hipotálamo. La principal responsable de esta inhibición es la dopamina, liberada principalmente por las neuronas TIDA localizadas en el núcleo arcuato (ARC), la cual inhibe la producción y secreción de PRL. B) Diagrama ilustrativo de la vía de señalización JAK/STAT que se activa luego de la unión de PRL a la forma larga del receptor (PRL-R_L). Este receptor está asociado a JAK2 que se activa y fosforila al receptor, a sí misma y a STAT5b, el que se recluta formando dímeros que traslocan al núcleo donde se

unen al ADN, activando los genes blanco de PRL. Entre ellos se activa la transcripción de TH, enzima limitante de dopamina, principal inhibidor de PRL. Adaptado de (Grattan *et al.* 2008).

Los lactotrofos poseen actividad basal y espontáneamente secretan PRL en sangre. La DA actúa sobre los receptores D2 presentes en los lactotrofos para inhibir tónicamente la secreción de PRL. Los estímulos que producen la liberación de PRL como el coito, la succión y la administración de estrógenos producen caídas en la liberación de DA hipotalámica, que a su vez, desreprime la liberación de PRL por los lactotrofos. Una vez en circulación, la PRL entra en el cerebro a través de un sistema de transporte (Walsh *et al.* 1987), que involucra a los RPRL expresados en altos niveles en el plexo coroideo. En el hipotálamo, la PRL actúa directamente en las neuronas TIDA que expresan RPRL (Lerant & Freeman 1998). La actividad de las neuronas dopaminérgicas se incrementa de acuerdo a los niveles en sangre de PRL (Demarest *et al.* 1986, Moore 1987). Como mencionamos previamente PRL se une a sus receptores activando la vía de señalización JAK-STAT, (Figura 1.6) que estimula la expresión de los genes blanco de PRL, entre ellos a la TH, la enzima que convierte tirosina en L-dopa, el precursor inmediato de DA, y que es la enzima limitante de la biosíntesis de DA en las neuronas dopaminérgicas (Figura 1.7) (Arbogast & Voogt 1991). TH es regulada básicamente por dos mecanismos: uno rápido que involucra una fosforilación/desfosforilación de la enzima ya existente y otro de larga inducción que lleva a una alteración en la síntesis/degradación de la proteína (Zigmond *et al.* 1989). Además de inducir la síntesis de TH, PRL induce su activación por fosforilación, que incrementa rápidamente la síntesis de DA. La DA es liberada de los terminales nerviosos en la EM y es transportada a través de los vasos del sistema porta hasta la hipófisis anterior. Así, niveles séricos elevados de PRL aumentan la síntesis hipotalámica de DA y la concentración de DA en sangre portal (Gudelsky & Porter 1979), que se dirigen a la hipófisis donde actúan inhibiendo la liberación de PRL. Se ha descrito la presencia de RPRL en todas las poblaciones de neuronas dopaminérgicas neuroendocrinas (Arbogast & Voogt 1997, Lerant & Freeman 1998), proporcionando la base anatómica para el mecanismo de regulación de su propia secreción a través del mecanismo de retroalimentación negativa.

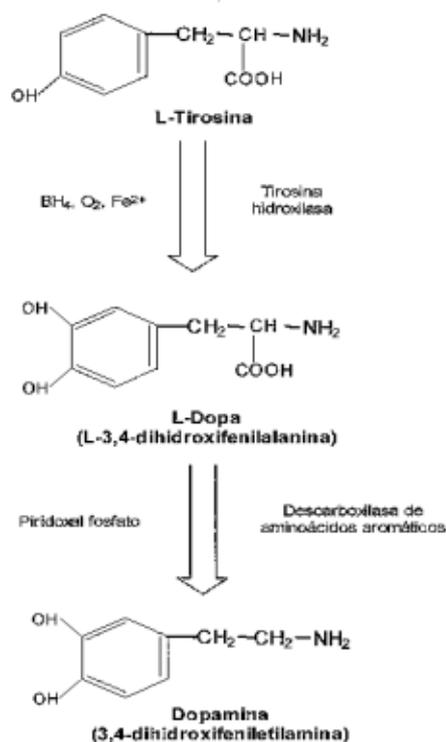


Figura 1.7: Biosíntesis de Dopamina

Para que se establezca el estado de hiperprolactinemia necesario para una lactancia eficiente y así promover la producción de leche que es esencial que durante el final de la gestación y en la lactancia se produzca una atenuación de la activación del retrocontrol corto de PRL en respuesta a los niveles elevados de la hormona (Grattan et al. 2008). Esto es un ejemplo notable de la plasticidad adaptativa del control neuroendocrino, para permitir un periodo de alta secreción de PRL. En la segunda mitad de la gestación, en roedores, el retrocontrol negativo para prevenir la secreción de PRL, es activado por los altos niveles de los lactógenos placentarios (PLs) que son producidos en esta etapa de la preñez. Como mencionamos previamente, los PLs pueden unirse a los RPRL activando el mecanismo de retrocontrol. La actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas es mantenida por la presencia de los PLs, por lo que la secreción de PRL pituitaria es baja. A pesar de la presencia de los PLs, al final de la gestación decrece la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas (Andrews et al. 2001) asociada con el aumento de la PRL en la tarde-noche previa al parto (Grattan & Averill 1990, 1995). Aparentemente de las neuronas dopaminérgicas no responden a los niveles de PRL ni a los PLs y no activan su retrocontrol negativo (Grattan & Averill 1995, Fliestra & Voogt 1997). Esta adaptación persiste durante la lactancia y la secreción de DA permanece baja a pesar de los niveles elevados de PRL (Ben-Jonathan et al. 1980, Demarest et al. 1983).

Así, se puede apreciar que las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas se activan según cual sea el estadio fisiológico en el que se encuentre el organismo en relación a la regulación de la secreción de

PRL. En cualquier estadio fisiológico distinto a la gestación o la lactancia, frente a un estímulo que induzca aumento de la secreción de PRL, ésta autolimitará su propia secreción y/o síntesis, a través del establecimiento a nivel hipotalámico del retrocontrol corto mencionado. Durante la segunda mitad de la gestación, cuando los niveles de PRL deben mantenerse bajos, cualquier estímulo de liberación de PRL produce la activación de estas neuronas dopaminérgicas, activándose el retrocontrol corto, pero además la P₄ estaría involucrada asegurando que los niveles de PRL se mantengan bajos. En el final de la gestación y durante la lactancia, la PRL es necesaria en niveles elevados, por lo que las propias neuronas dopaminérgicas deben cambiar su sensibilidad y volverse refractarias a los niveles de PRL, atenuando el mecanismo de retrocontrol, esto a su vez sería ayudado por los niveles de estrógeno, que activarían la vía alternativa para inhibir a STAT5, que bloquea la señalización de PRL (Figura 1.8).

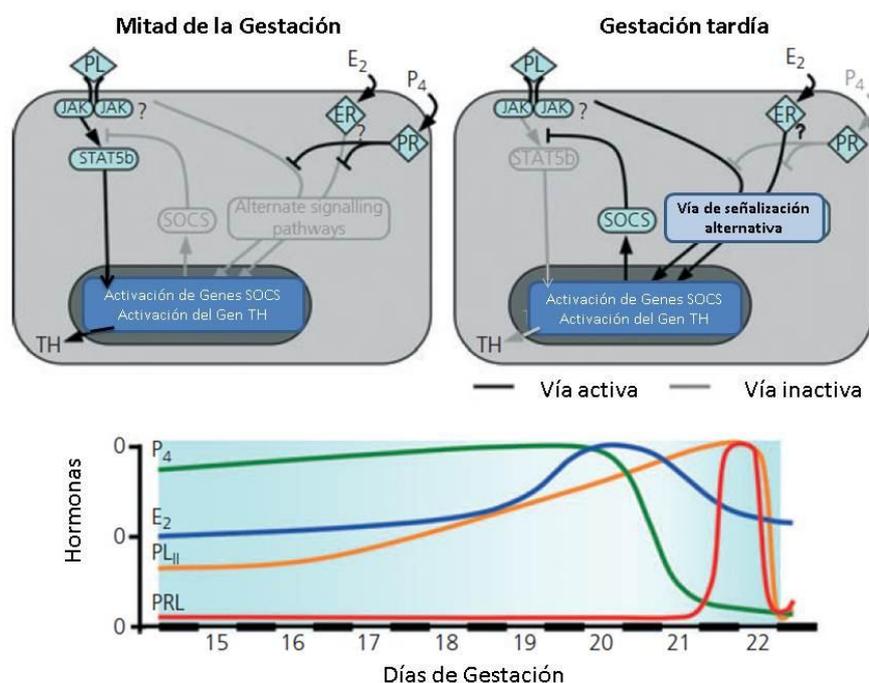


Figura 1.8: Modelo que propone los cambios en la regulación de secreción de PRL en la transición desde la mitad de la gestación al final de la misma y los cambios de las hormonas ováricas que acompañan este proceso. Propuesta de cómo intervienen P₄ y E₂ sobre la vía JAK/STAT. (Grattan *et al.* 2008)

1.3.4 EL MECANISMO DE RTROCONTROL CORTO EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS ESTÁ SUJETO A REGULACIÓN DEPENDIENDO DE LOS ESTADOS FISIOLÓGICOS Y DEL AMBIENTE HORMONAL.

STAT5b es un mediador crítico de la acción de la PRL en las neuronas TIDA. Por ejemplo la pérdida de respuesta de las neuronas TIDA durante la lactancia parece ser debida a la disminución de la fosforilación y posterior traslocación de STAT5b al núcleo. Han sido identificados varios factores que pueden suprimir esta vía , por ejemplo la familia de receptores de citoquinas que contienen dominio

SH2: proteínas tirosina fosfatasa 1 (SHP-1), proteínas inhibidoras de la actividad de STATs (PIAS) y los supresores de la señalización de citoquinas (SOCS). Estas proteínas cooperan para disminuir la respuesta de la señalización de citoquinas. Las SHP-1 y las PIAS son constitutivamente expresadas por la célula y poseen diversas funciones en la regulación de respuestas rápidas. Por el contrario las proteínas SOCS están involucradas en la pérdida de respuesta de la señalización de PRL en neuronas dopaminérgicas durante la gestación y la lactancia (Anderson *et al.* 2006a, Anderson *et al.* 2006c). Se han identificado ocho miembros de la familia SOCS (SOCS1 a SOCS7 y CIS). El mecanismo de acción preciso de estas proteínas varía entre los diferentes miembros de la familia SOCS. Los dominios SH2 de las proteínas STAT5 y las proteínas SOCS están conservados, es por este dominio que ambas proteínas se unen al dominio kinasa de JAK2. En el dominio kinasa de JAK es donde ocurre la actividad catalítica del mismo, lugar donde se une STAT5, fosforilándose y activando la cascada de señalización. Cuando se encuentran presentes las proteínas SOCS, específicamente SOCS3 y CIS compiten por el sitio de unión con STAT5 bloqueando el acceso de STATs a los sitios de unión al receptor (Kile *et al.* 2001), inactivando de esta manera la señalización de PRL. En cambio SOCS1 directamente suprime la activación de la vía JAK2. Ambas acciones interrumpen la fosforilación y posterior translocación de STAT5 al núcleo, interrumpiendo así la señalización de PRL. Es interesante que SOCS2 a diferencia de otras proteínas SOCS puede actuar inhibiendo o restituyendo la señalización de PRL, dependiendo de la interacción con otras proteínas SOCS (Pezet *et al.* 1999).

En ratas ovariectomizadas, se observó que PRL induce a SOCS1, SOCS3 y a CIS pero no a SOCS2 en el núcleo ARC (Anderson *et al.* 2006a). Si PRL induce la expresión de SOCS que inhibe la activación de STAT5b, disminuyendo la respuesta neuronal a PRL, se establece un círculo autolimitante que regula la reactividad de las neuronas a la PRL. Por otro lado, la expresión de SOCS no sería solamente dependiente de la acción de PRL a través de la vía JAK/STAT, sino que otras vías de señalización hormonal presentes durante la gestación y la lactancia pueden inducir la expresión de SOCS, ya sea independientemente de PRL o en conjunto con ésta. Por ejemplo el estrógeno, que aumenta al final de la gestación, induce la expresión de SOCS en otros sistemas como por ejemplo en glándula mamaria (Leung *et al.* 2003, Leong *et al.* 2004) y podría participar en el mecanismo de atenuación de la respuesta a PRL durante la lactancia a través de la inducción de proteínas SOCS.

1.4 HORMONAS OVÁRICAS

Las adaptaciones del mecanismo de control de la secreción de PRL durante el final de la gestación son muy importantes para permitir el estado de hiperprolactinemia de la lactancia, y están muy relacionados con los cambios en los niveles de los esteroides ováricos presentes. Los niveles de estrógeno, por ejemplo, en la rata permanecen bajos durante los dos primeros tercios de la gestación,

luego comienzan a aumentar suavemente hasta unas horas antes del parto, cuando sus niveles se elevan mucho más fuertemente. Por el contrario los niveles de P_4 son altos a lo largo de toda la gestación y caen rápidamente a niveles cercanos a los basales entre las 24 y 12 horas previas al parto. Como las neuronas dopaminérgicas expresan los receptores para E_2 y P_4 , es probable que los esteroides ováricos influyan directamente sobre estas neuronas.

1.4.1 ESTRÓGENOS

Los estrógenos son sintetizados principalmente en animales hembra en el ovario, las glándulas suprarrenales y el tejido adiposo. Intervienen en un gran número de procesos como efectos somáticos (desarrollo de las características sexuales secundarias, estímulo de crecimiento, aumento de la masa ósea, redistribución de la grasa corporal), efectos sobre los órganos de la reproducción (aumento de los receptores para progesterona, efecto trófico sobre el útero, aumento del flujo sanguíneo, proliferación endometrial), efecto a nivel de las mamas (crecimiento mamario, pigmentación areolar, desarrollo ductal (durante el embarazo)), efectos vasculares/metabólicos (aumento de la NOS endotelial, aumento de la relación HDL/LDL colesterol, aumento del fibrinógeno circulante), efectos sobre el SNC y la adenohipófisis (modificación de la conducta sexual en el estro, aumento de la excitabilidad neuronal, aumento de la sinaptogénesis y de la neurogénesis, regulación de la secreción de gonadotrofinas, aumento de la secreción de GH y PRL).

Está ampliamente aceptado que los esteroides sexuales, especialmente el estrógeno, son importantes en la fisiología y la regulación de la homeostasis energética del SNC y periférico. En el cerebro los estrógenos actúan en numerosos procesos, como mencionamos previamente en la neurogénesis, diferenciación sexual, neuroprotección, cognición, homeostasis energética, comportamiento reproductivo femenino, etc., a través de una gran variedad de mecanismos incluyendo la inducción de los receptores de P_4 (RP). El hipotálamo es un área cerebral clave en la regulación neuroendócrina de las funciones reproductivas y de la homeostasis energética, que responde a los estrógenos y expresa sus receptores. Las funciones biológicas del estrógeno son mediadas por sus receptores (RE) que se encuentran en varias isoformas, las más estudiadas son el $RE\alpha$ y el $RE\beta$. El $RE\alpha$ que fue el primero en identificarse, contribuye a la regulación de distintos metabolitos y comportamientos sexuales más que otros subtipos de receptores. Estudios fisiológicos y moleculares han identificado múltiples núcleos hipotálamicos que expresan $RE\alpha$ como sitios de acción que mediarían los efectos de los estrógenos. El E_2 modifica la actividad de las neuronas neuroendócrinas, encargadas de regular la secreción de PRL. En animales no preñados, los niveles de estrógeno disminuyen el recambio de DA en el ARC y EM, suprimiendo su liberación; también inhiben la expresión de TH en el ARC (Zimmermann 1982, Simerly *et al.* 1990) y su actividad en EM (Blum *et al.* 1987, Jones & Naftolin 1990, Lerant &

Freeman 1997). El tratamiento prolongado con E₂ disminuye la concentración de DA hipotálamica que llega a la adenohipofisis (Cramer *et al.* 1979). Altas concentraciones de estradiol en forma crónica, incluso son deletéreas de las neuronas TIDA (Morel *et al.*, 2009). Los esteroides ováricos pueden influir en las neuronas TIDA por alteración de la expresión de las proteínas SOCS; por ejemplo en animales ovariectomizados el tratamiento agudo con estrógeno o PRL pueden inducir independientemente el RNAm de SOCS1, SOCS3 y CIS en el ARC, pero sólo en ausencia de P₄ (Garcia-Segura *et al.* 1999).

A nivel hipofisiario el E₂ puede afectar la secreción de PRL actuando directamente sobre el lactotrofo, ya que controla la expresión de los genes de PRL (Lieberman *et al.* 1981, Shull & Gorski 1984) y modifica la sensibilidad a los estimuladores e inhibidores fisiológicos de la secreción de PRL. El E₂ tiene efectos antidopaminérgicos en el mismo lactotrofo, reduciendo la potencia de DA como inhibidor ya que disminuye el número de receptores de DA en el mismo (Raymond *et al.* 1978, Leong *et al.* 1983). Por otro lado, es importante destacar que la P₄ inhibe la expresión de PRL inducida por el E₂ (Tong *et al.* 1989, Cho *et al.* 1993).

1.4.1.1 RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Los receptores nucleares clásicos de las hormonas sexuales, estrógeno, progesterona y andrógenos, son activados por sus respectivas hormonas produciendo cambios conformacionales, dimerización con otros receptores y el reclutamiento de moléculas correpressoras y coactivadoras. Los dímeros actúan como factores de transcripción nuclear modificando la transcripción y expresión de los genes blanco de las hormonas esteroides. El receptor más abundante y activo de estrógeno en las hembras es el RE α , de gran importancia en el hipotálamo. Este receptor puede unirse a otras formas naturales del estrógeno presentes en circulación, aunque con menos afinidad que al E₂. Por otro lado el ER β ha sido encontrado en poblaciones neuronales del hipotálamo que contienen GnRH, CRH, vasopresina, oxitocina y neuronas que contienen triptófano hidroxilasa en mesencéfalo. Las acciones comportamentales del ER β pueden ser explicadas por los efectos directos en la regulación de neuropéptidos que están involucrados en la respuesta al estrés. El ER β regula la actividad de los promotores de CRH y de la vasopresina (Shapiro *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2004; Pak *et al.*, 2007), y altera los ligandos selectivos de CRH, ACTH y corticosterona en respuesta al estrés.

Los REs están compuestos por cinco dominios funcionales, un dominio amino terminal (NTD) o dominio A/B, el dominio de unión al ADN (DBD), una región bisagra (D), y la región de unión al ligando (LBD o E) y el dominio carbono terminal (F). Todos los receptores de esteroides interactúan con moléculas correceptoras como son los coactivadores y correpressoras. (Hsia *et al.* 2010, George *et al.* 2011). Las principales moléculas que interactúan con los receptores esteroidales son las moléculas

de la familia p160/SRC (coactivador de receptores de esteroides) 1, 2 y 3 (Lonard & O'Malley 2005, Bulynko & O'Malley 2011, Johnson & O'Malley 2012): SRC1 (NCoA1), SRC2 (GRIP1 y TIF2), y SRC3 (pCIP, RAC3, ACTR, TRAM, y AIB1). Estas interacciones coordinan funciones específicas necesarias para un apropiado y selectivo acceso a la cromatina, modificando los miembros de los complejos co-reguladores de histonas (O'Malley et al. 2012). De esta manera los coactivadores median la dinámica y procesos de coordinación necesarios para realizar la transcripción, incluso la iniciación, elongación, terminación y recambio de moduladores transcripcionales.

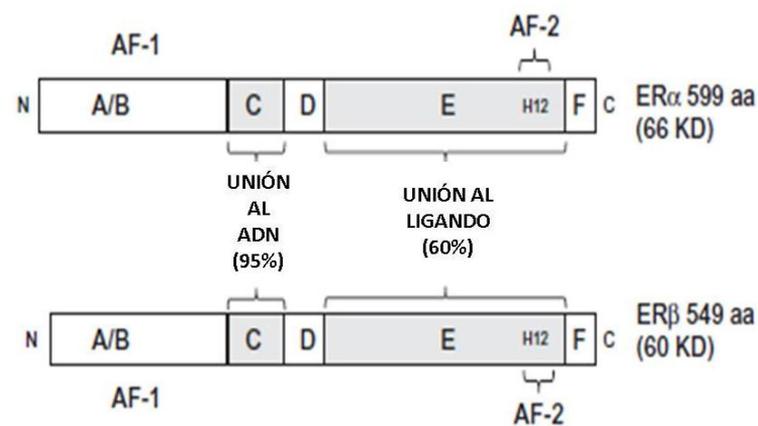


Figura 1.9: Estructura de los RE α y RE β con sus respectivos dominios funcionales. Ambas estructuras se encuentran conservadas, el dominio A/B, el dominio amino terminal (N) y el dominio AF-1. El dominio C se une a sitios del ADN llamados EREs (Elementos de Respuesta al Estrógeno). El dominio D es llamado la región bisagra y contribuye a la unión específica al ADN y a la localización nuclear de los REs. El dominio E es llamado dominio de unión al ligando debido a que interactúa con el estrógeno, a través de 11 motivos α hélice (H1, H3 al H12), La región H12 es crítica para mediar la activación transcripcional por la vía AF-2. La región carboxilo terminal es la región F. Se muestra también el % de homología entre ambos receptores. *What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. Sylvia C Hewitt1, Wipawee Winuthayanon2 and Kenneth S Korac.*

En el modelo clásico de la respuesta a estrógeno, éste se internaliza, difunde por el citoplasma y atraviesa la membrana nuclear para unirse al RE, produciendo cambios conformacionales en el receptor, que lo activan para unirse a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) de los genes blanco al E₂, actuando como factores de transcripción. También se ha descrito una señalización no genómica, que ocurre más rápidamente que la acción genómica, y comienza en la membrana citoplasmática, activando varias cascadas de quinasas, desencadenando señalización intracelular y subsecuentemente induciendo múltiples acciones como la transcripción de genes y la alteración en la actividad de las neuronas en el SNC. Se han encontrado isoformas de REs asociados a la membrana, que pueden asociarse con moléculas de señalización como las proteínas G y SRC para facilitar la interacción y la rápida señalización intracelular. La unión del E₂ a su receptor puede influir en varias vías de señalización como son la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa cAMP dependiente de protein quinasa (PKA), produciendo la movilización intracelular de Ca²⁺ dependiente

de la vía de la proteína quinasa C, activación de la señalización extracelular regulada por quinasas ERK/ actividad mitogénica de la vía MAP quinasa y la activación del receptor tirosina quinasa y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Figura 1.10).

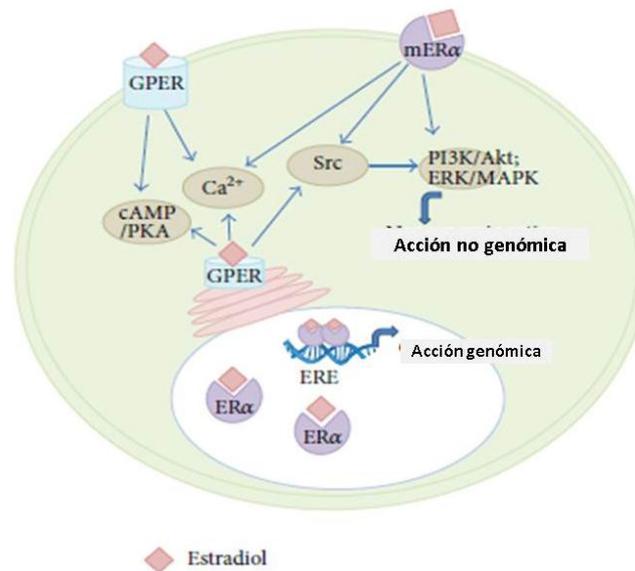


Figura 1.10: Acción de los REα: vía de señalización nuclear genómica a través de REα y vía rápida no genómicas a través de GPER e isoformas de los REα de membrana.

1.4.2 PROGESTERONA

La progesterona (P₄) es el principal progestágeno. Junto con los estrógenos, los progestágenos forman el binomio hormonal femenino por excelencia. Su principal fuente es el ovario donde se sintetiza principalmente en los folículos y cuerpos lúteos (CL) y la placenta, si bien también pueden sintetizarse en las glándulas adrenales y el hígado. Durante procesos como ovulación, fecundación y a lo largo de la gestación en animales de laboratorio como la rata, el ovario asegura la síntesis y el mantenimiento de niveles óptimos de P₄. Hacia el final de la gestación, los niveles de P₄ disminuyen facilitando la secreción de PRL y permitiendo que las hormonas lactogénicas actúen en el tejido mamario desencadenando el proceso de lactogénesis y también contribuyendo a que se produzcan las contracciones uterinas para que ocurra el parto. La P₄ se produce como intermediario biosintético en los folículos en desarrollo y como producto final de secreción del CL. En los folículos en desarrollo la capa tecal es el principal sitio de producción de progestágenos. Luego de la ovulación, el CL secreta grandes cantidades de P₄. Esta acción prepara la pared uterina para la óptima implantación del blastocisto. Además junto con los estrógenos, estimula el crecimiento lóbulo-alveolar de la glándula mamaria. A nivel del sistema nervioso central, P₄ reduce la frecuencia de pulsos de LH, aumentando

su amplitud, mientras que FSH no es afectada. En la rata durante los primeros días de preñez, P₄ estimula la secreción de PRL (Jahn *et al.* 1986, Jahn & Deis 1986). Sin embargo, después de los días 9 y 10 de gestación ejerce una acción inhibitoria sobre su síntesis y secreción (Jahn *et al.* 1986, Jahn & Deis 1986, Deis *et al.* 1989a, Deis *et al.* 1989b). La función específica de P₄ en la síntesis y liberación de PRL, no está tan bien definida como la de E₂. Algunos estudios no reportan efecto alguno (Sar & Meites 1968, Chen & Meites 1970), mientras que otros informan una acción inhibidora (Giguere *et al.* 1982). Por otra parte, otros estudios indican una acción estimuladora en la secreción de PRL en respuesta a P₄. Algunos resultados indican que P₄ es capaz de adelantar el horario, en el cual se produce un incremento en los niveles de PRL inducidos por E₂. Aparentemente, este efecto es producido por P₄ a nivel hipotalámico. P₄ posee un efecto dual sobre la actividad de TH en las neuronas TIDA. Por un lado de forma aguda P₄ puede modular negativamente su actividad (Arbogast & Ben-Jonathan 1989, Arbogast & Ben-Jonathan 1990, Arbogast & Voogt 1994). Por ejemplo, el incremento de P₄ en la tarde del proestro se asocia con una disminución en la actividad de TH generada por una desfosforilación de la enzima, debido a un incremento en la actividad y cantidad de la fosfatasa 2A, lo que contribuye al aumento de PRL, en la tarde del proestro (Liu & Arbogast 2010). Estas observaciones son consistentes con el adelanto en el incremento de PRL inducido por E₂ cuando interviene P₄. Mientras que, en una segunda etapa, P₄ aumenta la actividad de TH (Arbogast & Voogt 1993), un hallazgo que es consistente con la inhibición de la secreción de PRL por parte de P₄.

1.4.2.1. RECEPTORES DE PROGESTERONA

Muchos efectos de la P₄ son mediados por las isoformas clásicas del receptor intracelular de P₄ (RP), sin embargo la reciente identificación de receptores de membrana de P₄ proveen otro mecanismo para su acción. Las células que expresan RP₄ en cerebro son encontradas en regiones discretas, incluyendo el área preóptica, el núcleo periventricular, hipotálamo anterior, núcleo ventromedial, ARC, y EM (Parsons *et al.* 1982). El hipotálamo medio basal (HMB) contiene importantes poblaciones de neuronas neuroendocrinas que expresan RP₄ implicadas en la liberación de PRL y de LH. Existen principalmente dos isoformas del RP que son estructuralmente similares pero diferentes en cuanto a su función: el receptor A (RPA) de 94 kDa y el B (RP B) de 116 kDa que pertenecen a la familia del tipo I de los receptores de hormonas nucleares (Conneely *et al.* 2003). El gen de la isoforma B consiste en ocho exones que codifican para una proteína que contiene diferentes dominios funcionales. El exón 1 codifica para la región N-terminal del receptor y para uno de los tres dominios de activación: el AF-3. Los exones 2 y 3 codifican para el AF-1 y el dominio de unión al DNA. Aunque se encuentra muy conservado, éste contiene dos dedos de cinc asimétricos coordinados cada uno por cuatro residuos de cisteína. Los exones 4-8 codifican para el DUL o LBD y para el AF-2 (Figura 1.11). En esta parte

también se codifica para la región bisagra, los sitios de localización nuclear y motivos importantes para la dimerización del receptor y unión de las proteínas de golpe de calor. El RPA proviene del mismo gen que el RPB, pero su transcripción es regulada por un promotor alternativo que presenta la terminación N-terminal truncada por lo que carece de 164 aminoácidos que corresponden al dominio AF-3 (Bramley 2003). Las isoformas de los RP₄, al igual que otros miembros de la familia de receptores a hormonas esteroides, son susceptibles a ser fosforilados por múltiples proteínas kinasas principalmente sobre residuos de serina pero particularmente en la región amino terminal (Figura 1.11).

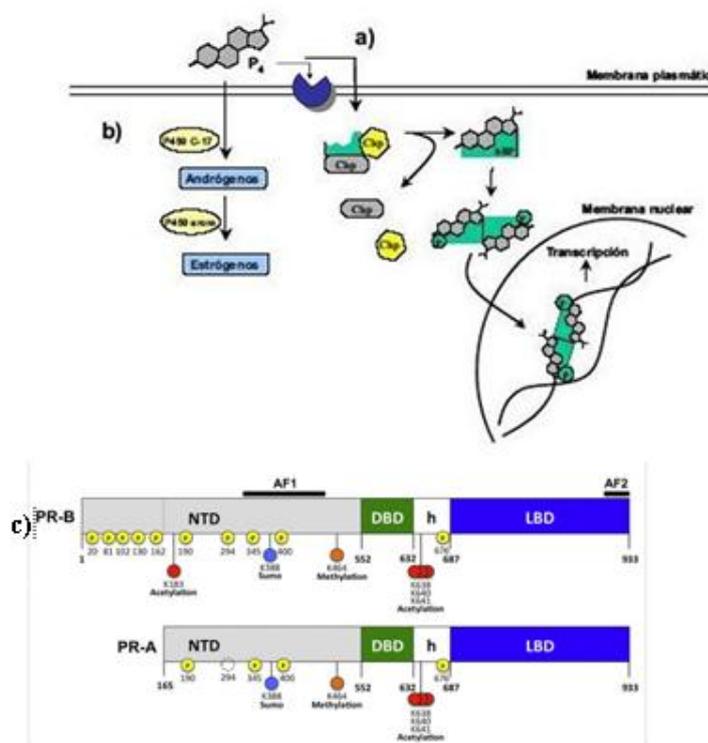


Figura 1.11: Esquema del mecanismo de acción genómica de P₄, metabolismo y estructura general de los receptores de P₄ (hRPs). A) internalización de P₄ por receptor de membrana o formación del complejo hormona-receptor intracelular, dimerización e interacción con el ADN sobre elementos de respuesta a P₄ para iniciar la transcripción. B) biosíntesis de andrógenos y estrógenos a partir de P₄ mediante sus correspondientes citocromos, P450C-17 y P450 aromataasa. C) Principales componentes del gen de los receptores de P₄. (AF) dominio de activación funcional. (DBD) dominio de unión al ADN. (SLN) secuencia de localización nuclear. (H) región bisagra. (DBL) dominio de unión al ligando.

Los receptores de P₄ contienen un total de 14 sitios de fosforilación conocidos. Aunque la importancia de la fosforilación no ha sido totalmente dilucidada, se ha implicado en la regulación de la transcripción de genes al permitir la interacción del receptor con algunos co-reguladores aún independientemente del ligando. Por otra parte, la P₄ y sus receptores pueden activar vías de señalización que involucran entrecruzamiento de señales para inducir diferentes efectos biológicos

(Ballare *et al.* 2006, Faivre & Lange 2007). Ambas isoformas se expresan de forma diferencial en sus tejidos blancos, produciendo así respuestas a la P₄ célula o tejido específicos en distintas situaciones fisiológicas. Se ha postulado que la isoforma RPA puede inhibir la acción de la isoforma B. La variabilidad de acciones biológicas de P₄ depende del contexto, que involucra factores tejido específicos y estadios específicos del desarrollo que permiten a la interacción de los RP con las proteínas correguladoras (CoR) y otros factores de transcripción que colaboran a la accesibilidad a los genes blanco (Briskin 2013, Abdel-Hafiz & Horwitz 2014). Sin embargo, la evidencia sugiere que las dos isoformas A y B adoptan distintas conformaciones en la célula (Bain *et al.* 2000) permitiendo al PRA interactuar con correguladores que son diferentes a los que interactúan con la isoforma B (Tetel *et al.* 1999). Esto está basado en estudios que demuestran que el RPA posee una mayor afinidad por los correpresores SMRT que la isoforma B en presencia de antagonistas del RP, y el RPA no interactúa directamente o no posee alta afinidad como el RPB por los coactivadores SRC-1 y SRC-2 (Giangrande *et al.* 2000, Heneghan *et al.* 2007, Molenda-Figueira *et al.* 2008), potencialmente contribuyendo a las diferencias transcripcionales de las dos isoformas del RP en el complejo sistema de regulación del mismo. También se ha demostrado que el RPA activa genes diferentes a los que activa el RPB en la misma célula (Camacho-Arroyo *et al.* 2007).

E₂ y P₄ poseen la capacidad de regular la expresión de los genes de los RP. En el ciclo estrual se encontró que la forma predominante de los RP es la isoforma B en el hipotálamo, área preóptica y corteza frontal (Shughrue *et al.* 1997, Francis *et al.* 2002, Guerra-Araiza *et al.* 2003, Acharya *et al.* 2015). La expresión de RPB, varía durante el ciclo estrual con altos contenidos de ARNm en la tarde del proestro en comparación con la mañana del proestro, en la tarde temprana del diestro 2 y en la tarde temprana del estro. Este perfil básico de expresión de los genes en el HMB durante el ciclo reproductivo podría contribuir a la comprensión de los mecanismos de las hormonas esteroidales en la regulación de la actividad neuronal y de la secreción hormonal con el fin último de regular los mecanismos reproductivos (Liu & Arbogast 2009).

En relación a la expresión de los RP al final de la gestación, contrario a la disminución esperada, sigue igual o a veces aumenta como ocurre durante la lactancia (Pi & Grattan 1999). Por otro lado, el estudio de la expresión de los receptores de esteroides demostró que si se analiza entre el día 5, 19 y 21 de gestación y el día 5 de lactancia, la expresión del RE α y del RP no varía, salvo que en el día 19 de gestación hay un aumento de la expresión del RE α comparado con el día 12 de gestación y la lactancia (Steyn *et al.* 2007). La presencia de receptores de esteroides en las neuronas TIDA durante la gestación y la lactancia apoyan el concepto de efectos directos de estas hormonas sobre las neuronas TIDA en estos estadios (Steyn *et al.* 2007).

Podemos concluir, con respecto a las hormonas mencionadas, que al final de la gestación, en momentos previos al parto, los cambios que se producen como la caída de progesterona y la disminución del tono dopaminérgico son necesarios para permitir la liberación de PRL. El pico preparto de PRL tiene un rol clave ya que está involucrado en la modulación de funciones hipotalámicas relacionadas con el comportamiento materno y el establecimiento de la lactancia. También PRL junto a las otras hormonas lactogénicas como los LPs intervienen en la reorganización y coordinación neuronal para lograr las adaptaciones neuroendocrinas y comportamentales necesarias en el cerebro materno para prepararlo para la lactancia. Además, como mencionamos anteriormente, el sistema dopaminérgico hipotalámico se adapta para permitir la secreción elevada de PRL durante la lactancia. Este proceso de adaptación es clave, ya que el sistema dopaminérgico necesita disminuir su capacidad de respuesta a la PRL, es decir que debe volverse insensible o refractario a ésta. Este proceso de desensibilización a PRL involucra la disminución de la expresión y actividad de la enzima TH que es la que limita la biosíntesis de DA.

1.5 HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas (HTs) son claves en la regulación del metabolismo, coordinando a corto y largo plazo las necesidades energéticas del cuerpo. Las HTs se distribuyen por la circulación a los diferentes órganos y tejidos, regulando el metabolismo basal e interviniendo en procesos tales como el crecimiento celular, la regulación de la temperatura corporal, el nivel de colesterol, el humor, la memoria y la capacidad de concentración. Como mencionamos anteriormente, participan en diversos procesos del desarrollo del sistema nervioso como la neurogénesis, el crecimiento axonal y dendrítico, la sinaptogénesis, la migración neuronal, la mielinización y la muerte neuronal. Así, variaciones en el estatus tiroideo en humanos se acompañan de profundos cambios metabólicos. El hipertiroidismo (HiperT), caracterizado por niveles elevados de HTs en suero, se asocia con un metabolismo acelerado, incremento en la lipólisis, pérdida de peso, incremento de la biosíntesis y excreción de colesterol hepático y niveles reducidos de colesterol en sangre. Por otro lado, el hipotiroidismo (HipoT), caracterizado por bajos niveles de HTs en suero, se asocia con una reducción del metabolismo, reducción de la lipólisis, ganancia de peso, aumento de colesterol en sangre. En casos de baja ingesta de comida y nutrientes, se observa una reducción de la producción de HTs, resultando en un metabolismo bajo que cambia el modo de conservación energética del cuerpo que se adapta a la disponibilidad reducida de nutrientes.

1.5.1 FISIOLÓGÍA Y SÍNTESIS DE LAS HTS

La glándula tiroidea secreta dos hormonas importantes: la tiroxina y la triyodotironina, llamadas habitualmente T_4 y T_3 respectivamente. Un 80% de las HTs son secretadas en forma de T_4 , mientras que el 20% restante corresponde a la T_3 (Celis ME. Fisiología Humana. Primera Edición. Córdoba, Ed.: Celis ME, Tomo I, 1999.); Ambas hormonas presentan en su molécula tironinas iodadas con 4 o 3 átomos de yodo respectivamente. Una vez liberadas a la circulación las HTs se unen reversiblemente a proteínas plasmáticas que son: la globulina de unión a tiroxina (TGB), la prealbúmina de unión a tiroxina o transtiretina (TTR) y la albúmina que facilitan su transporte y entrada a los distintos tejidos, incluido el cerebro (Wiens & Trudeau 2006). Una vez que la HT ha llegado a los tejidos, la tiroxina se internaliza por transporte activo y se convierte en T_3 , la forma activa de las HTs, por medio de deiodinasas que se encuentran distribuidas específicamente de acuerdo a cada tejido.

1.5.2 RECEPTORES DE HTS

La acción de las HTs se ejerce a través de sus receptores, los receptores de hormonas tiroideas (RTs), que existen como varias isoformas. La distribución de los mismos es específica de cada tejido y también espacio-temporal. La regulación espacio-temporal de la expresión de cada una de las isoformas es crítica para el desarrollo adecuado de la anatomía y función de las diversas regiones del cerebro y médula espinal.

Los RTs pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y funcionan como factores de transcripción inducibles por la hormona activa T_3 . Los RTs derivan de dos genes localizados en dos cromosomas diferentes (Cheng 2000). El gen que codifica al $RT\beta$, se encuentra en el cromosoma 3, y codifica para tres isoformas que unen a la hormona T_3 , $RT\beta_1$, $RT\beta_2$ y $RT\beta_3$ (Williams 2000). Estas isoformas del $RT\beta$ comparten homología en los dominios de unión al ADN y a la T_3 pero difieren en la longitud y secuencias de aminoácidos en el dominio amino terminal A/B (Figura 1.12). Existe una isoforma adicional del $RT\beta$ que es la $RT\Delta\beta_3$, que carece de la región amino A/B y de la región de unión al ADN, pero conserva el sitio de unión a T_3 (Williams 2000). El gen que codifica a $RT\alpha$ se localiza en el cromosoma 17 y codifica para una proteína con unión a T_3 : $RT\alpha_1$ y dos variantes por splicing alternativo ($RT\alpha_2$ y $RT\alpha_3$). Estas variantes del $RT\alpha_1$, difieren en la longitud y secuencia de aminoácidos y en la región del C-terminal, y no poseen la capacidad para unirse a T_3 . Existe una variante del $RT\alpha_1$, $RT\Delta\alpha_1$, la cual tampoco se une a T_3 (Mitsuhashi *et al.* 1988). Estas variantes truncadas de los $RT\alpha$ surgen por transcripción a partir de un promotor interno situado en el intron 7, de ahí provienen las isoformas $RT\Delta\alpha_1$ y $RT\Delta\alpha_2$ que carecen de los sitios A/B y las regiones de unión al ADN pero conservan la mayor parte de unión a T_3 (Plateroti *et al.* 2001) (Figura 1.12). La función

que tiene el dominio A/B está involucrada en la regulación de la transcripción. El dominio de unión al ADN es la región que interactúa con los elementos de respuesta a la hormona tiroidea en los genes blanco de T₃. En el sitio de unión de los RTs a los genes blanco se encuentran los elementos de respuesta de la hormona (ERT o TREs) con una secuencia consenso básica en el centro de los hexanucleotidos dispuestos en distintas orientaciones: repetición revertida, repetición directa o repetición invertida (palíndromo). Los RTs se unen a ERT no sólo como homodímeros sino también como heterodímeros con otros miembros de la superfamilia de receptores, como RXR, receptor de la vitamina D y todos los subtipos de los receptores del ácido retinoico (Zhang & Kahl 1993). La heterodimerización con el RXR aumenta dramáticamente la unión del RT al ERT, la capacidad de respuesta del RT a T₃ y la activación transcripcional. Así, la heterodimerización proporciona una importante manera para modular las funciones de los RTs. Esto también nos muestra la capacidad de interacción que tienen los RTs con otros receptores, apoyando la hipótesis de la interacción de estos receptores de manera indirecta con otras vías de señalización.

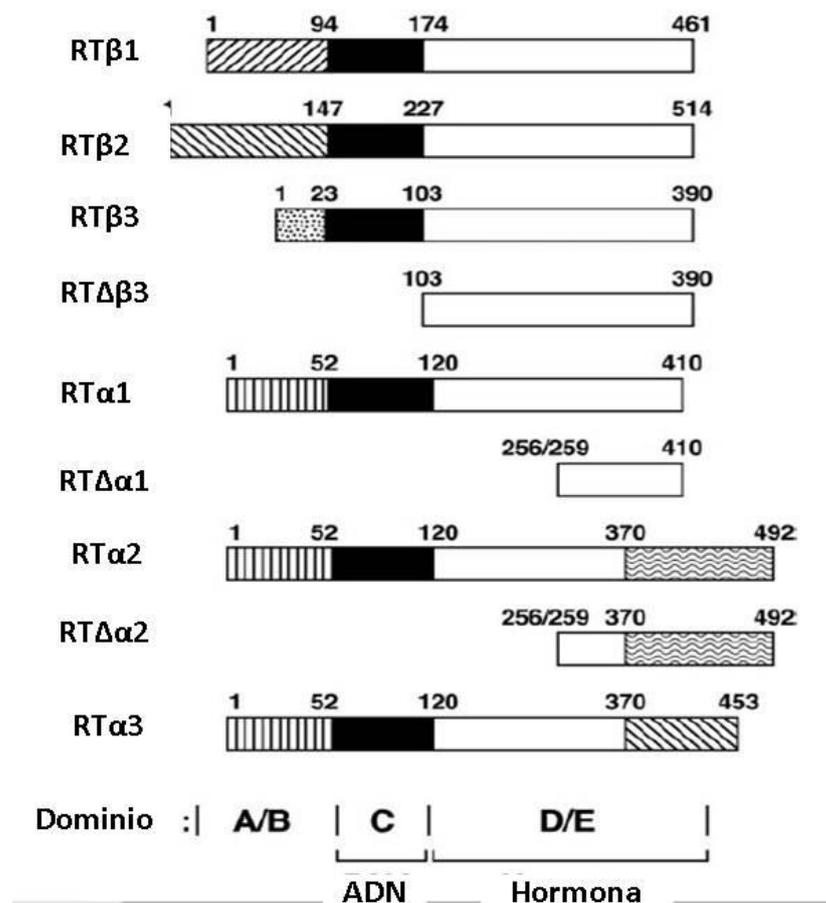


Figura 1.12: Representación esquemática de las isoformas de los receptores tiroideos (RTs) (Cheng *et al.* 2010)

Las isoformas del receptor se expresan dependiendo de cada tejido y son reguladas durante el desarrollo (Cheng 2000), por ejemplo el $RT\alpha_1$, es expresado durante el desarrollo embrionario, mientras que $RT\beta_1$ es expresado en estadios tardíos del desarrollo (Bradley *et al.* 1992). El $RT\beta_1$ es expresado predominantemente en riñón, hígado, cerebro, corazón y tiroides y en bajos niveles en músculo esquelético y bazo (Cheng 2000, Williams 2000, Ying *et al.* 2003). El $RT\beta_2$ es principalmente expresado en cerebro, retina, oído interno, y en bajos niveles en bazo y corazón (Williams 2000). Las isoformas $RT\alpha_1$ y $RT\alpha_2$ predominan en cerebro y se expresan en bajos niveles en riñón, músculo esquelético, bazo, corazón, testículos e hígado (Williams 2000). La diversidad molecular de los RTs plantea la discusión sobre si las diversas isoformas tienen distintas funciones o simplemente desempeñan funciones redundantes. La expresión de los RTs en el desarrollo tejido dependiente y la regulación de la expresión diferencial de las isoformas de los RTs sugieren que pueden mediar subtipos de funciones específicas. Esta posibilidad es apoyada por los distintos patrones de expresión espacio-temporal de las isoformas del receptor en el sistema nervioso embrionario y posnatal (Bradley *et al.* 1992). Estudios de inactivación de las distintas isoformas, demostraron que pueden tener acciones específicas pero también superposición de roles funcionales. Por ejemplo, los ratones knockout para $RT\alpha_1$, tienen frecuencia cardíaca reducida, alteraciones en la actividad contráctil del corazón y temperatura corporal disminuida (Wikstrom *et al.* 1998). En contraste, en ratones knockout para $RT\beta$ se ha podido observar una disfunción leve del eje hipófiso-tiroideo y déficit en la función auditiva y ocular. Además, en los ratones en los que ambos $RT\alpha_1$ y $RT\alpha_2$ se han suprimido hay problemas de desarrollo y disminución de la supervivencia posnatal (Cheng *et al.* 2010). Estos distintos fenotipos manifestados por los ratones knockout indicarían que las isoformas de los RTs mediarían funciones específicas. Cuando se suprimen ambas isoformas $RT\alpha$ y $RT\beta$ se detectan una gran variedad de fenotipos, incluido el de disfunción del eje hipófiso-tiroideo con retraso en el crecimiento y maduración ósea, que no se encuentra en ratones deficientes de un solo receptor. Estos resultados indican que los $RT\alpha$ y $RT\beta$ pueden sustituirse unos a otros para mediar en algunas acciones de T_3 y también mediar funciones específicas de una isoforma. Además, se ha demostrado la expresión diferencial en distintas áreas del cerebro como en el hipotálamo medio basal (HMB).

1.5.3 REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN Y ACCIONES DE LAS HTS

La regulación de las HTs es bastante compleja, debido a que posee múltiples niveles. Un primer nivel de regulación de la síntesis y secreción es llevada a cabo en el SNC, donde en el retrocontrol negativo intervienen: hipotálamo, hipófisis y glándula tiroides. Adicionalmente, una vez que la hormona es liberada en sangre hay un segundo nivel de regulación en cada tejido llevada a cabo por la expresión

de los transportadores de HTs, las enzimas deiodinasas y los moduladores positivos y negativos que regulan el ingreso, metabolización y acción de las HTs a nivel celular.

Como mencionamos previamente la regulación de la síntesis y secreción de las HTs es llevada a cabo por el eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroidea, a través de un retrocontrol negativo.

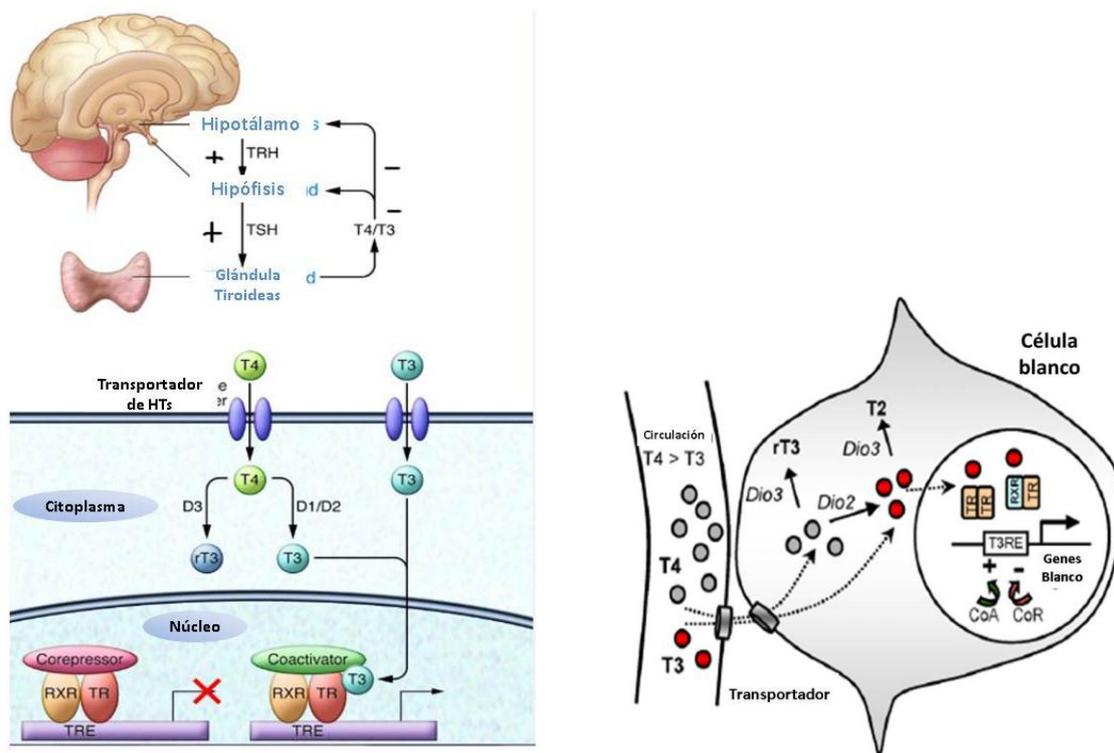


Figura 1.13: representación gráfica de los distintos puntos de regulación de las HTs, desde la regulación de la biosíntesis y liberación a la regulación de la acción de las mismas por transportadores, moduladores positivos o negativos y deiodinasas.

En las décadas del 70 y 80 por estudios de inmunohistoquímica en hipotálamo de rata se demostraron neuronas positivas para la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) en numerosos núcleos hipotalámicos y se estableció el rol de estas neuronas en el núcleo paraventricular (NPV) en la regulación de secreción de las HTs (Segerson *et al.* 1987). La TRH es sintetizada por las neuronas del NPV que proyectan a la zona externa de la eminencia media (EM), donde TRH es liberada en los capilares para ser transportada a la hipófisis anterior por los vasos del sistema porta-hipofisario y regular la liberación de TSH. En la adenohipófisis actúa sobre las células tirotróficas estimulando la síntesis y la secreción de la tirotrófina (TSH). La TSH actúa sobre la glándula tiroidea, siendo el factor más importante en la estimulación de la síntesis y la secreción de las HTs. Se comprobó también que hay una relación inversa entre los niveles de las HTs en suero y la expresión del ARNm de TRH en el NPV durante un estado de hipo o hipertiroidismo inducido experimentalmente, demostrando el rol clave que tienen estas neuronas en el clásico retrocontrol negativo de las HTs. Es interesante destacar

que hay evidencias de que las neuronas hipofisiotróficas del NPV reciben también proyecciones monosinápticas desde otras áreas hipotalámicas de interés neuroendocrino y de regulación del metabolismo.

Las isoformas de los RT α 1, RT α 2, RT β 1 y RT β 2 son expresadas en muchas áreas del cerebro incluyendo el hipotálamo. En ratas adultas, se reportó una expresión predominante de la isoforma RT β 2 en el NPV, ARC y en EM (Lechan *et al.* 1994) por lo que se sugirió que esta isoforma del receptor actuaría como regulador del feedback negativo en neuronas TRH+. Las demás isoformas también se localizaron en HMB. Se demostró una localización de los RTs predominantemente citoplasmática pero se sabe que pueden traslocarse rápidamente al núcleo (Hager *et al.* 2000). La traslocación de los RTs puede ser ligando dependiente y necesita varias proteínas como cofactores (Barman *et al.* 2001).

Aunque la glándula tiroides secreta mayormente T₄, la hormona biológicamente más activa es la T₃, por lo que hay otro punto regulador de su biodisponibilidad que es la modulación de la actividad de las enzimas deiodinasas (Fliers *et al.* 2006). Las deiodinasas activan o desactivan la HT y su importancia en la homeostasis de las HTs se pudo esclarecer con el uso de animales knockout para las deiodinasas. Las deiodinasas de yodotironina tipos I, II y III (D1, D2 y D3, respectivamente) regulan la actividad de las HTs a través de la eliminación de restos específicos de yodo de la molécula precursora T₄ o de la T₃. D2 genera la forma activa de la hormona tiroidea T₃ a través de deiodación de T₄. Por el contrario, D3 inactiva T₃ por conversión a T₃ reversa o a T₂ y en menor medida impide que se active T₄. Por último, D1 es una enzima cinéticamente ineficiente que activa o inactiva T₄ y su papel en la salud sigue siendo motivo de estudio.

D2 y D3 se expresan en hipotálamo e hipófisis y su inmunorreactividad se ha detectado en células ependimales del tercer ventrículo y células gliales adyacentes a neuronas del núcleo Infundibular (INF) y EM (Alkemade *et al.* 2005). También se detectó D2 en astrocitos y tanicitos. Estos últimos son un tipo de células ependimarias encontradas principalmente en las paredes del tercer ventrículo que presentan prolongaciones que establecen contacto con los vasos sanguíneos de la EM (Alkemade *et al.* 2005) o con neuronas. Por otro lado, es interesante destacar que D3 se detecta exclusivamente en neuronas que poseen RTs, sugiriendo que D3 se expresa en neuronas que responden o son sensibles a T₃. En dichas neuronas también se detectó el transportador MCT8 (transportador 8 monocarboxilado) de las HTs. Además, se detectaron otros tipos de transportadores con afinidad para T₄ que pueden ser los responsables de facilitar el transporte de la hormona a través de la barrera hematoencefálica como por ejemplo el transportador OATP1C1.

A partir de estos hallazgos se propuso que el clásico retrocontrol de las HTs en las neuronas TRH+ del NPV podría deberse a un efecto directo de la HTs sobre dichas neuronas hipotalámicas. Por otro lado,

basándose en estudios morfológicos del NPV se postuló que la hormona T_4 podría llegar al NPV desde la circulación a través de los astrocitos y que este proceso requeriría de un transportador activo de T_4 por ejemplo OATP1C1 (Jansen *et al.* 2005) que presenta mayor afinidad por T_4 . Así, la T_4 podría ser convertida a T_3 por D2 en los astrocitos y subsecuentemente transportada a las neuronas TRH+ por MCT8. La co-expresión de D3, MCT8 y RTs en conjunto con TRH en el NPV apoya la existencia de esta vía de acción del retrocontrol en hipotálamo (Figura 1.14). Las HTs tomadas o captadas del líquido cefalorraquídeo representan una alternativa en la cual específicamente las HTs son transportadas desde el líquido cefalorraquídeo del 3V por los tanicitos hacia las neuronas del núcleo ARC que proyectan sus terminales hacia las neuronas TRH+ en el PVN. También se ha propuesto que la T_3 puede ser transportada al núcleo INF y de éste a las neuronas TRH+ del PVN por un transportador axonal (Figura 1.14) (Diano *et al.* 2003). La captación de las HTs desde el líquido cefalorraquídeo como una posible ruta para el retrocontrol en las neuronas TRH se basa en la presencia de la enzima D2 en las células gliales a lo largo del límite de la parte basal del 3V y la expresión de MCT8, RTs y D3 en las neuronas del núcleo INF. Otra alternativa sería que la HTs puedan tener acceso directo desde la circulación al núcleo INF por la ausencia de la barrera hematoencefálica en esta parte del HMB.

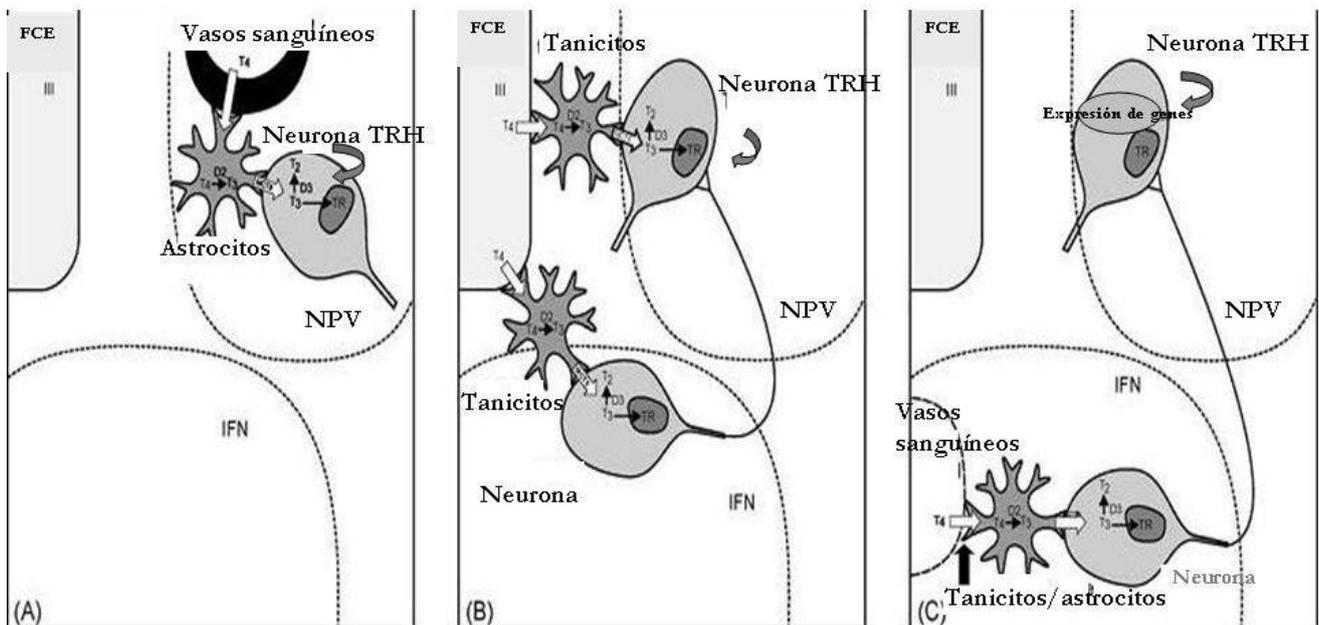


Figura 1.14: Esquema de las tres vías propuestas para el feedback de las HTs en neuronas TRH+ en el NPV. (A) Captación local de la hormona tiroide desde el compartimiento vascular al NPV. La T_4 es tomada localmente del compartimiento vascular en el NPV por astrocitos que expresan D2. En estos astrocitos la T_4 es convertida a T_3 y transportada a neuronas TRH+ por MCT8. En las neuronas TRH+, T_3 puede unirse al RT y producir un feedback negativo en la expresión de los genes TRH. La hormona T_3 puede ser inactivada por D3 presente en neuronas TRH. **(B) La T_4 es tomada del líquido cefalorraquídeo en el tercer ventrículo seguido por el transporte a neuronas TRH+ en el NPV o a neuronas del núcleo infundibular (INF) que proyectan sus terminales al NPV.** La T_4 es tomada desde el líquido cefalorraquídeo (FCE) por tanicitos que expresan D2. En estas células T_4 es convertida a T_3 y subsecuentemente transportada por MCT8 a neuronas TRH+ del NPV o a neuronas del INF. T_3 puede unirse a los RTs o ser degradada por D3. El RT unido a la hormona puede alterar la expresión directa de los genes TRH. Alternativamente, T_3 puede viajar desde las neuronas del INF a neuronas TRH+ del NPV a través de un transportador axonal. **(C) La T_4 es tomada del compartimiento vascular por tanicitos/astrocitos que hacen contacto con neuronas del INF que proyectan sus terminales al NPV.** La expresión de D2 en los astrocitos o tanicitos del área infundibular permite la conversión de T_4 a T_3 que es transportada por MCT8 a neuronas del INF. T_3 puede

unirse localmente a los RTs alterando la expresión de genes en neuronas INF o también ser inactivada por D3. Aunque también T_3 puede llegar a las neuronas TRH+ por medio de terminales axónicos desde el INF al NPV. Adaptado de (Alkemade *et al.* 2005)

Es de interés mencionar que tanto D2 como MCT8 fueron detectados en las células foliculo-estrelladas (FS) de la hipófisis anterior. Estas células son capaces de modular la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) por parte de la glándula pituitaria. En el modelo propuesto las células FS son centrales ya que convierten T_4 a T_3 a nivel hipofisario (Alkemade *et al.* 2006), conversión modulada por TSH ya que expresan su receptor (TSHR) (Figura 1.15) (Fliers *et al.* 2006). Además, la co-expresión de las isoformas de los RTs y de la enzima D3 sugiere que la acción y degradación de las HTs puede ocurrir en las mismas células productoras de TSH (Figura 1.15). Estos datos en conjunto conforman el feedback ultracorto de TSH propuesto previamente por Prummel (Prummel *et al.* 2000).

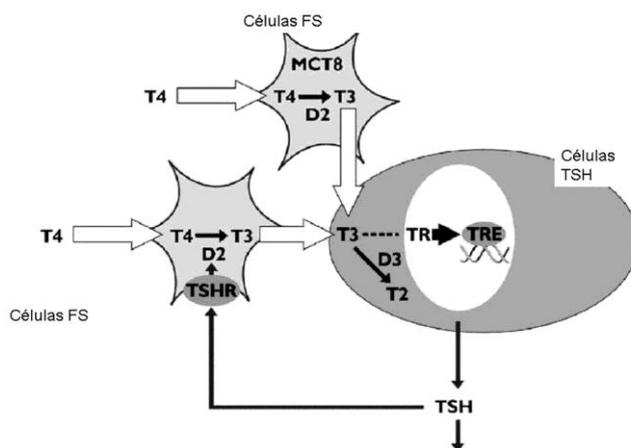


Figura 1.15: Modelo propuesto para la acción de las HTs en la secreción de la TSH en células de la hipófisis anterior: T_4 es tomada por las células FS y convertida a T_3 por D2. TSH puede estimular la expresión de D2 por unión al receptor de TSH en determinadas células FS. T_3 es transportada por las células que secretan la hormona TSH que co-expresan el RHT (TR). T_3 puede unirse al receptor y alterar la expresión de genes blanco para T_3 o puede ser degradada localmente por D3. El rol del transportador MCT8 puede estar involucrado en el transporte de T_4 o en la liberación de T_3 por una clase de células FS. [Figura adaptada de Alkemade y col (2006).]

Se ha sugerido que el efecto de los diversos RTs puede estar mediado por interacción con una gran cantidad de proteínas celulares, denominadas comoduladores que se agrupan en proteínas co-activadoras (CoA) y co-represoras (CoR) en un esquema básico y simple de regulación en presencia y ausencia de la hormona (Fig. 1.16) (Cheng *et al.* 2010). Estas proteínas pueden ser expresadas de manera tejido-específico y permitir respuestas diferenciales a las HTs. Esto último, junto con la conocida expresión diferencial de las isoformas de los RTs y la heterodimerización de los mismos podrían contribuir a comprender la variada actividad transcripcional de los RTs en diferentes tejidos.

Así, los diversos efectos de los RTs podrían lograrse mediante complejas combinaciones con diferentes proteínas.

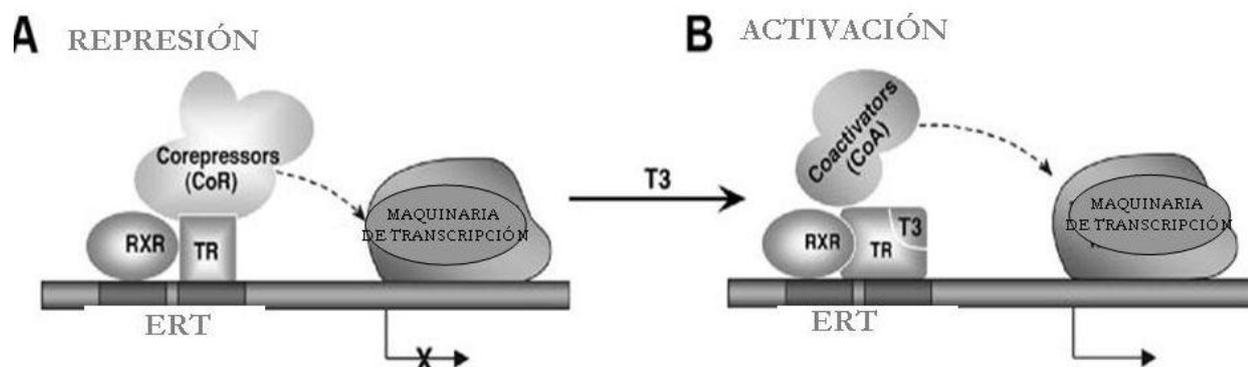


Figura 1.16: Modelo simplificado para la represión en ausencia del ligando al RT (TR) y activación por el ligando. (A) Interacción de los complejos co-represores (CoRs) en el modelo de represión en ausencia del ligando y (B) asociación con proteínas Coactivadoras (CoAs) en presencia del ligando (T_3). Adaptada de (Cheng *et al.* 2010).

El CoA del receptor de hormonas esteroideas (SRC-1) es el primer CoA que ha sido clonado que une a los ligandos de los RTs en adición con otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Onate *et al.* 1995, McKenna *et al.* 1999a, McKenna *et al.* 1999b). Subsecuentemente otros CoA fueron identificados, como el conocido SRC-2/TIF2/GRIP1 y SRC-3/TRAM-1/RAC3/ACTR/pCIP. Estos CoA, con una homología del 40 %, poseen propiedades funcionales similares a SRC-1 y se los conoce como la familia SRC/p160 (McKenna & O'Malley 2002). Estos SRCs están altamente conservados con un *basic helix loop helix* (bHLH) en el dominio A/B, en la región amino terminal que funciona como dominio de unión al ADN o región de interacción para la dimerización para otros factores de transcripción (Leo & Chen 2000). En el centro de la molécula, se encuentran tres copias del motivo LXXLL (X indica cualquier aminoácido). Cerca de la región C-terminal, SRC-1 contiene dos dominios de acción, AD1 y AD2, responsables de la acción de coactivación. Ambos dominios AD son requeridos para una óptima coactivación. SRC-1 también funciona como una acetiltransferasa de histonas, y esta actividad es localizada en la región C-terminal de la proteína. La función acetiltransferasa de histona funciona modificando la estructura de la cromatina para facilitar la actividad transcripcional de los receptores nucleares. Por otro lado una de las características funcionales de los RTs es la habilidad para reprimir o silenciar la transcripción basal en ausencia del ligando, esto es gracias a la presencia de los CoRs.

Los primeros CoRs clonados fueron NCoR (repressor nuclear) y su homólogo el SMRT (mediador del silenciamiento de los receptores tiroideos y retinoicos) (Horlein *et al.* 1995). Subsecuentemente otras

proteínas como Hairless, Alien, RIP-140 y SUN-CoR fueron reportadas con funciones como CoRs para los RTs. Nuestro estudio sobre los CoRs que median la represión basal de los RTs está enfocado a NCoR y SMRT porque son los mejores caracterizados. NCoR y SMRT se unen a la superficie de los RTs en hélices de 3, 4 y 5 vueltas en la caja “CoRNR” en la región C-terminal (Hu & Lazar 1999, Perissi *et al.* 1999). Estos CoRs están asociados a otras proteínas como las *transducin-like protein* (TBL1, or TBL1R) y la deacetilasa de histonas 3 (HDAC3) para formar un largo complejo de represión. A pesar que NCoR y SMRT son altamente homólogos y el modo de acción es similar, la inactivación de estos genes en el ratón sugieren que estos dos CoRs poseen funciones biológicas no redundantes (Lazar 2003).

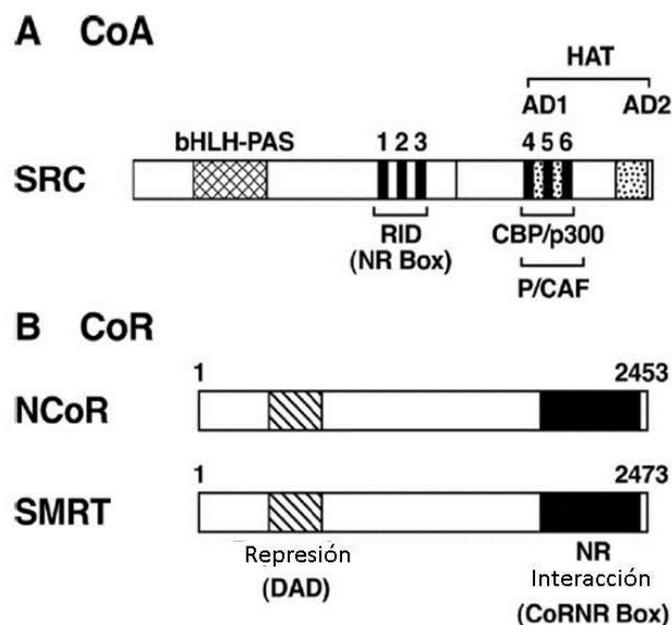


Figura 1.17: Representación gráfica de las moléculas modificadoras más relevantes, que participan en la regulación de la actividad de las HTs Adaptada de (Cheng *et al.* 2010).

Un nivel adicional de complejidad se observa en los tejidos reproductivos y el SNC, ya que los comoduladores no interaccionan solamente con los RTs, sino que también lo hacen con los receptores de hormonas sexuales, como los REs y RPs, a través de un mecanismo de *cross talk* entre sus vías de señalización. Por lo tanto se debe tener presente, lo descrito previamente en este capítulo sobre la intervención de los comoduladores en la activación de la transcripción de los receptores esteroidales como el RE α y el RP.

Como mencionamos, la acción de las HTs posee diversos puntos de regulación, que nos lleva pensar lo importante que es la adecuada expresión y función de las mismas.

1.6 HORMONAS TIROIDES Y REPRODUCCION

Las disfunciones tiroideas, son frecuentes en mujeres en edad reproductiva y son causa frecuente de infertilidad, fertilidad subnormal, abortos espontáneos, problemas en el embarazo y parto prematuro. Se asocian con trastornos en la ovulación y en los ciclos menstruales. La presencia de anticuerpos antitiroideos aumenta el riesgo de aborto, infertilidad, etc. Además, las HTs pueden afectar la fertilidad indirectamente interfiriendo con el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal o directamente a nivel ovárico ya que sus receptores están presentes en la mayoría de los tipos celulares del ovario. El hipertiroidismo produce frecuentemente oligomenorreas y amenorreas en mujeres en edad fértil. Ya en 1975 se reportaron niveles aumentados de estrógenos circulantes en mujeres con tirotoxicosis asociados con falla en la ovulación. Los niveles elevados de estrógenos fueron incapaces de inducir la secreción preovulatoria de LH, por lo que se asoció esta falla con una disfunción hipotalámica-hipofisaria. La elevación de E₂ circulante se acompañó de niveles aumentados de la globulina ligadora de los esteroides sexuales (SHBG), lo que ocasiona una vida media más prolongada de los estrógenos circulantes y aumentos en los niveles plasmáticos de andrógenos que se convierten a estrógenos. Sin embargo, la biodisponibilidad de los estrógenos circulantes estaría reducida por el exceso de SHBG, lo que podría ser causa de la falla de la secreción preovulatoria de gonadotrofinas (Akande 1975, Akande & Hockaday 1975).

Por otro lado, se detectó que otro grupo de mujeres tirotóxicas cursó con niveles elevados de LH y FSH durante diferentes fases del ciclo, posiblemente debido a un aumento en la sensibilidad a la GnRH (Fujii *et al.* 1981).

En ratas vírgenes con HiperT inducido, se observan alteraciones tempranas en la tasa de ovulación, seguidas por una disminución paulatina en el número de ratas con ciclos normales entre el 1° y 4° ciclo desde el comienzo del tratamiento (Jahn *et al.*, 1995). Posteriormente, las ratas dejan de ciclar normalmente. El tratamiento con HTs podría actuar en 2 niveles, uno sería incrementando inicialmente la tasa de ovulación a través de una elevación en las concentraciones circulantes de FSH para inducir un incremento en el número de folículos reclutados y otro sería a través de la potenciación del efecto de FSH sobre el crecimiento folicular. Simultáneamente, el HiperT ocasiona una falla progresiva en la secreción preovulatoria de LH que termina induciendo un estado de anovulación y anestro permanente (Jahn *et al.*, 1995). La mayoría de los autores asocia la incidencia aumentada de abortos, irregularidades menstruales y fertilidad subnormal en pacientes con disfunciones tiroideas a la reactividad cruzada de los anticuerpos antitiroideos bloqueantes sobre los receptores de

gonadotrofinas, que provocaría un grado de bloqueo de las acciones de las gonadotrofinas sobre el ovario y por ende una falla ovárica o luteal (Poppe *et al.* 2007, Toulis *et al.* 2009). Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio indican que las hormonas tiroideas tienen efectos directos sobre el ovario y la función luteal y que estas acciones directas pueden tener un papel en los desórdenes de la fertilidad y del embarazo asociados con el HipoT e HiperT (Rosato *et al.*, 1992, Hapon *et al.* 2007, Navas *et al.*, 2011). Así, encontramos que el hipertiroidismo adelanta la luteólisis (Navas *et al.*, 2011) y la caída de P₄ al final de la gestación (Rosato *et al.*, 1992), lo que a su vez, adelanta el aumento en PRL sérica preparto y produce parto y lactogénesis prematuras. Las madres HiperT también presentan un bloqueo de la liberación de PRL y de la eyección láctea inducidas por succión. Por el contrario, las madres HipoT tienen un atraso en la luteólisis, la caída de P₄ y el parto (Hapon *et al.*, 2007a), y aunque los niveles de PRL no se ven afectados durante la lactancia, hay un bloqueo parcial de la liberación de ocitocina y de la eyección láctea inducida por succión (Hapon *et al.*, 2007b). Adicionalmente, nuestro grupo ha demostrado que las madres HipoT o HiperT tienen alteraciones en el metabolismo que resultan en un déficit de la calidad de la leche, los que asociados con el bloqueo parcial en la eyección láctea producen un déficit en el crecimiento de las camadas por malnutrición (Varas *et al.* 2002, Hapon *et al.* 2003, Hapon *et al.* 2005, Hapon *et al.* 2007). También hemos demostrado que las ratas madres en lactancia HiperT o HipoT presentan involución prematura de la glándula mamaria, lo que compromete aún más el éxito de la lactancia (Varas *et al.* 2002, Campo Verde *et al.*, 2016).

Las ratas HipoT vírgenes o en el final de la gestación presentan hiperprolactinemia (Hapon *et al.* 2003, Hapon *et al.* 2010). que podría estar relacionada con los niveles hipotalámicos elevados de TRH inducidos por el estado hipotiroideo, asociados en el caso de las vírgenes con niveles elevados de estrógenos circulantes (Hapon *et al.* 2010).

Por otro lado, existe abundante evidencia sobre los efectos inhibitorios de las HTs sobre la acción de los RE en diferentes áreas cerebrales, reduciendo la transcripción inducida por los mismos (Vasudevan *et al.* 2001). Además, se ha encontrado coexpresión de los receptores de estas dos hormonas en neuronas hipotalámicas evidenciando la interacción entre ellas. Se ha visto que el HipoT disminuye la expresión de RP₄ en corteza (Kato y col., 1984) y se ha demostrado coexpresión de RP y de los RTs en el diencéfalo de oveja (Dufourny & Skinner 2003).

En nuestro laboratorio hemos descrito alteraciones en la expresión de RTs, RPs y REs en tejido mamario y luteal de ratas HipoT e HiperT en el fin de la gestación y la lactancia (Varas *et al.*, 2005; Hapon *et al.*, 2007^a, b; Navas *et al.*, 2011, 2014; Campo Verde *et al.*, 2015), que se pueden relacionar con las alteraciones funcionales descritas de estos tejidos y que evidencian una compleja interacción entre las respuestas a las hormonas ováricas y tiroideas, que sería necesaria para el curso normal de la gestación y la lactancia. Estos antecedentes demuestran el interés de estudiar los mecanismos por los

que el HiperT e HipoT afectan las vías de señalización de las HTs, la expresión y acción regulatoria de sus moduladores y la interacción de las mismas con otras vías de señalización hormonal incluyendo los esteroides sexuales o PRL en hipotálamo, para determinar cuáles son los factores comprometidos en la regulación de la secreción de PRL responsables de la lactancia deficiente en madres que sufren estas patologías.

CAPÍTULO 2

HIPOTESIS DE TRABAJO.

Las hormonas tiroideas afectan la actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (principalmente las neuronas TIDA, reguladoras de la liberación de PRL hipofisaria) a través de interacciones con las vías de señalización de PRL y hormonas esteroidales. La modulación anormal de estas vías producidas por niveles patológicos de hormonas tiroideas serían las responsables de los trastornos en la secreción de PRL observados en madres Hipo o HiperT al final de la gestación y en la lactancia.

OBJETIVOS:

General:

El objetivo general de nuestro trabajo es caracterizar los mecanismos hipotalámicos por los que el HiperT afectan la regulación hormonal de la secreción de PRL hipofisaria al final de la gestación y la lactancia.

Específicos:

- 1- Se determinará el efecto del HiperT sobre la secreción de PRL al final de la gestación y lactancia temprana midiendo la expresión génica y/o proteica del RPRL y de las principales moléculas de activación y modulación de su vía (STAT5b, SOCS y CIS) en HMB de ratas al final de la gestación (día 19, 20 y 21) y en el día 2 de lactancia (lactancia temprana, L2). Los resultados obtenidos se correlacionarán con la expresión génica y proteica de: RP₄ (isoforma A y B), RE, TH y los niveles hormonales de T₃, T₄, TSH, PRL, E₂ y P₄. Además determinaremos la expresión de la TH fosforilada en Ser-40 (forma activa de TH, p-TH) para evaluar si la activación de TH por fosforilación es regulada de forma diferencial.
- 2- Se determinará el efecto del HiperT sobre la señalización de las HTs en HMB de ratas al final de la gestación (día 19, 20 y 21) y en el día 2 de lactancia (lactancia temprana, L2), midiendo la expresión proteica del receptor de HT beta 1 (RTβ1) y alfa 1 (RTα1), principales isoformas

mediadoras de la acción de las HTs, y la expresión del ARNm en la misma área por PCR en tiempo real de las isoformas de los RTs (RT α 1, RT α 2, RT β 1 y RT β 2). Además, se estudiará la expresión génica de los moduladores de los RTs (SMRT, NCoR, SRC-1 y receptores retinoides X) por PCR en tiempo real, que podrían interactuar con la señalización de PRL en la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas. También se determinará la expresión génica de las enzimas DIO2 y DIO3 y los transportadores MCT8, MCT10 y OATP1c1 en las mismas áreas y grupos mencionados.

- 3- Para investigar la modulación de las neuronas TIDA por las HTs, se estudiará si la TH y los RTs se co-expresan en neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (principalmente las neuronas del sistema TIDA) utilizando inmunofluorescencia en ratas HiperT y eutiroides al final de la gestación y en la lactancia temprana. De esta manera podremos determinar si el efecto de las HTs sobre las neuronas TIDA puede ejercerse de forma directa (coexpresión positiva) o indirecta.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1 ANIMALES Y MODELOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas hembra Wistar del bioterio del “Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo” (IMBECU) de 3 a 4 meses de edad, que pesaban 200 a 230 g al iniciar el tratamiento y que presentaban ciclos estrales regulares de 4 días. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz y oscuridad (luz desde las 06:00 h hasta las 20:00 h) y temperatura (22 a 24 °C). Se les administró alimento balanceado (Cargill, Córdoba) y agua de bebida ad libitum. En estas ratas se indujo el Hipertiroidismo (HiperT) mediante la administración subcutánea de T₄ a una dosis de 0,25 mg/kg/día desde 8 días antes de aparearlas y hasta el sacrificio en los días 19 (G19), 20 (G20) y 21 (G21) de gestación. La presencia de espermatozoides en el extendido vaginal en el día posterior al apareamiento con un macho fértil en la noche del proestro, se consideró como día 0 de preñez. Se registraron los días y hora aproximada del parto.

Para mantener la lactancia en las madres HiperT que serían utilizadas en el día 2 posparto (ver abajo), se cambió la dosis de T₄ a partir del día 18 de gestación a 0,1 mg/kg/día hasta el día del sacrificio (ver esquema). Esto último se implementó debido a que las crías de las ratas HiperT con la dosis alta de T₄ mueren en los primeros días posparto por deficiencia en la lactancia.

El mantenimiento y manejo de los animales fue llevado a cabo de acuerdo a la Guía del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH publicación N° 86-23, revisada en 1985 y 1991) y de acuerdo a los requerimientos éticos del Reino Unido para la experimentación con animales (Animal Scientific Procedures, Act 1986). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el CICUAL de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Cuyo.

Para determinar el perfil hormonal y realizar los estudios en el HMB durante la gestación y lactancia temprana se sacrificaron por decapitación grupos de 8 ratas HiperT y controles en G19, G20 y G21 de gestación y en el día 2 de lactancia (L2) a las 12 hs. Se recolectó la sangre troncal, se dejó coagular a temperatura ambiente, se separó el suero por centrifugación y se conservó a -20°C hasta su utilización. Se removieron rápidamente los cerebros que se colocaron en una matriz (Slicer modelo RBM 4000C, ASI, Inc., Warren, MI, USA) para realizar los cortes correspondientes de 2mm, a partir de los cuales se disecaron los HMB. Los HMB se tomaron entre las coordenadas de -2,12 a -4,52mm del bregma, utilizando como límites el área del quiasma óptico e hipotálamo lateral en la superficie ventromedial del cerebro, marcadas por cortes oblicuos a lo largo de ambos lados del tercer ventrículo. La sección de tejido tomada incluyó el PeV, ARC y EM, siendo excluida el área del hipotálamo anterior, núcleo

ventromedial y zona incerta. Todo el procedimiento se realizó en un baño de hielo molido (4 °C). Los HMB de las ratas fueron inmediatamente almacenados a -70°C hasta su utilización.

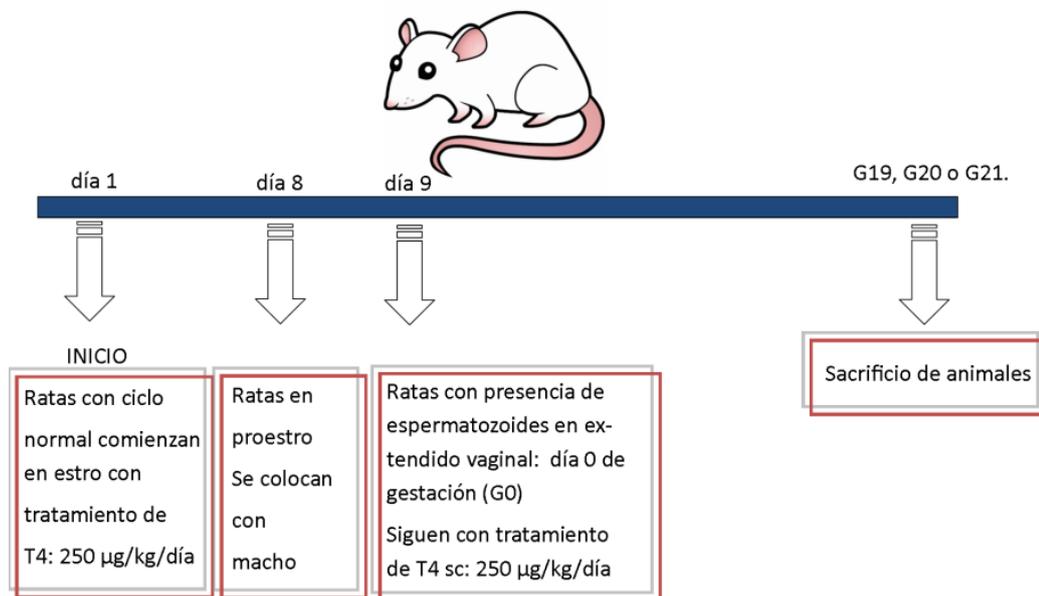


Figura 3.1: Esquema del tratamiento de animales para la inducción del hipertiroidismo para estudios al final de la gestación. Abreviaciones: G19: día 19 de gestación, G20: día 20 de gestación y G21: día 21 de gestación.

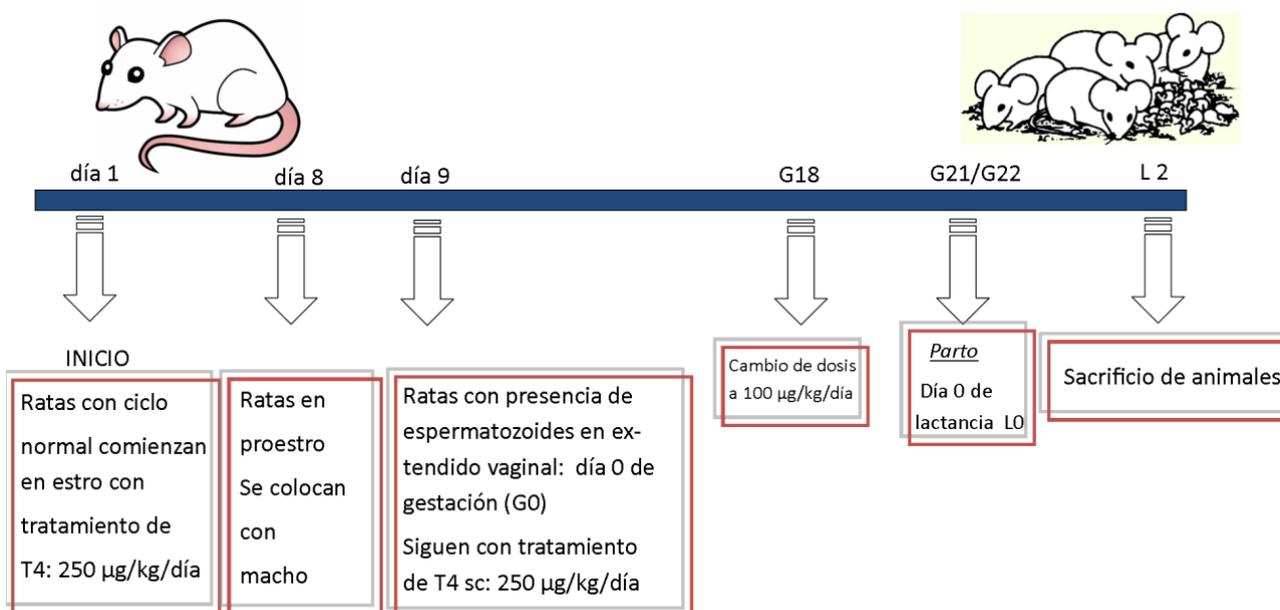


Figura 3.2: Esquema del tratamiento de animales para la inducción del hipertiroidismo para estudios en lactancia temprana. Abreviaciones: G21: día 21 de gestación, L0: día del parto, considerado día cero de lactancia, L2: día 2 de lactancia.

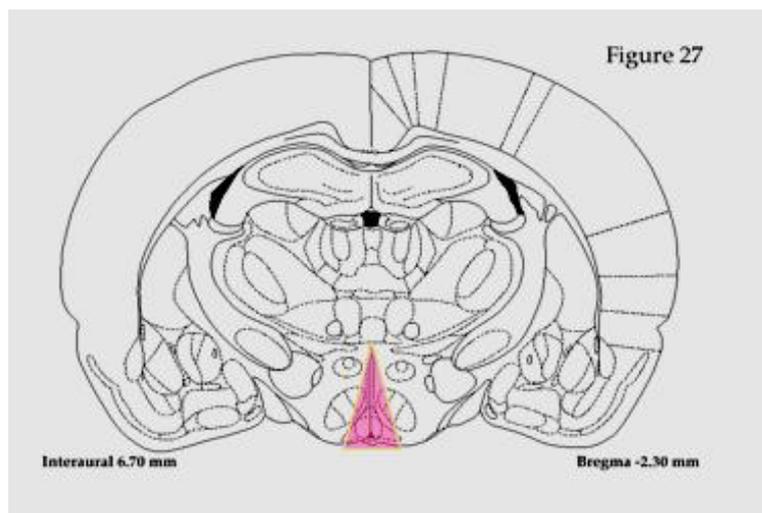


Figura 3.3: Esquema de la sección del cerebro de la que se disecciona el HMB, donde se encuentran las poblaciones de neuronas dopaminérgicas. The rat brain, Paxinos y Watson, 1986.

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES HORMONALES

Las concentraciones de prolactina (PRL) y hormona estimulante de la tiroides (TSH) fueron medidas por radioinmunoensayo de doble anticuerpo usando materiales provistos por A.F. Parlow y por el NHPP (National Hormone and Pituitary Program, Harbor- UCLA Medical Center, Torrance CA). Las hormonas fueron radioiodinadas usando el método de la Cloramina T y purificadas mediante el pasaje por Sephadex G-75. Los resultados se expresaron en relación a las preparaciones estándar de rata RP-3, TSH RP-3. La sensibilidad del ensayo en suero fue de 0.5 ug/L para todas las hormonas y los coeficientes de variación intra e inter- ensayo fueron menores al 10 % para todas las hormonas. Todas las muestras fueron medidas en el mismo ensayo por duplicado.

Las concentraciones séricas de las hormonas E₂, P₄, T₃ y T₄ fueron medidas utilizando kits comerciales para hormonas totales (radioinmunoensayo de doble anticuerpo, kits Coat-a-Count para T₃ total, T₄ total, y Progesterona, Siemens, USA y kit DSL-4800 para estradiol, Beckman-Coulter, USA).. La validación y puesta a punto de los kits para la medición de hormonas en suero de rata fue realizada previamente en nuestro laboratorio (Hapon y col., 2003; 2010).

3.3 AISLAMIENTO DE ARN

El ARN total fue aislado del HMB usando TRizol (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante (Chomczynski, 1993), adaptado para el área hipotalámica. El tejido fue homogenizado en 500 µl de TRizol usando un homogenizador de vidrio. Se adicionó 100 µl de cloroformo para separar las fases, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C por 15 minutos. La fase acuosa que contiene, fue separada y el ARN fue precipitado con 250 µl de alcohol isopropílico, nuevamente centrifugado y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el pellet de ARN

se lavó con 500 µl etanol al 75 % en agua libre de RNAasa. Una vez lavado el ARN se solubilizó en agua libre de RNasa, se realizó la cuantificación por espectrofotometría. Luego se corroboró la integridad del ARN aislado mediante un gel de integridad (agarosa 1%). El ARN se precipitó con NaCl 3M y etanol absoluto. Luego las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

3.4 SÍNTESIS DE cDNA

El ADN complementario al ARNm fue sintetizado usando el equipo PCT-100 Programmable Thermal Cycler MJ Research con productos de Invitrogen usando la enzima retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLVRT) en un volumen de 20 µl conteniendo 2.5 µg de RNA. Los tubos se incubaron en baño a 70° C por 5 minutos e inmediatamente fueron colocados en hielo. La síntesis del cDNA se realizó con una solución de mezcla que incluye por tubo: 4 µl de Buffer 5X [250mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 2 µl de ditioneitol (DTT), 1 µl de 2'-deoxinucleotido-5'-trifosfato (dNTP) 10 mM y 1 µl de la enzima M-MLVRT (200 unidades). Las muestras fueron sometidas a un programa de una hora a 37° C y 5 minutos a 95° C para finalizar. Concluido el mismo, a cada tubo se le adicionó agua libre de RNasa y se almacenaron a -20°C.

3.5 PCR EN TIEMPO REAL

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) en tiempo real fueron llevadas a cabo en el equipo Rotor-Gene 6000, Corbett, utilizando el colorante EvaGreen 20X (Biotium, Inc.). Se realizaron pruebas para establecer las cantidades óptimas de cDNA, enzima y otros reactivos. El volumen final de la reacción fue de 20 µl conteniendo 15 µl de solución master con reactivos del kit de la enzima polimerasa recombinante *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 8), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % (v/v) glicerol, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM, 5 pmol de cada *primer* (sentido y contrasentido), 5U de la enzima Taq polimerasa, 1µl del colorante EvaGreen y 50 ng de ADNc, salvo que se indique otra cosa en cada experimento específico. Las secuencias de los *primers* específicos fue seleccionada de la bibliografía y verificada por el programa BLAST, los que no se encontraron fueron diseñados y corroborados por programa BLAST; todos se presentan en la tabla N°1. Luego de un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, la amplificación fue llevada a cabo por 40 ciclos.

La especificidad y la pureza de la reacción de amplificación fue determinada por la representación de la curva de *melting* analizada desde 67 °C hasta 95 °C con incrementos de 0.5 °C. Se observó un pico distintivo indicando que una única secuencia de ADN fue amplificada durante cada PCR. En cada ensayo de PCR se incluyeron controles negativos, dos de los cuales fueron realizados durante la retrotranscripción (uno de los cuales no contenía muestra y el otro control se realizó sin la enzima de la

retrotranscripción). El método de comparación de números de ciclos umbrales (Ct) fue usado para la cuantificación de los resultados obtenidos por las PCR en Tiempo Real (PCR-TR) y el cálculo del Δ Ct. El patrón de expresión de los genes analizados fue normalizado respecto al gen S16 (gen *housekeeping*). Para llegar a la elección del mismo se probaron varios genes “*housekeeping*”, y se seleccionó el que no presentaba variación en la expresión del ARNm por el tratamiento, ni por los días de gestación estudiados. Para analizar los datos obtenidos se utilizó el método del Δ Ct. El Δ Ct de cada muestra fue calculado por la diferencia entre el Ct del gen S16 y el Ct del gen de interés. La eficiencia de cada PCR-TR fue calculada usando la ecuación $E=10^{-[1/s]}$ (Schmitg y Livak 2008, Plaffl 2001), siendo s la derivada de la pendiente de cada corrida establecida con curvas estándar de cada par de *primers*, que siempre estuvo en valores de 0,98 a 1,00.

Para terminar de validar cada par de *primers* se determinó su eficiencia, siendo este valor siempre cercano a 2. Para determinar la linealidad de las reacciones se realizaron curvas con *pools* de todas las muestras en distintas concentraciones 120, 60, 30, 15, 7.5 ng finales. Una vez puestas a punto las condiciones de reacción para cada par de *primers*, los productos de reacción se separaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio para determinar la amplificación de un solo producto del tamaño esperado (esto sólo se realizó por única vez en la puesta a punto de las reacciones).

Gen	Secuencia (5`-3`)	Acceso al Gen Bank	Tamaño del producto
TR Alfa 1 S TR Alfa 1 AS	TGCCCTTACTCACCCCTACA AAGCCAAGCCAAGCTGTCCT	NM001017960	132
TR Alfa 2 S TR Alfa 2 AS	TGAGCAGCAGTTTGGTGAAG GAATGGAGAATTCCGCTTCG	NM031134.2	116
TR Beta 1 S TR Beta 1 AS	AGCCAGCCACAGCACAGTGA CGCCAGAAGACTGAAGCTTGC	J-03819.1	119
TR Beta 2 S TR Beta 2 AS	TATCTGGAAGACAGTCCGGC GGCCATGTCCAAGTCAGAGTCCT	NM25071.1	156
TH S TH AS	TCACCACCTGGTCACCAAGTT GTTCAACCGTGCTTGTACT	NM012740.3	125
PRL R (común) S RPRL R (forma larga) AS	CTGGGCAGTGGCTTTGAAG AAGGGCCAGGTACAGATCCA	NM001034111.1 NM012630.1	152

RP4-(total) S	TGGTTCGCCACTCATCA	NM022847	102
RP4-(total) AS	TGGTCAGCAAAGAGCTGGAAG		
RP4-B S	CCAATACCGATCTCCCTGGAC	NM022847	127
RP4-B AS	CTTCCACTCCAGAGAAAGCTCC		
STAT 5b S	CAGTTCAGTGTTGGTGGAAATGAG	NM_022380.1	105
STAT 5b AS	GGTAGCCGTCGCATTGTTGT		
SOCS1 S	CTTCTTGGTGCGCGACAGT	AJ243123	67
SOCS1 AS	GGCCCGAAGCCATCTTC		
SOCS3 S	CAGCTCCAAGAGCGAGTACCA	AJ249240	83
SOCS3AS	CGGTTACGGCACTCCAGTAGA		
CIS S	GCCTTCCCAGATGTGGTCA	XM_343472	63
CIS AS	CCGGGTGTCAGCCGTAC		
RXRα S	GAGGACATGCCTGTAGAGAAGATT	NM_012805.2	126
RXRα AS	ACAGATGTTGGTAACAGGGTCATT		
RXRγ S	TGAACAGCAAACATGTATGG	NM_031765.1	91
RXRγ AS	TGG ATG TGG AGC CAG TGT GA		
NCoR1 S	AGTCGCTACAGCCCAGAGTC	XM 001077495.2	125
NCoR1 AS	CTCCTCTCTGGGGATTTTCC		
NCoR2 S	CCGAACACCACTCACCAA	NM_001108334.1	100
NCoR2 AS	ACCTGCCTGTAGCCTCATA		
CoA1 S	TGCTCCCGAGGAGGTTAAA	NM_001108012.1	64
CoA1 AS	ATCAAACCTGGTCAAGGTCAGC		
CoA2 S	CTGTGAAGGAGGAGGTGAGC	NM_031822.1	76
CoA2 AS	TCCAAAATCTCTCCAAGTTGTC		
DIO 2 S	CTTTGAACGTGTGTGCATCGT	NM_031720.4	101
DIO 2 AS	TCTCCAGCCAACTTCGGACTT		
DIO 3 S	GCTCGAACTGGCAACTTTGTC	NM_017210.4	256
DIO 3 AS	GTGAGATGCTGGCGACTTATTG		
S16 S	TCCAAGGGTCCGCTGCAGTC	XM_341815	100
S16 AS	CGTTCACCTTGATGAGCCCATT		

Tabla 1: secuencia de los *primers* específicos utilizados para cada tipo de gen. Se muestra el tamaño del producto y el código de acceso al Gen Bank.

3.6 EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA, RP4, RE Y DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE LA HORMONA TIROIDEA POR WESTERN BLOT.

Los niveles de expresión de las proteínas se determinaron por Western blot a partir de la fase orgánica de la extracción del ARN de los HMB con el reactivo TRizol (Invitrogen Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de proteínas. Los *pellets* de proteína se homogenizaron y se reservó una alícuota a -20 °C para la electroforesis, otra alícuota se destinó a la determinación de la concentración de proteínas totales por duplicado por el método del azul de Coomassie modificado por Bradford (1976) utilizando ASB (Albúmina sérica bovina) como estándar por triplicado. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5 % con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de una alícuota de proteínas de concentración ajustada.

Para ello, los tubos con extractos proteicos destinados a la electroforesis fueron diluidos en buffer de siembra (10mM TRIS-HCl, SDS 1 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), 1mM EDTA, 20mM DTT, azul bromofenol 0.05 % (p/v, pH 6.8) e inmediatamente colocados en un baño de agua a ebullición por 2 minutos. Se sembraron 8 µg o 20 ug de proteínas totales y fueron separadas electroforéticamente utilizando como buffer de corrida: 25 mM Tris, 250 mM glicina (pH 8,3) y SDS al 0.1 % (p/v). En la misma corrida se sembraron en forma paralela marcadores de peso molecular. La electroforesis se realizó a 100 V durante aproximadamente 90 minutos. Una vez finalizada la corrida las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF (tamaño del poro 0.45 µm, Hybond TM Amersham) durante aproximadamente 16 horas a 30 V a 4 °C utilizando como buffer de transferencia 25 mM Tris, 19 mM glicina SDS 0.025 % (p/v) y metanol al 20 % (v/v), pH 8,3.

Una vez finalizada la transferencia se colorearon las membranas con rojo ponceau para evaluar la eficiencia de la transferencia y al mismo tiempo se colorearon los geles para determinar si la transferencia de las proteínas del gel a la membrana fue óptima.

3.7 EXPRESIÓN DE FOSFO-TIROSINA HIDROXILASA, RPRL, STAT5, CIS Y RTβ1 POR WESTERN BLOT.

Para la determinación de estas proteínas los HMB tomados de animales controles y tratados fueron sometidos a extracción proteica total con buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas para conservar los grupos fosfatos y la integridad de las proteínas. Para ello se homogenizaron los HMB en 200 µl de buffer de lisis (SDS 1 % (p/v), Glicerol, TRIS 5 mM,) con inhibidores de proteasa y fosfatasas (leupeptina 1 mg/mL, Aprotinin 1 mg/mL, coctel SIGMA p1380, inhibidores de fosfatasas NaF 10 mM, PMSF, Na₃VO₄ 1 M) a 4°C. Se reservó una alícuota a -20 °C

para la electroforesis, otra alícuota se destinó a la determinación de la concentración de proteínas totales por duplicado por el método del azul de Coomassie modificado por Bradford (1976) utilizando ASB (Albúmina sérica bovina) como estándar por triplicado. Se realizó SDS-PAGE de una alícuota de proteínas de concentración ajustada.

Los tubos con extractos proteicos destinados a la electroforesis fueron diluidos con una relación ¼ vol de buffer de siembra (10 mM TRIS-HCl, SDS 1 % (p/v), glicerol 20 % (v/v), 1 mM EDTA, 20 mM DTT, azul bromofenol 0.05 % (p/v, pH 6.8) e inmediatamente colocados en un baño de agua a ebullición. por 2 minutos Se sembraron 20 µg de proteínas totales que fueron separadas y transferidas como se describió en el punto anterior.

3.8 CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS.

Proteína	Bloqueo	Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
RT α	Leche descremada al 5 % en PBS-T por 30 min.	Anti-TR α 1, FL-408, IgG de conejo policlonal, Sc-772, Santa Cruz dilución 1:300 por 2 horas a TA en solución de bloqueo.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
RT β 1	Leche descremada al 5 % en TBS-T por 30 min.	Anti-RT β 1 (J52) sc-738 monoclonal de ratón IgG1, Santa Cruz, dilución de 1:500 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-mouse DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:2500 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
TH	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en buffer de lavado por 30 min.	anti-TH con una dilución 1:500 en solución de bloqueo (Semenko y col. 1986) por 120 min a TA	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-mouse DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:2500 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
p-TH	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en buffer de lavado (TBS) por 30 min.	Anti-pTH(ser-40) IgG de conejo, sc-135715 Santa Cruz, dilución de 1:1000 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
STAT5	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en buffer de lavado por 30 min.	Anti-STAT5(C-17) IgG de conejo sc-835 Santa Cruz, dilución de 1:500 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
CIS	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en	Anti CIS (H80) SC 15344, Santa Cruz policlonal de conejo IgG, dilución 1:500 en solución de	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de

	buffer de lavado por 30 min.	bloque toda la noche a 4°C.	bloqueo durante 120 min a TA.
RP4	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en buffer de lavado por 30 min.	Anti-RP4 (PR130) rabbit polyclonal, generado y testeado en el departamento de Endocrinología y Hormonas, Universidad Nacional del Litoral. Argentina Dilución: 1:250 en solución de bloqueo a 4 °C toda la noche.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
RE α	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en buffer de lavado por 30 min.	Anti E α (MC.20) SC-542, policlonal de conejo IgG, Santa Cruz, dilución de 1:300 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
RPRL	ABS 0.5 % (p/v) en buffer de lavado por 30 min.	Anti-Receptor de Prolactina EPR7184(2), AbCam, monoclonal de conejo, dilución 1:1000, en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-rabbit DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:3000 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.
α -Tubulina	ABS 0.5 % (p/v) suero de caballo 2 % (v/v) en buffer de lavado por 30 min.	α -Tubulina (monoclonal mouse IgG1, Sigma, USA) con una dilución 1:12000 en solución de bloqueo por 90 min a TA	Anticuerpo conjugado a peroxidasa goat anti-mouse DAKO, CA, USA) con una dilución de 1:2500 en solución de bloqueo durante 120 min a TA.

Luego de realizar una serie de lavados, la inmunorreactividad de los complejos de proteína-anticuerpo fueron revelados utilizando un kit de quimioluminiscencia (ECL TM, Amershan Pharmacia, Biotech) y revelados con el equipo de Bio-Rad Molecular Image ChemiDoc XRS. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría óptica utilizando el programa de NIH Image 1.6/ppc (disponible gratis en internet en el dominio <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

3.9 INMUNOFLUORESCENCIA.

Se determinó la coexpresión de la enzima reguladora de la síntesis de dopamina tirosina hidroxilasa (TH) a nivel hipotalámico con los RTs y STAT5. Las ratas fueron anestesiadas a las 12.00 h con una inyección i.p. de hidrato de cloral al 8 % p/v y los cerebros fueron perfundidos intracardíacamente primero con solución lavadora, salina al 0.9 % (p/v), seguida de una solución fijadora, paraformaldehído al 4 % (p/v) en buffer borato sódico 0.01 M, pH 7.4 (Valdez et al. 2007). Los cerebros fueron seccionados serialmente (cortes de 10 μ m) con un crióstato (Microm) comenzando en el núcleo periventricular (PeV) (-1.80 mm posterior al bregma) y a través de toda la extensión rostrocaudal del arcuato (ARC) (-2,2 mm a -4,30 mm posterior al bregma) siguiendo los

planos correspondientes a los núcleos del HMB según el atlas del cerebro de la rata de Paxinos y Watson (1986). Para detectar la inmunorreactividad de los cuerpos celulares TH (+) y sus procesos inmediatos en el PeV y ARC, y los axones distales en la EM se realizó la IFI para TH. Los cortes de 10 μ m, pegados en portaobjetos se incubaron en solución de NH_4Cl para bloquear los grupos aldehídos de la solución de fijado (paraformaldehído) debido a que son fuertes puntos de unión de los anticuerpos, luego se incubó con la solución de bloqueo con Tris HCl 0.01 M pH 7.4, ABS 1 % (m/v) y tritón X-100 0.3 % (v/v), luego se incubó con el anticuerpo primario desarrollado en ratón contra TH de rata (Semenko y col. 1986) generosamente provisto por el Dr. Claudio Cuello (Universidad de McGill, Canadá). La dilución usada fue de 1:150 en solución de bloqueo, toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se lavaron los cortes con solución buffer (PBS 0.1 M pH 7.4) y se incubaron con el anticuerpo secundario AlexaFluor goat-anti mouse 555 (diluído 1:500 en solución bloqueante (PBS 0,1 M pH 7.4, ASB 1 % (p/v), y tritón X-100 0.3 % (v/v). Posteriormente se lavaron varias veces con solución de lavado. Los cortes se incubaron nuevamente en solución de bloqueo por 40 minutos, luego se los incubó toda la noche a 4 °C contra los diferentes anticuerpos según corresponda:

Anticuerpo	Anticuerpo secundario
Anti-RT β 1 (J52) sc-738 monoclonal de ratón IgG1, Santa Cruz, dilución de 1:100 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	FICT Fluor anti mouse 1/200 en solución de bloqueo, por una hora y media a temperatura ambiente
Anti-TR α 1, FL-408, IgG de conejo policlonal, Sc-772, Santa Cruz dilución 1:100 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Alexa Fluor 488 donkey anti-goat 1/700 en solución de bloqueo, por una hora y media a temperatura ambiente
Anti-STAT5(C-17) IgG de conejo sc-835 Santa Cruz, dilución de 1:500 en solución de bloqueo toda la noche a 4 °C.	Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit 1/700 en solución de bloqueo, por una hora y media a temperatura ambiente

Al día siguiente de la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron los cortes con PBS 0,1 M, y se lo incubó con el anticuerpo secundario por una hora y media. Pasado el tiempo de incubación con los anticuerpos secundarios, los cortes se lavaros con PBS 0,1M. Se retiró todo el líquido de los cortes y se pasó a montar los cortes con Gold DAPI (Invitrogen), este medio de montaje tiñe los núcleos celulares de color azul.

Las IFI fueron examinadas por microscopía de fluorescencia con un microscopio NIKON Eclipse E 200. Las secciones de cada cerebro fueron clasificadas de acuerdo a su localización dentro del HMB basada en planos comparables con las figuras 25-35 (-2,2 mm a -4,30 mm posterior al bregma) del atlas de Paxinos y Watson (1986) para el cerebro de la rata adulta. Se muestran figuras representativas del núcleo ARC y dorsomedial (coordenadas -2,36/-2,56 posterior al bregma)

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó ANOVA de una o dos vías según corresponda, seguido por el test de Bonferroni para comparar las diferencias entre las medias de los diferentes grupos y se aplicó el test “t” de student para establecer diferencias entre las medias cuando se analizaron dos grupos (en L2), usando el programa Graphpad Prism. Cuando las varianzas no fueron homogéneas se aplicó transformación logarítmica de los datos para homogenizar las varianzas, y si aun aplicando la transformación las varianzas no eran homogéneas se utilizó el test de Mann Whitney. La diferencia entre medias fue considerada significativa con un $p < 0.05$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 "EFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE LA SECRECIÓN DE PRL Y LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE TH, COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PRL Y RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA"

Objetivo 1: “Determinar el efecto del HiperT sobre la secreción de PRL al final de la gestación y lactancia temprana midiendo la expresión génica y/o proteica del RPRL y de las principales moléculas de activación y modulación de su vía (STAT5b, SOCS y CIS) y su correlación con la expresión del RP4 (isoforma A y B), RE, TH y los niveles hormonales de T₃, T₄, TSH, PRL, E₂ y P₄. Determinar además la expresión de la TH fosforilada en Ser-40 (forma activa de TH, p-TH).”

Como hemos descrito en la introducción, la secreción de PRL durante la gestación y la lactancia está sujeta a un complejo sistema de regulación que involucra a esteroides ováricos, hormonas placentarias y sistemas de neurotransmisión como los dopaminérgico, adrenérgico, serotoninérgico y opioide, estos últimos ejerciendo acciones duales (Soaje & Deis 1994, Valdez et al. 2014). El principal regulador de la secreción de PRL es DA, producida por las neuronas TIDA, THDA y PHDA localizadas en el núcleo ARC y en el núcleo PeV (Freeman et al. 2000). La producción de DA por las neuronas TIDA es regulada por la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la biosíntesis de DA. A la vez la expresión de la TH es inducida por la propia PRL, actuando a través de los receptores de PRL largos (RPRL) presentes en las neuronas dopaminérgicas y la vía de señalización JAK2/STAT5 (Freeman et al. 2000, Grattan 2015), en el clásico feedback corto que regula la liberación de PRL hipofisaria. La transición entre el final de la gestación y la lactancia es caracterizada por cambios considerables en los niveles hormonales circulantes, como la caída de P₄, el incremento de E₂ y el pico preparto de PRL que participa en la inducción de la lactogénesis a nivel mamario y de la conducta maternal (Jahn et al. 1986, Grattan & Averill 1990). A nivel hipotalámico también hay cambios en la respuesta neuronal, en particular, se instaura una disminución de la respuesta de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas a PRL, que se conoce como desensibilización o refractariedad de las neuronas dopaminérgicas y permite mantener los niveles elevados de PRL durante la lactancia (Andrews & Grattan 2004). Esta caída en la actividad de las neuronas TIDA al final de la gestación ocurre con una caída de la expresión de la TH (Starr & Hilton 1999, Anderson et al. 2006a, Grattan et al. 2008) y un aumento de la expresión de los supresores de la señalización de citoquinas (SOCS), que limitan la señalización de PRL y así atenúan el feedback corto de PRL. Las proteínas SOCS son inducidas por la propia PRL y los niveles en aumento de E₂ y sus niveles aumentan al final de la

gestación y en la lactancia en neuronas del núcleo ARC (Anderson et al. 2006a, Steyn et al. 2008). Sin embargo la caída del tono dopaminérgico en el final de la gestación no es acompañada inmediatamente con aumento en los niveles de PRL, si no que su aumento ocurre luego de la caída de los niveles circulantes de P₄, indicando un rol crucial de este esteroide como un inhibidor de la liberación de PRL al final de la gestación.

Para explorar el mecanismo por el cual el HiperT afecta la secreción de PRL ocasionando una falla en la lactancia, en este objetivo evaluamos el efecto de un tratamiento crónico de T₄ la expresión hipotalámica de TH, RPRL, miembros de la vía de señalización de PRL (STAT5, SOCS, CIS), receptor de E₂ y receptor de P₄ durante el final de la gestación y en la lactancia temprana en la rata.

4.1.2 Efecto del hipertiroidismo sobre las hormonas tiroideas circulantes al final de la gestación y en el posparto temprano.

Los niveles elevados de T₃ y T₄ y los niveles bajos de la TSH en los animales tratados con T₄ confirman el estado de hipertiroidismo inducido por el tratamiento farmacológico (Tabla 4.1). Por otro lado, observamos que los niveles de T₄ en las ratas controles cayeron significativamente entre G19 y G21 y luego aumentaron en el posparto a niveles aún mayores que en G19. Los niveles de T₃ tuvieron un patrón similar pero con variaciones mucho más pequeñas, que no mostraron diferencias significativas entre si.

DIA	T ₃ (ng/dl)		T ₄ (ug/dl)		TSH (ng/dl)	
	Control	HiperT	Control	HiperT	Control	HiperT
G19	61,8 ± 4,0	363,7 ± 58,1*	1,2 ± 0,1 ^{a,c}	20,4 ± 2,7*	3,1 ± 0,4	1,4 ± 0,3 *
G20	53,3 ± 2,6	322,0 ± 26,1*	0,5 ± 0,1 ^b	18,8 ± 0,6*	2,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1*
G21	54,8 ± 4,0	241,2 ± 25,1*	0,9 ± 0,1 ^{a,b}	13,2 ± 1,4*	3,5 ± 0,4	1,5 ± 0,1*
L2	57,2 ± 4,5	101,4 ± 16,2 *	1,6 ± 0,1 ^c	3,7 ± 0,8 *	2,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1*

Tabla 4.1: Niveles circulantes de hormonas tiroideas (T₃, T₄) y TSH en ratas controles (Eutiroideas) e hipertiroides (HiperT).

Las letras identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, a p < 0.05..

4.1.3 Efecto del hipertiroidismo en niveles circulantes de PRL y hormonas ováricas al final de la gestación.

La caída de P₄ circulante observada entre los días G20 y G21 en las ratas controles se adelantó al día 20 (G20) en el grupo HiperT. Esta caída adelantada de P₄ en el grupo tratado con T₄ es responsable del adelanto del pico pre-parto de PRL que se detectó al mediodía del G21 en el grupo HiperT (Figura 4.1.1). Este pico de PRL se observa en el grupo control en la tarde-noche del día G21 (Rosato et al. 1992), mientras que a la hora del sacrificio (12 h) de G21 los niveles de PRL aún están bajos. Estos resultados confirman datos previos del laboratorio (Rosato et al. 1992, (Rosato *et al.* 1998)). En el grupo control los niveles circulantes de E₂ fueron similares en los tres días (G19, G20 y G21) mientras que en el grupo HiperT los valores fueron significativamente menores que los controles en G19 y G21, sin diferencia en G20 (Figura 4.1.1). Las curvas de peso corporal de las hembras controles e HiperT a lo largo de la gestación no fueron significativamente diferentes (estos datos no se muestran).

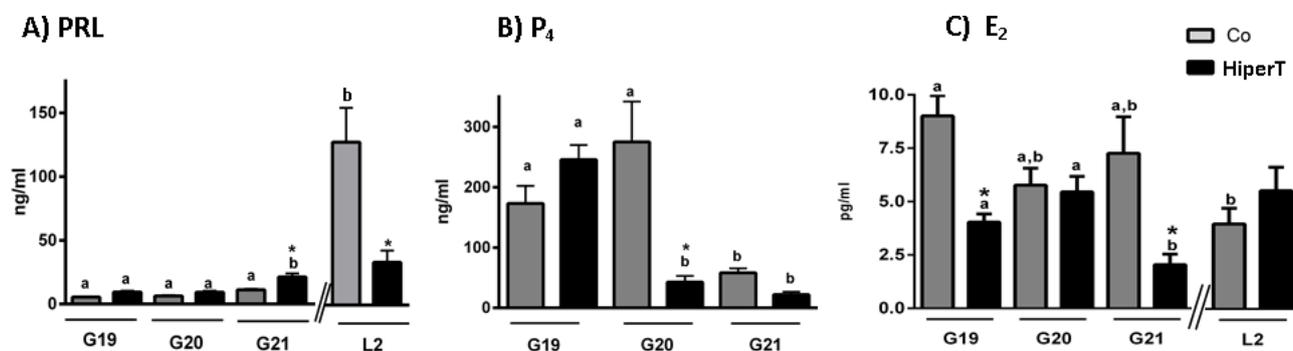


Figura 4.1.1: Niveles circulantes de hormonas al final de la gestación y en lactancia temprana. A) Prolactina, B) Progesterona y C) Estradiol. En barras grises se representan los grupos control y en barras negras los grupos de ratas hipertiroides. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, $p < 0.05$.

4.1.4 Efecto del Hipertiroidismo sobre la expresión de la enzima TH al final de la gestación.

Para investigar los mecanismos hipotalámicos por los que el HiperT modifica el patrón de la secreción de PRL entre los días 19 y 21 de gestación, medimos la expresión del ARNm de la TH por PCR en tiempo real y la expresión proteica de TH total y fosforilada (forma activa de TH) por Western blot.

En las ratas controles los niveles de ARNm disminuyeron desde el día G19 a G21. En el grupo HiperT la caída del ARNm entre G19 y G20 fue similar a los controles, pero interesantemente dejaron de caer en G21 mostrando valores significativamente más altos que los controles (Figura 4.1.2). La expresión proteica de TH también decreció progresivamente entre G19 y G21 en las ratas controles.

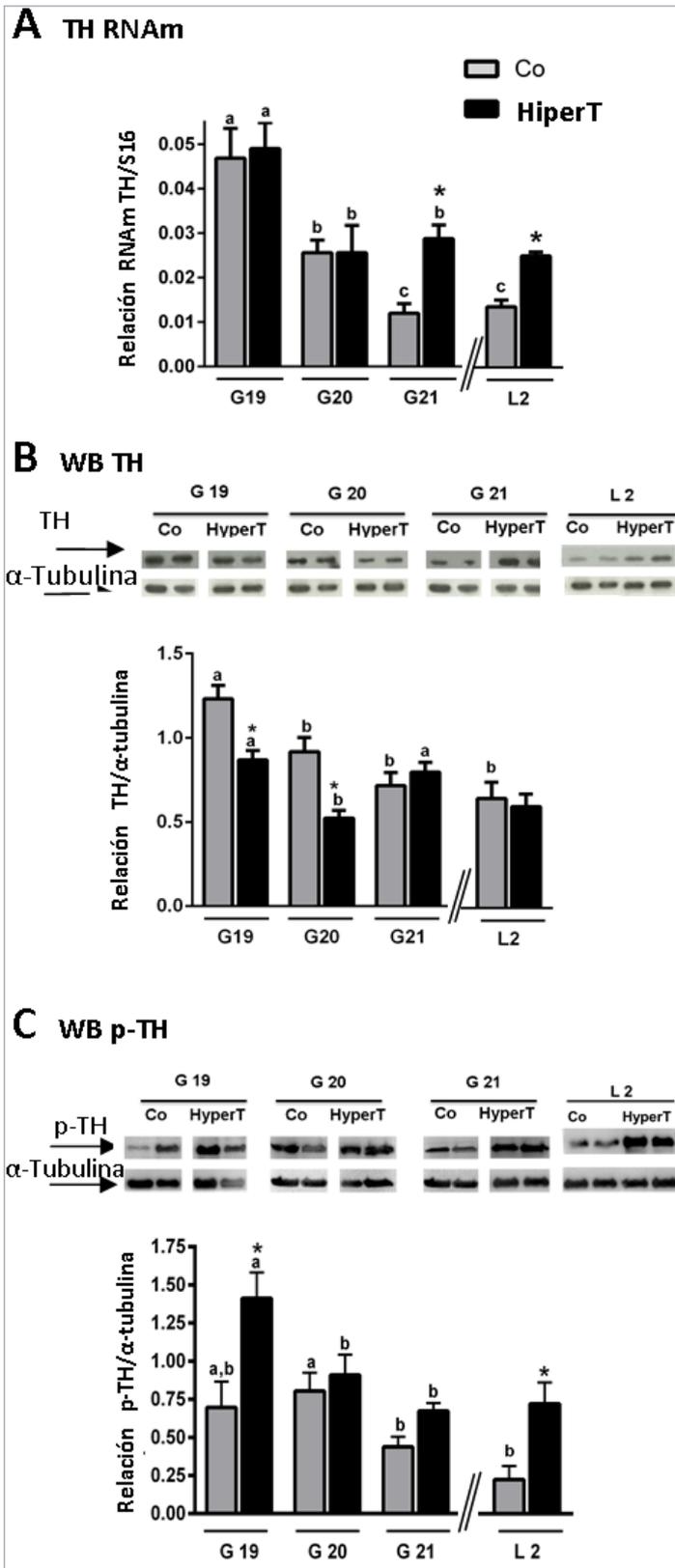


Figura 4.1.2: Expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en el HMB al final de la gestación y lactancia temprana. A) Expresión de ARNm, B) contenido de la proteína total y C) contenido de la proteína fosforilada en Ser-40, que representa la forma activa de la enzima. En barras grises se representan los grupos control y en barras negras los grupos de ratas hipertiroideas. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, a $p < 0.05$.

En el HiperT la expresión proteica de TH también disminuyó y fue significativamente menor que los controles en G19 y G20, pero en G21 la expresión se mantuvo sin cambios con valores similares a los controles y fue significativamente mayor comparada con G20 HiperT. En las ratas controles, la forma activa de la enzima, la p-TH decreció de G20 a G21; En cambio en el grupo HiperT se observó un incremento significativo de los niveles de p-TH respecto a los controles en G19, pero en G20 y G21 se mantuvo similar a los controles (Figura 4.1.2). Los cambios en la p-TH observados en cada grupo fueron paralelos a los cambios y caída de la P₄.

4.1.5 Efecto del hipertiroidismo sobre la expresión de RPRL, STAT5b y miembros de la familia SOCS-CIS en el HMB al final de la gestación.

Para determinar los mecanismos por los cuales el HiperT induce cambios en la expresión y activación de la TH, que impactan en los niveles de PRL circulante al final de la gestación, medimos la expresión del ARNm del RPRL_{largo}, STAT5b y miembros de la familia SOCS-CIS por PCR en tiempo real y RPRL_{largo}, STAT5 y CIS por Western blot. En el grupo control, la expresión del ARNm del RPRL, STAT5b, SOCS3, SOCS1 y CIS mostró un patrón similar, con valores elevados en G19 que disminuyeron marcadamente en G20 y G21. El grupo HiperT mostró patrones similares con valores altos y similares a los controles en G19 y una caída en G20 y G21, excepto en la expresión del ARNm del RPRL, cuya expresión fue significativamente mayor en el grupo tratado comparado con el control en G19 (Figura 4.1.3).

Con respecto a los niveles proteicos del RPRL, encontramos expresión constante en las ratas controles, mientras que en el grupo HiperT los niveles aumentaron significativamente en G21, tanto en comparación con los controles como con los días anteriores en estudio. En ambos grupos los niveles proteicos de STAT5 decrecieron desde G19 a G20 y permanecieron bajos, en paralelo con el contenido del ARNm. Interesantemente, en el grupo HiperT los niveles proteicos de STAT5 fueron significativamente mayores que en los controles en G19, luego se observó una caída marcada en G20 seguido por un aumento en G21. Por otro lado, en los controles la expresión proteica de CIS mostró un aumento entre G19 y G20 con tendencia a decaer en G21. La expresión de la proteína CIS en el grupo HiperT en G19 fue significativamente mayor en comparación con los controles, con una caída posterior a valores similares a los controles. Intentamos medir la expresión de SOCS3 por *Western blot* pero no pudo ser detectada.

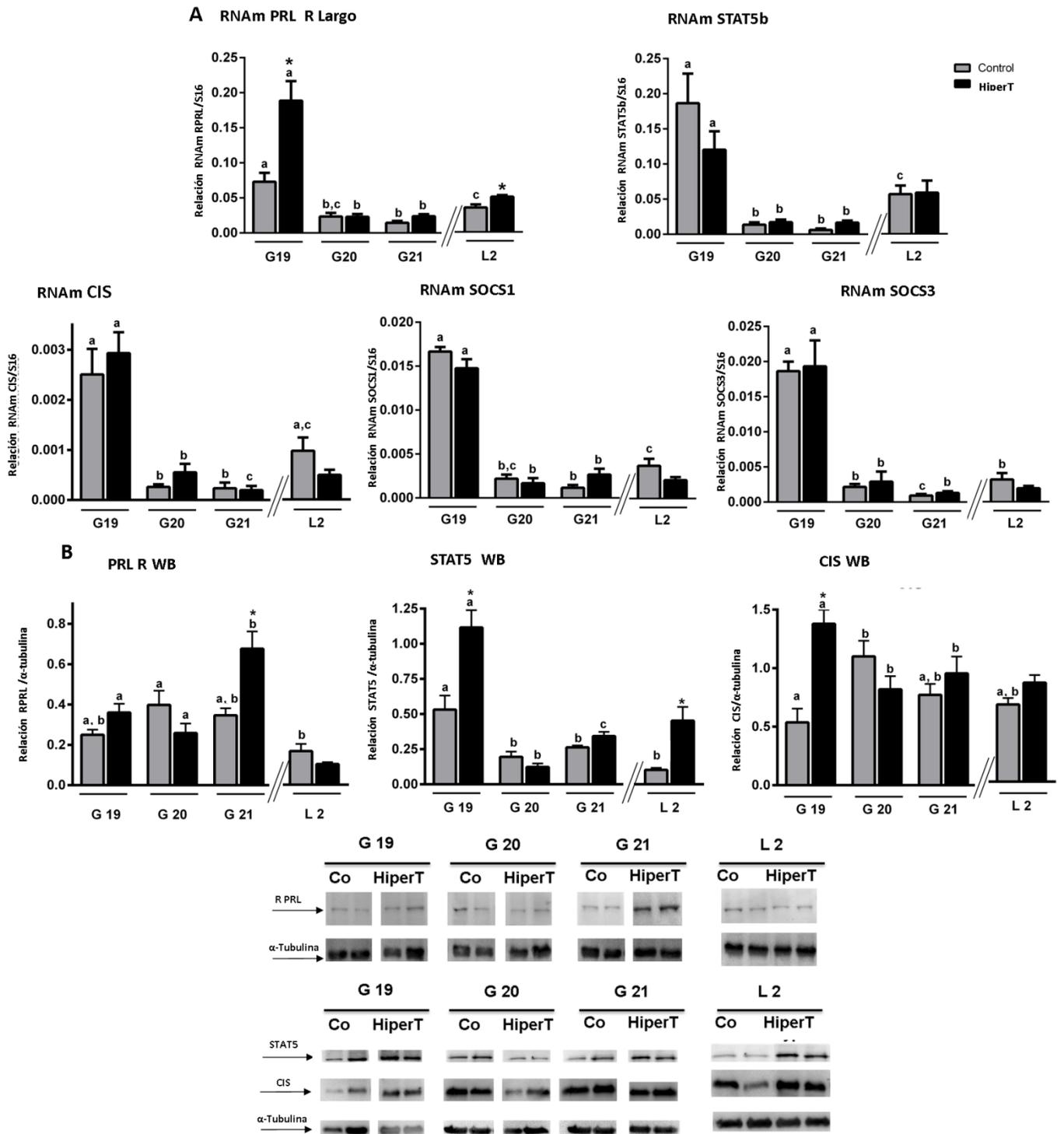


Figura 4.1.3: Expresión de la vía de señalización de prolactina al final de la gestación y lactancia temprana. A) Expresión del ARNm de Receptor de Prolactina (RPRL), STAT5b, CIS, SOCS1 y SOCS3. B) expresión de la proteína total del RPRL, STAT5 y CIS. En barras grises se representan los grupos control y en barras negras los grupos de hipertiroides. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, a $p < 0.05$.

4.1.6 Efecto del HiperT sobre la expresión del RE y RP al final de la gestación.

Como la P_4 y E_2 poseen roles en la regulación de PRL, también medimos la expresión del ARNm y de la proteína de sus receptores en el HMB al final de la gestación.

El contenido de ARNm del RP total, RPA y RPB tuvieron un comportamiento similar, decreciendo abruptamente desde G19 a G20 en el grupo control, mientras que en el grupo HiperT los contenidos de RP total y ambas isoformas fueron significativamente menores que los controles en G19, pero los RP total y RPA en G20 y el RPB en G21 estuvieron significativamente incrementados comparados con sus respectivos controles. La expresión proteica del RPA decreció desde G19 a G21 en el grupo control. En las ratas HiperT la expresión proteica de RPA fue significativamente más baja en G19 y G20 comparada con sus controles, con una tendencia a incrementar en G21, con valores similares a los controles. No pudimos detectar la proteína de la isoforma B del receptor (Figura 4.1.4).

Los niveles del ARNm del $RE\alpha$ en el grupo control mostraron un patrón similar al de los RPs, con una disminución significativa entre G19 y G20. En el grupo HiperT el patrón fue similar; sin embargo, en G19 los niveles del mRNA tendieron a ser más bajos que los controles, y se observó una disminución significativa entre G20 y G21. En contraste con los valores del mensajero, la expresión proteica del $RE\alpha$ en el grupo control fue similar en todos los días estudiados. En las ratas HiperT el contenido de la proteína fue significativamente mayor que en los controles en G19, cayó en G20 a valores significativamente menores que el grupo control, mientras que en G21 los valores fueron similares (Figura 4.1.4).

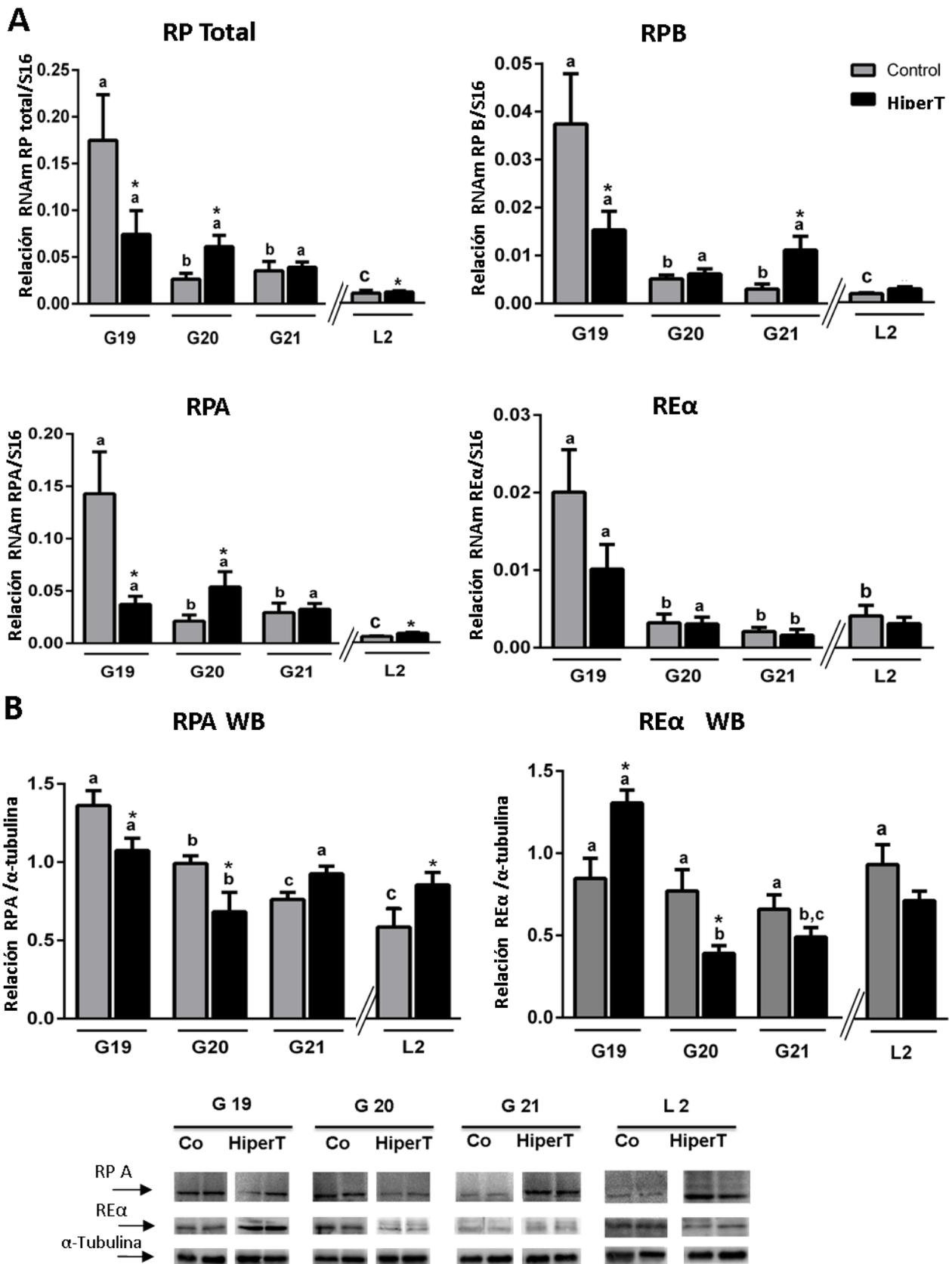


Figura 4.1.4: Expresión de los receptores esteroidales al final de la gestación y en lactancia temprana. A) Expresión del ARNm de Receptor de Progesterona total (RP), receptor de progesterona isoforma B (RPB), receptor de progesterona isoforma A (RPA) y receptor de estrógeno alfa (RE α). B) Expresión de la proteína total por Western blot de RPA y RE α . En barras grises se representan los grupos

control y en barras negras los grupos de ratas hipertiroides. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, $p < 0.05$.

4.1.7 Efecto del HiperT sobre los niveles de hormonas circulantes y la expresión de TH, RPRL, STAT5 y los miembros de la familia SOCS-CIS en el HMB en lactancia temprana (L2)

Los grupos de ratas HiperT que recibieron un tratamiento con una dosis de 0,250 mg/Kg/día de T_4 poseen una conducta maternal alterada (en algunos casos canibalismo) y las crías no pueden obtener la cantidad de leche suficiente para la supervivencia, razón por la cual se produce una mortalidad elevada (80-90%) en las primeras 24 horas después del parto (Rosato et al. 1998). Para poder evaluar el impacto del HiperT en la lactancia temprana, en estos grupos bajamos la dosis a 100 ug/Kg/día a partir de G18, de esta manera se mantiene el estado hipertiroides en la madre (ver tabla de hormonas 4.1) permitiendo la supervivencia de las crías y el establecimiento de la lactancia materna. Con este régimen de tratamiento el parto se adelantó aproximadamente 11 hs en las ratas HiperT (parto: Controles día 22, 18.30 \pm 0.6 horas; hiperT día 22, 07.00 \pm 1.2 horas, $p < 0.001$), y las camadas tuvieron significativamente más crías (Controles 10.4 \pm 0.4; HiperT 12.9 \pm 0.5 crías, $p < 0.01$), comportamiento maternal normal y producción de leche suficiente para la supervivencia de las crías, confirmando datos previos (Rosato et al. 1998, Varas et al. 2002).

Los valores de T_3 y T_4 en el grupo HiperT L2 fueron menores que en los grupos HiperT de gestación, reflejando la menor dosis administrada a estas ratas a partir de G18, sin embargo tuvieron valores significativamente mayores al grupo control L2, confirmando el estado HiperT de la madre. Los valores de TSH fueron significativamente menores, indicando que este tratamiento también fue capaz de inducir un estado hipertiroides (Tabla 4.1). Los niveles circulantes de PRL fueron menores en el grupo HiperT comparado con el grupo control, mientras que los valores circulantes de E_2 no fueron afectados por el estado tiroideo (Figura 4.1.1).

En el grupo L2 control los niveles de ARNm y proteína de TH (total y p-TH) fueron similares a los valores observados en G21 (ANOVA y Bonferroni post-hoc test, Figura 4.1.2). En el grupo HiperT L2, el ARNm de TH y de p-TH fue significativamente mayor mientras que los valores de la proteína total fueron similares a los controles. Los contenidos de ARNm de RPRL, STAT5b, SOCS1, SOCS3 y CIS en las ratas controles fueron significativamente mayores que en G21, mientras que la expresión proteica del RPRL y de STAT5 fueron significativamente menores y la de CIS fue similar a G21 ($p < 0.05$, ANOVA y Bonferroni post-hoc test, Figura 4.1.3). El HiperT aumentó significativamente la expresión del mensajero del RPRL y de la proteína STAT5 comparada con el grupo control, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el ARNm de SOCS1, SOCS3 y CIS ni tampoco en los niveles de expresión de las proteínas de RPRL y CIS (Fig. 4.1.3).

La expresión del ARNm de RP total y RPA en las ratas controles decreció significativamente entre G21 y L2, mientras que el ARNm de RPB, la proteína del RPA y mensajero y proteína del RE α no tuvieron cambios ($p < 0.05$, ANOVA y Bonferroni post-hoc test, Figura 4.1.4). El HiperT aumentó significativamente la expresión del ARNm del RP total y el RPA, sin cambios en la expresión del ARNm del RPB y RE α . El HiperT incrementó significativamente la expresión proteica del RPA en L2 respecto a sus respectivos controles, sin encontrarse diferencias en la expresión proteica del RE α .

Discusión.

Hemos encontrado previamente que el HiperT posee efectos perjudiciales sobre la lactancia, a través de un bloqueo de la liberación de PRL inducida por la succión que se ve reflejado una disminución de la producción de leche y en el bajo crecimiento de las crías (Varas et al. 2002). Los presentes resultados confirman resultados previos de nuestro laboratorio sobre el bajo nivel de PRL circulante en las ratas HiperT durante la lactancia establecida (día 7 y 14) (Varas et al. 2002) y extiende estos resultados a la lactancia temprana (L2). Nuestros datos confirman también el avance de la luteólisis y la liberación prematura de PRL descrita previamente (Rosato et al. 1992, Navas et al. 2011). La expresión de la TH y la p-TH hipotalámica son buenos indicadores de la actividad dopaminérgica hipotalámica, y se observa que sus variaciones correlacionan inversamente con los niveles circulantes de PRL. En el presente capítulo exploramos la expresión del ARNm y la abundancia de la proteína total y fosforilada de TH como puntos de modulación de su actividad. A través de la vía JAK2/STAT5, PRL induce la expresión de TH y la fosforilación en la serina 40 de la misma (Grattan et al. 2008). La fosforilación de la TH le confiere mayor afinidad por el cofactor tetrahidrobiopterina, resultando en un incremento de la síntesis de DA (Kumer & Vrana 1996), que limita la secreción de PRL, constituyéndose así el feedback corto, mecanismo por el cual PRL regula si propia secreción (Ben-Jonathan et al. 1980, Grattan et al. 2001b, Grattan et al. 2008, Brown et al. 2012, Romano et al. 2013, Grattan 2015). Los esteroides ováricos, en particular la P₄ también pueden modular la expresión de la TH y su activación por fosforilación, actuando directamente sobre la expresión de TH o indirectamente a través de la modulación de la expresión del RPRL y los miembros de la familia SOCS, principales moléculas inhibitoras de la vía de señalización de PRL (Arbogast & Voogt 1993, Arbogast & Voogt 1996, Jensik & Arbogast 2011).

Aunque P₄ inhibe la síntesis y la liberación de DA y en consecuencia estimula la secreción de PRL a través de la inactivación de la TH por un incremento de su desfosforilación (Arbogast 2010), también estimula la síntesis del ARNm y de la proteína de TH y largas exposiciones a P₄ incrementan la síntesis de DA resultando en la inhibición de la liberación de la PRL pituitaria (Jensik & Arbogast 2011). En concordancia con datos previos (Wang et al. 1993, Arbogast & Voogt 1996, Fliestra &

Voogt 1997, Li et al. 1999, Andrews et al. 2001, Valdez et al. 2007, Feher et al. 2010, Romano et al. 2013) en ratas controles el ARNm, la proteína y la forma fosforilada de la proteína de TH decrecen gradualmente en la transición entre el final de la gestación y la lactancia temprana, reflejando el establecimiento de la atenuación del feedback corto de PRL necesaria para mantener la hiperprolactinemia durante la lactancia (Wang et al. 1993). Además, en las ratas controles los niveles de p-TH decrecieron significativamente desde G20 a G21, en paralelo con la caída de la P₄ circulante, y esta caída promovería la inactivación de la TH y el subsecuente incremento de la PRL circulante que se observa fisiológicamente en la tarde noche del día G21 (Rosato et al. 1992, Valdez et al. 2007, Grattan et al. 2008).

Se ha descrito que los niveles de T₄/T₃ modulan la actividad cerebral de la TH por alteración de las propiedades cinéticas de la enzima, que a su vez influye sobre la actividad catecolaminérgica (Zimmermann et al. 2001, Chaube & Joy 2003). Sin embargo, los cambios producidos por el HiperT en la PRL circulante al final de la gestación pueden ser explicados por los cambios en la expresión de la TH y la p-TH, a su vez, producidos por los cambios en P₄ circulante. Así, en paralelo con los cambios en los niveles de P₄, la p-TH también disminuye significativamente entre G19 y G20, un día antes que en las controles. Esta disminución de p-TH junto con los niveles disminuidos de la proteína TH en G20, serían responsables del incremento prematuro de la PRL circulante encontrada en la tarde del G20 en las ratas HiperT, que sigue siendo detectable en G21 (Rosato et al. 1992) y los presentes resultados), mientras que en G19 los niveles elevados de la p-TH en comparación con sus controles pueden compensar la caída de la proteína total manteniendo bajos los niveles de PRL circulante.

Los niveles altos de p-TH en las ratas HiperT en G19 pueden sugerir una actividad dopaminérgica hipotalámica basal elevada comparada con los controles. Por otro lado, en la lactancia temprana (L2), los niveles elevados de p-TH y del ARNm de TH son indicativos del mantenimiento de la síntesis y activación de la TH, que a su vez, sugieren una elevado tono dopaminérgico, que frenaría la liberación de PRL en respuesta a la succión. Así en el posparto de las ratas HiperT la atenuación normal del feedback corto de la regulación de la secreción de PRL parece estar considerablemente alterada, es decir que las neuronas dopaminérgicas conservan su capacidad de responder a PRL, activando el feedback corto e inhibiendo su propia secreción, lo que perjudica la lactancia.

Al final de la gestación, en las ratas controles la caída del ARNm del RPRL y de STAT5 entre G19 y G20 y de la proteína del RPRL entre G21 y L2 formarían parte del mecanismo de atenuación del feedback corto, haciendo que las células disminuyan su capacidad de respuesta a PRL o a los LPs. Este proceso es necesario para la desensibilización neuroendocrina de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas a los niveles elevados de PRL, que permiten una normal transición a la hiperprolactinemia característica de la lactancia. Aunque hay un leve aumento del ARNm de STAT5

en L2, los valores continúan siendo mucho más bajos que en G19, manteniendo la baja capacidad de respuesta a PRL durante la lactancia.

La caída del ARNm de TH y de la proteína total y fosforilada entre G19 y L2 en ratas controles puede ser la consecuencia de la caída de la expresión del RPRL y de STAT5. A su vez, la caída de la expresión del ARNm de los miembros de la familia SOCS puede también ser reflejo de la baja respuesta fisiológica a PRL, ya que son los genes blanco de PRL, pero al estar bajos, también tenderían a atenuar la inhibición de la señalización de PRL producida por la caída del RPRL y STAT5 (Anderson et al. 2006a, Anderson et al. 2006b).

Al final de la gestación, PRL tiende a disminuir la habilidad para activar a STAT5b (Anderson et al. 2006a), sin embargo en las ratas HiperT la vía de señalización de PRL parece estar en un estado más activo, ya que encontramos aumentos significativos en el ARNm del RPRL en G19, de la proteína del RPRL en G21 y la proteína de STAT5 en G19 y L2, sin cambios en los ARNm de los inhibidores SOCS1, SOCS3 y CIS y en la proteína CIS. Estos patrones de expresión en ratas HiperT en G21 y L2, llevarían a las células en un estado de mayor reactividad a PRL a través de la conservación de la activación del feedback corto, con menor capacidad de atenuar la señalización de PRL en la lactancia temprana. Así, el cerebro no es una excepción del efecto del estado tiroideo sobre la expresión del RPRL, como se ha visto en otros órganos como el hígado, riñón, glándula adrenal, próstata, glándula mamaria y ovario (Tiong et al. 1992).

Es posible que los esteroides ováricos E_2 y P_4 sean los más importantes reguladores de la síntesis, secreción y acción de PRL en diferentes estados fisiológicos, actuando a nivel hipotalámico y pituitario. La expresión de ambos receptores ($RE\alpha$ y RP) en las neuronas TIDA, nos indica que los esteroides pueden modular directamente la expresión de TH y la señalización de PRL (Steyn et al. 2007, Anderson et al. 2008, Steyn et al. 2008), así como la expresión de sus propios receptores y los RPRL en hipotálamo y otras áreas cerebrales (Pi et al. 2003). La caída de la expresión proteica del RPA y del mRNA total (RPA+RPB) como la de las isoformas RPA y RPB desde G19 a L2 podrían ser uno de los factores que disminuye la expresión y activación de TH en las ratas controles o eutiroideas. Esta caída se encuentra adelantada en las ratas HiperT, que junto con la caída temprana de P_4 circulante serían responsables del incremento prematuro de la secreción de PRL en G21, y también de los aumentos en el contenido del ARNm del RPA en G20 y RPB en G21, dado que P_4 inhibe la inducción de los RP por estrógenos. En contraste, el incremento de la proteína del RPA observado en ratas HiperT en L2, podría contribuir al mantenimiento de expresión y activación elevadas de TH durante la lactancia, reprimiendo la secreción de PRL. P_4 es capaz de activar el promotor de la TH actuando a través de ambas isoformas, aunque RPB es mucho más efectivo (Jensik & Arbogast 2011).

Desafortunadamente no pudimos detectar la expresión de la proteína del RPB para poder comparar con los cambios observados en el RPA.

Otros autores encontraron niveles estables del ARNm del RE α (Wagner & Morrell 1995, Mann & Babb 2005) durante la gestación y el posparto temprano. Nuestros resultados están en concordancia con los resultados de los citados autores, con la excepción de los niveles elevados del RE α encontrados en las ratas eutiroideas en G19. Sin embargo, estos trabajos previos no estudian este día particular de la gestación. También, encontramos niveles constantes de expresión proteica del RE α en ratas controles entre G19 y L2, en concordancia con lo encontrado por Steyn y colaboradores (Steyn et al. 2007), quienes encontraron valores similares en la inmunoreactividad del RE en neuronas hipotalámicas TH $^{+}$ entre G19 y G21, con una disminución significativa sólo en el día 5 de lactancia. En contraste, el ARNm y la proteína del RP decrecieron entre G19 y L2, confirmando datos previos (Mann & Babb 2005). Steyn y colaboradores (Steyn et al. 2007) también encontraron que la expresión del RP y RE α decrece en células TH $^{+}$ entre G21 y la lactancia temprana.

Los cambios en los patrones de expresión del RP y RE α producidos por el HiperT, en particular a nivel de proteínas, podrían ser resultado de los cambios en P $_4$ y E $_2$ circulante, junto con acciones directas de las HTs a nivel de las neuronas hipotalámicas. Así, la caída del ARNm de los RPs y de la proteína RPA observados en G19 en las ratas HiperT pueden ser consecuencia de los bajos niveles de E $_2$ observados en ese día, ya que el estrógeno induce la expresión de los RP en neuronas TH $^{+}$ del núcleo arcuato (Steyn et al. 2007). Los niveles elevados de la expresión proteica del RE α en ratas HiperT podrían no ser capaces de compensar los bajos niveles de E $_2$ circulante. La combinación del incremento del RE α y la caída del RPA a nivel proteico en el día G19 en ratas HiperT podrían favorecer el incremento de la expresión del ARNm del RPRL y de la proteína CIS, ya que ha sido demostrado que el E $_2$ estimula su expresión y la P $_4$ bloquea esta acción estimuladora del E $_2$ (Pi et al. 2003, Steyn et al. 2008).

En condiciones eutiroideas las diferencias en los patrones de expresión a nivel de ARNm y proteínas del RP y RE α a lo largo de los días en estudio podrían deberse a cambios diferenciales en los mecanismos regulatorios actuantes a nivel postranscripcional, que pueden modular la traducción, procesamiento o degradación de las proteínas, resultando en patrones de expresión diferentes (Jacobsen & Horwitz 2012). A su vez, el HiperT puede también estar modificando algunos de estos mecanismos, ya que la proteína del RPA y el RE α muestran patrones marcadamente diferentes a los controles.

En conclusión, los cambios inducidos por el HiperT en la expresión y activación de la TH pueden explicar los niveles de PRL circulante observados, tales como el adelanto del pico preparto así como también los niveles bajos de PRL observados en la lactancia temprana. En las madres HiperT, el

mecanismo que atenúa el feedback corto de PRL al final de la gestación y durante la lactancia se ve comprometido, y sería responsable del bloqueo parcial de la liberación de PRL por succión y por ende, del déficit en la lactancia de las madres HiperT descrito previamente (Rosato et al. 1992, Varas et al. 2002). Los cambios observados en los patrones de expresión del RPRL, RP y RE α a nivel hipotalámico y el consecuente incremento de STAT5, contribuyen a mantener los niveles elevados del ARNm de TH y de p-TH, manteniendo así un tono dopaminérgico elevado durante la lactancia, que frena la liberación de PRL inducida por succión (Varas et al. 2002).

Estos hallazgos indican que el HiperT tiene efectos no despreciables a nivel del hipotálamo, que a su vez, afectan el rendimiento de la lactancia y el crecimiento del recién nacido.

4.2 "EFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE PUNTOS DE REGULACIÓN DE LA ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS"

Objetivo 2: Se determinará el efecto del HiperT sobre la expresión de los receptores de HT (principales isoformas mediadoras de su acción) en HMB de ratas al final de la gestación (día 19, 20 y 21) y en el día 2 de lactancia (lactancia temprana, L2). Además, en todos los grupos se estudiará la expresión génica de los moduladores de los RTs (SMRT, NCoR, SRC-1 y receptores retinoides X) por PCR en tiempo real, que podrían interactuar con la señalización de PRL en la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Por otro lado también se determinará la expresión génica de los transportadores de las HTs, MCT8, MCT10 y OATP1C1 y la expresión de las enzimas DIO2 y DIO3 en la misma área y grupos mencionados.

Las HTs poseen un amplio rango de acción sobre el desarrollo y función del sistema nervioso central. Sus distintas funciones en los tejidos blancos emergen de múltiples puntos de regulación específica entre ellos, las isoformas de los receptores de las HTs y los factores de transcripción a los que están ligados. Las HTs cumplen diferentes roles dependiendo del contexto fisiológico específico, activando vías de señalización que difieren según el tejido blanco. Por décadas se ha investigado la regulación de la actividad de las HTs y los estudios han revelado un sistema complejo de regulación, donde la biodisponibilidad y la bioactividad de las HTs son reguladas periféricamente por subtipos de mecanismos en varios niveles de organización incluidos transportadores en la superficie celular, la presencia de enzimas como las deiodinasas en el citoplasma, presencia de las distintas isoformas de los receptores tiroideos (RTs), la unión de proteínas citosólicas a los RT (coactivadores y co-represores), y la vía de acceso a los elementos respuesta en los promotores de los genes blanco (Hulbert 2000; Little and Seebacher 2014a; Hammes and Davis 2015).

Las HTs actúan vía sus receptores (RTs) (Mangelsdorf *et al.* 1995) que presentan dos isoformas principales, el RT α y el RT β , de los cuales se producen nueve variantes RT α 1, RT α 2, RT α 3, RT Δ 1, RT Δ 2 (Sap *et al.* 1986, Cheng 2000) y los RT β 1, RT β 2, RT β 3, RT Δ 3 (Williams 2000). Tanto la isoforma RT α 1 como la RT β 1 poseen un patrón diferencial de expresión con funciones independientes, mientras que la isoforma RT β 2 presenta un patrón bien especializado de expresión que se limita a zonas como los conos fotoreceptores, la cóclea, hipófisis y el NPV en el hipotálamo (Bradley *et al.* 1989, Hodin *et al.* 1989, Sjoberg *et al.* 1992). El RT α 1 y el RT β 1 muestran un solapamiento de expresión en muchas regiones del cerebro, sin embargo las proporciones de RT α 1 y RT β 1 varían de acuerdo al tipo celular. En determinadas situaciones, siempre que se co-expresen

ambas isoformas en una misma célula, pueden existir diferencias en el reconocimiento de los genes blanco o la preferencia con el cofactor lo que determina las funciones independientes como sucede en las células de Purkinje (Heuer & Mason 2003). En el cerebro maduro, la masa total de los RTs, independientemente de la composición de las isoformas α o β , puede ser un factor determinante en la capacidad de respuesta de determinados tipos celulares (Nunez *et al.* 2008).

Estos receptores al unirse a los elementos respuesta (ER) en el ADN pueden hacerlo en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros (cuando los RTs se unen a los receptores del ácido retinoico (RXR)) (Glass 1994, Wu & Koenig 2000) modificando la biodisponibilidad de los RTs, lo que pasa a ser otro punto de regulación. Cuando los RTs se encuentran unidos a los ER, reclutan un complejo de múltiples proteínas entre las cuales se encuentran los corepresores (NCoR) (Cheng *et al.* 2010), que mantienen inactiva la maquinaria de transcripción. La unión del RT a la hormona produce cambios conformacionales en los mismos, que hacen que se liberen de los corepresores y se recluten los coactivadores (CoA)(Cheng *et al.* 2010) activando de esta manera la maquinaria de transcripción.

Las HTs atraviesan la membrana celular usando diversos transportadores de membrana como son el transportador MCT8, que transporta ambas hormonas T_4 y T_3 pero posee una mayor afinidad por T_3 , y se localiza en áreas como las células piramidales y granulares del hipocampo y plexo coroideo y en tunicitos del 3V (Muller & Heuer 2014). El transportador OATP1C1, posee alta afinidad por la T_4 , se encuentra altamente expresado en plexo coroideo, células ependimales del 3V y en células capilares endoteliales (Muller & Heuer 2014). Por último el transportador MCT10, que posee mayor afinidad por la hormona T_3 se encuentra con alta expresión en oligodendrocitos, giro dentado y núcleos del hipotálamo como el núcleo dorsomedial (Muller & Heuer 2014).

Una vez que se encuentran en el interior de la célula, las HTs, tienen otro punto de regulación de su biodisponibilidad que es llevado a cabo por las enzimas deiodinasas. Estas enzimas encargadas de activar o desactivar las HTs, representan un punto fuerte para la homeostasis del cerebro. (Crantz *et al.* 1982, Bianco *et al.* 2002).

Una vez determinado que el estado tiroideo afecta la expresión de la vía de señalización de PRL, con el consecuente déficit en su secreción, el punto de este objetivo es demostrar en qué proporción los RTs, deiodinasas y transportadores se expresan en HMB y si la expresión de los principales puntos de regulación de la biodisponibilidad y actividad de las HTs se encuentra alterada por el estado tiroideo.

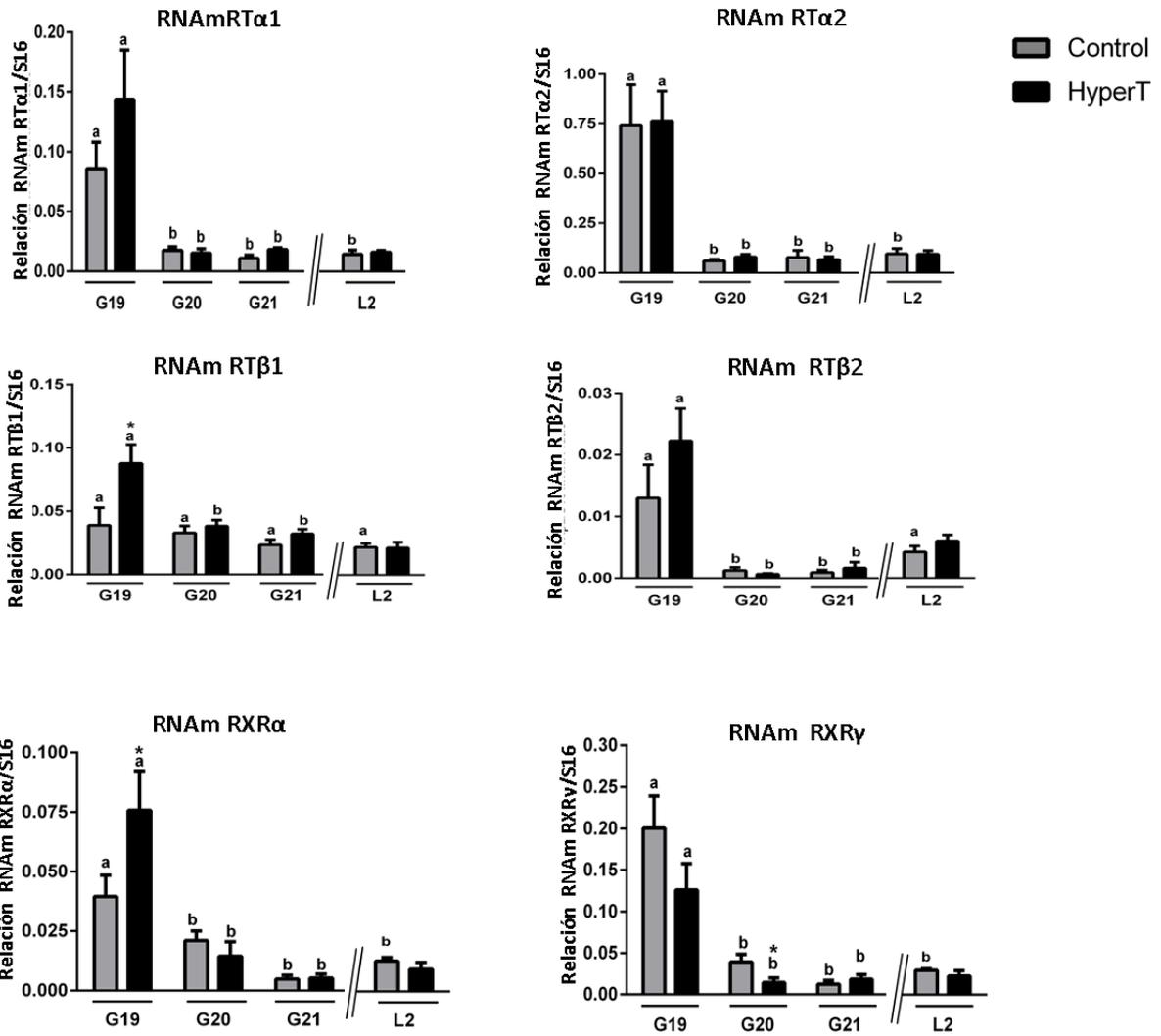
4.2.1 Efecto del HiperT sobre la expresión de los Receptores Tiroideos en el HMB al final de la gestación.

Nuestros resultados mostraron que la expresión del ARNm de las isoformas de los receptores tiroideos RT α 1, RT α 2, RT β 2, tuvo niveles máximos en G19 en los grupos controles, con una caída en G20 (Figura 4.2.1), con un patrón similar al observado para T₄ (ver Tabla 4.1). Luego, los niveles de RT α 1, RT α 2 y RT β 2 se mantuvieron en niveles bajos y similares. Los niveles de la isoforma RT β 1 no variaron en los días estudiados (Figura 4.2.1). El HiperT no modificó sustancialmente el patrón de expresión de los RTs, con excepción del RT β 1, en el que se observó un aumento significativo en G19 (Figura 4.2.1).

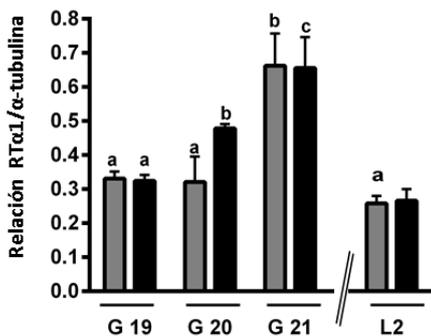
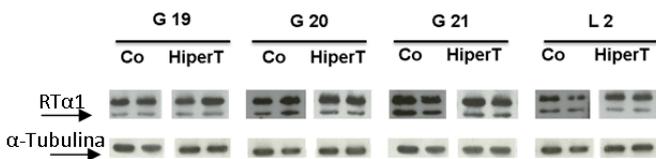
La expresión proteica de las isoformas de los RTs mostró un patrón diferente de sus ARNm. En el grupo control la proteína RT α 1 mostró niveles más altos en G21 comparado con los otros días. Aunque el HiperT no produjo cambios significativos en la expresión de RT α 1 en los días estudiados, interesantemente los niveles comenzaron a aumentar a partir de G20 hasta G21. En cambio, no observamos variaciones en la expresión de la isoforma RT β 1 en el grupo control, coincidiendo con la expresión del ARNm. El HiperT produjo un aumento significativo de los niveles de RT β 1 en G19, disminuyendo su expresión hasta niveles similares a los controles en G20 y G21, coincidiendo también con la expresión del mensajero (Figura 4.2.1)

En cuanto a los RXR, receptores que heterodimerizan con los RTs, en los controles la expresión del ARNm de sus isoformas α y β mostraron niveles máximos en G19, que disminuyeron posteriormente en G20 y G21. El HiperT sólo aumentó la expresión del ARNm de la isoforma RXR α en G19 y disminuyó los niveles de la isoforma RXR γ en G20 (Figura 4.2.1).

A)



B) WB RTα1



WB RTβ1

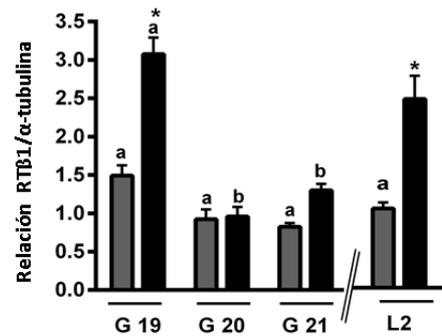
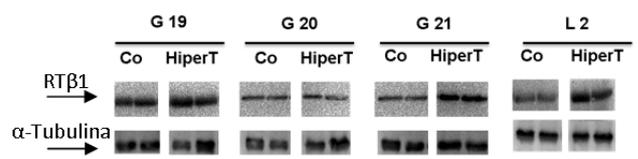


Figura 4.2.1: Expresión de las isoformas de los RTs y RXR en el HMB al final de la gestación. A) Contenido de ARNm, B) contenido de proteína. En barras grises se representan los grupos control y en barras negras los grupos de ratas hipertiroideas. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo experimental y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, a $p < 0.05$.

4.2.2 Efecto del HiperT sobre la expresión de los comoduladores en el HMB al final de la gestación.

Para determinar si el punto de regulación de la acción de las HTs sobre sus genes blanco está afectado por el HiperT, y si esto está relacionado con una alteración de la actividad de las neuronas dopaminérgicas, estudiamos la expresión de las principales moléculas moduladoras de la actividad de los RTs, los coactivadores CoA1 y CoA2 y sus represores más estudiados NCoR1 y SMRT (NCoR2) en el HMB al final de la gestación.

En el grupo control, la expresión del ARNm de CoA1 fue máxima en G19, y presentó niveles más bajos y similares en G20 y G21. El HiperT mostró un patrón similar al grupo control, con máxima expresión en G19 y caída en G20 y G21, pero a niveles significativamente más altos que los controles. El coactivador CoA2, no mostró cambios en los controles en los días estudiados, mientras que en el grupo HiperT observamos un patrón similar, pero con expresión aumentada en G19 con respecto a su control (Figura 4.2.2).

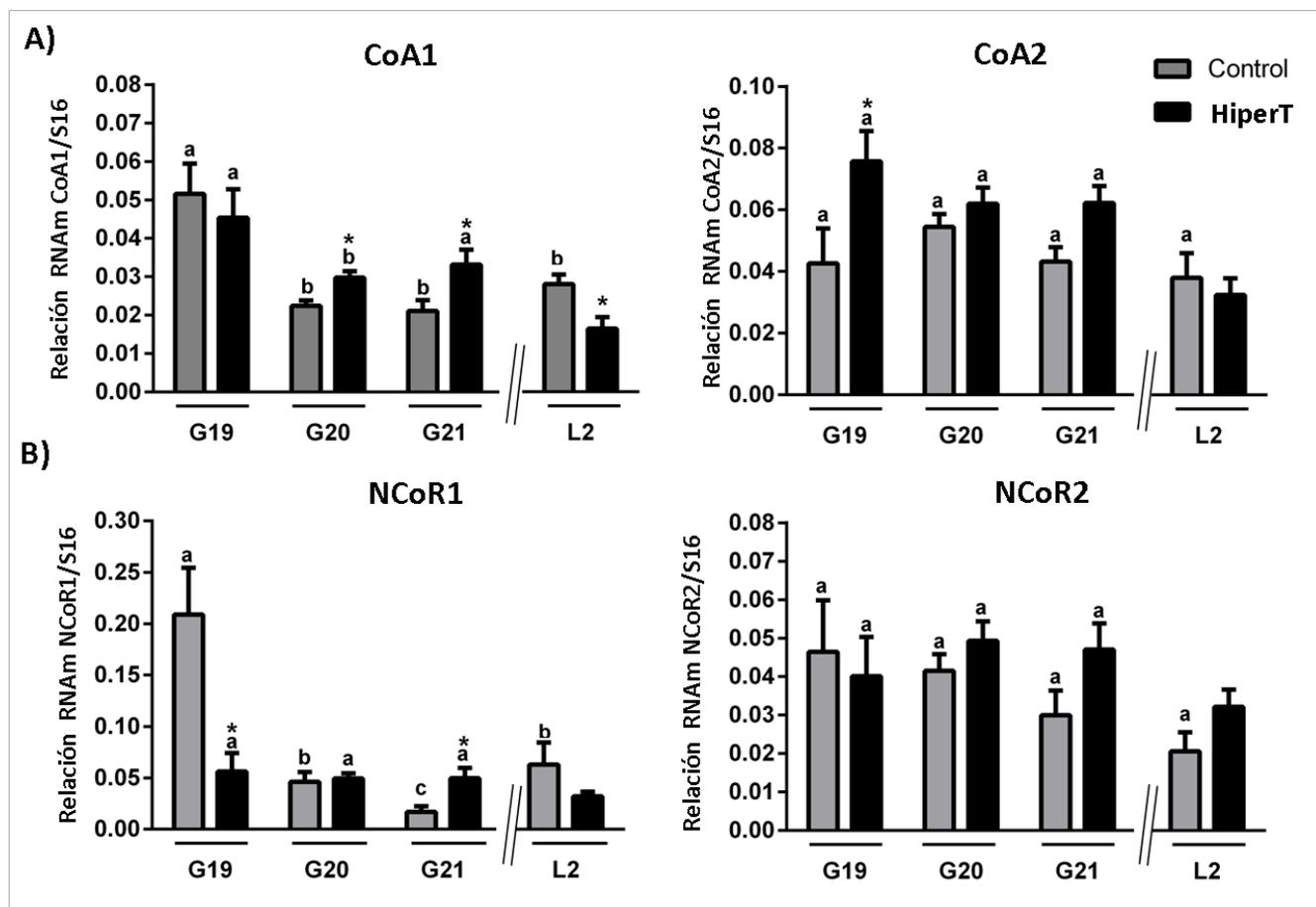


Figura 4.2.2: Expresión de las isoformas de los moduladores de las RTs en el HMB al final de la gestación. A) Contenido de ARNm de los coactivadores CoA1 y CoA2. B) contenido del ARNm de los correpresores NCoR1 y NCoR2. En barras grises se representan los grupos control y en barras negras los grupos de ratas hipertiroideas. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, a $p < 0.05$.

La expresión de NCoR1 en el grupo control mostró niveles altos en G19, que disminuyeron en G20 y aún más en G21 (Figura 4.2.2). El HiperT produjo una expresión muy distinta al grupo control con niveles similares en los 3 días, significativamente más bajos que los controles en G19, pero más elevados en G21 (Figura 4.2.2). En cambio, el contenido de ARNm de NCoR2 se mantuvo constante en los 3 días y no fue afectado por el HiperT (Figura 4.2.2).

4.2.3 Efecto del HiperT sobre la expresión de los transportadores y deiodinasas en el HMB al final de la gestación.

Finalmente nos propusimos determinar si el HiperT afecta la biodisponibilidad de las HTs, otro punto de regulación de su acción, estudiando la expresión de los transportadores MCT8, MCT10 y OATP1C1, y la expresión de las enzimas deiodinasas DIO2 y DIO3.

En el grupo control la expresión del ARNm de los tres transportadores estudiados fue máxima en G19, con una caída en G20. En G21, los niveles de MCT8 continuaron disminuyendo, mientras que MCT10 tuvo valores similar a G20 y OATP1C1 aumentó (Figura 4.2.3). El HiperT no produjo cambios en estos valores, salvo en la expresión de MCT10 en G19, que descendió a niveles indetectables (Figura 4.2.3). La regulación en baja de la expresión del transportador MCT10 en las ratas HiperT en G19 es un resultado a destacar considerando que este transportador se encuentra en neuronas hipotalámicas mientras que los otros dos en células endodiales, endoteliales y gliales entre otras.

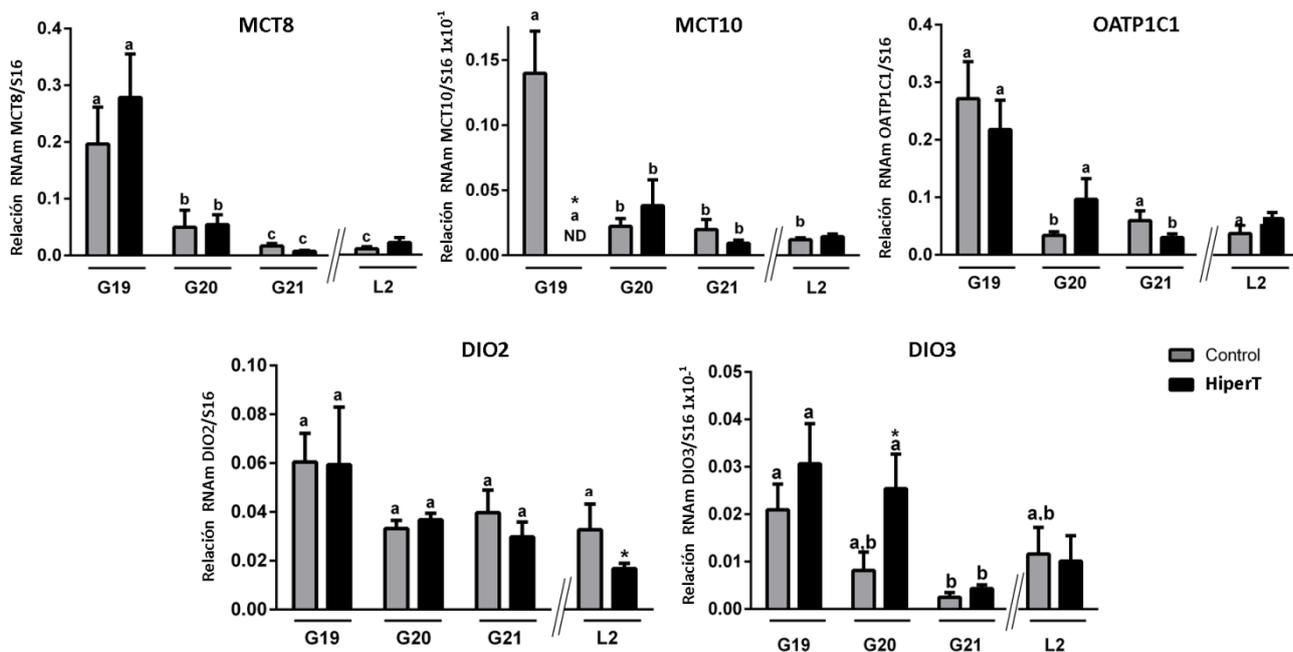


Figura 4.2.3: Expresión de las isoformas de los transportadores de HTs y las enzimas deiodinasa en el HMB. En barras grises se representan los grupos control y en barras negras los grupos de ratas hipertiroideas. Letras distintas identifican diferencias significativas entre días dentro del mismo grupo y los asteriscos diferencias significativas entre los grupos control y tratado en el mismo día, a $p < 0.05$.

La expresión del ARNm de DIO2 fue similar en los 3 días estudiados (G19, G20 y G21) en ambos grupos (eutiroides e HiperT) (Figura 4.2.3). En cambio, en el grupo control los niveles de DIO3 disminuyeron entre G19 y G21. En las ratas HiperT se observaron niveles elevados de DIO3 en G19 y G20 que disminuyeron en G21 a niveles similares a los controles aunque en G20 los niveles de expresión de DIO3 fueron mayores respecto a su control en el mismo día y similares a los observados en G19, para caer a niveles similares a los controles en G21 (Figura 4.2.3).

4.2.4 Efecto del HiperT sobre la expresión de los RTs, comoduladores, transportadores y deiodinasas en el HMB en la lactancia temprana (L2).

En el capítulo 4.1 se muestra que los niveles circulantes de T_4 en el grupo control en L2 fueron significativamente mayores comparados con los días previos al parto (Tabla 4.2.1), lo que no se acompañó de cambios en la expresión del ARNm de los RTs, salvo en la isoforma RT β 2 que aumentó significativamente en comparación con G20 y G21 (Figura 4.2.1). El hipertiroidismo inducido por la administración de T_4 tampoco afectó la expresión génica de los RTs. Por otro lado, en condiciones fisiológicas (ratas eutiroides) la expresión proteica de la isoforma RT α 1 mostró una caída comparada con el final de la gestación, que no fue modificada por el HiperT. La expresión de la proteína del RT β 1

no mostró cambios comparada con la gestación, mientras que el HiperT produjo un aumento significativo (Figura 4.2.1) respecto a las ratas controles en L2.

En ratas controles en L2, la expresión del ARNm de los coactivadores CoA1 y CoA2 no cambió con respecto al final de la gestación. Si bien no hubo diferencias entre controles e HiperT en la expresión de CoA2, el HiperT disminuyó significativamente los niveles de expresión de CoA1 mientras que el correpresor NCoR1 aumentó en L2 comparado con G21 (Figura 4.2.2). Por otro lado, el HiperT no tuvo efecto sobre los niveles del ARNm de NCoR1. (Figura 4.2.2). El contenido de ARNm de NCoR2, no cambió con respecto al final de la gestación y tampoco hubo efecto del tratamiento (Figura 4.2.2).

La expresión del ARNm de los transportadores de HTs, MCT8, MCT10 y OATP1C1, no fue diferente de los valores encontrados en G20 y G21, y el HiperT no tuvo efecto (Figura 4.2.3).

Tampoco observamos cambios en el ARNm de la DIO2 en el grupo control entre L2 y el final de la gestación. El HiperT en L2 disminuyó significativamente la expresión de DIO2, enzima convertidora de T4 en T3, respecto a sus respectivos controles (Figura 4.2.3). Por otro lado, la expresión del ARNm de DIO3 en los controles mostró una tendencia al aumento entre G21 y L2, que no llegó a ser significativo. En L2 el HiperT no alteró los niveles de expresión génica de DIO3 respecto de sus controles.

Discusión.

Como citamos en el capítulo anterior, los niveles de T_4/T_3 modulan la actividad cerebral de TH alterando su expresión y fosforilación, lo que a su vez influye en la actividad catecolaminérgica (Zimmermann et al. 2001, Chaube & Joy 2003), por lo que es posible que las hormonas tiroideas puedan estar actuando directamente sobre las neuronas dopaminérgicas, afectando su actividad, y alterando así la secreción de PRL. Por lo tanto quisimos determinar si los principales puntos de regulación de las HTs, varían entre los últimos días de gestación y el posparto temprano y si se ven afectados por un tratamiento crónico de T_4 . Esto nos ayudaría a dilucidar si las HTs participan en la regulación de la secreción de PRL en estas etapas y si el HiperT provoca cambios en ellos que puedan alterar la respuesta a las hormonas tiroideas, como por ejemplo, un mecanismo compensatorio ante el exceso de las mismas, o por el contrario, exacerbando sus efectos.

Confirmando resultados previos de nuestro laboratorio y de otros (Fukuda *et al.* 1980, Calvo *et al.* 1990, Hapon *et al.* 2003), observamos una disminución de T_4 en el grupo control entre G19 y G20, seguido de un aumento en L2 a niveles mayores que en G19, lo que sugiere que es necesaria una disminución de la hormona en estos días, para una transición adecuada hacia la lactancia. Este patrón se debe a que en los últimos días de la gestación el clearance de hormonas tiroideas está aumentado

como resultado de una metabolización elevada de las hormonas por el hígado, placenta y otros tejidos y excreción aumentada de iodo urinario (Galton 1968) ;(Fukuda *et al.* 1980, Calvo *et al.* 1990)), que se normalizan en el posparto (Fukuda *et al.* 1980), lo que explica el aumento observado en L2. La expresión del ARNm de RT β 2 mostró un patrón similar, lo que se corresponde a su rol fisiológico, ya que este receptor interviene en la regulación de la liberación de TRH y el retrocontrol negativo del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas (Lechan *et al.* 1994). Por otro lado, la expresión de RT α 1, una de las isoformas que median la señalización de las HTs, y del RT α 2 también disminuyó entre G19 y G20, pero los niveles continuaron bajos hasta L2, posiblemente para atenuar los efectos del aumento de T $_4$, que podría tender a mantener activado el retrocontrol corto y así perjudicar la liberación de PRL por succión en el momento de establecimiento de la lactancia. Muy distinto es lo que se observa en el grupo HiperT donde encontramos alteraciones en la expresión de distintos puntos de regulación, tales como los aumentos observados en G19 de los ARNm de RT β 1 y RXR α (receptor con cual heterodimerizan), y en la expresión proteica del RT β 1. Estos cambios coinciden con el aumento del ARNm del CoA2 y la caída del ARNm del represor NCoR1, lo que sugiere una fuerte actividad transcripcional de las hormonas tiroideas en el día 19 de gestación en el grupo HiperT (Cheng 2000, Cheng *et al.* 2010), que podría ser responsable de los cambios en la expresión de los miembros de la vía de señalización de PRL descritos en el capítulo anterior. En este día no observamos cambios en la expresión de las deiodinasas ni de los transportadores, con excepción del MCT10 (transportador altamente expresado en oligodendrocitos y neuronas hipotalámicas), cuya expresión cayó a niveles indetectables, lo que puede haber limitado parcialmente el ingreso de hormonas tiroideas a las células hipotalámicas (Muller & Heuer 2014) y así limitar su acción.

Por otro lado, en G20 y G21 el HiperT también produjo aumentos en la expresión de CoA1, que podría estar indicando una respuesta aumentada a las hormonas tiroideas. En cambio, el aumento de la DIO3 (enzima que en neuronas disminuye los niveles de T $_4$ y T $_3$, convirtiéndolas a T $_3$ r y a T $_2$ respectivamente) en G20 y el aumento de NCoR1 en G21 estarían contrarrestando este efecto, disminuyendo la capacidad de las poblaciones de neuronas hipotalámicas de responder a los niveles elevados de HTs. Mientras que los niveles de DIO2 (enzima que cataliza la conversión de T $_4$ a T $_3$ principalmente en astrocitos y tanicitos) permanecieron sin cambios en los días estudiados al final de la gestación y no fueron alterados por el HiperT.

Como mencionamos previamente, en las ratas eutiroideas la disminución de los niveles de T $_4$ en G20 nos indica la importancia de mantener niveles bajos en los días de transición hacia la lactancia, por lo que sería posible suponer que el HiperT altere la actividad de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran circundantes a la zona del 3V que carece de barrera hematoencefálica, por lo que la biodisponibilidad hormonal aumenta. Por otro lado en las ratas HiperT no existen cambios en la

expresión del mensajero de los transportadores respecto a los controles, evidenciando que el HiperT no afecta este punto de control de la biodisponibilidad de las HTs a este nivel de regulación, que es el control del ingreso de las HTs a las células.

Durante la lactancia temprana (L2) de las ratas HiperT observamos también una disminución de la enzima DIO2, la cual en ratas normales es responsable de mantener los niveles nucleares adecuados de T₃ en áreas cerebrales, hipófisis y tejido adiposo (Larsen *et al.* 1981, Bianco & Silva 1987). Por lo tanto, esta disminución de DIO2 observada en L2 de ratas HiperT sería un indicador de un mecanismo de las células hipotálamicas para contrarrestar los niveles elevados de T₄ y atenuar el efecto del HiperT sobre las poblaciones neuronales. En L2 también observamos un aumento de la expresión proteica del RTβ1, el cual se postula que posee una interacción con STAT5b que podría estar interfiriendo con la vía de señalización de PRL (Favre-Young *et al.* 2000).

También se ha sugerido que los RTs pueden inhibir la actividad de los RE a través de la interacción y disponibilidad de los coactivadores que se comparten en ambas vías de señalización (Vasudevan *et al.* 2001). Por lo que el aumento de la expresión del RTβ1 durante la lactancia temprana podría estar interfiriendo con la señalización vía estrógeno, clave de este día.

Estos resultados están en concordancia con lo propuesto anteriormente donde se describe que al final de la gestación en condiciones fisiológicas, ocurren adaptaciones neuroendocrinas que permiten que se desarrolle un proceso de plasticidad neuronal en el cerebro de la madre necesario para lograr un parto normal y una conducta maternal adecuada que culmine en una lactancia exitosa. La lactancia temprana también es un punto crucial en donde cambios en los mecanismos que la regulan podrían comprometer el desarrollo de la lactancia. Con los presentes resultados describimos como el HiperT a través de la alteración en los niveles de expresión de sus RTs, moduladores, transportadores y enzimas involucradas en la biodisponibilidad de las HTs afecta la actividad de neuronas hipotálamicas de interés neuroendocrinológico que regulan la secreción de PRL hipofisiaria comprometiendo la lactancia.

Estos resultados demuestran la importancia de la modulación de la respuesta a las hormonas tiroideas en el hipotálamo al final de la gestación durante las adaptaciones neuroendocrinas en el cerebro maternal que posibilitan una lactancia exitosa, y posiblemente un parto normal y el desarrollo de la conducta materna, aunque este tema no se ha abordado en este trabajo de tesis.

4.3 "LOCALIZACION DE LOS RECEPTORES TIROIDEOS EN EL HMB POR INMUNOFLOURESCENCIA"

Objetivo 3: Para investigar la modulación de las neuronas TIDA por las HTs, se estudiará en ratas al final de la gestación, si neuronas hipotalámicas TH+ co-expresan RTs utilizando inmunofluorescencia. De esta manera podremos determinar si el efecto de las HTs sobre las neuronas TIDA puede ejercerse de forma directa (co-expresión positiva).

Las HTs ejercen la mayor parte de sus acciones mediante la regulación de la expresión de sus genes blanco a través de los RTs que actúan como factores de transcripción nuclear. Se sabe que los RTs se expresan en el cerebro de forma espacio-temporal y que tienen un rol protagónico durante estadios fisiológicos determinados. Hay estudios que identifican genes regulados por las HTs en cerebro. La mayoría de estos genes son sensibles a las HTs sólo durante ventanas específicas de la vida de un individuo como por ejemplo durante el desarrollo principalmente, aunque también se han identificado durante la edad adulta (Quignodon *et al.* 2007). Todas las distintas isoformas de los RTs se expresan en cerebro, aunque globalmente predomina el TR α 1 (Bradley *et al.* 1989, Mellstrom *et al.* 1991, Bradley *et al.* 1992). Sin embargo, la expresión de la proteína de TR β 1 predomina (Ercan-Fang *et al.* 1996) en algunas zonas como por ejemplo en las células de Purkinje, y algunas isoformas se expresan específicamente en áreas muy precisas, como la isoforma TR β 2 en el NPV, área donde se encuentran las neuronas TRH+.

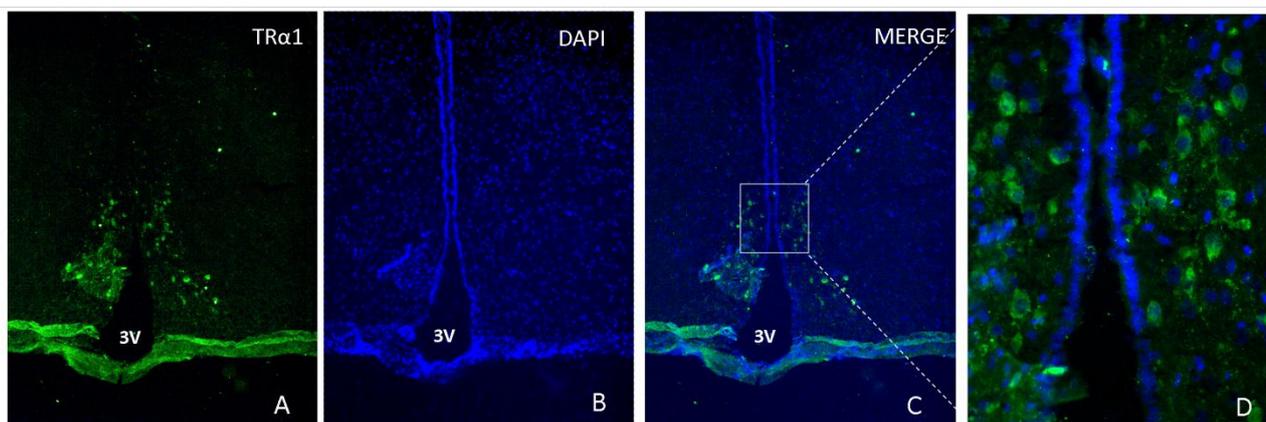
En el capítulo anterior vimos que la expresión de ambas isoformas varía a lo largo del final de la gestación en el HMB, por lo que la pregunta central de este capítulo es saber si los RTs se expresan en las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas que presentan variaciones en su actividad al final de la gestación para garantizar el éxito de la lactancia. Esto nos permitirá dilucidar si las hormonas tiroideas pueden ejercer sus acciones directamente sobre estas neuronas dopaminérgicas, o si sus efectos serían solo indirectos.

Para este objetivo se determinó la coexpresión de TH con RT α 1 y RT β 1, y de STAT5 y RT β 1 en HMB en ratas en G21.

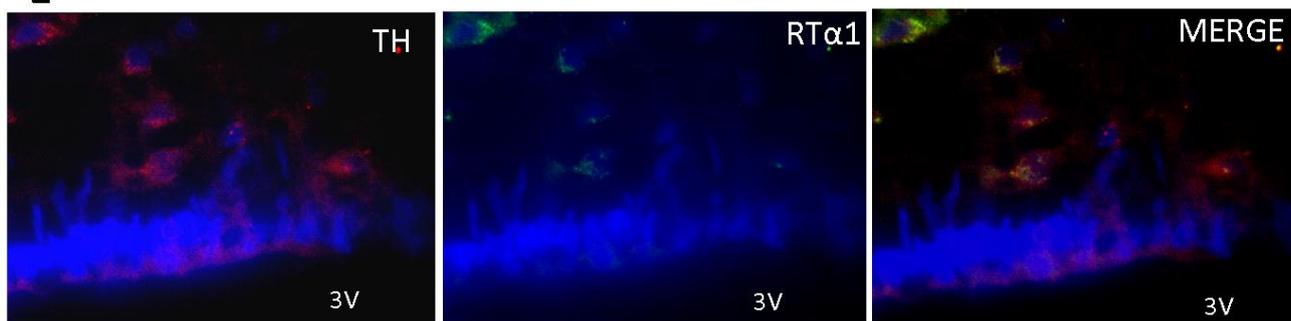
4.3.1 Localización de la expresión del RT α 1 en HMB al final de la gestación de la rata.

Con la marcación para TH, pudimos detectar las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (TH+) (Figura 4.3.1 A y E) que fueron localizadas en la zona del núcleo arcuato (ARC) (Figura 4.3.1 E) y en el núcleo periventricular (PeV) (Figura 4.3.1.F). La segunda marcación para RT α 1, permitió

detectarlo en neuronas TH⁺. Las neuronas TH⁺ que coexpresaron el RT α 1, se encontraron en la zonas más próximas al tercer ventrículo (3V), en el núcleo ARC (Figura 4.3.1 E) y en las células dopaminérgicas que recubren el 3V, que corresponden a las del núcleo PeV (Figura 4.3.1.F). En ambos tipos celulares la expresión del RT α 1 fue de localización citoplasmática. El RT α 1 también pudo observarse en células TH⁻, que podrían corresponder a otras poblaciones neuronales existentes en estas zonas o a células de la glia.



E



F

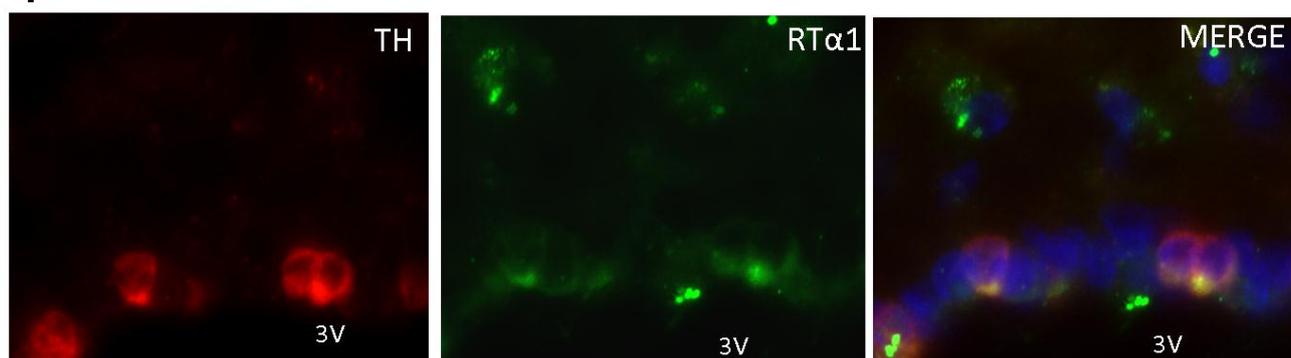


Figura 4.3.1: Expresión del RT α 1 en HMB al final de la gestación. Cortes de 10 μ m de cerebro de rata en G21 marcadas contra TH (rojo) para determinar neuronas dopaminérgicas, y contra RT α 1 (verde) y DAPI (azul) para delimitar los núcleos. A) marcación contra TR α 1 a 10 X, B) marcación contra DAPI1 a 10 X, C) MERGE (solapamiento), D) Magnificación de imagen C, E) TH, TR α 1 y Merge a 100 x en área del ARC, F) TH, TR α 1 y Merge a 100 x en área del PeV.

4.3.2 Localización de la expresión del RTβ1 en HMB al final de la gestación de la rata.

La marcación para TH y la isoforma β1 del receptor tiroideo (TRβ1) también demostró la coexpresión de TH y TRβ1 (Figura 4.3.2 A). Se pudo observar que al igual que la isoforma α1 del receptor, la expresión del TRβ1 es de localización citoplasmática. La isoforma β1 se localizó en las neuronas dopaminérgicas del ARC y también en el PeV (Figura 4.3.2 C).

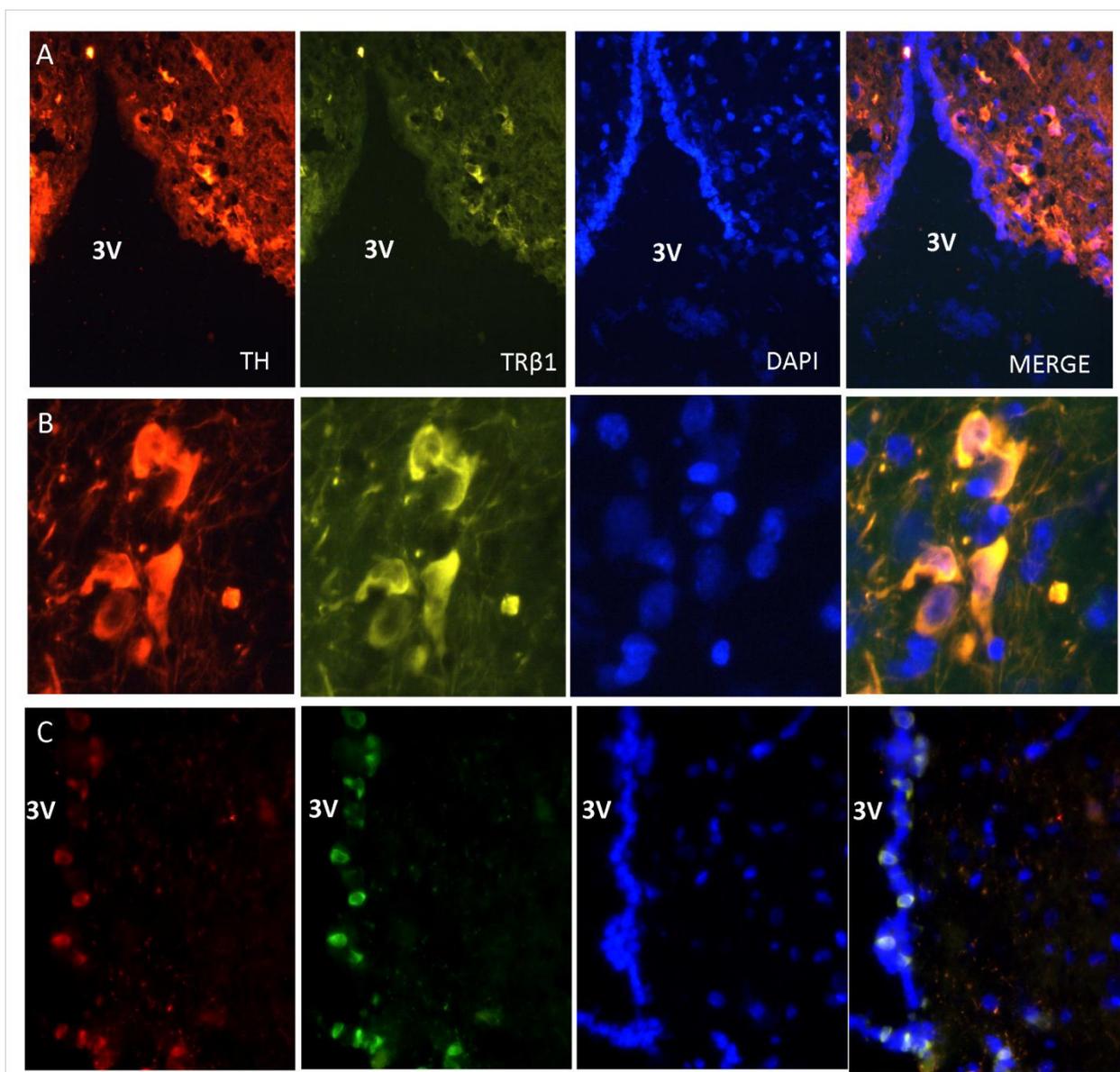


Figura 4.3.2.: **Expresión del RTβ1 en HMB al final de la gestación.** Cortes de 10 μm de cerebro de rata en G21 marcadas contra TH (rojo) para determinar neuronas dopaminérgicas, y contra RTβ1 (verde) y DAPI (azul) para delimitar los núcleos. A) Marcación contra TRβ1 a 40 X, marcación contra DAPI a 40 X, MERGE (solapamiento), B) Magnificación de imagen A, C) TH, TRβ1 y Merge a 60 x en área del PeV.

4.3.3 Localización de la expresión del TR β 1 y STAT5 en HMB al final de la gestación de la rata.

La colocalización de TH con las isoformas del receptor tiroideo nos confirmó que las neuronas dopaminérgicas del HMB expresan los receptores. A su vez, las neuronas dopaminérgicas responden a PRL y expresan su receptor y los componentes de su vía de señalización. Por lo tanto nos interesó determinar si los RTs se expresan en células capaces de responder a PRL, por lo que determinamos la coexpresión de una de las isoformas del receptor, el TR β 1 (rojo), junto con STAT5 (verde). Además, la localización de TH y RTs fue citoplasmática mientras que STAT5 puede encontrarse en citoplasma y núcleo, a donde trasloca después de la activación de la vía. Observamos nuevamente localización citoplasmática del TR β 1, mientras que la de STAT5 fue nuclear en la mayoría de las células, y citoplasmática en una minoría (Figura 4.3.3 A). El STAT5 se localizó en las células que recubren el 3V y en las neuronas del ARC (Figura 4.3.3 B), que se corresponden con las neuronas dopaminérgicas. La coexpresión de ambas proteínas, STAT5 y TR β 1, también indica la posibilidad de interacción directa, en la misma célula, de las vías de señalización de PRL y hormonas tiroideas.

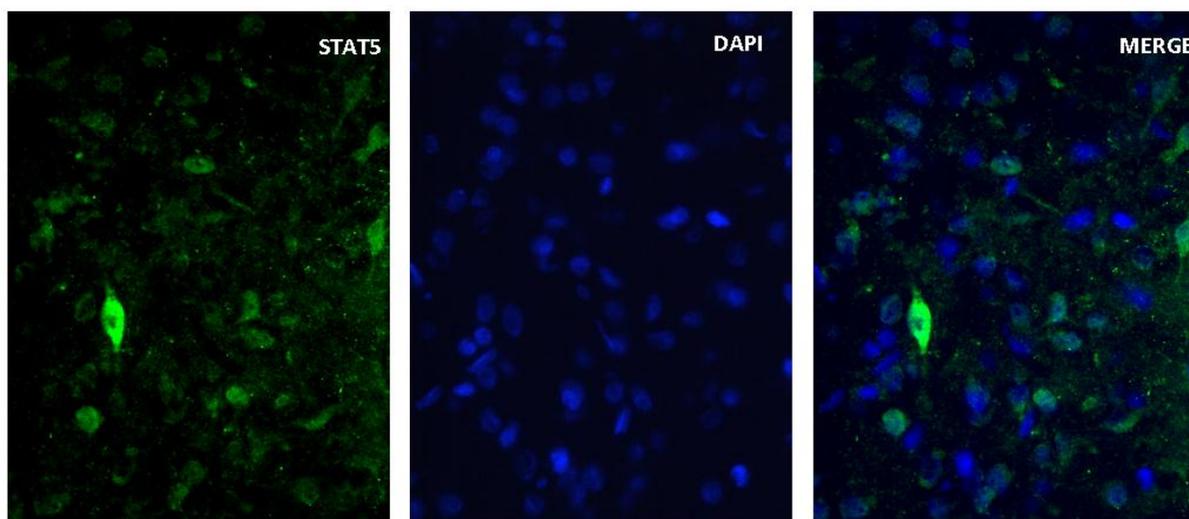


Figura 4.3.3: Expresión de STAT5. Verde: Proteína STAT5, Azul: núcleos. En algunas células se puede apreciar la expresión citoplasmática pero la mayoría se encuentra en una localización nuclear.

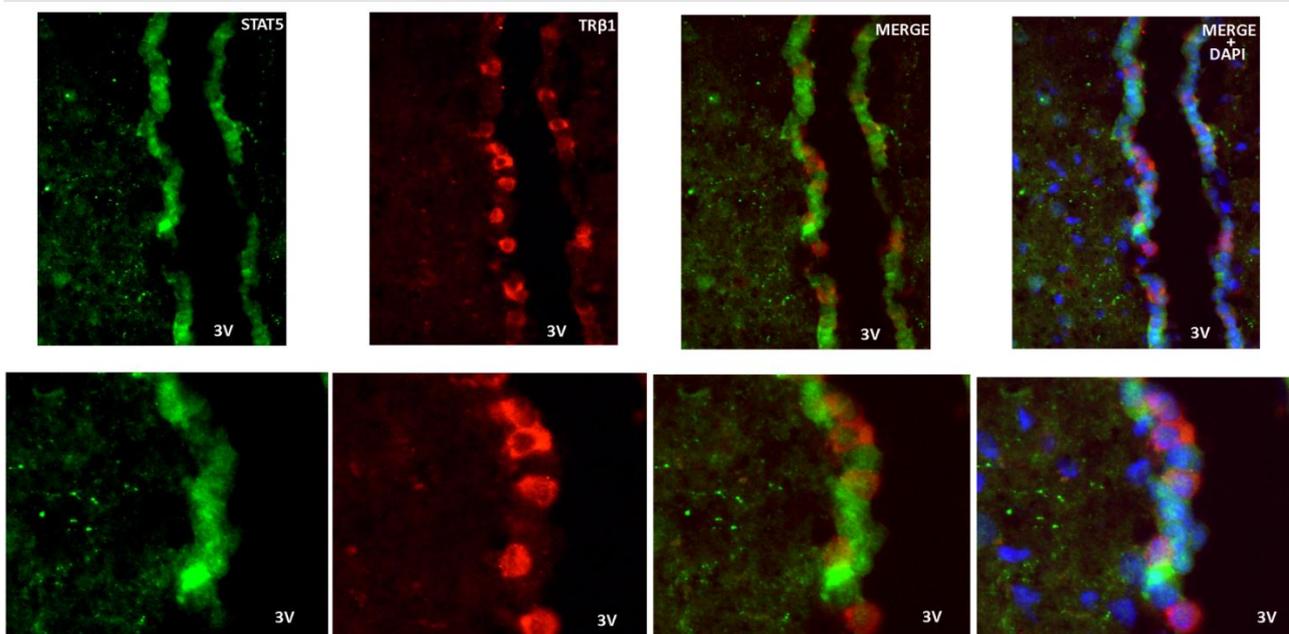


Figura 4.3.4: Expresión de la proteína STAT5 y el RTβ1. Proteína STAT5 marcada en verde, RTβ1, marcada en rojo. Solapamiento sólo de STAT5 y TRβ1 y solapamiento de ambas con DAPI.

Discusión

Los RTs se distribuyen a lo largo de toda la extensión del cerebro. Nuestros datos indican que tanto el RTα1 como el RTβ1 se expresan en las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas, no descrito hasta el momento, lo que nos indica que los efectos del HiperT descritos en los capítulos anteriores pueden estar siendo ejercidos por acción directa de las HTs en exceso sobre ellas. Por otro lado la localización citoplasmática de los RTs, corrobora lo propuesto por otros autores respecto de la importancia de la interacción entre diferentes vías de señalización con acciones no genómicas citoplasmáticas, además de las interacciones a nivel genómico en los sitios de reconocimiento ubicados en los promotores de los genes blanco. También se ha descrito que las HTs actúan a través de sus receptores en la mitocondria, donde el TRα1 juega un rol protagónico (Saelim *et al.* 2004, Saelim *et al.* 2007), y también está presente la forma TRβ1 (Andersson & Vennstrom 1997). La coexpresión de TRβ1 y STAT5 en zonas donde se localizan las neuronas dopaminérgicas, sugiere que en este caso también se podría dar la interacción física entre el RTβ1 y STAT5 a nivel citoplasmático propuesta previamente (Favre-Young *et al.* 2000). En este trabajo, realizado en células HEK293, se propone que las variaciones en los niveles de HTs afectan la expresión de los genes blancos de PRL, postulando un *cross-talk* negativo entre el RTβ1 y STAT5 que podría involucrar la alteración del reclutamiento de deacetilasas de histonas ligadas al TRβ1.

Además de la colocación de los RTs y TH, encontramos una marcación positiva en células TH-. Por lo tanto, además de una acción directa de las HTs sobre las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas, no podemos descartar una acción indirecta, sobre las células circundantes a las neuronas TH+, que afecten la actividad de estas últimas. Los tanicitos hipotalámicos, células de la glía radial que forman la pared del tercer ventrículo, actúan potencialmente como transductores de las señales hormonales o metabólicas provenientes del líquido cefalorraquídeo o de la circulación hacia las neuronas hipotalámicas (Shearer *et al.* 2010). Estas células juegan un importante rol como intermediarias en el balance energético, control del apetito (Bolborea & Dale 2013) y ayudan a mediar cambios moleculares entre la sangre, el cerebro y el LCR (Langlet *et al.* 2013). Estas células extienden largos procesos al hipotálamo adyacente y a la eminencia media (Rodríguez *et al.* 1979), terminando en capilares y terminales axónicos. Los tanicitos podrían estar implicados en la captación de T₄ de los capilares de la eminencia media y el hipotálamo basal, o desde el líquido cefalorraquídeo. La T₄ captada por los tanicitos daría lugar a T₃ por acción de la D2. Esta T₃, formada en los tanicitos, podría ser liberada al líquido cefalorraquídeo y desde allí alcanzar otras áreas, como los núcleos hipotalámicos, o actuar sobre los mismos tanicitos que expresen RTs. Por lo tanto, estas células TH-, entre ellas los tanicitos, podrían actuar como mediadores de las acciones de las HTs sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas, por su amplia acción a largas distancias.

En conclusión, la colocación de los RTs y TH o STAT5 en neuronas hipotalámicas, indican que las neuronas dopaminérgicas pueden responder directamente a las hormonas tiroideas y que la interacción entre sus vías de señalización y las de la PRL podrían ser responsables, al menos parcialmente, de los cambios observados en los capítulos anteriores.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

Existen fuertes evidencias del impacto de los desórdenes tiroideos en áreas específicas del cerebro relacionadas con la función y regulación neuroendocrina. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que tanto el hiper- como el hipotiroidismo experimentales producen importantes efectos deletéreos sobre la fertilidad, la gestación y la lactancia. Niveles anormales de HTs producen un desbalance en las hormonas necesarias para una reproducción, gestación y lactancia exitosas, entre ellas, de la prolactina. Los resultados de este trabajo demuestran la alteración producida por el HiperT de la actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas que son responsables de la regulación de la secreción de PRL. Nuestros resultados también resaltan la importancia del final de la gestación, como el momento clave en que se producen las adaptaciones necesarias para garantizar el éxito de la lactancia.

Nuestro hallazgo principal es que las ratas HiperT tienen una reactividad aumentada del retrocontrol corto de PRL al final de la gestación y en el posparto, por lo que no pueden volverse refractarias de forma normal a los niveles elevados de PRL y mantienen un tono dopaminérgico exacerbado que impide una respuesta normal de PRL al estímulo de la succión.

Sin embargo, se mantiene la capacidad de respuesta a la caída de P_4 , que aunque se adelanta en las ratas HiperT, es seguida de una atenuación de la activación de TH y del pico pre parto de PRL. Por otro lado, este pico y el grado de atenuación del tono dopaminérgico son menores que los observados posteriormente en ratas normales y en el posparto se restablece el tono dopaminérgico elevado (Figura 5.1).

La acción de las hormonas tiroideas se estaría ejerciendo directamente a nivel de la señalización de PRL, y también a través de interacciones con los esteroides ováricos, P_4 y E_2 , y sus receptores, ya que ellos modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Grattan & Averill 1990, Grattan *et al.* 2008) a través de sus receptores estimulando la activación o inhibición de la vía de señalización de PRL, es decir contribuyendo o no al *feedback* corto de PRL.

El hallazgo de la expresión de los RTs en las neuronas dopaminérgicas, indica que las HTs pueden ejercer una acción directa sobre estas neuronas modulando la señalización de PRL. También encontramos cambios en los RTs, en los días que encontramos alteraciones en la expresión de los miembros de la vía de señalización de PRL, que sugieren que los RTs tienen un rol no menor en el control del tono dopaminérgico hipotalámmico y en el mecanismo de atenuación que sucede antes del parto y se mantiene durante la lactancia. Los cambios que producen el HiperT en la expresión de los RTs y las moléculas que modulan sus acciones. En los tres días finales de la gestación, sugieren un aumento de la actividad transcripcional. Además, los cambios observados en los comoduladores podrían modificar también la vía de señalización de E_2 , ya que son compartidos con las HTs. En particular, los aumentos de la expresión proteica del $RT\beta 1$, que inhibe la expresión de los genes blanco del E_2 en células neuronales (Vasudevan *et al.* 2001) y que interactúa con STAT5, alterando su

activación inducida por PRL, puede ser determinante en el control de la actividad de las neuronas dopaminérgicas.

Por otro lado, resultados previos (Hapon 2003) y los presentados en este trabajo indican que al final de la gestación los niveles circulantes de HTs, así como sus niveles intracelulares en el cerebro materno, están sometidos a un control preciso, posiblemente necesario para el transcurso normal de los procesos que acompañan al parto y al establecimiento de la lactancia. Estos mecanismos de control parecen activarse más en las ratas HiperT, ya que también se observa una disminución en los niveles séricos de T₄ entre G19 y G21, acompañados de cambios en la expresión de deiodinasas tendientes a producir una disminución de los niveles hipotalámicos de T₃, la forma activa de las HTs. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de defensa ante los efectos de la administración crónica de T₄, que sin embargo, no alcanzan a mantener una actividad normal de las neuronas hipotalámicas.

No podemos dejar de mencionar que así como las poblaciones de las neuronas dopaminérgicas se encuentran alteradas por el exceso de HTs, otras poblaciones también podrían estar siendo afectadas. Como mencionamos previamente, en el HMB se encuentran otras poblaciones neuronales como son las neuronas POMC que regulan la ingesta, las neuronas KNDy encargadas de regular la secreción de LH, que además de expresar el RPRL, expresan RP y RE. También existen en el área preóptica otras poblaciones neuronales importantes relacionadas con el comportamiento materno, que también pueden estar siendo afectadas por el aumento de las HTs, ya sea de manera indirecta, a través de los cambios en la secreción de PRL, o de manera directa ya que también expresan entre otros el RPRL, RP y RE, receptores de hormonas que tienen un papel fundamental en la inducción de la conducta materno (Bridges & Grattan 2003) y que como demostramos en este trabajo, son afectados por el HiperT.

Los hallazgos presentados en este trabajo de tesis indican que el HiperT tiene efectos no despreciables a nivel del hipotálamo, a nivel de las vías de señalización de PRL, esteroides ováricos y las propias hormonas tiroideas, que inciden en el control dopaminérgico de la secreción de PRL y posiblemente sobre otras funciones hipotalámicas. A su vez, estos cambios afectan negativamente el rendimiento de la lactancia y el crecimiento del recién nacido. Por los resultados expuestos y discutidos en este trabajo podemos concluir aceptando la hipótesis planteada que *“Las hormonas tiroideas afectan la actividad de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (principalmente las neuronas TIDA, reguladoras de la liberación de PRL hipofisaria) a través de interacciones con las vías de señalización de PRL y hormonas esteroideas, a su vez la modulación anormal de estas vías producidas por niveles patológicos de hormonas tiroideas serían las responsables de los trastornos en la secreción de PRL observados en madres Hipo o HiperT al final de la gestación y en la lactancia”*. Aunque el hipertiroidismo no es frecuente en mujeres embarazadas, sus consecuencias pueden ser muy

severas cuando no se lo trata adecuadamente. Nuestros resultados aportan conocimientos que pueden ayudar al manejo clínico apropiado de mujeres puérperas con trastornos tiroideos que desean amamantar.

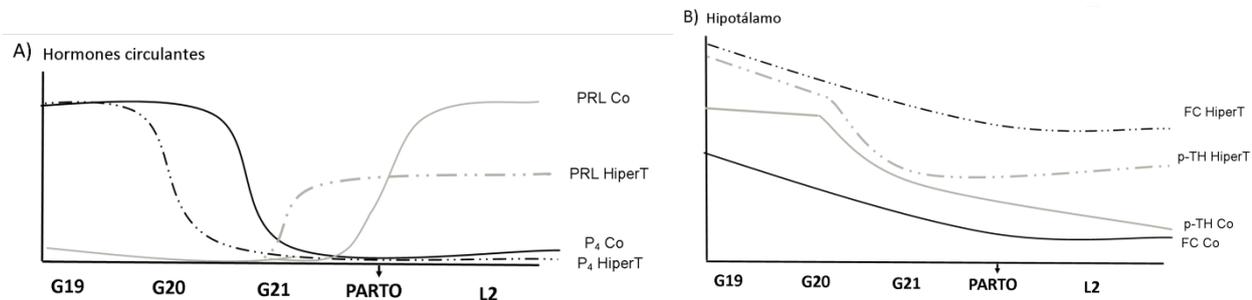


Figura 5.1: Gráficos que representan el final de la gestación y el posparto temprano. Panel A) niveles circulantes de las hormonas PRL y P₄ en ratas controles (Co) y ratas hipertiroideas (HiperT). Panel B) representación esquemática del retrocontrol corto de PRL (FC PRL) y niveles de la p-TH en ratas controles e hipertiroideas (Pennacchio *et al.* 2017).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hafiz HA & Horwitz KB** 2014 Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **140** 80-89.
- Acharya KD, Finkelstein SD, Bless EP, Nettles SA, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, Mani SK & Tetel MJ** 2015 Estradiol Preferentially Induces Progesterone Receptor-A (PR-A) Over PR-B in Cells Expressing Nuclear Receptor Coactivators in the Female Mouse Hypothalamus(1,2,3). *eNeuro* **2**.
- Akande EO** 1975 Plasma estrogens in euthyroid and thyrotoxic women. *Am J Obstet Gynecol* **122** 880-886.
- Akande EO & Hockaday TD** 1975 Plasma concentration of gonadotrophins, oestrogens and progesterone in thyrotoxic women. *Br J Obstet Gynaecol* **82** 541-551.
- Alkemade A, Friesema EC, Kuiper GG, Wiersinga WM, Swaab DF, Visser TJ & Fliers E** 2006 Novel neuroanatomical pathways for thyroid hormone action in the human anterior pituitary. *Eur J Endocrinol* **154** 491-500.
- Alkemade A, Vuijst CL, Unmehopa UA, Bakker O, Vennstrom B, Wiersinga WM, Swaab DF & Fliers E** 2005 Thyroid hormone receptor expression in the human hypothalamus and anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 904-912.
- Anderson GM, Beijer P, Bang AS, Fenwick MA, Bunn SJ & Grattan DR** 2006a Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation. *Endocrinology* **147** 4996-5005.
- Anderson GM, Grattan DR, van den Ancker W & Bridges RS** 2006b Reproductive experience increases prolactin responsiveness in the medial preoptic area and arcuate nucleus of female rats. *Endocrinology* **147** 4688-4694.
- Anderson GM, Kieser DC, Steyn FJ & Grattan DR** 2008 Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology* **149** 1562-1570.
- Anderson ST, Barclay JL, Fanning KJ, Kusters DH, Waters MJ & Curlewis JD** 2006c Mechanisms underlying the diminished sensitivity to prolactin negative feedback during lactation: reduced STAT5 signaling and up-regulation of cytokine-inducible SH2 domain-containing protein (CIS) expression in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology* **147** 1195-1202.
- Andersson ML & Vennstrom B** 1997 Chicken thyroid hormone receptor alpha requires the N-terminal amino acids for exclusive nuclear localization. *FEBS Lett* **416** 291-296.
- Andrews ZB & Grattan DR** 2004 The roles of dopamine and the neurointermediate lobe of the pituitary in the regulation of prolactin secretion during late pregnancy in rats. *J Neuroendocrinol* **16** 859-865.
- Andrews ZB, Kokay IC & Grattan DR** 2001 Dissociation of prolactin secretion from tuberoinfundibular dopamine activity in late pregnant rats. *Endocrinology* **142** 2719-2724.
- Arbogast LA** 2010 Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39): a new player in the translation of sensory input to prolactin release during lactation. *Endocrinology* **151** 5568-5569.
- Arbogast LA & Ben-Jonathan N** 1989 Tyrosine hydroxylase in the stalk-median eminence and posterior pituitary is inactivated only during the plateau phase of the preovulatory prolactin surge. *Endocrinology* **125** 667-674.
- Arbogast LA & Ben-Jonathan N** 1990 The preovulatory prolactin surge is prolonged by a progesterone-dependent dopaminergic mechanism. *Endocrinology* **126** 246-252.

- Arbogast LA & Voogt JL** 1991 Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* **128** 997-1005.
- Arbogast LA & Voogt JL** 1993 Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* **58** 501-510.
- Arbogast LA & Voogt JL** 1994 Progesterone suppresses tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nucleus on proestrus. *Endocrinology* **135** 343-350.
- Arbogast LA & Voogt JL** 1996 The responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to prolactin feedback is diminished between early lactation and midlactation in the rat. *Endocrinology* **137** 47-54.
- Arbogast LA & Voogt JL** 1997 Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* **138** 3016-3023.
- Arden KC, Boutin JM, Djiane J, Kelly PA & Cavenee WK** 1990 The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet* **53** 161-165.
- Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS & Horwitz KB** 2000 The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain. *J Biol Chem* **275** 7313-7320.
- Ballare C, Vallejo G, Vicent GP, Saragueta P & Beato M** 2006 Progesterone signaling in breast and endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102** 2-10.
- Barman S, Ali A, Hui EK, Adhikary L & Nayak DP** 2001 Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. *Virus Res* **77** 61-69.
- Barraclough CA & Sawyer CH** 1959 Induction of pseudopregnancy in the rat by reserpine and chlorpromazine. *Endocrinology* **65** 563-571.
- Becks GP & Burrow GN** 1991 Thyroid disease and pregnancy. *Med Clin North Am* **75** 121-150.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL & Steinmetz RW** 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* **17** 639-669.
- Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL & Hoefler MT** 1980 Dopamine in hypophysial portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* **106** 690-696.
- Bernard V, Young J, Chanson P & Binart N** 2015 New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol* **11** 265-275.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ & Larsen PR** 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* **23** 38-89.
- Bianco AC & Silva JE** 1987 Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* **120** 55-62.
- Bjorklund A, Moore RY, Nobin A & Stenevi U** 1973 The organization of tubero-hypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron systems in the rat brain. *Brain Res* **51** 171-191.
- Blum M, McEwen BS & Roberts JL** 1987 Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment. *J Biol Chem* **262** 817-821.
- Bolborea M & Dale N** 2013 Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci* **36** 91-100.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA** 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* **19** 225-268.

- Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Alves SB, Reis AM & de Moura EG** 2008 Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *J Endocrinol* **198** 331-337.
- Bradley DJ, Towle HC & Young WS, 3rd** 1992 Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* **12** 2288-2302.
- Bradley DJ, Young WS, 3rd & Weinberger C** 1989 Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** 7250-7254.
- Bramley T** 2003 Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* **125** 3-15.
- Brandebourg T, Hugo E & Ben-Jonathan N** 2007 Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes Metab* **9** 464-476.
- Bridges RS** 1984 A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology* **114** 930-940.
- Bridges RS & Grattan DR** 2003 Prolactin-induced neurogenesis in the maternal brain. *Trends Endocrinol Metab* **14** 199-201.
- Brisken C** 2013 Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nat Rev Cancer* **13** 385-396.
- Brown RS, Piet R, Herbison AE & Grattan DR** 2012 Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* **153** 2375-2384.
- Butcher RL, Fugo NW & Collins WE** 1972 Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat. *Endocrinology* **90** 1125-1127.
- Calvo R, Obregon MJ, Ruiz de Ona C, Ferreiro B, Escobar Del Rey E & Morreale de Escobar G** 1990 Thyroid hormone economy in pregnant rats near term: a "physiological" animal model of nonthyroidal illness? *Endocrinology* **127** 10-16.
- Camacho-Arroyo I, Gonzalez-Arenas A & Gonzalez-Moran G** 2007 Ontogenic variations in the content and distribution of progesterone receptor isoforms in the reproductive tract and brain of chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146** 644-652.
- Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC & Martinez de la Escalera G** 2006 Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* **17** 301-307.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B & Lydon JP** 2003 Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* **68** 771-778.
- Cramer OM, Parker CR, Jr. & Porter JC** 1979 Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood. *Endocrinology* **104** 419-422.
- Crantz FR, Silva JE & Larsen PR** 1982 An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology* **110** 367-375.
- Chan S & Kilby MD** 2000 Thyroid hormone and central nervous system development. *J Endocrinol* **165** 1-8.
- Chaube R & Joy KP** 2003 Thyroid hormone modulation of brain in vivo tyrosine hydroxylase activity and kinetics in the female catfish *Heteropneustes fossilis*. *J Endocrinol* **179** 205-215.
- Chen CC, Stairs DB, Boxer RB, Belka GK, Horseman ND, Alvarez JV & Chodosh LA** 2012 Autocrine prolactin induced by the Pten-Akt pathway is required for lactation initiation and provides a direct link between the Akt and Stat5 pathways. *Genes Dev* **26** 2154-2168.
- Chen CL & Meites J** 1970 Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* **86** 503-505.

- Cheng SY** 2000 Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev Endocr Metab Disord* **1** 9-18.
- Cheng SY, Leonard JL & Davis PJ** 2010 Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* **31** 139-170.
- Cho BN, Suh YH, Yoon YD, Lee CC & Kim K** 1993 Progesterone inhibits the estrogen-induced prolactin gene expression in the rat pituitary. *Mol Cell Endocrinol* **93** 47-52.
- de Vlaming VL, Vodcink MJ, Meyer RA, Jr. & Meyer MH** 1979 The effect of pinealectomy on serum K⁺ and Cl⁻ levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* **37** 131-133.
- Deis RP, Carrizo DG & Jahn GA** 1989a Suckling-induced prolactin release potentiates mifepristone-induced lactogenesis in pregnant rats. *J Reprod Fertil* **87** 147-153.
- Deis RP, Leguizamon E & Jahn GA** 1989b Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. *J Endocrinol* **120** 37-43.
- Demarest KT, Duda NJ, Riegler GD & Moore KE** 1983a Placental lactogen mimics prolactin in activating tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res* **272** 175-178.
- Demarest KT, McKay DW, Riegler GD & Moore KE** 1983b Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology* **36** 130-137.
- Demarest KT, Riegler GD & Moore KE** 1986 The rapid 'tonic' and the delayed 'induction' components of the prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons following the systemic administration of prolactin. *Neuroendocrinology* **43** 291-299.
- DeMaria JE, Lerant AA & Freeman ME** 1999 Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Res* **837** 236-241.
- Diano S, Leonard JL, Meli R, Esposito E & Schiavo L** 2003 Hypothalamic type II iodothyronine deiodinase: a light and electron microscopic study. *Brain Res* **976** 130-134.
- Dufourny L & Skinner DC** 2003 Colocalization of progesterone receptors and thyroid hormone receptors alpha in the ovine diencephalon: no effect of estradiol. *Neuroendocrinology* **77** 51-58.
- Ercan-Fang S, Schwartz HL & Oppenheimer JH** 1996 Isoform-specific 3,5,3'-triiodothyronine receptor binding capacity and messenger ribonucleic acid content in rat adenohypophysis: effect of thyroidal state and comparison with extrapituitary tissues. *Endocrinology* **137** 3228-3233.
- Fahie-Wilson M & Smith TP** 2013 Determination of prolactin: the macroprolactin problem. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27** 725-742.
- Faivre EJ & Lange CA** 2007 Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **27** 466-480.
- Favre-Young H, Dif F, Roussille F, Demeneix BA, Kelly PA, Edery M & de Luze A** 2000 Cross-talk between signal transducer and activator of transcription (Stat5) and thyroid hormone receptor-beta 1 (TRbeta1) signaling pathways. *Mol Endocrinol* **14** 1411-1424.
- Feher P, Olah M, Bodnar I, Hechtel D, Bacskay I, Juhasz B, Nagy GM & Vecsernyes M** 2010 Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses. *Brain Res Bull* **82** 141-145.
- Fliers E, Alkemade A, Wiersinga WM & Swaab DF** 2006 Hypothalamic thyroid hormone feedback in health and disease. *Prog Brain Res* **153** 189-207.
- Fliestra RJ & Voogt JL** 1997 Lactogenic hormones of the placenta and pituitary inhibit suckling-induced prolactin (PRL) release but not the ante-partum PRL surge. *Proc Soc Exp Biol Med* **214** 258-264.
- Francis K, Meddle SL, Bishop VR & Russell JA** 2002 Progesterone receptor expression in the pregnant and parturient rat hypothalamus and brainstem. *Brain Res* **927** 18-26.

- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G** 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* **80** 1523-1631.
- Freeman ME, LaRochelle FT, Jr. & Moore RB** 1976 Effect of thyroid status on spontaneous and induced surges of luteinizing hormone. *Endocrinology* **99** 713-719.
- Fresno Vara JA, Caceres MA, Silva A & Martin-Perez J** 2001 Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell* **12** 2171-2183.
- Fujii S, Akai T, Tanaka S, Nakatani K, Kinoshita M, Seki J & Wada M** 1981 Thyroid hormone abnormalities in patients with diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* **4** 71-74.
- Fukuda H, Ohshima K, Mori M, Kobayashi I & Greer MA** 1980 Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat. *Endocrinology* **107** 1711-1716.
- Fuxe K** 1963 Cellular Localization of Monoamines in the Median Eminence and in the Infundibular Stem of Some Mammals. *Acta Physiol Scand* **58** 383-384.
- Galton VA** 1968 Thyroxine metabolism and thyroid function in the pregnant rat. *Endocrinology* **82** 282-290.
- Garcia-Martinez JM, Calcabrini A, Gonzalez L, Martin-Forero E, Agullo-Ortuno MT, Simon V, Watkin H, Anderson SM, Roche S & Martin-Perez J** 2010 A non-catalytic function of the Src family tyrosine kinases controls prolactin-induced Jak2 signaling. *Cell Signal* **22** 415-426.
- Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I & Chowen JA** 1999 Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol* **40** 574-584.
- Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP & McDonnell DP** 2000 The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* **20** 3102-3115.
- Giguere V, Meunier H, Veilleux R & Labrie F** 1982 Direct effects of sex steroids on prolactin release at the anterior pituitary level: interactions with dopamine, thyrotropin-releasing hormone, and isobutylmethylxanthine. *Endocrinology* **111** 857-862.
- Glass CK** 1994 Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* **15** 391-407.
- Goffin V, Binart N, Touraine P & Kelly PA** 2002 Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol* **64** 47-67.
- Goudreau JL, Lindley SE, Lookingland KJ & Moore KE** 1992 Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology* **56** 100-105.
- Grattan DR** 2002 Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* **123** 497-506.
- Grattan DR** 2015 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol* **226** T101-122.
- Grattan DR & Averill RL** 1990 Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology* **126** 1199-1205.
- Grattan DR, Pi XJ, Andrews ZB, Augustine RA, Kokay IC, Summerfield MR, Todd B & Bunn SJ** 2001a Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: implications for behavior. *Horm Behav* **40** 115-124.
- Grattan DR, Steyn FJ, Kokay IC, Anderson GM & Bunn SJ** 2008 Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. *J Neuroendocrinol* **20** 497-507.
- Grattan DR, Xu J, McLachlan MJ, Kokay IC, Bunn SJ, Hovey RC & Davey HW** 2001b Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology* **142** 3935-3940.
- Gudelsky GA & Porter JC** 1979 Release of newly synthesized dopamine into the hypophysial portal vasculature of the rat. *Endocrinology* **104** 583-587.

- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, Gonzalez-Arenas A, Chavira R & Camacho-Arroyo I** 2003 Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* **15** 984-990.
- Guillemin R & Schally AV** 1961 On the nature of the hypothalamic substance which controls the secretion of ACTH. *Acta Neuroveg (Wien)* **23** 58-62.
- Hager GL, Lim CS, Elbi C & Baumann CT** 2000 Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **74** 249-254.
- Hapon MB, Gamarra-Luques C & Jahn GA** 2010 Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reprod Biol Endocrinol* **8** 14.
- Hapon MB, Motta AB, Ezquer M, Bonafede M & Jahn GA** 2007 Hypothyroidism prolongs corpus luteum function in the pregnant rat. *Reproduction* **133** 197-205.
- Hapon MB, Simoncini M, Via G & Jahn GA** 2003 Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction* **126** 371-382.
- Hapon MB, Varas SM, Jahn GA & Gimenez MS** 2005 Effects of hypothyroidism on mammary and liver lipid metabolism in virgin and late-pregnant rats. *J Lipid Res* **46** 1320-1330.
- Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT & Bain DL** 2007 Coactivator assembly at the promoter: efficient recruitment of SRC2 is coupled to cooperative DNA binding by the progesterone receptor. *Biochemistry* **46** 11023-11032.
- Heuer H & Mason CA** 2003 Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1. *J Neurosci* **23** 10604-10612.
- Hiraoka Y, Tatsumi K, Shiozawa M, Aiso S, Fukasawa T, Yasuda K & Miyai K** 1991 A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Mol Cell Endocrinol* **75** 71-80.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD & Chin WW** 1989 Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* **244** 76-79.
- Holzbauer M & Racke K** 1985 The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol* **63** 97-116.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK & et al.** 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377** 397-404.
- Horseman ND & Yu-Lee LY** 1994 Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev* **15** 627-649.
- Hu X & Lazar MA** 1999 The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402** 93-96.
- Hu ZZ, Meng J & Dufau ML** 2001 Isolation and characterization of two novel forms of the human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. *J Biol Chem* **276** 41086-41094.
- Hu ZZ, Zhuang L, Meng J, Leondires M & Dufau ML** 1999 The human prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: the generic promoter hPIII and a novel human promoter hP(N). *J Clin Endocrinol Metab* **84** 1153-1156.
- Jacobsen BM & Horwitz KB** 2012 Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol* **357** 18-29.
- Jahn GA, Alonso N & Deis RP** 1986 Ovarian and feto-placental factors and the regulation of prolactin release during pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil* **77** 125-133.
- Jahn GA & Deis RP** 1986 Stress-induced prolactin release in female, male and androgenized rats: influence of progesterone treatment. *J Endocrinol* **110** 423-428.
- Jahn GA, Moya G, Jammes H & Rosato RR** 1995 Effect of chronic thyroid hormone treatment on cycling, ovulation, serum reproductive hormones and ovarian LH and prolactin receptors in rats. *Endocrine* **3** 121-127.
- Jansen J, Friesema EC, Milici C & Visser TJ** 2005 Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* **15** 757-768.

- Jensik PJ & Arbogast LA** 2011 Differential and interactive effects of ligand-bound progesterone receptor A and B isoforms on tyrosine hydroxylase promoter activity. *J Neuroendocrinol* **23** 915-925.
- Jones EE & Naftolin F** 1990 Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Res* **510** 84-91.
- Kanematsu S & Sawyer CH** 1973 Elevation of plasma prolactin after hypophysial stalk section in the rat. *Endocrinology* **93** 238-241.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK & Low MJ** 1997 Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* **19** 103-113.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC & Edery M** 1991 The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* **12** 235-251.
- Kile BT, Nicola NA & Alexander WS** 2001 Negative regulators of cytokine signaling. *Int J Hematol* **73** 292-298.
- Kline JB, Roehrs H & Clevenger CV** 1999 Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J Biol Chem* **274** 35461-35468.
- Kohrle J** 2000 Thyroid hormone metabolism and action in the brain and pituitary. *Acta Med Austriaca* **27** 1-7.
- Kumer SC & Vrana KE** 1996 Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* **67** 443-462.
- Kwa HG & Verhofstad F** 1967 Prolactin levels in the plasma of female rats. *J Endocrinol* **39** 455-456.
- Langan EA, Foitzik-Lau K, Goffin V, Ramot Y & Paus R** 2010 Prolactin: an emerging force along the cutaneous-endocrine axis. *Trends Endocrinol Metab* **21** 569-577.
- Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prevot V & Dehouck B** 2013 Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol* **521** 3389-3405.
- Larsen PR, Silva JE & Kaplan MM** 1981 Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr Rev* **2** 87-102.
- Lazar MA** 2003 Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* **1** e001.
- Lebrun JJ, Ali S, Sofer L, Ullrich A & Kelly PA** 1994 Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *J Biol Chem* **269** 14021-14026.
- Lechan RM, Qi Y, Jackson IM & Mahdavi V** 1994 Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **135** 92-100.
- Lee Y & Voogt JL** 1999 Feedback effects of placental lactogens on prolactin levels and Fos-related antigen immunoreactivity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* **140** 2159-2166.
- Leo C & Chen JD** 2000 The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245** 1-11.
- Leong DA, Frawley LS & Neill JD** 1983 Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annu Rev Physiol* **45** 109-127.
- Leong GM, Moverare S, Brce J, Doyle N, Sjogren K, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ho KK, Ohlsson C & Leung KC** 2004 Estrogen up-regulates hepatic expression of suppressors of cytokine signaling-2 and -3 in vivo and in vitro. *Endocrinology* **145** 5525-5531.
- Lerant A & Freeman ME** 1997 Dopaminergic neurons in periventricular and arcuate nuclei of proestrous and ovariectomized rats: endogenous diurnal rhythm of Fos-related antigens expression. *Neuroendocrinology* **65** 436-445.

- Lerant A & Freeman ME** 1998 Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Res* **802** 141-154.
- Leung KC, Doyle N, Ballesteros M, Sjogren K, Watts CK, Low TH, Leong GM, Ross RJ & Ho KK** 2003 Estrogen inhibits GH signaling by suppressing GH-induced JAK2 phosphorylation, an effect mediated by SOCS-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** 1016-1021.
- Li C, Chen P & Smith MS** 1999 Neuropeptide Y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: role of prolactin. *Endocrinology* **140** 118-123.
- Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Wiklund J, Wertz N & Gorski J** 1981 Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Adv Exp Med Biol* **138** 151-163.
- Liu B & Arbogast LA** 2009 Gene expression profiles of intracellular and membrane progesterone receptor isoforms in the mediobasal hypothalamus during pro-oestrus. *J Neuroendocrinol* **21** 993-1000.
- Liu B & Arbogast LA** 2010 Progesterone decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation state and increases protein phosphatase 2A activity in the stalk-median eminence on proestrous afternoon. *J Endocrinol* **204** 209-219.
- Lkhider M, Castino R, Bouguyon E, Isidoro C & Ollivier-Bousquet M** 2004 Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. *J Cell Sci* **117** 5155-5164.
- Macotela Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la Escalera G & Clapp C** 2006 Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* **119** 1790-1800.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans RM** 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83** 835-839.
- Mann PE & Babb JA** 2005 Neural steroid hormone receptor gene expression in pregnant rats. *Brain Res Mol Brain Res* **142** 39-46.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H & Watson SJ** 1990 Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci* **10** 2587-2600.
- Marano RJ & Ben-Jonathan N** 2014 Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol* **28** 622-633.
- Marano RJ, Tickner J & Redmond SL** 2013 Prolactin expression in the cochlea of aged BALB/c mice is gender biased and correlates to loss of bone mineral density and hearing loss. *PLoS One* **8** e63952.
- Markee JE & Sawyer CH** 1949 Evidence that copper acetate induces ovulation in the rabbit by direct stimulation of the adenohipophysis. *Proc Soc Exp Biol Med* **72** 174.
- McKenna NJ, Lanz RB & O'Malley BW** 1999a Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* **20** 321-344.
- McKenna NJ & O'Malley BW** 2002 Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108** 465-474.
- McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW** 1999b Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69** 3-12.
- Mellstrom B, Naranjo JR, Santos A, Gonzalez AM & Bernal J** 1991 Independent expression of the alpha and beta c-erbA genes in developing rat brain. *Mol Endocrinol* **5** 1339-1350.
- Mitsuhashi T, Tennyson GE & Nikodem VM** 1988 Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** 5804-5808.

- Molenda-Figueira HA, Murphy SD, Shea KL, Siegal NK, Zhao Y, Chadwick JG, Jr., Denner LA & Tetel MJ** 2008 Steroid receptor coactivator-1 from brain physically interacts differentially with steroid receptor subtypes. *Endocrinology* **149** 5272-5279.
- Moore KE** 1987 Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol Reprod* **36** 47-58.
- Muller J & Heuer H** 2014 Expression pattern of thyroid hormone transporters in the postnatal mouse brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5** 92.
- Navas PB, Motta AB, Hapon MB & Jahn GA** 2011 Hyperthyroidism advances luteolysis in the pregnant rat through changes in prostaglandin balance. *Fertil Steril* **96** 1008-1014.
- Nunez J, Celi FS, Ng L & Forrest D** 2008 Multigenic control of thyroid hormone functions in the nervous system. *Mol Cell Endocrinol* **287** 1-12.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW** 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270** 1354-1357.
- Parsons B, Rainbow TC, MacLusky NJ & McEwen BS** 1982 Progesterin receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei. *J Neurosci* **2** 1446-1452.
- Pennacchio GE, Neira FJ, Soaje M, Jahn GA & Valdez SR** 2017 Effect of hyperthyroidism on circulating prolactin and hypothalamic expression of tyrosine hydroxylase, prolactin signaling cascade members and estrogen and progesterone receptors during late pregnancy and lactation in the rat. *Mol Cell Endocrinol* **442** 40-50.
- Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Krones A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK & Rosenfeld MG** 1999 Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13** 3198-3208.
- Peters LL, Hoefler MT & Ben-Jonathan N** 1981 The posterior pituitary: regulation of anterior pituitary prolactin secretion. *Science* **213** 659-661.
- Pezet A, Favre H, Kelly PA & Edery M** 1999 Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem* **274** 24497-24502.
- Pi X & Grattan DR** 1999 Expression of prolactin receptor mRNA is increased in the preoptic area of lactating rats. *Endocrine* **11** 91-98.
- Pi X, Zhang B, Li J & Voogt JL** 2003 Promoter usage and estrogen regulation of prolactin receptor gene in the brain of the female rat. *Neuroendocrinology* **77** 187-197.
- Plateroti M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund JN, Samarut J & Chassande O** 2001 Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* **21** 4761-4772.
- Poppe K, Velkeniers B & Glinde D** 2007 Thyroid disease and female reproduction. *Clin Endocrinol (Oxf)* **66** 309-321.
- Prummel MF, Brokken LJ, Meduri G, Misrahi M, Bakker O & Wiersinga WM** 2000 Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* **85** 4347-4353.
- Quignodon L, Grijota-Martinez C, Compe E, Guyot R, Allioli N, Laperriere D, Walker R, Meltzer P, Mader S, Samarut J & Flamant F** 2007 A combined approach identifies a limited number of new thyroid hormone target genes in post-natal mouse cerebellum. *J Mol Endocrinol* **39** 17-28.
- Raymond V, Beaulieu M, Labrie F & Boissier J** 1978 Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* **200** 1173-1175.
- Robertson MC & Friesen HG** 1981 Two forms of rat placental lactogen revealed by radioimmunoassay. *Endocrinology* **108** 2388-2390.
- Robertson MC, Gillespie B & Friesen HG** 1982 Characterization of the two forms of rat placental lactogen (rPL): rPL-I and rPL-II. *Endocrinology* **111** 1862-1866.
- Rodriguez EM, Gonzalez CB & Delannoy L** 1979 Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res* **201** 377-408.

- Romano N, Yip SH, Hodson DJ, Guillou A, Parnaudeau S, Kirk S, Tronche F, Bonnefont X, Le Tissier P, Bunn SJ, Grattan DR, Mollard P & Martin AO** 2013 Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci* **33** 4424-4433.
- Rosato RR, Gimenez MS & Jahn GA** 1992 Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* **127** 547-554.
- Rosato RR, Jammes H & Jahn GA** 1998 Effect of chronic thyroxine treatment on pregnancy in rats: effects on oestrogen, progesterone, prolactin and GH receptors in uterus, liver and mammary gland. *Endocr Res* **24** 269-284.
- Russell JA, Douglas AJ & Ingram CD** 2001 Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *Prog Brain Res* **133** 1-38.
- Saelim N, Holstein D, Chocron ES, Camacho P & Lechleiter JD** 2007 Inhibition of apoptotic potency by ligand stimulated thyroid hormone receptors located in mitochondria. *Apoptosis* **12** 1781-1794.
- Saelim N, John LM, Wu J, Park JS, Bai Y, Camacho P & Lechleiter JD** 2004 Nontranscriptional modulation of intracellular Ca²⁺ signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *J Cell Biol* **167** 915-924.
- Saiardi A, Bozzi Y, Baik JH & Borrelli E** 1997 Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* **19** 115-126.
- Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H & Vennstrom B** 1986 The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* **324** 635-640.
- Sar M & Meites J** 1968 Effects of progesterone, testosterone, and cortisol on hypothalamic prolactin-inhibiting factor and pituitary prolactin content. *Proc Soc Exp Biol Med* **127** 426-429.
- Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM & Lechan RM** 1987 Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* **238** 78-80.
- Shearer KD, Goodman TH, Ross AW, Reilly L, Morgan PJ & McCaffery PJ** 2010 Photoperiodic regulation of retinoic acid signaling in the hypothalamus. *J Neurochem* **112** 246-257.
- Shughrue PJ, Lane MV & Merchenthaler I** 1997 Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. *Endocrinology* **138** 5476-5484.
- Shull JD & Gorski J** 1984 Estrogen stimulates prolactin gene transcription by a mechanism independent of pituitary protein synthesis. *Endocrinology* **114** 1550-1557.
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M & Swanson LW** 1990 Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* **294** 76-95.
- Sjoberg M, Vennstrom B & Forrest D** 1992 Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for alpha and N-terminal variant beta receptors. *Development* **114** 39-47.
- Soaje M & Deis RP** 1994 A modulatory role of endogenous opioids on prolactin secretion at the end of pregnancy in the rat. *J Endocrinol* **140** 97-102.
- Starr R & Hilton DJ** 1999 Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* **21** 47-52.
- Steyn FJ, Anderson GM & Grattan DR** 2007 Expression of ovarian steroid hormone receptors in tuberoinfundibular dopaminergic neurones during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol* **19** 788-793.
- Steyn FJ, Anderson GM & Grattan DR** 2008 Hormonal regulation of suppressors of cytokine signaling (SOCS) messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus during late pregnancy. *Endocrinology* **149** 3206-3214.

- Tanner JW, Chen W, Young RL, Longmore GD & Shaw AS** 1995 The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* **270** 6523-6530.
- Tetel MJ, Giangrande PH, Leonhardt SA, McDonnell DP & Edwards DP** 1999 Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* **13** 910-924.
- Thomas R & Reid RL** 1987 Thyroid disease and reproductive dysfunction: a review. *Obstet Gynecol* **70** 789-798.
- Tiong TS, Stevenson JL & Herington AC** 1992 Regulation of prolactin receptor gene expression by thyroid hormone status in the rat. *J Mol Endocrinol* **8** 63-72.
- Tong Y, Simard J, Labrie C, Zhao HF, Labrie F & Pelletier G** 1989 Inhibitory effect of androgen on estrogen-induced prolactin messenger ribonucleic acid accumulation in the male rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* **125** 1821-1828.
- Tonkowicz PA & Voogt JL** 1983 Termination of prolactin surges with development of placental lactogen secretion in the pregnant rat. *Endocrinology* **113** 1314-1318.
- Tonkowicz PA & Voogt JL** 1984 Ovarian and fetal control of rat placental lactogen and prolactin secretion at midpregnancy. *Endocrinology* **114** 254-259.
- Toulis KA, Goulis DG, Venetis CA, Kolibianakis EM, Tarlatzis BC & Papadimas I** 2009 Thyroid autoimmunity and miscarriages: the corpus luteum hypothesis. *Med Hypotheses* **73** 1060-1062.
- Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI & Martial JA** 1984 Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* **3** 429-437.
- Valdez SR, Penissi AB, Deis RP & Jahn GA** 2007 Hormonal profile and reproductive performance in lactation deficient (OFA hr/hr) and normal (Sprague-Dawley) female rats. *Reproduction* **133** 827-840.
- Valdez SR, Pennacchio GE, Gamboa DF, de Di Nasso EG, Bregonzio C & Soaje M** 2014 Opioid modulation of prolactin secretion induced by stress during late pregnancy. Role of ovarian steroids. *Pharmacol Rep* **66** 386-393.
- van den Pol AN, Herbst RS & Powell JF** 1984 Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* **13** 1117-1156.
- Varas SM, Munoz EM, Hapon MB, Aguilera Merlo CI, Gimenez MS & Jahn GA** 2002 Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. *Reproduction* **124** 691-702.
- Vasudevan N, Davidkova G, Zhu YS, Koibuchi N, Chin WW & Pfaff D** 2001 Differential interaction of estrogen receptor and thyroid hormone receptor isoforms on the rat oxytocin receptor promoter leads to differences in transcriptional regulation. *Neuroendocrinology* **74** 309-324.
- Voogt J, Robertson M & Friesen H** 1982 Inverse relationship of prolactin and rat placental lactogen during pregnancy. *Biol Reprod* **26** 800-805.
- Voogt JL** 1984 Evidence for an inhibitory influence of rat placental lactogen on prolactin release in vitro. *Biol Reprod* **31** 141-147.
- Wagner CK & Morrell JI** 1995 In situ analysis of estrogen receptor mRNA expression in the brain of female rats during pregnancy. *Brain Res Mol Brain Res* **33** 127-135.
- Walsh RJ, Slaby FJ & Posner BI** 1987 A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* **120** 1846-1850.
- Wang HJ, Hoffman GE & Smith MS** 1993 Suppressed tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic system during lactation. *Endocrinology* **133** 1657-1663.
- Wiens SC & Trudeau VL** 2006 Thyroid hormone and gamma-aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **144** 332-344.

- Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thoren P & Vennstrom B** 1998 Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J* **17** 455-461.
- Williams GR** 2000 Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* **20** 8329-8342.
- Wu Y & Koenig RJ** 2000 Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* **11** 207-211.
- Ying H, Suzuki H, Zhao L, Willingham MC, Meltzer P & Cheng SY** 2003 Mutant thyroid hormone receptor beta represses the expression and transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during thyroid carcinogenesis. *Cancer Res* **63** 5274-5280.
- Zhang XK & Kahl M** 1993 Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol Metab* **4** 156-162.
- Zigmond RE, Schwarzschild MA & Rittenhouse AR** 1989 Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* **12** 415-461.
- Zimmermann P** 1982 Estrogen-dependent changes in the functional interrelationships among neurons, ependymal cells and glial cells of the arcuate nucleus. Cytometric studies in the female albino mouse. *Cell Tissue Res* **227** 113-128.
- Zimmermann RC, Krahn LE, Klee GG, Ditkoff EC, Ory SJ & Sauer MV** 2001 Prolonged inhibition of presynaptic catecholamine synthesis with alpha-methyl-para-tyrosine attenuates the circadian rhythm of human TSH secretion. *J Soc Gynecol Investig* **8** 174-178.