

Tesis de Posgrado

Modulación ejercida por el sistema nervioso autónomo simpático sobre la función del eje hipófiso-tiroideo

Romeo, Horacio Eduardo

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Romeo, Horacio Eduardo. (1987). Modulación ejercida por el sistema nervioso autónomo simpático sobre la función del eje hipófiso-tiroideo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2060_Romeo.pdf

Cita tipo Chicago:

Romeo, Horacio Eduardo. "Modulación ejercida por el sistema nervioso autónomo simpático sobre la función del eje hipófiso-tiroideo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2060_Romeo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

MODULACIÓN EJERCIDA POR EL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO SIMPÁTICO SOBRE
LA FUNCIÓN DEL EJE HIPOFISO-TIROIDEO.

AUTOR

HORACIO EDUARDO ROMEO

DIRECTOR

PROF. DR. DANIEL PEDRO CARDINALI

LUGAR DE TRABAJO

CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y DE PRINCIPIOS NATURALES. CONICET

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 2060 -
y. 2

1987

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y especial reconocimiento al Prof. Dr. Daniel P. Cardinali quien me inició y orientó en el campo de la Investigación Científica, brindándome sus conocimientos, su apoyo y su afecto.

Al Dr. Axel O. Bachmann quien me introdujo en la zoología y por sus permanentes consejos.

A mis compañeros de Laboratorio: Irene Vacas, Ruth Rosenstein, César G. Soveyra, Inés K. Sarmiento, Elba Pereyra, Eduardo Chuluyan, Adriana del Castello y Graciela Etchegoyen, por los momentos compartidos y las amenas polémicas, casi diarias.

A los distintos profesionales que colaboraron para que esta Tesis pudiera realizarse: Dres. R. Boado y A. Zaninovich (Radioinmunoensayo de T_4 y TSH); Dras. M. Barontini e I. Armando (Determinación de Catecolaminas) y Dra. C. Díaz (Técnicas Histológicas).

Al Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales donde se realizó este trabajo y particularmente a Daniel González encargado del Bioterio por su esmero en el trabajo.

A Producciones García Ferré por su apoyo durante mis estudios universitarios y en todos los momentos difíciles.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas que me otorgaron.

A mi madre y a la Srta. Mirta Carnero por el mecanografiado de esta Tesis.

A todos aquéllos que de alguna manera contribuyeron para que esta Tesis pudiera concretarse.

A mis Padres por su ejemplo cotidiano.

A mis hermanas por su comprensión.

A mis abuelas presentes y mis abuelos ausentes
por todo aquello que no se expresa con palabras.

A mis amigos de siempre por su lucha sostenida
en pos de un futuro mejor.

ABREVIATURAS

ARN	Acido ribonucleico
COMT	Catecol-O-metil transferasa
DA	Dopamina
Dc unil	Descentralización cervical superior unilateral
DMI	Desmetil imipramina
DOPA	3,4 dihidroxifenilalamina
E	Adranalina
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
EGTA	Acido etilenglicol tetraacético
ES	Error Estandard
GCI	Ganglio Cervical Inferior
GCM	Ganglio Cervical Medio
GCS	Ganglio Cervical Superior
GCSx unil	Gangliectomia cervical superior unilateral
GCSx bil.	Gangliectomia cervical superior bilateral
GH	Hormona de crecimiento
[³ H]	Tritio
MAO	Monoamino oxidasa
MMI	Metil mercapto imidazol
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NCE	Nervio carotídeo externo del GCS
NCEx unil	Sección unilateral del nervio carotídeo externo del GCS
NCI	Nervio carotídeo interno del GCS
NE	Noradrenalina
NP	Nervio Pterigoideo Palatino
nm	Nanómetro
LCR	Líquido céfalo-raquídeo
PCA	Acido perclórico
SAM	5-adenosil-L-Metionina
SNC	Sistema Nervioso Central
TCC	Tronco carotídeo común
T ₃	L-3,5,3' triyodotironina
T ₄	Tiroxina o tetrayodotironina

Tris	Tris (hidroximetil)-amino metano
TSH	Tirotrofina
μg	microgramo
μm	micrometro
μl	microlitro
μU	microunidad

INDICE

I- INTRODUCCION

1. FENOMENOS NEUROENDOCRINOS.	
1.1- Conceptos Generales.	2
1.2- Mecanismos de Interacción Neuroendócrina	5
2. SISTEMA SIMPATICO CERVICAL.	
2.1- Sistema Nervioso Autónomo.	14
2.2- El Ganglio Cervical Superior (GCS): Anatomía.	15
2.3- Fisiología del GCS: Neurona Noradrenérgica.	18
2.4- Degeneración Anterógrada ó Walleriana.	23
3. EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-TIROIDEO.	
3.1- Concepto de Eje: Breve Reseña Histórica.	25
3.2- Eje Hipofiso-Tiroideo.	25
3.3- El Control Hipotalámico de la Hipófisis.	28
3.4- Efecto de la Temperatura sobre la Función Tiroidea.	31
4. VINCULO ENTRE EL GCS Y EL EJE HIPOFISO TIROIDEO.	
4.1- Catecolaminas y Glándula Tiroides.	32
4.2- Efecto de la Degeneración Walleriana sobre el eje Hipofiso-Tiroideo.	34
5. OBJETIVOS DE ESTA TESIS.	36

II- MATERIALES Y METODOS.

1. ANIMALES Y TEJIDOS.	38
2. PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS.	
2.1- Gangliectomía Cervical Superior (GCSx).	38
2.2- Descentralización Ganglionar (Dc).	39
2.3- Sección del Nervio Carotídeo Externo (NCEx).	39
2.4- Tiroidectomía.	39
2.5- Hipofisectomía.	40
2.6- Punción Yugular.	40

3. DETERMINACION DE HORMONAS.	
3.1- Determinación de los Niveles Séricos de TSH.	41
3.2- Determinación de los Niveles Séricos de Hormona Tiroidea (T ₄).	41
4. CAPTACION NEURONAL DE [³ H] NE.	41
5. DETERMINACION DE CATECOLAMINAS.	42
6. TECNICAS HISTOLOGICAS.	
6.1- Empleo de Colchicina.	43
6.2- Fijación e Inclusión en Parafina.	43
6.3- Coloración y Montaje.	44
6.4- Valoración de los Resultados.	45
7. ANALISIS ESTADISTICO.	45

III- RESULTADOS

1. EFECTOS DE GCSx bil. SOBRE EL EJE HIPOFISO TIROIDEO.	
1.1- Variación de TSH Sérica en los Animales GCSx entre 1-28 días Post Cirugía.	47
1.2- Variación de la T ₄ Sérica en los Animales GCSx entre 1-28 días Post Cirugía.	47
1.3- Cambios Ponderales en Animales GCSx bil. a los 28 días Transcurrida la Cirugía.	50
1.4- Cambios de la TSH Sérica Inducidos por Tiroidectomía Bilateral en Ratas GCSx bil.	50
2. CAMBIOS EN EL EJE HIPOFISO TIROIDEO DURANTE LA DEGENERACION ANTEROGRADA DE LOS TERMINALES POST GCSx.	
2.1- Modificación del Ritmo Diario de TSH.	53
2.2- Modificación del Ritmo Diario de T ₄ .	53
2.3- Ritmo Diario de Catecolaminas Intratiroideas.	56
2.4- Respuesta de TSH al TRH en Ratas durante la Degeneración anterógrada post GCSx bil.	56
2.5- Receptores Andrenérgicos involucrados en la Inhibición de TSH durante la Degeneración Anterógrada.	61

2.6- Receptores Adrenérgicos Involucrados en la inhibición de la Liberación de T ₄ durante la Degeneración Anterógrada.	61
3. EFECTOS DE GCSx bil. EN LA ADAPTACION DE LAS RATAS A AMBIENTES FRIOS.	65
4. ESTUDIOS SOBRE LOS CAMBIOS TARDIOS TIROIDEOS POST GCSx unil.	
4.1- Hipertrofia Compensadora en Ratas.	68
4.2- Hipertrofia Compensadora en Ratas Sometidas a GCSx unil del Lóbulo Remanente.	68
4.3- Cambios Hormonales durante la Hipertrofia Compensadora en Animales GCSx unil. y con Operación Simulada.	71
4.4- Hipertrofia Compensadora en Ratas Hipofisoprivas.	71
4.5- Hormonas Plasmáticas en la Hipertrofia Compensadora de Ratas Hipofisoprivas.	75
4.6- Efectos de GCSx unil. sobre la Hipertrofia Compensadora en Animales Hipofisectomizados.	75
4.7- Cambios Hormonales durante la Hipertrofia Compensadora de Animales Hipofisoprivos.	80
5. EFECTO DE LA GCSx SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS HEMITIROIDECTOMIZADAS.	83
6. ORIGEN DE LA INERVACION SIMPATICA TIROIDEA.	
6.1- Efecto de la Dc y la GCSx unil. sobre el contenido de Catecolaminas Intratiroideas.	87
6.2- Efecto de la Dc y la GCSx unil. sobre el contenido de Catecolaminas en la Glándula Pineal.	87
6.3- Captación Neuronal de [³ H] NE en Tiroides luego de GCSx unil. o Dc.	91
6.4- Efecto de NCEx unil. del GCS sobre la Captación [³ H] NE en Tiroides y Pineal.	91
6.5- Efecto de la NCEx unil. y la GCSx unil. en Animales Hipofisoprivos.	95

IV- <u>DISCUSION</u>	97
V- <u>CONSIDERACIONES FINALES</u>	112
VI- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	113

"Para la ciencia la vida no es un principio ni un fin, es una continuación y su objetivo es contribuir a mejorar los problemas que se susciten".

David Sers

I

INTRODUCCION

1- FENOMENOS NEUROENDOCRINOS

1.1- CONCEPTOS GENERALES

Los organismos pluricelulares están formados por distintas poblaciones celulares que constituyen tejidos y órganos responsables de ejecutar las diversas funciones metabólicas indispensables para la vida. Una adecuada coordinación de dichas funciones permitiendo que el organismo se comporte como un todo, requiere de mecanismos que faciliten una eficaz comunicación entre las células. Este fenómeno de comunicación intercelular está mediado por sustancias químicas portadoras de información, capaces de transferir sus mensajes según alguna de las modalidades enumeradas a continuación:

- Comunicación Endócrina: cuando el canal a través del cual se trasladan las moléculas mensajeras es la sangre, la linfa u otro líquido corporal a excepción del líquido intersticial.
- Comunicación Parácrina: Cuyo canal es el líquido intersticial; las moléculas mensajeras no ingresan a la circulación general y la comunicación se establece entre células adyacentes.
- Comunicación Neural: El canal de comunicación se encuentra limitado a formaciones anatómicas especiales denominadas sinapsis.
- Comunicación Intercelular: Se lleva a cabo en las llamadas "uniones estrechas" o "gap Junctions" que son aposiciones de membranas celulares atravesadas por poros de 2 nm. de diámetro.

Durante bastante tiempo se consideró que la comunicación endócrina y la neural eran entidades separadas, cuya diferencia radicaba en el nivel de relación que establece cada una de ellas (más directo en la neural, menos directo en la endócrina), además de expresarse por mensajeros específicos y diferentes entre sí.

La comunicación neural se establece en sitios anatómicos particulares: las sinapsis. Las moléculas mensajeras (neurotransmisores), liberadas en la biofase sináptica, se unen con receptores post-sinápticos sobre la superficie de la célula efectora, provocando cambios químicos que generan cambios de potencial eléctrico en la membrana. Receptores presinápticos, por su parte, modulan la cantidad de neurotransmisor liberado.

La comunicación endócrina se definió como "menos directa o a distancia", mediada por mensajeros químicos específicos diferentes de los neurotransmisores que, vertidos en el torrente sanguíneo, se ponen en contacto con células efectoras provistas de receptores capaces de reconocer exclusivamente a dichas sustancias, a las que se denominan hormonas. De este modo los receptores secuestran moléculas hormonales incorporándolas a la propia célula.

Pero esta aparente diferencia entre ambos sistemas de comunicación intercelular no es tal, esfumándose la antigua delimitación antes propuesta. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que muchas moléculas mensajeras similares son empleadas por ambos sistemas, tal como ocurre con las hormonas secretadas tanto por células endócrinas como neurales en el hipotálamo (1). Un mismo mensajero químico puede actuar como neurotransmisor en células de comunicación neural y como hormona para la comunicación endócrina ej: la NE (2) o las hormonas gastrointestinales gastrina y colescistoquinina (3). Las complejas relaciones entre los distintos grupos celulares de los islotes de Langerhans pancreáticos (4) (5) (6), son un buen ejemplo donde sustancias secretadas, tanto por neuronas como por células endócrinas, actúan como intermediarias en la comunicación parácrina. Asimismo en ambos sistemas: endócrino y neural, las señales constituidas por neurotransmisores y hormonas actúan sobre células efectoras provistas de receptores específicos e inducen una serie de eventos intracelulares que desencadenan una modificación en el estado funcional de las mismas (7-9). Estas consideraciones hacen que, hoy en día, se hable de un sistema integrado de información o neuroendócrino, comprendiendo tanto a las señales hormonales como a las neurales.

Tal vez la diferencia que se puede establecer entre el proceso de información neural y el hormonal esté centrado en la manera como el mensaje adquiere "privacidad", término que alude a la forma de establecer la relación con los tejidos efectores. El sistema nervioso adquiere su "privacidad" a través de la estructura anatómica y bioquímica particular de la sinapsis. Es en estas conexiones puntiformes, donde los neurotransmisores portadores del mensaje se liberan en cantidades pequeñas y discontinuas, actuando sólo en su inmediata vecindad (10) (11). La comunicación endócrina, por su parte, adquiere privacidad gracias a receptores específicos en las poblaciones celulares efectoras, sobre las cuales actúa la hormona mensajera (12) (13) (14).

En la sinapsis (12) las zonas de contacto están determinadas por una expansión de la región presináptica conocida como botón terminal o axonal,

en cuya estructura interna se encuentran alojadas vesículas sinápticas, que acumulan las sustancias neurotransmisoras. Al llegar un impulso nervioso hasta el terminal, luego de su tránsito por el axón, varias vesículas descargan su contenido en el espacio intercelular o hendidura sináptica, que lo separa de la estructura post-sináptica efectora. El neurotransmisor entra así en contacto con receptores específicos en la membrana post-sináptica de la célula contigua, alterando su actividad. Aunque existe gran variedad de neurotransmisores, de diferente naturaleza química, sólo pueden evocar en la célula postsináptica 2 tipos de respuesta:

- a) Despolarización con o sin inducción del potencial de acción
- b) Hiperpolarización por aumento del potencial de membrana, con los consiguientes cambios en la excitabilidad neural.

Las sustancias que se desempeñan como neurotransmisores pueden ser ordenadas en 3 grandes grupos químicos:

- Aminas biógenas: como NE, DA, serotonina, etc.
- Aminoácidos: glutamato, glicina, GABA, etc.
- Péptidos: Gastrina, angiotensina II, sustancia P, etc.

Mientras que las aminas biógenas se sintetizan en las terminales nerviosas a partir de aminoácidos precursores (15) (en el capítulo siguiente se detallan las síntesis de NE). los péptidos son sintetizados en el cuerpo neural desde donde, incluidos dentro de vesículas, son transportados al terminal sináptico (transporte axoplásmico). En muchos casos existe un procesamiento del péptido durante el transporte (16).

Las acciones post sinápticas de los neurotransmisores, pueden reunirse en dos categorías: ionotrópicas o metabotrópicas. La acción ionotrópica resulta la más clásica, implicando la apertura o cierre de canales iónicos en la membrana post sináptica, asociados con algún receptor. El efecto post-sináptico se debe inicialmente a cambios en la difusión pasiva de distintas iones a través de sus respectivos poros. El tipo de ión y la dirección de su movimiento (hacia o fuera de la célula), generan un potencial eléctrico que puede ser excitatorio o inhibitorio. Citaremos dos ejemplos de respuesta excitatoria o inhibitoria.

La acetilcolina es un neurotransmisor ionotrópico típico, que ejerce una acción excitatoria en el sistema nervioso central y el periférico cuando

actúa sobre un receptor nicotínico constitutivo del poro de sodio (17). Un neurotransmisor inhibitorio ionotrópico, tal vez el inhibidor por excelencia en el sistema nervioso central, es el GABA que actúa con un receptor vinculado al poro de cloro (18 (19)).

Sin embargo la mayor parte de los neurotransmisores, inclusive la acetilcolina sobre los receptores de tipo muscarínico, actúan por el mecanismo de neurotransmisión metabotrópica. En este caso en lugar de una modificación directa de la permeabilidad membranal, el receptor metabotrópico al ser activado, pone en acción a segundos mensajeros intracelulares. Estos mensajeros desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas que llevan finalmente a la fosforilación de proteínas de membrana, relacionadas con la regulación de la permeabilidad a distintos iones. Se han identificado una gran variedad de segundos mensajeros: AMPc, Ca^{++} , GMPc, fosfolípidos, etc. (8) (9) (21-22).

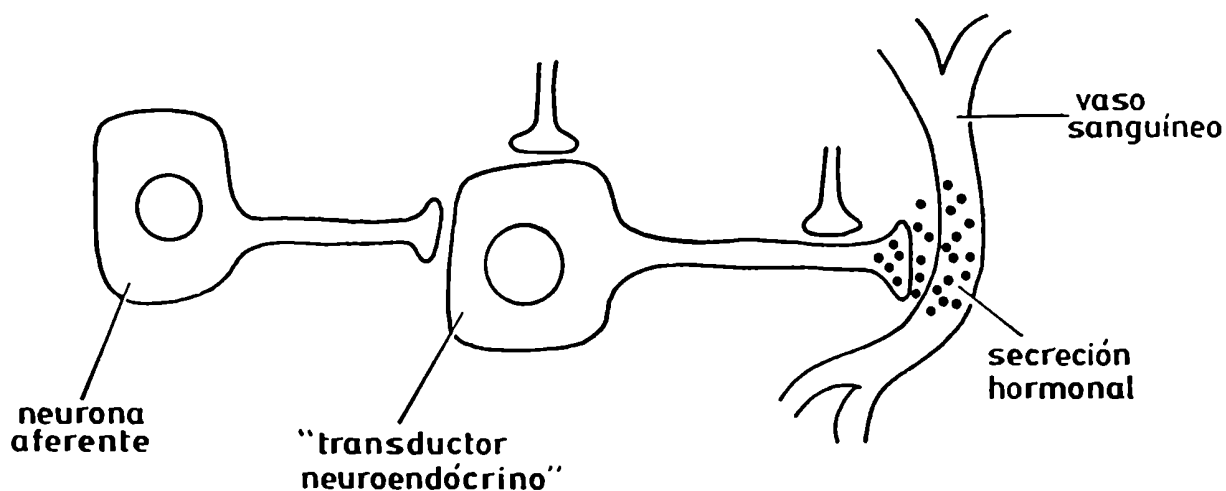
Otra diferencia entre los dos tipos de transmisión radica en la velocidad de la conducción del mensaje. La transmisión ionotrópica es veloz, produciéndose entre los 0,2 y 0,5 mseg., mientras que todos los eventos desencadenados por la activación de segundos mensajeros hacen a la transmisión metabotrópica más lenta.

1.2- MECANISMOS DE INTERACCION NEUROENDOCRINA

Toda interacción, tanto de un neurotransmisor como de una hormona, con sus respectivos receptores consiste siempre en un proceso de transferencia de información. Como hemos visto, el mensaje puede viajar por distintos canales o vías de comunicación, pero la transferencia de éste puede clasificarse en dos tipos:

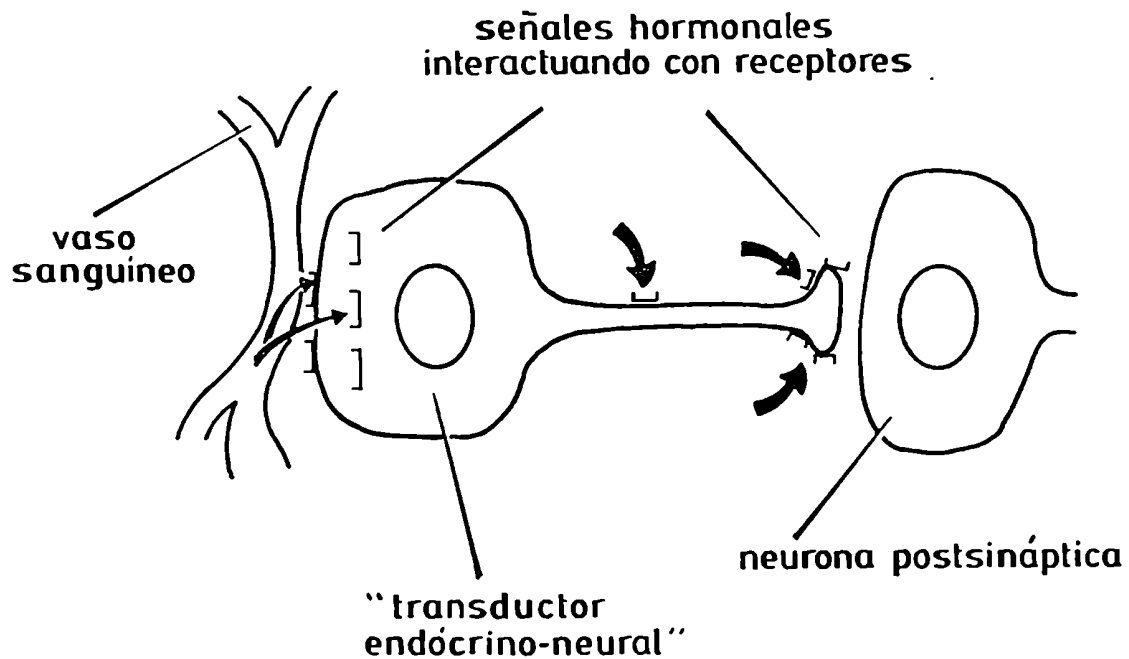
- a) Transducción: nos referimos con este término al fenómeno de información primaria que involucra la descodificación del mensaje y su recodificación posterior.
- b) Modulación: Es la acción ejercida sobre una respuesta primaria sin modificar el sentido de la misma, pero produciendo una alteración en la amplitud, forma o intensidad de dicha respuesta. La modulación incluye múltiples factores que, si bien no pueden inducir la respuesta primaria, pueden alterar varios aspectos de la misma. Tres tipos de transducción tienen lugar en una determinada estructura neuroendócrina (23) (24):

Figura N° 1: ESQUEMA DE TRANSDUCCION NEUROENDOCRINA



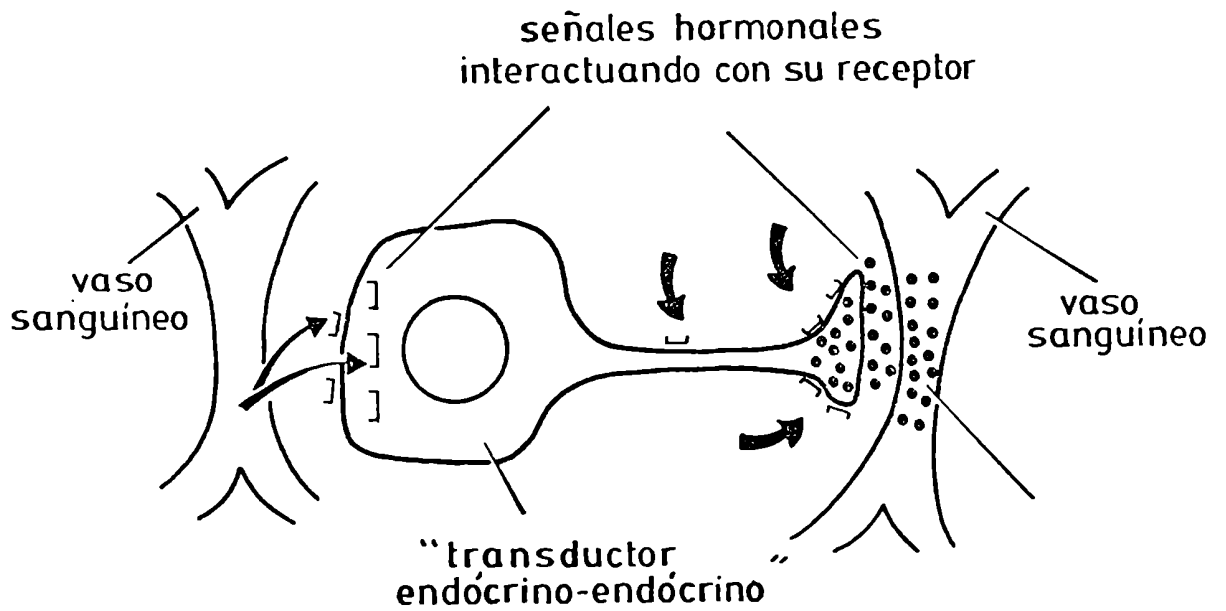
Las células neuroendócrinas son las transductoras. La señal de entrada llega a través de conexiones sinápticas desde neuronas aferentes. Esta información provoca cambios en la célula transductora que responde liberando hormonas a la circulación general.

Figura N° 2: ESQUEMA DE TRANSDUCCION ENDOCRINO-NEURAL



Las neuronas endocrinoneurales son los transductores. La entrada o señal hormonal llega por la circulación sanguínea o bien desde el líquido cefalorraquídeo (LCR). Esta información provoca cambios en la neurona transductora que se expresan como alteraciones en su actividad eléctrica normal. La señal ahora generada es transmitida a la neurona postsináptica.

Figura N°3: ESQUEMA DE TRANSDUCCION ENDOCRINO-ENDOCRINA

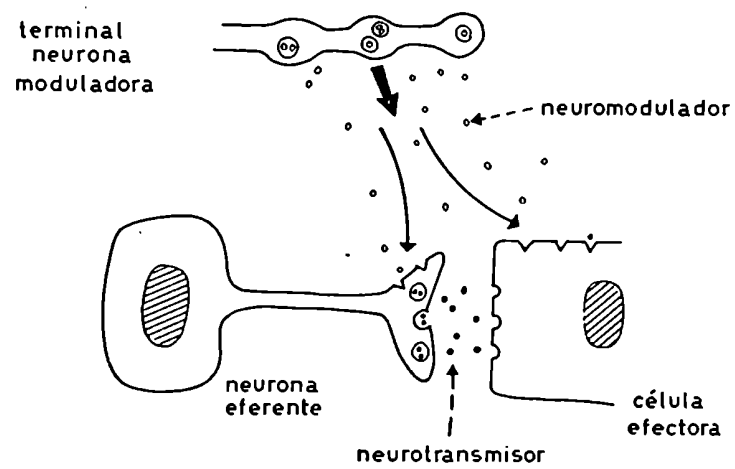


Las células endócrinas son transductores endócrino-endócrinos. La señal hormonal llega a la célula vía circulación sanguínea, siendo reconocida por receptores específicos. La células endócrina transductora transforma la señal de entrada en una señal de salida también hormonal que se libera a la circulación.

- Transducción neuroendócrina: (Fig. 1) el mensaje neural es descodificado al llegar a una célula endócrina donde se recodifica en un mensaje hormonal que se libera al espacio extracelular.
- Transducción endocrinoneural: (Fig. 2) es precisamente el proceso inverso al anterior, hay cambios en la liberación del neurotransmisor, como consecuencia de una acción hormonal.
- Transducción endócrino-endócrina: (Fig. 3) constituye la clásica transducción estudiada por la endocrinología donde la interacción se produce entre las distintas glándulas endócrinas. Así como ejemplo pertinente a esta tesis, la información contenida en la tirotrófina es conducida por la sangre a la glándula tiroides donde se descodifica y recodifica como hormona tiroidea.

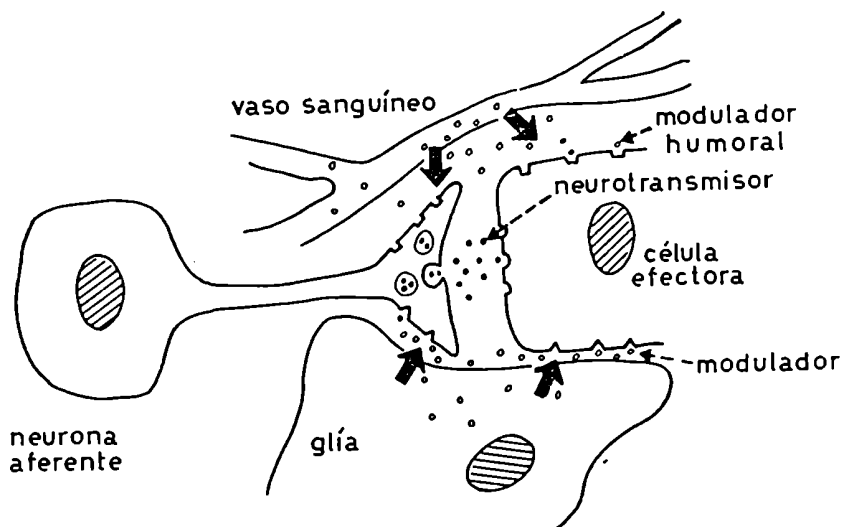
La modulación comprende gran número de efectos de las distintas hormonas o neurotransmisores en el Sistema Nervioso o en el propio sistema endócrino. Estos efectos, sin generar la acción primaria, pueden afectar la excitabilidad y el tenor de la respuesta en las distintas vías neurosecretorias, existiendo bastante información de alteración en la actividad neural por acción hormonal (25) (26) (27). La idea central sobre la que se desarrollará esta tesis es el estudio de la acción moduladora neural sobre la actividad funcional del eje hipófiso-tiroideo. Las Fig. (4-7) muestran las distintas formas de modulación conocidas en el sistema neuroendócrino; como veremos nuestros resultados se encuadran principalmente en la modulación neurohormonal (fig. 6)

Figura N° 4: MODULACION INTERNEURONAL



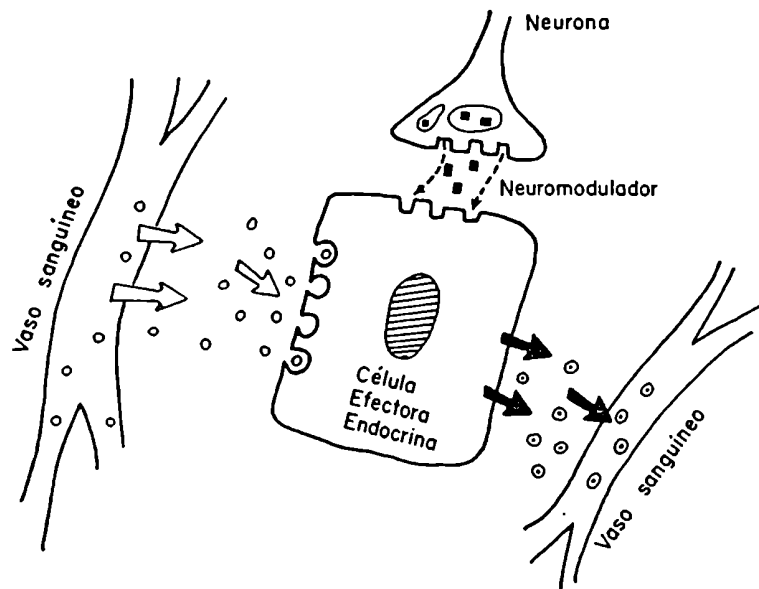
El modulador de origen neural (neuromodulador) interacciona con receptores pre y/o postsinápticos; modificando la liberación del neurotransmisor y/o la respuesta de la célula efectora al propio neurotransmisor.

Figura N° 5: MODULACION HUMORAL



El modulador de origen humoral (circulación sanguínea, secreciones de células gliales, etc) interacciona con receptores pre y/o postsinápticos; modificando la liberación del neurotransmisor y/o la respuesta de la célula efectora al propio neurotransmisor.

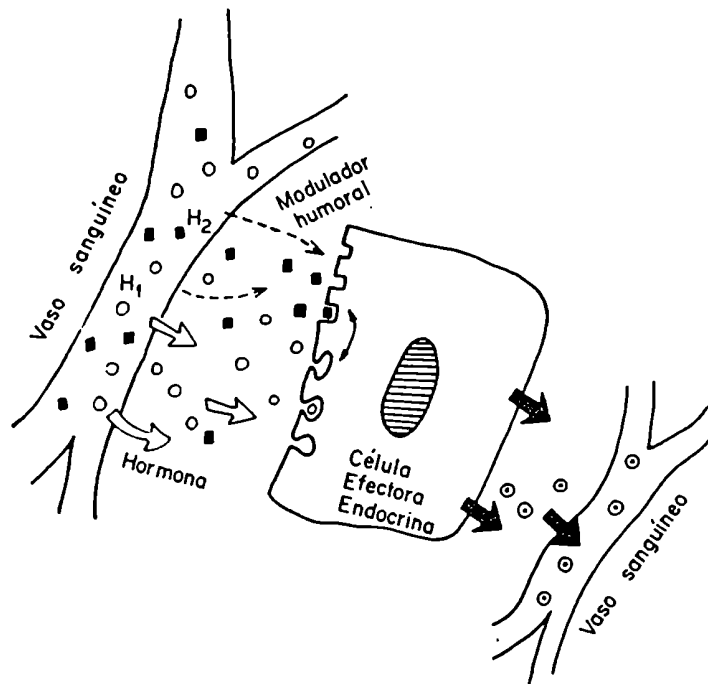
Figura N° 6: MODULACION NEURO HORMONAL



El modulador de origen neural (neuromodulador) interacciona con receptores postsinápticos en la célula efectora endócrina, modificando la liberación hormonal inducida por la correspondiente hormona trófica.

Este tipo de modulación estudiaremos en nuestra Tesis.

Figura N° 7: MODULACION HETERO HORMONAL.



El modulador de origen humoral (H_2) interacciona con receptores en la célula efectora endócrina; modificando la liberación hormonal de dicha célula (H) inducida por la correspondiente hormona trófica (H_1).

2- SISTEMA SIMPATICO CERVICAL

2.1- SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO

El sistema nervioso autónomo se puede definir como aquél cuya fibras nerviosas motoras eferentes proporcionan inervación al músculo liso, las vísceras, los vasos sanguíneos y a las glándulas endócrinas. Un análisis anatómico de la vía nerviosa eferente indica que se trata de una cadena bineuronal. La primera neurona o preganglionar se encuentra localizada en núcleos específicos del cerebro o en la columna intermedio lateral de la médula espinal, mientras que la segunda o postganglionar se aloja en ganglios fuera de las estructuras nerviosas centrales. La distinción entre sistema nervioso simpático y parasimpático depende de la localización, organización y neurotransmisores de las vías características de cada uno de ellos (28).

Así, para el sistema simpático las neuronas preganglionares se encuentran ubicadas en los niveles torácico y lumbar alto de la columna intermedio lateral de la médula espinal, de allí que también se lo denomine sistema toracolumbar, y envía sus axones a ganglios de ubicación para y prevertebral. El neurotransmisor característico de la neurona simpática es norepinefrina (NE). Por su parte, las neuronas preganglionares del sistema parasimpático se alojan en ciertos núcleos de los pares craneales y en la médula espinal a la altura de la región sacra, por lo que se la denomina sistema cráneo-sacro. Los ganglios parasimpáticos se encuentran alejados de la columna vertebral e incluidos en la cápsula de los órganos efectores, siendo el neurotransmisor característico de la neurona postganglionar la acetilcolina.

La actividad autonómica es controlada o regulada por varias estructuras que se sitúan a distintos niveles, en el sistema nervioso central. Este control se inicia en los hemisferios cerebrales donde ciertas partes de la corteza cerebral, especialmente la corteza frontal, algunos ganglios basales, la amígdala y sistema límbico regulan la función autonómica (29) enviando proyecciones nerviosas a regiones ubicadas más abajo, particularmente al hipotálamo y centros del tallo cerebral. El hipotálamo es el centro integrador fundamental de la actividad autonómica, desde el que parten vías descendentes multisinápticas, llegando a grupos celulares del tallo cerebral y la médula espinal, que dan origen a las conexiones preganglionares de los sistemas simpático y parasimpático.

Tal como se destacó tiempo atrás (30) (31) (32), el sistema nervioso

autónomo es importante en el control y modulación del medio interno, contribuyendo a mantener la homeostasis del organismo.

2.2- EL GANGLIO CERVICAL SUPERIOR (GCS): ANATOMIA

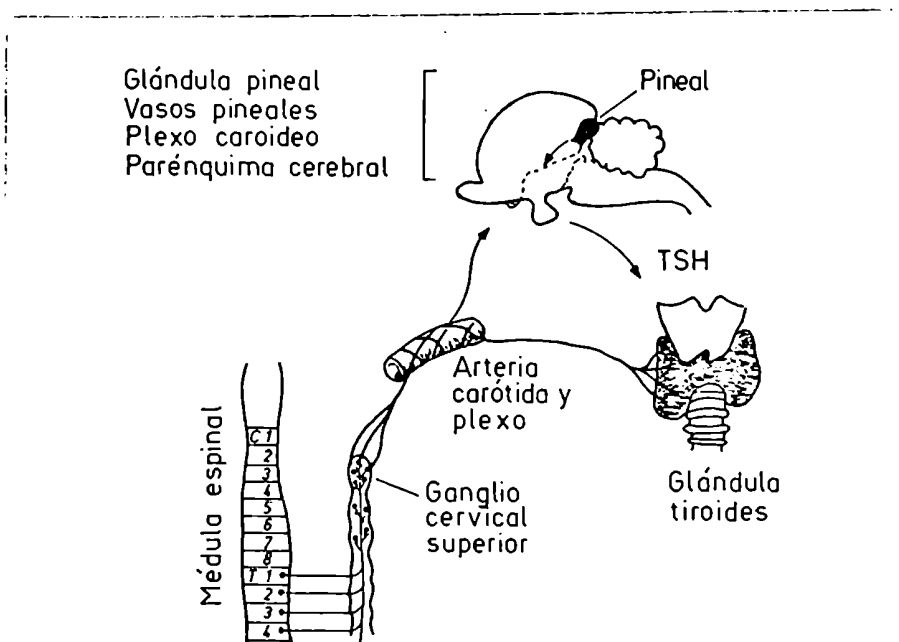
El ganglio cervical superior (GCS) es el primer ganglio de la cadena simpática paravertebral. El territorio comprendido en su área de inervación es amplio, abarcando estructuras del cuello, cara e interior del cráneo (33). De este modo estructuras relacionadas directa o indirectamente con el sistema endócrino como: la glándula pineal, arterias piales e intracerebrales, el plexo coroideo, el iris, los cuerpos carotídeos, las glándulas salivales, la tiroides y la paratiroides, reciben información adrenérgica provista por axones que se proyectan desde el GCS (Fig. 8).

Debido a su ubicación, tamaño relativo y fácil acceso, ha sido ampliamente utilizado para el estudio de fenómenos electrofisiológicos y bioquímicos de la neurotransmisión (34) considerándose, desde tiempo atrás, como "un cerebro en miniatura" (35).

En la rata el GCS, con un peso de 1 mg., está formado por unos 40.000 cuerpos neuronales postganglionares y 400 células SIF ("small, intensely fluorescent") de tipo dopaminérgico (36). Todas sus células derivan embriológicamente de la cresta neural (37). Anatómicamente es posible delimitar las células postganglionares en dos grupos bastante definidos por su ubicación y vías particulares de proyección axonal. Por un lado tenemos los cuerpos neuronales alojados en la porción caudal del ganglio, cuyos axones se proyectan, principalmente a través del nervio carotídeo externo (NCE), vía nerviosa que nace en la porción media rostral de la estructura ganglionar. Existen también cuerpos neuronales asentados en la porción rostral, cuyos axones eferentes viajan, vía del nervio carotídeo interno (NCI) del GCS (38) (39) (Fig. 9). El número de neuronas proyectándose por cada una de estas vías nerviosas es similar; se ha descrito (40) que aproximadamente unos 250 cuerpos ganglionares alojados en la porción rostral del GCS y cuyos axones se proyectan por el NCI son responsables de la inervación pineal. Esta descripción anatómica servirá, como veremos, en la discusión de control para algunos experimentos.

Aparte de los dos grandes nervios NCE y NCI, existen en el GCS dos eferencias menores. Un 15% de las neuronas ubicadas caudalmente envían sus axo-

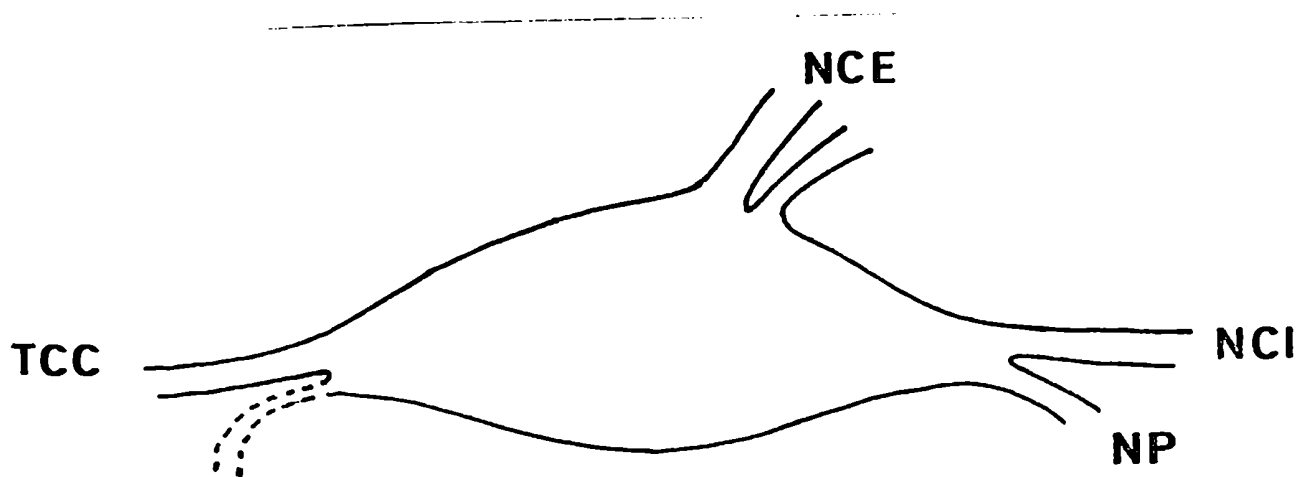
Figura N° 8: PROYECCIONES DEL GCS.



Fibras adrenérgicas provenientes del GCS proveen inervación simpática a las estructuras representadas en el esquema y a otras (gl. salivales, membrana nictitante, hipotálamo medio basal, etc) no ilustradas.

Para mayores detalles ver cita (33).

Figura N° 9: ESQUEMA DEL GCS DE LA RATA



Aferencias y eferencias del GCS:

Tronco cervical común (TCC); nervio carotídeo externo (NCE); nervio carotídeo interno (NCI); nervio pterigóideo-palatino (NP).

nes por una pequeña vía descendente que corre paralela al tronco cervical común (TCC), puente de conexión entre el GCS y el Ganglio cervical medio (GCM). Hasta el presente se ignora el destino final de esta vía, también identificada en el gato (41) (42). La otra de las eferencias menores está constituida por el pequeño nervio pterigóideo palatino, que nace en la porción rostral del ganglio, cerca del NCI.

Histológicamente se han descrito en el ganglio simpático cuatro tipos celulares (43) (44) (45) que contribuyen, en diferente forma, a los requerimientos metabólicos del mismo (46):

- a) Vainas conectivas que representan al 30% del peso seco.
- b) Células ganglionares, principalmente adrenérgicas, con distintas poblaciones de péptidos coexistiendo en las terminales (47).
- c) Células gliales.
- d) Células cromafines o SIF dopaminérgicas.

Las SIF se encuentran a su vez subdivididas en dos poblaciones. SIF I son células aisladas sobre las que hacen sinapsis axones amielínicos y que a su vez conectan, por expansiones membranales, con otras células membranales (48) (49). La SIF II se agrupan densamente alrededor de los capilares fenestrados, lo que les permite estar en estrecho contacto con la circulación sanguínea y las sustancias por ella transportadas. (Fig. 10).

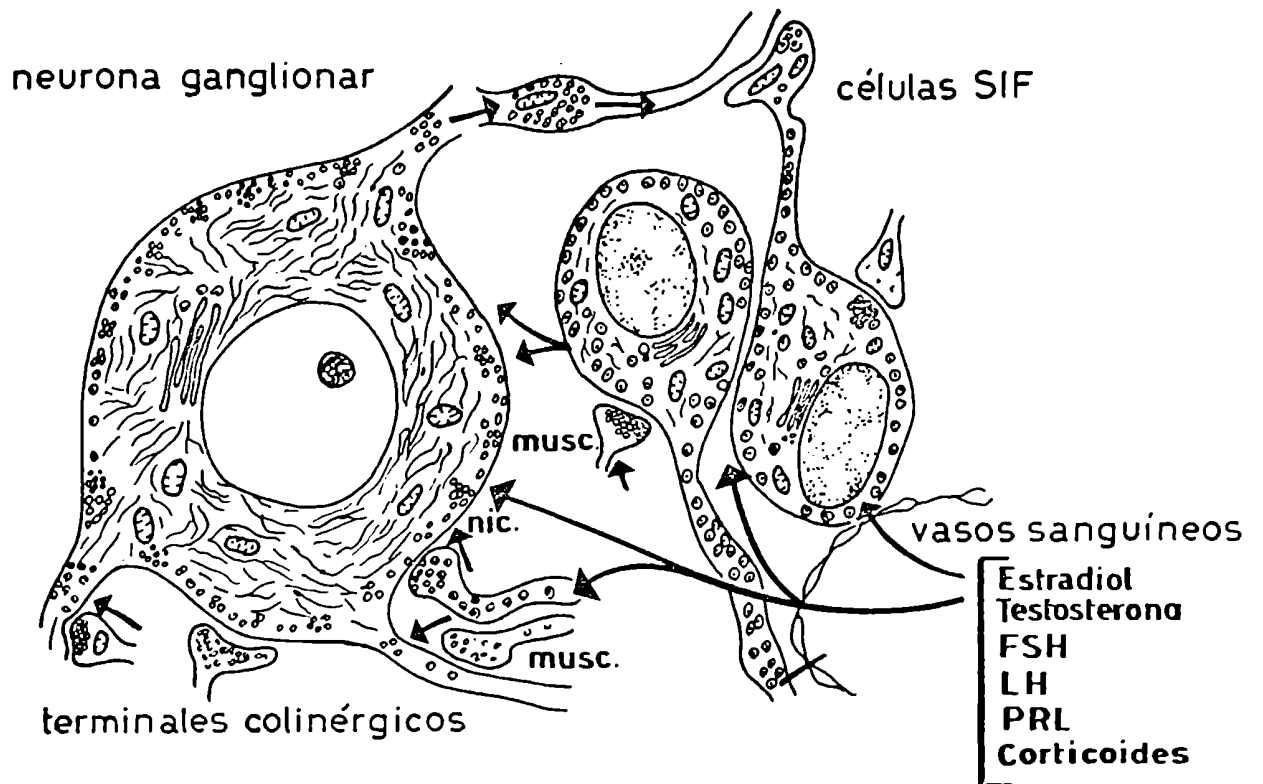
Existen complicadas interacciones entre las distintas células, desechándose así la antigua idea del ganglio sólo como una estación de relevo para los impulsos nerviosos provenientes de fibras preganglionares. Tanto neurotransmisores (50) (51) como varias hormonas (50-56), pueden afectar la función ganglionar provocando efectos inhibitorios o excitatorios sobre la neurotransmisión.

2.3.- FISIOLOGIA DEL GCS: NEURONA NORADRENERGICA

En la integración y/o modulación de la transmisión nerviosa ganglionar están involucrados tres sistemas; por otra parte, debido a las complejas interrelaciones entre los distintos tipos celulares, se considera el ganglio cervical superior como un centro neuroendócrino periférico (57).

El primero de estos sistemas abarca los mecanismos intrasinápticos mediados por receptores pre y post sinápticos, donde las neuronas colinérgicas preganglionares provenientes la raíz ventral de la médula penetran en el gan-

Figura N° 10: DISTINTOS TIPOS CELULARES CONTENIDOS EN EL GCS.



Distintas sustancias llevadas hasta el ganglio por la circulación sanguínea ejercen sus efectos sobre las diferentes poblaciones celulares, alterando su funcionamiento.

glio, haciendo sinapsis con las neuronas postganglionares adrenérgicas. Estas últimas proyectan sus axones por las distintas eferencias del ganglio, suministrando inervación simpática a los tejidos efectores. El segundo mecanismo comprende las relaciones intersinápticas donde participan las células SIF. Por último, tenemos el mecanismo que involucra el efecto modulador ejercido por sustancias hormonales que, pudiendo estar presentes en el ganglio o aportadas por la sangre a través de los capilares fenestrados, modifican la transmisión neural actuando sobre mecanismos pre y post sinápticos.

En esta tesis nos limitaremos a tratar los aspectos eferentes del primer mecanismo y en particular los eventos postsinápticos que acompañan a la destrucción de la neurona ganglionar. La ablación del ganglio (GCSx) provoca una serie de alteraciones funcionales en las estructuras comprendidas en su área de influencia (57).

En una primera instancia nos referiremos brevemente a las etapas bioquímicas involucradas en la neurotransmisión de las fibras postganglionares. Las enzimas responsables de la biosíntesis de NE son sintetizadas en el cuerpo de la neurona ganglionar simpática y transportadas a lo largo del axón hacia los botones terminales distales, por un proceso conocido como transporte axoplásmico (58). Durante el transporte los microtúbulos actuarán como vías, permitiendo la migración y distribución de los distintos componentes celulares. El transporte axoplásmico es bloqueado (59) por drogas como la colchicina o la vinblastina, que interfieren en la integridad funcional de los microtúbulos. Particularmente, el alcaloide colchicina se une irreversiblemente a la tubulina (proteína constituyente de los microtúbulos), evitando su polimerización (60) (61).

El aminoácido precursor de la NE es la tirosina, captada desde el torrente sanguíneo por los terminales catecolaminérgicos y en el primer paso de la vía biosintética, es hidroxilada por la tirosina hidroxilasa transformándola en dihidroxifenil alanina (DOPA). La enzima requiere para su activación O_2 y Fe^{++} , además del cofactor tetrahidropteridina (62) y resulta ser el paso limitante en la síntesis de catecolaminas (63), sujeto a retroalimentación negativa ejercida por el producto final, NE y algunos de sus metabolitos. En un segundo paso la DOPA es descarboxilada por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos L, que requiere como cofactor Fosfato de Piridoxal, formándose la Dopamina que es captada en los gránulos o vesículas de almacenamiento de unos 50 nm de diámetro. Cada terminal contiene entre 500 y 2000 de estas vesículas, donde la Dopamina es convertida en NE por acción de la Do-

pamina β hidroxilasa, enzima que requiere ácido ascórbico y Cu^{++} como cofactores (Fig. 11). Tras su síntesis la NE se mantiene unida y almacenada en vesículas donde forma un complejo estable con el ATP y una proteína específica, la cromogranina.

Cuando un impulso nervioso se difunde por el axón, arribando finalmente al terminal, provoca la liberación de las aminas almacenadas. La despolarización del terminal produce un incremento en la permeabilidad a los iones, particularmente el Ca^{++} , cuyo aumento intracelular es el responsable de la iniciación de los acontecimientos conducentes a la liberación de las catecolaminas hacia la brecha sináptica (64-66). La liberación de las catecolaminas, desde los terminales, es un proceso exocitótico bloqueable por agentes antimitóticos, lo que indica la participación de los microtúbulos (67). Además del mecanismo de síntesis, otro aspecto importante lo constituye la recaptación neuronal. Este es un proceso de transporte activo hacia el interior celular de la NE liberada al líquido extracelular, que realizan los terminales presinápticos (69)(70). La recaptación puede ser bloqueada por fármacos selectivos, como la cocaína (71) o los antidepresivos tricíclicos.

Finalmente los procesos de inactivación de la NE pueden darse por dos vías:

- a) La degradación enzimática mediante la desaminación oxidativa por la monoaminooxidasa (MAO) (72) (73).
- b) Metilación de NE por la catecol-o-metiltransferasa (COMT) (74) (Fig. 11).

La primera vía degradativa ocurre en las mitocondrias. La COMT se encuentra en la fracción citoplasmática soluble no necesariamente asociada a los nervios noradrenérgicos.

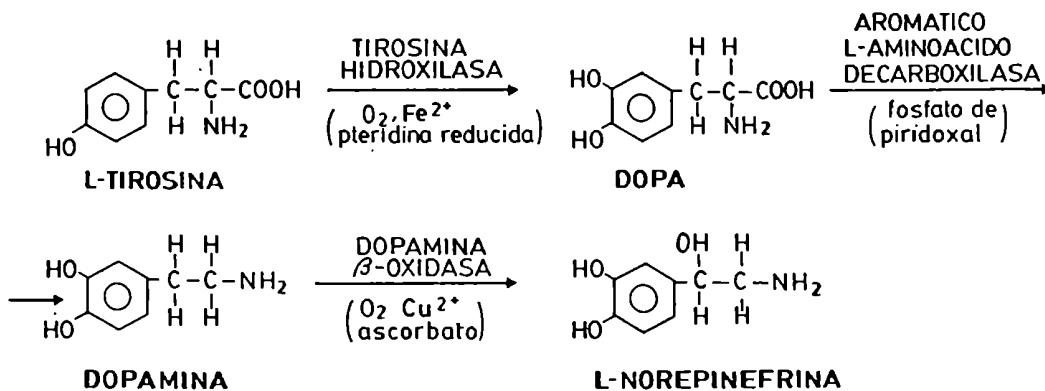
Las catecolaminas provocan una gran variedad de respuestas fisiológicas y metabólicas sobre los diversos tejidos efectores, acción mediada por receptores principalmente post-sinápticos. La determinación de los distintos receptores (75), surgió de estudios farmacológicos donde se observaban los efectos potenciadores en la respuesta producidos por las diferentes catecolaminas ensayadas.

Se definió como receptor α aquél sobre el cual la potencia de la respuesta y la afinidad venía determinada por el siguiente orden decreciente:

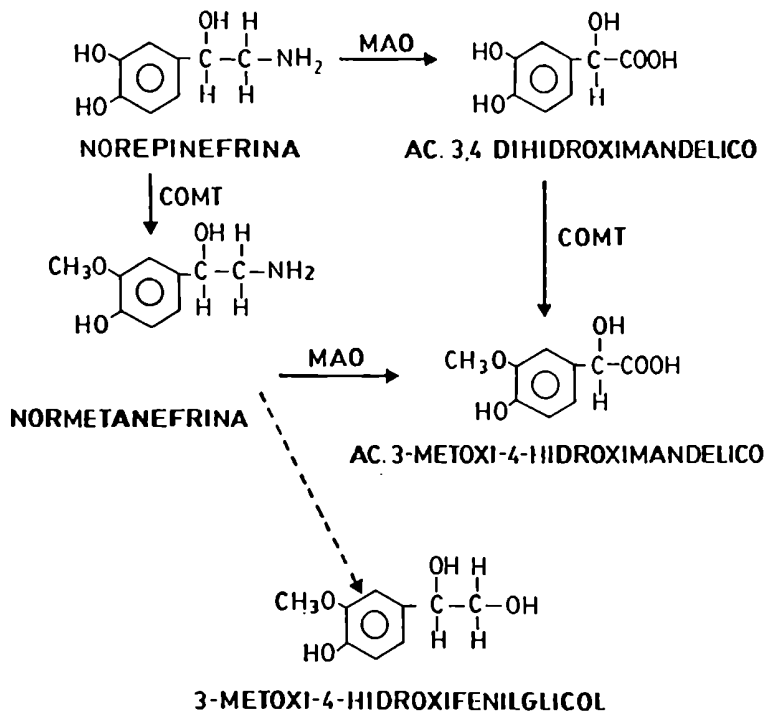
$\text{NE} \gg \text{E} \gg \text{ISO}$. Para los receptores β la potencia de los efectos resultaba inversa $\text{ISO} \gg \text{E} > \text{NE}$. El empleo de distintas drogas agonistas y antagonistas de acción selectiva sobre los adrenorreceptores, posibilitó una nueva subcla-

FIGURA N° 11: BIOSINTESIS Y METABOLISMO DE LA NE.

BIOSINTESIS DE NOREPINEFRINA



METABOLISMO DE NOREPINEFRINA



sificación de los mismos (76-78). Los receptores α_1 se encuentran principalmente distribuidos en la musculatura lisa y median efectos excitatorios. Los receptores α_2 se los describió inicialmente como presinápticos que mediaban respuestas inhibitorias, pero también se los ha encontrado postsinápticamente en varios tejidos (79). Existe también una subclasificación de receptores β en: β_1 y β_2 (80) (81).

2.4- DEGENERACION ANTEROGRADA O WALLERIANA

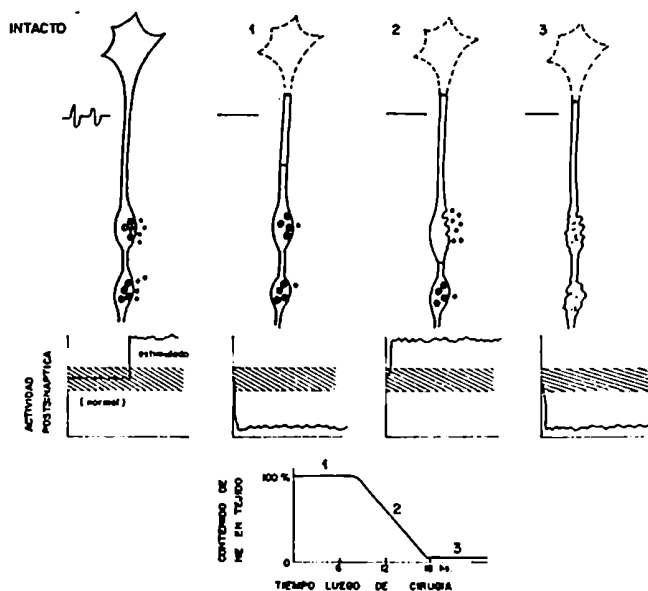
La sección de un nervio provoca fenómenos reactivos en la neurona a ambos lados del sitio lesionado o zona de trauma. Las alteraciones producidas en el segmento distal del axón y sus envolturas, fueron descritas en 1875 por A. Waller (82), de allí que en su honor se denomine al fenómeno como degeneración walleriana. El segmento distal, tras un lapso de pocas horas durante las que su excitabilidad esta aumentada, pierde sus propiedades fisiológicas y comienza a retraerse. La degeneración se inicia en este momento aunque, sin embargo, el proceso degenerativo completo transcurre en un lapso de 1-2 meses. Durante ese tiempo el axón y sus vainas mielínicas se fragmentan y son fagocitadas por macrófagos mesenquimáticos o células gliales. Datos obtenidos de experimentos en membrana nictitante, glándulas salivales, músculos periorbitales (83-86) y más recientemente en tiroides, (87) indican que

8 horas después de la gangliectomía del GCS comienza a registrarse, en esas estructuras, una caída en el contenido de NE, haciéndose mínimo transcurridas 18 horas de la operación (Fig. 12). Esta disminución progresiva del contenido de NE, se acompaña de una hiperactividad adrenérgica postsináptica; pues durante la degeneración se produce la descarga supraliminal de los neurotransmisores contenidos en las varicosidades sinápticas. La NE liberada supraliminalmente actúa sobre los receptores postsinápticos de las células efectoras, siendo capaz de imitar la activación normal del nervio (84).

De este modo el fenómeno de degeneración walleriana, en su etapa inicial, se convierte en un modelo adecuado para intentar dilucidar cual es el significado fisiológico regulatorio de la inervación simpática sobre los distintos órganos bajo su influencia.

En esta Tesis utilizaremos la degeneración walleriana para estudiar de qué modo influye la inervación simpática sobre el eje hipófiso-tiroideo en distintas situaciones experimentales.

Figura N° 12: ACTIVIDAD POSTSINAPTICA DURANTE LAS FASES INICIALES DE LA DEGENERACION WALLERIANA EN LA NEURONA SIMPATICA.



Tras la lesión (sección de un axon o de un cuerpo neural) se observa una caída en la actividad neuronal y ninguna variación en el contenido intratisular de catecolaminas (1), situación que se prolonga por unas 8 hs. Luego hay un incremento de la actividad neuronal que se acompaña de una caída en el contenido de catecolaminas intratisulares (2), precisamente este es el período donde se produce la descarga supraliminal de neurotransmisores.

Por último entre las 18-24 hs. postcirugía (3), la actividad neural ha cesado y el contenido de catecolaminas desciende a sus valores mínimos; la degeneración se ha completado y el fenómeno es ahora irreversible. Estos tiempos son variables, dependiendo del tejido; en ciertos casos la actividad de degeneración puede extenderse por 36-48 hs.

3- EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-TIROIDEO

3.1- CONCEPTO DE EJE: BREVE RESEÑA HISTORICA

Los primeros indicios acerca del control hipofisiario sobre la glándula tiroidea surgen en el siglo pasado de las observaciones realizadas durante la autopsia de cretinos (88), individuos en los que se describe un aumento considerable del volumen hipofisiario; similares observaciones (89) tienen lugar sobre la hipófisis de conejos previamente tiroidectomizados. Pero son principalmente los trabajos de Smith entre 1916-1922 (90) (91), los que sientan las bases del concepto de eje hipofiso-tiroideo al demostrar que la hipofisectomía en los renacuajos, provocaba atrofia tiroidea e inhibición de la metamorfosis. La inyección de extractos hipofisarios no sólo era capaz de revertir la atrofia, sino que incluso inducía hipertrofia tiroidea.

En 1923 Dott experimentando con perros, supone la existencia de una relación entre las tiroideas y la hipófisis. Hacia 1930 se establece que una sustancia hipofisaria denominada "tirotrófica" estimula la tiroidea (92) y años después se sostiene que las hormonas tiroideas ejercen un mecanismo de retroalimentación negativa sobre dicha sustancia, inhibiendo su secreción (93) (94). Una ampliación del concepto de eje hasta entonces sostenido, surge en 1935 con la postulación de la hipótesis neurovascular (95), incorporando al hipotálamo como un centro neurosecretor. El descubrimiento de los factores liberadores e inhibidores de la secreción hipofisaria, realizado en los últimos 20 años, ha permitido comprender varios aspectos de la regulación del eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo (96) (97).

3.2- EJE HIPOFISO-TIROIDEO

La secreción y trofismo tiroideo son controlados por la TSH, hormona sintetizada por las células tirotróficas (98) que se localizan predominantemente en la región anteromedial de la adenohipofisis (99).

La TSH es una glicoproteína de 28.000 daltons de peso molecular, constituida por dos subunidades (100) α y β , cada una por sí misma carente de actividad biológica (101) (102). Es la subunidad β (110 aminoácidos, 15.600 PM) la que caracteriza a la TSH, confiriéndole especificidad biológica e inmunológica; mientras la subunidad α resulta estructuralmente similar a las respectivas ca-

denas α constituyentes de las gonadotrofinas (103): La similitud de las subunidades permite realizar experimentos de hibridación entre cadenas proteicas pertenecientes a distintas hormonas (104), demostrando que la actividad específica para cualquiera de ellas está determinada por la subunidad β correspondiente.

La TSH estimula diferentes actividades tiroideas regulando prácticamente todos los metabolitos producidos por la glándula. Este resulta un ejemplo típico de la transducción endócrino-endócrina reseñado anteriormente (Fig 3). Así la TSH estimula el metabolismo del yodo aumentando la permeabilidad de las membranas en las células foliculares (105), aumenta la organificación intracelular del yodo (106), induce la formación de pseudopodos seguida de ingestión y proteólisis del coloide (107), etc. La interacción de la TSH con sus receptores foliculares estimula la acción de la adenilatociclasa, de este modo, el AMPc sería el mediador de casi todos sus efectos (108). A modo de conclusión podemos afirmar que la acción de la TSH tiene por objeto aumentar la síntesis y secreción de T3 y T4 (109) (110), así como también mantener el trofismo celular en la glándula tiroidea.

Las hormonas tiroideas, que son aminoácidos yodados, provocan una disminución en la secreción de TSH ejerciendo de este modo, un control inhibitorio predominantemente a nivel de la adenohipófisis, estableciéndose un balance entre ambas secreciones hormonales. Pequeños aumentos en la circulación de hormonas tiroideas reducen los niveles de TSH, y una disminución en los niveles séricos de T4, incluso por su inducción con agentes farmacológicos antitiroideos, provoca una correspondiente elevación en la concentración sérica de TSH (111-115).

En la rata, la acción de las hormonas tiroideas inyectadas en dosis farmacológicas agudas, se evidencia por la disminución de la secreción de TSH sin afectar su síntesis. Por el contrario, la administración continuada provoca una disminución en la síntesis de TSH (116-120).

Los efectos inhibitorios para la TSH son mediados por receptores con gran afinidad para T3 (10 veces superior que para T4) presentes en los núcleos de las células adenohipofisarias (121) (122). Se sabe que una parte sustancial de la T3 circulante (cuya concentración sérica es 50 veces menor a la correspondiente de T4), no proviene de la propia secreción glandular sino de la deshalogenación que tiene lugar en los tejidos periféricos. La T3 tiene una actividad 8 veces superior a la T4, lo que ha llevado a sostener que la primera es la verdadera hormona, mientras la T4 sólo constituye una prohormona. Pero la

proporción de conversión de T4 en T3 varía en los distintos tejidos; para la hipófisis la conversión es muy alta (123), explicándose de esta manera cómo la regulación de TSH es posible con la administración de T4 y no de T3.

Las hormonas tiroideas podrían ejercer inhibición en la secreción de TSH también a nivel hipotalámico, aunque este aspecto regulatorio aún no está dilucidado al no existir evidencias claras a favor de un efecto central. Ciertos experimentos sugieren este control, pues implantes de T4 en el hipotálamo de animales normales y con transplante de su hipófisis bajo la cápsula renal, provocan una disminución marcada en la concentración sérica de hormonas tiroideas. (124-126).

Otras sustancias hormonales presentes en la circulación, pueden afectar la secreción hipofisaria de TSH. Tal el caso de las hormonas corticoides, esteroides producidos por la glándula adrenal, con múltiples efectos descriptos sobre el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (127). La administración farmacológica de corticoides inhiben tanto la secreción basal como la estimulada por TRH de la TSH hipofisaria (128-133). En las ratas la inyección de dexametasona puede incrementar o inhibir la secreción de TSH, efectos dependientes de la dosis administrada y el tiempo transcurrido (134)(135). Hoy se sostiene que tanto el hipotálamo como la hipófisis contienen poblaciones de receptores para glucocorticoides (136)(137) con lo cual cabría la posibilidad de una regulación hétero hormonal de la secreción de TSH. Las hormonas sexuales por su parte ejercen acciones reconocibles sobre el mismo eje. Las altas concentraciones de TSH normales en las ratas macho (138-141), pueden restablecerse en los animales castrados con la administración de testosterona; mientras la ovariectomía no afecta los niveles basales ni estimulados por TRH de la TSH en las hembras (142). Por otra parte la administración de estrógenos en las hembras, puede provocar aumento, disminución o efectos bifásicos en la secreción de TSH (143-145). Los estudios hasta ahora efectuados confirman un rol modulador de la testosterona sobre la TSH; de manera diferente los efectos de los andrógenos en los seres humanos inhiben la secreción de tirotrófina (146).

Sin embargo estas modulaciones (corticosteroides, esteroides, esteroides sexuales) deben considerarse como de tipo hétero hormonal, ya que la señal primaria está dada por la concentración de hormonas tiroideas. (Fig. 7).

3.3- EL CONTROL HIPOTALAMICO DE LA HIPOFISIS.

El hipotálamo como órgano neuroendócrino que controla diversos aspectos de la función hipofisiaria, comienza a adquirir significado desde la postulación de la hipótesis neurovascular (94) (95). Esta idea se basa en la peculiaridad anatómica circulatoria que comunica la región basal del hipotálamo con la hipófisis constituyendo la circulación portal, de manera que la sangre que llega hasta la pituitaria proviene de los plexos capilares de la eminencia media; lesiones del tallo hipofisario provocan disminución en la secreción hormonal, pero no alteran los mecanismos de retroalimentación. Esto hizo suponer la existencia de ciertos factores hipotalámicos que, vertidos en la circulación portal, controlaban la distintas secreciones hipofisarias.

Fue precisamente el tripéptido (147) (148) TRH el primero de dichos factores aislados y sintetizados (149-151); ejerce una acción estimuladora sobre la secreción de TSH por las células tirotróficas. Experimentos recientes con antisueros anti-TRH avalan su función estimuladora, ya que su empleo provoca una marcada disminución en la secreción de TSH (149-156). El TRH es liberado a la circulación portahipofisaria por células neurosecretorias ubicadas en una región hipotalámica particular denominada área tirotrófica (157-161). A pesar de encontrarse en muy altas concentraciones en el hipotálamo, ha sido identificado también en otras áreas del sistema nervioso como la glándula pineal (162), la retina (163) y la médula espinal (164); la distribución filogenética del tripéptido, ya sea como neurohormona o neurotransmisor, es bastante difundida en el reino animal encontrándose hasta en hidozoos (165) y precediendo a la propia aparición del eje hipófiso-tiroideo.

Las células tirotróficas hipofisarias contienen receptores de alta afinidad para TRH (166-174), pero los mecanismos por los cuales inducen la secreción de TSH son todavía inciertos, postulándose varias posibilidades (175-177). Las evidencias iniciales indicaban que la liberación de TRH era activada por el sistema noradrenérgico central. Así la inyección NE o sus agonistas en el LCR, incrementa la secreción de TSH (178) (179) mientras que los antagonistas adrenoceptores la inhiben (180) (182), ejerciéndose estos efectos sobre el TRH y no como acción directa sobre los tirotrófos. Recientemente, sin embargo (183), se ha demostrado que la activación de los α_1 adrenoceptores tienen una influencia inhibitoria en la secreción de TSH; mientras la estimulación α_2 provoca incrementos en la secreción de la hormona. Los receptores α_2 son estimulados con más facilidad por la inyección intraventricular de los agonistas.

La importancia de estos hallazgos radica en que los receptores α_2 mediarían una influencia tónica del sistema nervioso central sobre la secreción de TSH.

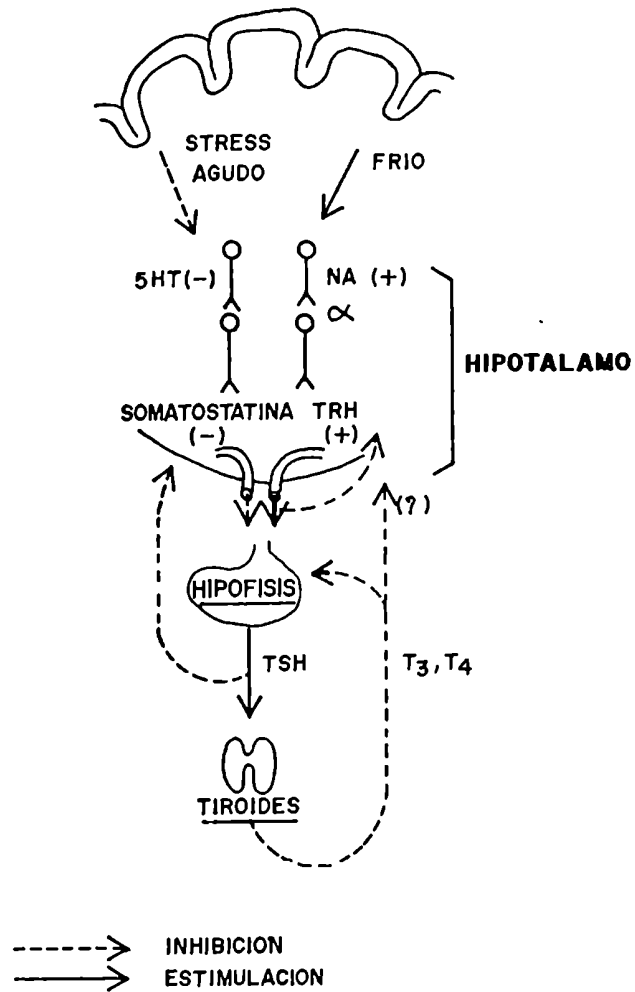
La serotonina es un modulador inhibitorio del TRH, pues su inyección intraventricular provoca la disminución del tripéptido en el hipotálamo, y de la TSH tanto intrahipofisaria (184) como sérica (185). La acción de la serotonina se revierte con bloqueantes específicos (186), recuperándose los niveles basales de las hormonas. Los opioides (187) inhiben la secreción de TRH; en cuanto al GABA inhibe la secreción de TSH posiblemente vía TRH y su antagonista bicuculina revierte tal efecto (188), aunque por sí solo es incapaz de modificar los niveles basales de TSH. Efectos estimulatorios sobre la TSH presenta la histamina cuando es inyectada por vía intravenosa (189), así también como sobre la incubación de tejidos hipofisarios (190), y estimula al TRH (191) en incubaciones hipotalámicas.

Varias sustancias presentes en el hipotálamo ejercen funciones inhibitorias de la secreción de TSH hipofisaria, interactuando en forma antagónica con el TRH. Así la dopamina secretada directamente a los capilares portales por las terminaciones nerviosas provenientes del sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (192), reduce la respuesta del tirotrofo al TRH (193) (220), disminuyendo al mismo tiempo la TSH sérica (201). Sin embargo la hormona hipofisotropa inhibidora más importante resulta ser el tetradecapéptido somatostatina. Su aplicación tanto "in vitro" (202-204) como "in vivo" (205-208) inhibe la secreción de TSH; su rol inhibitorio quedó evidenciado con la aplicación de suero antisomatostatina que induce una elevación de la secreción de TSH, tanto basal como TRH-estimulada (209-212). La gastrina y la colescistoquinina, péptidos descritos primitivamente en el sistema digestivo, pero encontrados en altas concentraciones en el hipotálamo (213-215), son reguladores fisiológicos inhibitorios de la secreción de TSH en las ratas (216-218).

A manera de conclusión podemos afirmar que la secreción de TSH se encuentra regulada por dos hormonas hipofisotropas: el TRH y la somatostatina, con funciones opuestas, y varias de las sustancias descritas modulan la actividad de éstas últimas (Fig. 13).

Finalmente, existe un control de retroalimentación entre la hipófisis y el hipotálamo, donde las propias hormonas inhiben la secreción de sus factores liberadores (219). Esto es posible pues el flujo sanguíneo en el sistema porta hipofisario es bidireccional. La retroalimentación se denomina corta, comparándola con el mecanismo de retroalimentación largo formado por el sistema

Figura N° 13: ESQUEMA DEL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO-TIROIDEO.



En la representación esquemática se muestran como intervienen los diferentes estímulos, cuyos efectos inhibitorios o estimulatorios tienen acción sobre la función endócrina del eje.

hipófisis-glándula periférica.

Las evidencias del control de retroalimentación corto son indirectas y provienen principalmente de experimentos realizados en animales tiroidectomizados, con o sin administración endógena de TSH, donde se observa una marcada disminución del TRH hipofisario (220) (221).

3.4- EFFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FUNCION TIROIDEA.

La temperatura constituye uno de los estímulos fisiológicos importantes, con acción directa sobre la función tiroidea. Ya en 1922 (222) se observó que la inyección de suero extraído de conejos expuestos a bajas temperaturas provocaba un incremento en la tasa metabólica de animales tiroidectomizados. La exposición al frío induce un aumento de la secreción de TSH en la rata (223-225), pero dicho incremento requiere de la integridad del tallo hipofisario (226-228). La regulación de la respuesta tiroidea al frío se encuentra localizada a nivel hipotalámico y depende de la liberación de TRH. La inmunización contra TRH bloquea la liberación de TSH inducida por el frío (229-231) provocando hipotermia en las ratas (232). En el mismo sentido actúan los bloqueantes noradrenérgicos (233-234) que modulan la secreción de TRH.

Hoy se sostiene un esquema fisiológico que incluye a las neuronas termosensibles del hipotálamo anterior, como etapa inicial de la vía (235). Ante el estímulo del frío, éstas células incrementarían su actividad eléctrica provocando un aumento en la secreción de NE (236) que induciría, a través de receptores α_2 la liberación de TRH el que, por su parte, actuaría sobre el eje hipofisotiroideo. Estas ideas parecen estar avaladas por experimentos donde se aplican distintas temperaturas en áreas localizadas del hipotálamo. El enfriamiento (237) provoca una activación tiroidea, mientras que el calentamiento de las mismas áreas hipotalámicas, en animales aún sometidos a bajas temperaturas externas (238), inhiben tal actividad. El rol del TRH como agente hipertérmico (239-240), fue demostrado en animales en hibernación (241), sobre los cuales, la inyección del tripéptido en áreas cerebrales, provoca un marcado aumento de la temperatura corporal.

Pese a toda la información referente a la manera como la función tiroidea se activa ante el stress de las bajas temperaturas, poco es lo que se sabe referente al papel desempeñado por la inervación simpática cervical. Uno de nuestros objetivos consiste precisamente en dilucidar el papel de tal inervación en el mecanismo de adaptación a las bajas temperaturas.

4- VINCULO ENTRE EL G. C. S. Y EL EJE HIPOFISOTIROIDEO

4.1- CATECOLAMINAS Y GLANDULA TIROIDES

Histológicamente la glándula tiroides se encuentra constituida por dos tipos celulares que corresponden a sistemas endócrinos diferentes: las "células foliculares" que en forma de monocapa, rodean a la matriz coloidal y sintetizan hormonas tiroideas, por una parte, y por otra las "células parafoliulares" o "células C", ubicadas entre los folículos, que son responsables de la secreción de calcitonina. Diferentes tipos de terminales nerviosas inervan el complejo tiroideo-paratiroideo entre las que sólo nos referiremos y describiremos las adrenérgicas, pues a ellas está dirigida nuestra tesis.

Las técnicas histoquímicas de fluorescencia (242-245) han revelado que las terminales simpáticas penetran a través del parénquima tiroideo, inervando tanto los vasos como los folículos. Las fibras adrenérgicas son postganglionares y desaparecen luego de la remoción del GCS (246). Por medio de autorradiografías se ha demostrado una estrecha conexión entre las terminales adrenérgicas y las propias células foliculares (247-248). La densidad de las terminales difiere según las especies (249) y parece disminuir en función de la edad de los individuos (250). Las observaciones morfológicas hacen suponer que la inervación adrenérgica participa de algún modo en la regulación de la función tiroidea. Pruebas farmacológicas apoyan tal suposición, aunque con reservas.

Los efectos de la NE sobre la secreción hormonal tiroidea han sido objeto de varios estudios, sin embargo no existe consenso acerca de la influencia de este neurotransmisor sobre la función glandular. Inyecciones agudas de NE y E en perros (251) y ovejas (252) afectan el flujo sanguíneo tiroideo sin cambios aparentes en la secreción hormonal. En conejos la infusión continua de E produce una vasoconstricción acompañada de un descenso en la captación del yodo (253); observaciones con el mismo modelo de administración en ratas arrojaron resultados similares (254). Efectos tanto inhibitorios como estimulatorios en seres humanos se han registrado por una inyección aguda de E, mientras que su administración continua lleva a una depresión en la captación de yodo (255).

Los experimentos con explantos glandulares o en cultivos celulares, indican que la NE puede estimular (256-263), inhibir (254) (264-265), o bien no

tener efecto sobre distintos aspectos de la función tiroidea (266) (267).

Una explicación para esta diversidad de resultados y efectos aparentemente contradictorios de la misma sustancia, puede atribuirse a las metodologías empleadas, así como a las especies animales. En la mayoría de los experimentos publicados, lo que se evaluó fue la respuesta farmacológica. Cada animal utilizado como modelo experimental, posee diferentes grados de inervación simpática la cual varía con la edad y es de esperar que reaccione diferencialmente a niveles supramáximos de catecolaminas (249) (250).

En oposición a la larga y detallada serie de experimentos farmacológicos efectuados empleando catecolaminas "in vitro" o "in vivo", poca atención se ha prestado a la posibilidad de una manipulación quirúrgica de la vía neuronal aferente a la glándula. Precisamente esto constituye un buen enfoque fisiológico del tema, pues es posible modificar la información nerviosa que llega a la glándula en distintas situaciones y estudiar como se comporta la función tiroidea.

Trabajos realizados en el laboratorio (87) (268) (269) donde se elaboró esta Tesis, inauguran una línea de investigación consistente en analizar los efectos de la ablación de ambos GCS, (GCSx bil.) y estudiar cómo la degeneración neural y la posterior denervación, influyen sobre la función tiroidea. Los primeros experimentos revelaron la existencia de un incremento de la respuesta bociógena a la administración de TSH exógena o MMI en ratas GCSx bil. estudiadas algunas semanas después (268). Dicho aumento ponderal del peso tiroideo se acompañaba de un incremento de la incorporación de $[^3H]$ Uridina al RNA tiroideo, en lóbulos de animales GCSx bil.. La efectiva denervación glandular queda demostrada con la caída marcada de las catecolaminas intra-tiroideas y el incremento en el número de adrenoceptores α (268) (87). En una segunda serie de experimentos, donde se aplicó el modelo de GCSx unilateral, lo que permitía mantener el lóbulo inervado contralateral como control, quedó demostrada la mayor respuesta bociógena inducida por MMI y TSH exógenos en el lóbulo desnervado (270). Dicho lóbulo desarrolla al mismo tiempo un crecimiento espontáneo que se verifica 4 semanas después de la gangliectomía unilateral.

La desnervación provoca cambios funcionales notables, registrándose una disminución en el contenido tiroideo de hormonas, en el metabolismo del I y de las catecolaminas.

El análisis de los resultados sugiere la hipótesis de que la inervación

simpática modula en forma inhibitoria la respuesta tiroidea a la TSH circulante (268). Parte de esta Tesis somete a verificación experimental tal hipótesis a partir de nuevas observaciones.

4.2- EFFECTOS DE LA DEGENERACION WALLERIANA SOBRE EL EJE HIPOFISOTIROIDEO.

Los cambios ponderales y metabólicos tiroideos inducidos por la GCSx bil. crónica son al parecer producto de una sensibilidad particular de la glándula a los niveles circulantes de TSH. Los niveles de dicha hormona 7 días después de la operación, no difieren de los basales obtenidos en los animales control. Pero la GCSx bil. (271) provoca también cambios crónicos a nivel hipotalámico; se registra una disminución en la captación de [³H] NE que se acompaña por una disminución del 40 al 60% en el contenido de catecolaminas de la eminencia media y un incremento del 35% en el número de receptores α adrenérgicos hipotalámicos, resultados que nos hablan de un importante papel desempeñado por la inervación simpática periférica sobre el hipotálamo.

En el estudio de los efectos moduladores de la inervación sobre el eje hipófiso-tiroideo se utilizó el fenómeno de degeneración walleriana explicado anteriormente. La originalidad del modelo experimental reside en la posibilidad de provocar una activación neural máxima durante la descarga supraliminal de neurotransmisores, sin manipulación del animal en este momento. Estos mediadores actúan directamente sobre sus receptores postsinápticos en ambos extremos del eje endócrino.

Durante el período de descarga supraliminal calculado entre las 8 y 16 horas tras la GCSx, se observó una marcada depresión en la captación de yodo y en los niveles séricos de T4 y TSH (87). La T4 sérica se mantiene deprimida durante este período, siendo la glándula refractaria aún a la inyección de TSH exógena, lo que indica la independencia de los efectos depresivos en la tiroides, con respecto a los centrales traducidos en una disminución de TSH. De este modo podemos proponer que la influencia de la inervación adrenérgica cervical sobre el eje endócrino se ejercería a dos niveles:

- a) Centralmente, afectando la secreción de TSH durante la degeneración walleriana y provocando cambios pre y post sinápticos intra-hipotalámicos crónicos, transcurridos varios días de la GCSx.

b) Periféricamente, alterando la sensibilidad de la tiroides a la TSH circulante, lo que induciría cambios ponderales y metabólicos. Durante la degeneración anterógrada se deprime la secreción hormonal tiroidea, efecto que se muestra independiente de la TSH circulante.

Uno de los temas de este trabajo de tesis consistió en evaluar la evolución temporal de ambos mecanismos.

5- OBJETIVOS DE ESTA TESIS

La serie de trabajos constitutivos de la presente Tesis tuvo como objetivo:

- 1) Analizar la evolución a lo largo del tiempo de la GCSx sobre la secreción de TSH y T4 en ratas.
- 2) Examinar el ritmo diario de secreción hormonal y de catecolaminas intraglandulares, estudiando cuáles eran los efectos moduladores ejercidos por la vía neural simpática sobre éstos.
- 3) Identificar y caracterizar el tipo de receptor postsináptico involucrado en los cambios secretorios de TSH y T4, durante la degeneración anterógrada aguda.
- 4) Evaluar la importancia de la proyección simpática cervical en la respuesta adaptativa al frío en las ratas.
- 5) Analizar los efectos de la desnervación simpática crónica en el proceso de hipertrofia compensadora tiroidea luego de la hemisección glandular. Evaluar los cambios ponderales y hormonales, caracterizando además la naturaleza hipertrofica y/o hiperplásica del fenómeno compensatorio.
- 6) Establecer si el fenómeno compensatorio es dependiente de la presencia de la hipófisis y qué influencia ejerce la inervación simpática sobre su desarrollo particular.
- 7) Identificar y caracterizar la vía aferente del sistema simpático cervical responsable de la inervación de la glándula tiroides.

II

MATERIALES Y METODOS

1- ANIMALES Y TEJIDOS

Se utilizaron ratas (Ratus norvegicus) adultas de cepas Wistar, con pesos entre 200-270 gr. manteniéndolas en régimen de iluminación diaria de 14 horas (luz de 0600-2000 hs), en ambiente climatizado (22 ± 2 C°), alimentadas con alimento balanceado "Purina" y agua "ad libitum". En los experimentos de adaptación al frío, dos horas después de la cirugía, los animales fueron transferidos a una cámara fría (4 ± 1 C°), donde contaban con comida y líquido. Un grupo de animales fue preadaptado durante un mes a las condiciones de la cámara fría antes de la operación, y una vez realizada, devueltos allí.

Para los experimentos de captación "in vitro", las glándulas tiroides y pineales se resecaron inmediatamente después del sacrificio, manteniéndolas en hielo hasta 30 minutos como tiempo máximo previos a su utilización.

2- PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

Las operaciones mencionadas a continuación se realizaron bajo anestesia con éter etílico. Para desinfección previa y posterior a la cirugía se utilizó alcohol 70C°, empleándose agrafes (Mitchell 100) en las suturas. Aquellas intervenciones de microcirugía como Dc o NCEx se llevaron a cabo bajo microscopio estereoscópico Wild y se utilizó material de microcirugía Aesculap.

2.1- GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR (GCSx)

La GCSx u operación simulada se realizó a distintos tiempos previos al sacrificio o a la punción para muestreo sanguíneo, según la técnica (272) que se explica:

Se expusieron las glándulas salivales mediante una incisión ventral en el cuello y se las separa lateralmente con el objeto de exponer los músculos suprahiodeos. Se divulsiona dichos músculos hasta una profundidad cercana a la arteria carótida primitiva. El GCS se encuentra alojado a la altura de la bifurcación carotídea entre las ramas interna y la externa; una vez identificado se lo reseca cuidadosamente con el propósito de no provocar hemorragias. En los animales con operación simulada se procedió de la misma manera sólo hasta la visualización del ganglio sin extirparlo. Para la GCSx unilateral sólo se reseca un ganglio y se inspecciona visualmente el contralateral. El criterio seguido

para confirmar la GCSx consiste en la detección de las siguientes secuencias temporales de fenómenos:

- a) Ptosis palpebral hasta las 10 horas de transcurrida la operación.
- b) retracción palpebral y exoftalmo: moderado entre las 10 y 24 horas posteriores a la cirugía.
- c) Ptosis irreversible después de las 24 horas.

Estas son las fases de la reacción de degeneración walleriana temprana a nivel de los músculos periorbitarios (ver Fig. 12).

2.2- DESCENTRALIZACION GANGLIONAR (Dc)

Se procedió a exponer los GCS como se describe arriba identificándose el tronco cervical común (vía que une al GCS con el GCM). La Dc se produce al seccionar quirúrgicamente dicho tronco, pues de ese modo se interrumpen las señales aferentes al ganglio, que llegan por las fibras preganglionares de la médula espinal y de otras conexiones con el sistema simpático. Se eliminaron de ese modo las posibles aferencias preganglionares provenientes de metámeras inferiores y/o superiores. Los animales con Dc exhiben una ptosis palpebral definitiva desde el momento que se recuperan de la anestesia, no observándose reacción de degeneración.

2.3- SECCION DEL NERVIO CAROTIDEO EXTERNO (NCEx)

El ganglio se expuso según la técnica ya descrita y bajo microscopio estereoscópico. Visualizado el ganglio se exploró alrededor de su parte media hasta identificar el NCE que corre paralelo a la arteria carótida externa. Se lo seccionó cuidadosamente, evitando dañar tanto la arteria como al resto del ganglio.

2.4- TIROIDECTOMIA

La ablación unilateral o bilateral de los lóbulos tiroideos se llevó a cabo practicando una incisión ventral a la altura del cuello. Se separaron hacia ambos lados las glándulas salivares exponiéndose así el músculo esternohioideo. Se practicó una divulsión en la parte media del músculo hasta llegar a la tráquea y las glándulas tiroideas. Antes de reseca cada lóbulo, se seccionó el

istmo tiroideo y luego, con una pinza curva, se tomó el lóbulo por su parte dorso apical. Suavemente se tiró del mismo practicando, con el bisturí, pequeños cortes bordeando la tráquea pero cuidando de no lesionarla; el lóbulo se desprende acompañado por algunas fibras musculares. Antes de resecar el lóbulo debe identificarse el nervio recurrente para evitar que resulte dañado durante la manipulación.

2.5- HIPOFISECTOMIA

Esta intervención se practica de acuerdo a la técnica transauricular (273) con modificaciones.

En los animales anestesiados se introduce una aguja, con el bisel hacia arriba, a través del canal óseo auricular perforando el tímpano y luego el hueso de la cápsula preótica. El bisel queda así alojado en el interior de la cápsula pituitaria y se lo gira 180°; con una jeringa se succiona hasta extraer la hipófisis, reconociéndosela por su tonalidad rosada. En ensayos previos, durante el perfeccionamiento de la técnica, se verificó que la longitud expuesta de la aguja no debía exceder los 11 mm. colocándose a esa distancia un tope plástico. El bisel de la aguja debe ser lo suficientemente duro y afilado para perforar los huesos craneales de una rata adulta. Las más adecuadas resultan ser aquéllas cuyo diámetro interno se encuentra entre 1 y 1,5 mm.; durante la extracción deben succionarse aproximadamente 2 ml. de sangre.

Los animales hipofisectomizados fueron tratados con Cloranfenicol (40 mg/Kg.), colocados en jaulas de a 2 ó 3 individuos contando con 2 botellas de agua, una de ellas conteniendo solución salina al 0,9%. La verificación de la operación se hace tras la autopsia y el índice de sobrevivencia es del 50%.

Para la operación simulada se procede de igual forma, sólo que el bisel de la aguja quedará ubicado hacia abajo para evitar lesiones del sistema porta hipofisario durante su introducción hasta la cámara pituitaria, no practicándose succión alguna.

2.6- PUNCION YUGULAR

Esta técnica se empleó para la obtención repetitiva de muestras sanguíneas. Los animales se anestesiaron con éter y luego se les practicó una incisión en la piel, justo por encima de la vena yugular. Una vez retraída la piel y ubica

da la yugular, con una aguja hipodérmica se la punciona cuidadosamente para extraer 1 ml. de sangre que se llevó a la heladera durante 2 horas. Posteriormente cada muestra se centrifugó por 20 minutos a 5,000 g. y el suero obtenido se congeló a -20°C hasta la medición por RIA.

3- DETERMINACION DE HORMONAS

3.1- DETERMINACION DE LOS NIVELES SERICOS DE TSH

Las muestras de sangre se obtuvieron en el momento mismo del sacrificio o por punción yugular a distintos tiempos, para la confección de los ritmos. Las muestras de suero se guardaron en heladera a -20°C hasta el momento del ensayo.

Los niveles de concentración sérica de TSH se determinaron por el método de radioinmunoanálisis (RIA). En este ensayo se empleó un doble anticuerpo y reactivos provistos por el Rat Pituitary Distribution Program (NIADDK). Los resultados se expresaron en μU de TSH-RP₁/ml. de suero (1 mg. TSH-RP₁ = 0,20 IU) siendo la sensibilidad del método $11\mu\text{U}/\text{ml}$. La variación intra e interensayo fue de 9% y 18% respectivamente.

3.2- DETERMINACION DE LOS NIVELES SERICOS DE HORMONA TIROIDEA (T₄)

La concentración sérica de T₄ se determinó por RIA según la metodología descrita por Chopra (274). Los reactivos se obtuvieron de Radioassay System Laboratory, Carlson, Calif. Estados Unidos y los resultados se expresaron como $\mu\text{g T}_4/\text{dl}$. de suero, siendo la sensibilidad del método de $0,4\mu\text{g T}_4/\text{dl}$. suero. La variación intra e inter ensayo fue del 6% y 15% respectivamente.

4- CAPTACION NEURONAL DE [3H] NE

Los experimentos de captación del [3H] NE se realizaron "in vitro" siguiendo la técnica de Kopiu y col (58). Previamente a la utilización del compuesto radiactivo, se comprobó su pureza por cromatografía de adsorción en columna de alúmina y por intercambio iónico en columna Dowex-x₄. Más del 95% de la radiactividad cromatografió con la amina standard pura.

Trozos con un volumen aproximado de 1 mm^3 de tiroides o glándulas pineales enteras, se incubaron individualmente durante 30 minutos a 37°C en 0,6 ml. de

Buffer Krebs Ringer bicarbonato, pH 7,4 que contenía además 0,01% de ácido ascórbico y 0,2 mM de EDTA. La incubación se realizó en una estufa oscura y bajo atmósfera húmeda compuesta por 95% O₂ y 5% CO₂. El compuesto radiactivo marcador [³H] NE (actividad específica 11,8 Ci/m mol; New England Nuclear, Boston, MA), se agregó en concentraciones de 0,5 μM en cada medio individual de cultivo al iniciarse la incubación. Para valorar la captación inespecífica, algunos tejidos fueron preincubados durante 5 minutos con 10 μM de desmetil Imipramina (DMI) antes del agregado del compuesto tritiado.

Esta droga, en las concentraciones empleadas, actúa como un inhibidor de la captación neuronal de NE. Finalizada la incubación los medios fueron rápidamente aspirados y los tejidos lavados 3 veces con 1 ml por vez de buffer frío. Luego los tejidos fueron digeridos con hidróxido de amoníaco y la radiactividad se determinó por espectrometría de centelleo líquido, utilizándose tolueno fosforo como solución centelladora. Los resultados se expresan como Femtomoles de [³H] NE acumulada/mg de tejido en 30 minutos de incubación.

Composición del medio de incubación:

124 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,25 mM MgSO₄; 1,45 mM CaCl₂; 25,3 mM KPO₄H₂; 8 mM glucosa. Se le agregó además 0,01% de ácido ascórbico y 0,2 mM de EDTA. La solución de KRB era preparada fresca el día del experimento y antes de su utilización se la gaseaba durante 20 minutos con la mezcla de carbógeno.

5- DETERMINACION DE CATECOLAMINAS

El contenido de NE, E y DA en el tejido tiroideo y pineal se determinó por un método radioenzimático modificado (275) del procedimiento original descrito por Da Prada y Zürcher (276).

Estos ensayos se basan en la transformación de las catecolaminas a sus derivados O-metilados por medio de la COMT, enzima parcialmente purificada del hígado de rata, que transfiere el grupo metilo radiactivo de la SAM al núcleo catecolico.

Tras el sacrificio del animal los tejidos fueron rápidamente resecados pesados y homogeneizados en PCA 0,3 N. Los homogenatos se centrifugaron en frío y el sobrenadante se congeló guardándose a -20°C hasta el ensayo. Cada alícuota del sobrenadante (100 μl) se incubó a 37° durante 60 minutos con 100 μl de una mezcla que contiene: buffer Tris-HCl-EGTA, PH 9,3; Cl₂Mg, benzilhydroxilamina (inhibidor de la DOPA decarboxilasa); pargilina (inhibidor de la MAO); [³H] SAM

y COMT (15 μ l).

La incubación se detiene con 150 μ l. de buffer borato 1M pH 8. Los derivados O-metilados tritiados: normetanefrina, metanefrina y metoxitiramina se extrajeron con una mezcla de tolueno: alcohol isoamílico (3:2 v/v). Se reextrajeron con HCl 0,1 N y tras la centrifugación se descartó la fase orgánica, mientras que la acuosa se sembró en placas de sílica gel con indicador fluorescente. Las placas se corrieron en un sistema de solventes cloroformo: etanol: etilamina(120:29:8 v/v). Tras su identificación con luz ultravioleta cada banda fue raspada y sus residuos depositados en los correspondientes viales. La [3 H] metanefrina y [3 H] normetanefrina se oxidan con peryodato de sodio a [3 H]-vainillina, compuesto extraído con tolueno omnifluor para su valoración en espectrómetro de centelleo líquido. La [3 H] metoxitiramina se eluye con 0,5 N deClH y se cuenta con una mezcla de Tritón x 100-tolueno-omnifluor.

Finalmente los resultados se expresaron en picogramos de catecolaminas/mg. de tejido.

6- TECNICAS HISTOLOGICAS

6.1- EMPLEO DE COLCHICINA.

Los animales, operados 72 horas antes, fueron inyectados con colchicina (2,2 mg/Kg) usando como vehículo solución salina 0,9% por vía intraperitoneal y sacrificados 3 horas después.

La colchicina (Sigma) es un alcaloide ampliamente utilizado como instrumento experimental por sus propiedades antimitóticas. Esta droga tiene la capacidad de asociarse irreversiblemente a la proteína microtubular interfiriendo en la función de los husos mitóticos y causando así, la despolimerización y desaparición de los microtúbulos. De este modo las células en división son afectadas deteniéndose el proceso mitótico, generalmente en metafase, por falta de formación de los husos (61).

6.2- FIJACION E INCLUSION EN PARAFINA (277)

a) Los lóbulos tiroideos de los animales sacrificados fueron inmediatamente resecados y fijados en líquido de Bouin (mezcla picro-formol-acética) durante 24 hs.

- b) Deshidratación: el material es pasado por una serie de alcoholes de gradación creciente, durante 20 minutos en cada uno, finalizando con alcohol 100% durante 30 minutos.
- c) Pasar a benzol o xilol, dos cambios, hasta que la pieza quede transparente.
- d) Parafinar la pieza: se procede a sumergir las piezas en parafina de 55°C de punto de fusión, la cual se mantiene líquida en una estufa sin superar los 57°C. Después de 2 horas se renueva la parafina haciéndose un segundo baño en parafina limpia de la misma duración.
- e) Tallar el taco, orientándolo y obtener los cortes del grosor deseado (5 μ m).
- f) Los cortes seriados se recogen en agua caliente y se procede a montarlos sobre porta objetos previamente albuminizados.
- g) Llevar el material a estufa de 37°C.

6.3- COLORACION Y MONTAJE

- a) Desparafinización: el material a teñir se desparafiniza pasando los cortes por dos baños de xilol o benzol durante 10 minutos cada vez.
- b) hidratación: Los cortes son sumergidos en una serie de alcoholes con graduación decreciente, finalizando en agua destilada.
- c) Coloración por hemalumbre ácido de Meyer (laca albumínica de Meyer): Los cortes se tiñeron con esta sustancia durante 10 minutos; luego se lavaron con agua (10-15 minutos) hasta que el preparado adquiriera color violeta oscuro.
- d) Coloración con eosina: Se aplica a cada corte solución acuosa de eosina 1% durante 1 minuto, luego se diferencia con alcohol 70%; proceso seguido bajo microscopio.
- e) Deshidratación: una vez coloreados los cortes se deshidratan con alcoholes de gradación creciente.
- f) Aclaración: procedimiento que tiene por objeto impregnar al corte con un disolvente del bálsamo de Canadá, usándose entonces carbolxilol que además le confiere un índice de refracción semejante al del vidrio.
- g) Montaje: sobre el porta objeto con el corte histológico, se coloca una gota de bálsamo del Canadá disuelto en xilol y se cubre rápidamente con un cubre objeto.

6.4- VALORACION DE LOS RESULTADOS

Se estudiaron los cortes seriados (5 a 7 μm) desechándose un número regular de los mismos. De esta manera se obtienen muestras representativas de todas las regiones tiroideas; en cada muestra se contó el número de mitosis observadas evaluándose según los siguientes índices:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de metafases}}{1000 \text{ células foliculares}}$$

$$\text{Índice folicular} = \frac{\text{número de mitosis}}{100 \text{ folículos}} \quad \text{Los resultados se expresan en porcentajes}$$

7- ANALISIS ESTADISTICO

Para los análisis estadísticos en el caso de dos muestras se emplearon los test de Student poblacional y de muestras apareadas. Para comparaciones múltiples se utilizó análisis de la varianza (ANOVA) seguido por test de Scheffé, Dunnet o Tukey según las fórmulas recomendadas (278).

III

RESULTADOS

1- EFECTOS DE LA GCSx BIL SOBRE EL EJE HIPOFISOTIROIDEO

1.1- VARIACION DE LA TSH SERICA EN ANIMALES GCSx ENTRE 1-28 DIAS POST CIRUGIA.

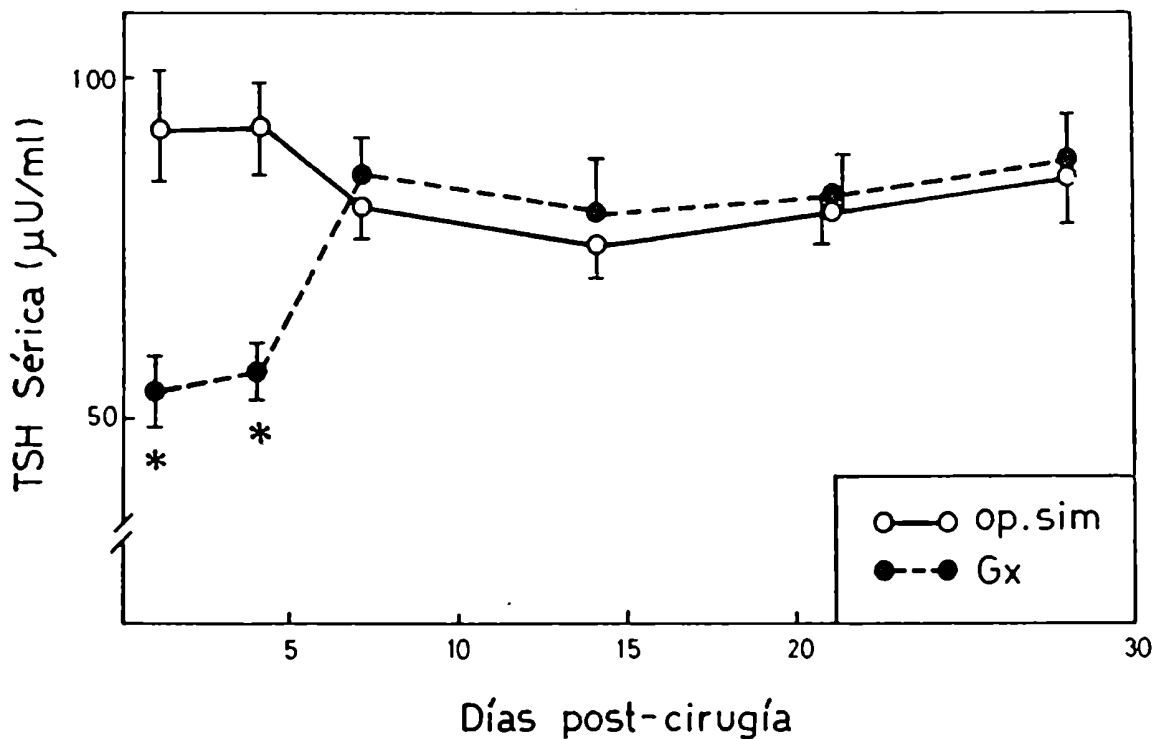
Los experimentos citados a continuación tuvieron por objeto explorar algunos aspectos del vínculo, de naturaleza moduladora, entre el GCS y el eje hipofisotiroideo. Determinamos los cambios observados en dicho eje en función del tiempo transcurrido luego de GCSx bil.. Tal como se ha detallado en las secciones precedentes de la Introducción, trabajos previos demuestran una marcada depresión de la TSH coincidentes con el período de descarga supraliminal de neurotransmisores, durante la degeneración anterógrada luego de la GCSx. Ese período está comprendido entre las 8 y 24 horas tras la cirugía y la actividad de degeneración (degeneración walleriana), no difiere de la detectada en otros órganos como: glándulas submaxilar y parótida (83), membrana nictitante (84) y músculos retractores del párpado.

La Fig. 14 muestra la inhibición en la secreción TSH observada entre 1 y 4 días luego de la cirugía, momento a partir del cual la concentración de TSH sérica evoluciona en forma similar para ambos grupos experimentales. Este resultado indica que el intervalo de tiempo donde se manifiestan los fenómenos endócrinos, acciones postsinápticas de la degeneración neural, se extiende por un período de hasta 4 días luego de la operación.

1.2- VARIACION DE LA T₄ SERICA EN ANIMALES GCSx bil. ENTRE 1 y 28 DIAS POST CIRUGIA

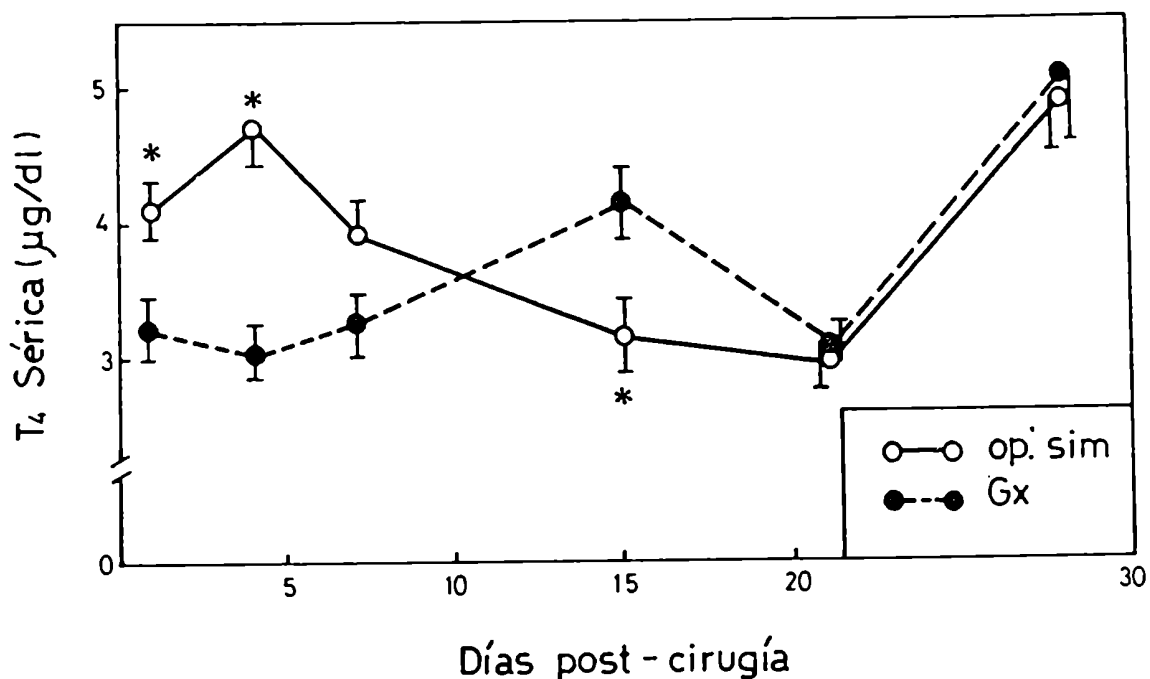
Los niveles circulantes de T₄ muestran también una marcada disminución entre el primero y cuarto día tras la operación (Fig. 15). Sin embargo 2 semanas después los animales GCSx bil. presentan un incremento significativo de T₄ con respecto, tanto a sus controles como a los niveles previos dentro del mismo grupo. Este aumento no se acompaña por una elevación correspondiente de TSH; a partir de 15 días las concentraciones séricas de T₄ son semejantes en ambos grupos. Nuevamente se observan que los fenómenos postsinápticos, consecuencia de la degeneración walleriana, se extienden hasta 4 días postcirugía. En el día 28 se observan las concentraciones más altas de T₄ para los 2 grupos de animales; desconociéndose la razón de este hallazgo. Quizás modificaciones inadvertidas en la dieta o ritmos de periodicidad de mayor extensión (2 a 4 se

Figura N° 14: CAMBIOS EN LA CONCENTRACION SERICA DE TSH DESPUES DE LA GCSx bil.



Dos grupos de 10 animales cada uno, fueron sometidos a GCSx bil. u (Gx) operación simulada. A distintos intervalos de tiempo se obtuvieron muestras de sangre por punción yugular según se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm ES de entre 8 y 10 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre GCSx y operación simulada. *p < 0,02 por test de Student.

Figura N° 15: CAMBIOS EN LA CONCENTRACION SERICA DE T₄ DESPUES DE GCSx bil.



Dos grupos de 10 animales cada uno fueron sometidos a GCSx bil. (Gx) u operación simulada; a distintos intervalos de tiempo por punción yugular se obtuvieron muestras sanguíneas, según se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm ES de entre 8 y 10 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre GCSx y operación simulada * $p < 0,02$ por test de Student.

manas) en la secreción o "clearance" metabólico de T_4 , puedan explicar este último resultado.

1.3- CAMBIOS PONDERALES EN ANIMALES GCSx bil. A LOS 28 DIAS TRANSCURRIDA LA CIRUGIA.

Al finalizar el experimento resumido en 1.1 y 1.2., los animales fueron sacrificados, sus tiroides resecadas, pesadas y referidas al peso corporal cuyos resultados se han volcado en la Tabla I. No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales, ni entre éstos y un grupo control de animales intactos sacrificados al mismo tiempo.

1.4- CAMBIOS DE LA TSH SERICA INDUCIDOS POR TIROIDECTOMIA BILATERAL EN RATAS GCSx bil.

La disminución o ausencia en circulación de hormonas tiroideas, pone en marcha el mecanismo de retroalimentación a nivel hipofisario que se traduce en un aumento de secreción de TSH. Por lo tanto, fue de interés analizar las modificaciones producidas por la GCSx bil. sobre la TSH circulante, en ratas carentes de hormonas tiroideas.

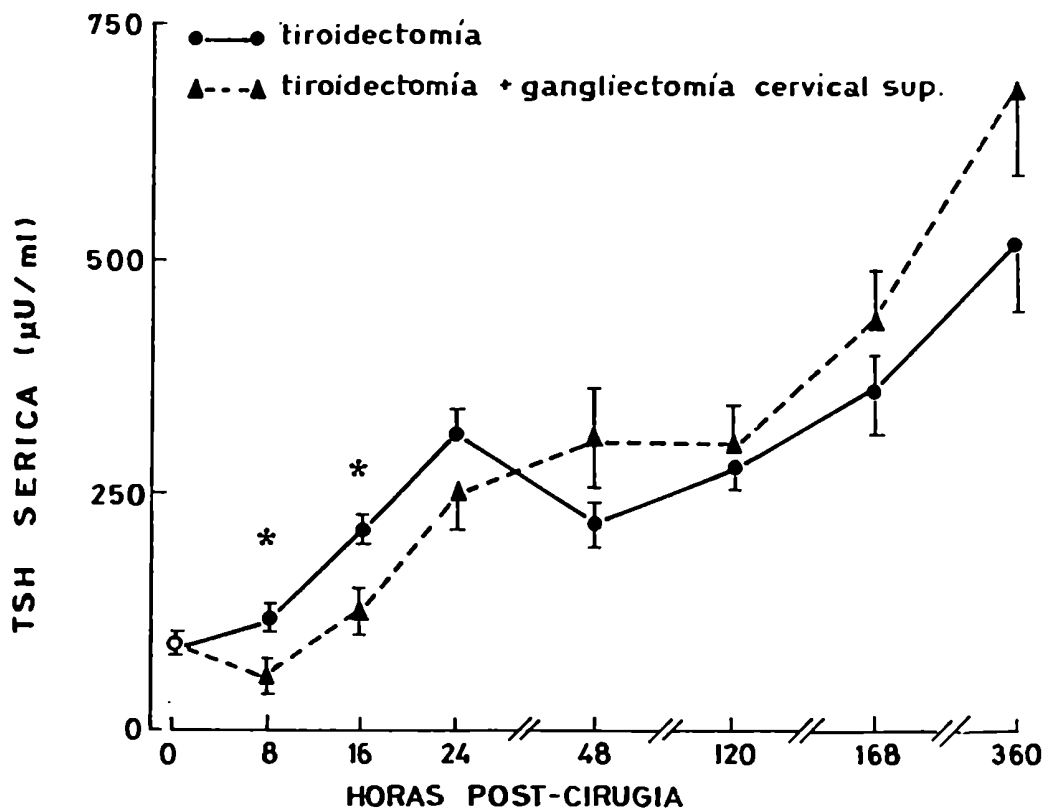
El experimento resumido en la Fig. 16 se diseñó para estudiar la influencia de los terminales periféricos sobre la secreción de TSH post Tiroidectomía quirúrgica. En los animales tiroprivos se produce el aumento esperado de TSH, que resulta en los GCSx bil. significativamente menor ($p < 0,01$ test de Student) en las primeras 24 horas tras la cirugía, durante el período de la de generación walleriana. A partir de la 48 hs. un análisis de la varianza (ANOVA) factorial, demostró que las concentraciones séricas de TSH son mayores en los GCSx bil. que en los controles únicamente de la GCSx 48 - 360 hs. post-tiroidectomía.

Tabla I: Cambios ponderales tiroideos en animales GCSx bil y con operación simulada.

<u>Grupos Experimentales</u>	<u>Peso Tiroideo</u> <u>(mgr./100 gr. Peso Corporal)</u>
Operación simulada	5,78 ± 0,26 (8)
GCSx bil.	5,69 ± 0,18 (8)
Control Intacto	5,73 ± 0,15 (16)

Animales sacrificados 28 días después de la cirugía. Cada valor representa el promedio ± ES; los números entre los paréntesis indican la cantidad de animales empleados. No hay entre los grupos diferencias estadísticas significativas.

FIGURA N° 16: EFECTOS DE LA GCSx SOBRE LOS NIVELES DE TSH SERICA EN ANIMALES TIROIDECTOMIZADOS BILATERALMENTE.



Los animales fueron operados simultáneamente practicándoseles GCSx bil. u operación simulada y ambos grupos tiroidectomía total. En cada intervalo de tiempo mostrado se tomaron muestras de sangre por el método de punción yugular. Cada punto representa el promedio \pm ES de 10 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre GCSx y operación simulada $*p < 0,01$ por test de Student. Un ANOVA de datos apareados revela diferencias en función del tiempo transcurrido tras la cirugía que comienzan a las 16 horas en las ratas tiroidectomizadas únicamente y a las 24 horas en las tiroidectomizadas y GCSx bil, ($p < 0,05$). Los valores de TSH entre las 48-360 horas fueron mayores en los animales GCSx que en aquellos con operación simulada, por ANOVA factorial ($p < 0,05$).

2- CAMBIOS EN EL EJE HIPOFISO TIROIDEO DURANTE LA DEGENERACION ANTEROGRADA DE LOS TERMINALES POST GCSx.

2.1- MODIFICACION DEL RITMO DIARIO DE TSH:

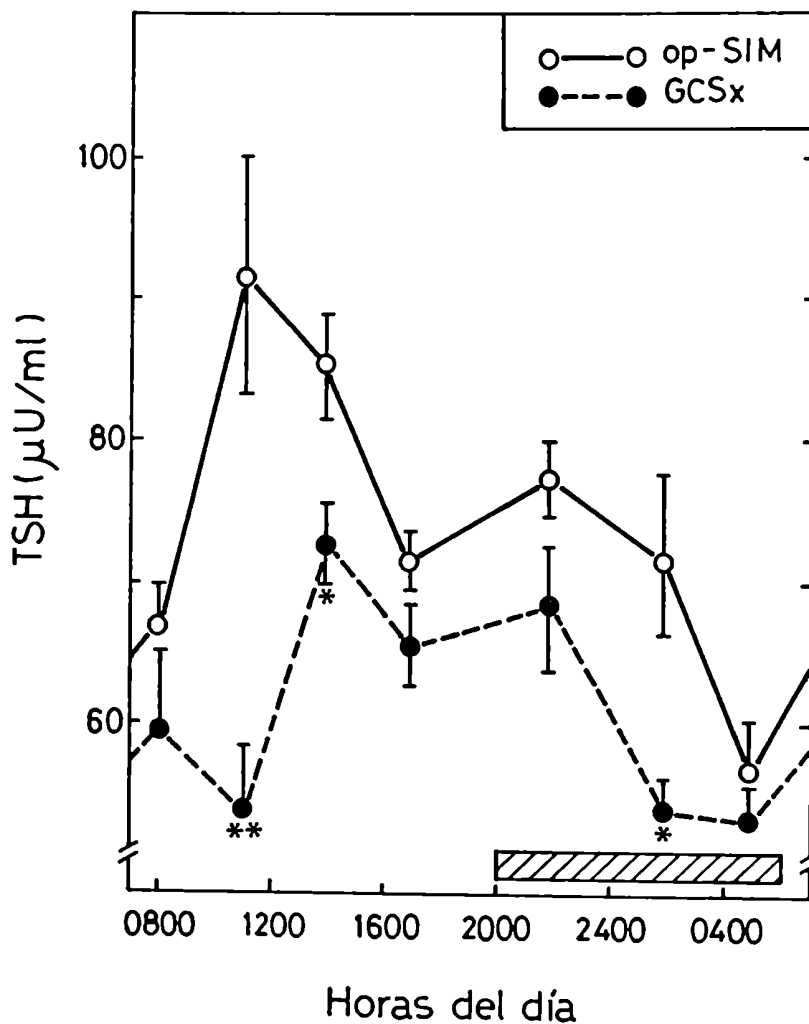
Es conocida la existencia de un ritmo diario de la actividad secretoria del eje hipofiso-tiroideo (280-284). El propósito de esta serie de experimentos fue analizar la influencia de la inervación simpática cervical sobre dicho ritmo. Con ese fin dos grupos de ratas fueron sometidas a GCSx bil. u operación simulada. Se tomaron muestras de sangre a intervalos de 4 horas, por punción yugular, en animales intervenidos quirúrgicamente 3 días antes, con el objeto de cubrir el período de degeneración anterógrada. En la Fig. 17 se representa el ritmo diario de TSH circulante; los animales control (operación simulada) tienen un máximo en la concentración hormonal entre las 1100 y 1500 hs. La degeneración de los terminales neurales post GCSx bil. no sólo provoca una disminución significativa en la concentración de TSH sérica ($p < 0,01$ por test de Student) sino también una alteración en su ritmo con un retraso de 3 horas en el pico máximo secretorio, con respecto a los controles.

2.2- MODIFICACION DEL RITMO DIARIO DE T₄

La determinación de T₄ sérica cada 4 horas, en las mismas condiciones anteriores, se encuentra resumida en la Fig. 18. Nuestros resultados demuestran la existencia en los animales controles (operación simulada) de 2 máximos secretorios de T₄: uno matinal 3 horas después del correspondiente de TSH y otro nocturno, no precedido por TSH, apareciendo 3 horas después de iniciarse el período de oscuridad. La T₄ tiene su secreción deprimida en los animales GCSx bil. con respecto a los controles ($p < 0,01$ por test de Student), produciéndose además un desplazamiento del máximo diurno hacia horas de la tarde y una desaparición del correspondiente máximo nocturno.

Nuestros resultados sugieren que, si bien la secreción del eje hipofiso tiroideo tiene ritmos propios originados en la conexión hipotálamo hipofisaria, la inervación simpática cervical ejercería un importante papel en la expresión y sincronización de los mismos.

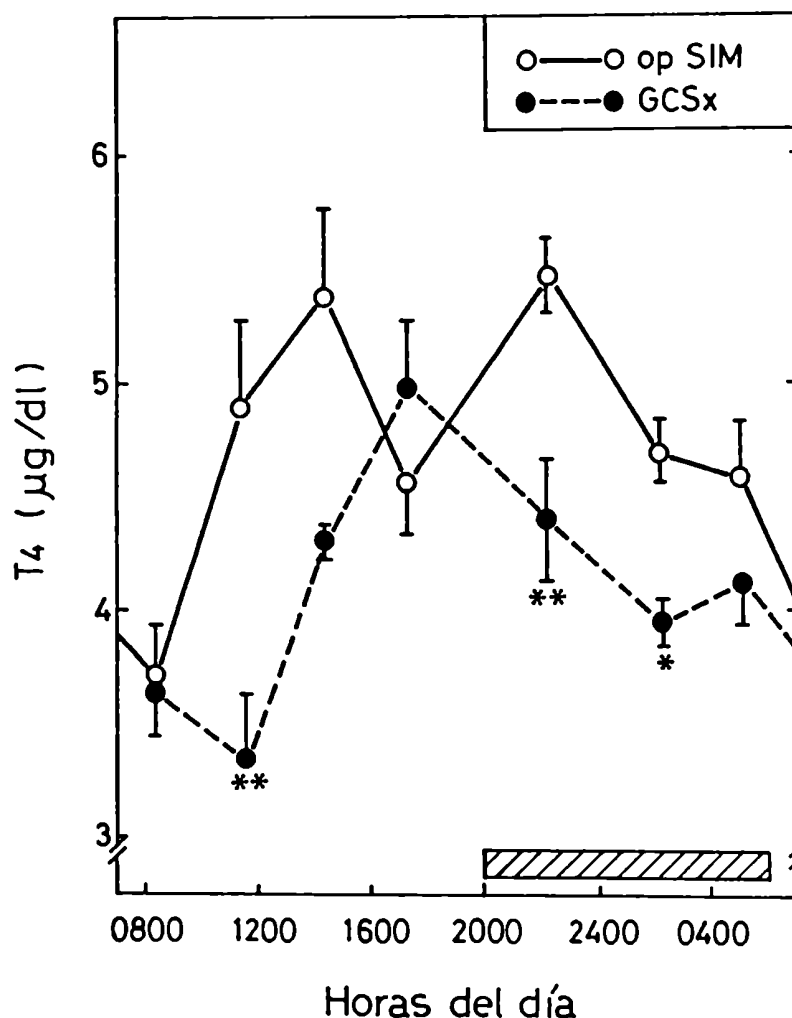
FIGURA N° 17: RITMO DIARIO DE TSH. ALTERACION POR GCSx. bil.



Los animales fueron GCSx bil. 3 días antes y el muestreo sanguíneo se realizó, en los tiempos fijados, por punción yugular según se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa un promedio \pm ES de 6-8 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los GCSx bil. y sus controles con operación simulada empleando el test de Student (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

En término medio los niveles de TSH en los GCSx son significativamente menores que en los controles ($p < 0,01$ por test de Student). Obsérvese el desplazamiento del máximo diurno en los GCSx bil.

FIGURA N° 18: RITMO DIARIO DE T₄. ALTERACION POR GCSx bil.



Los animales fueron GCSx bil. 3 días antes y el muestreo sanguíneo se realizó, en los horarios fijados, por punción yugular según se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm ES de 6-8 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los GCSx bil. y sus controles con operación simulada, empleándose el test de Student (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

En término medio los niveles de T₄ en los GCSx bil. son significativamente menores que en los respectivos controles ($p < 0,01$ por test de Student).

Obsérvese el desplazamiento del máximo diurno y la desaparición del máximo nocturno en los GCSx bil.

2.3- RITMO DIARIO DE CATECOLAMINAS INTRATIROIDEAS.

Está bien comprobado que la GCSx bil. lleva a la desaparición total de las catecolaminas tiroideas 24 horas después de la operación. No hay, sin embargo, ninguna descripción referente al ritmo diario en el contenido de catecolaminas en la glándula tiroides. Nos propusimos entonces verificar su existencia midiendo el contenido de NE, E y DA en animales, sacrificados cada 3 horas, durante un período completo de 24 horas.

La Figura 29 muestra las variaciones diarias en el contenido de NE intratiroidea, donde aparece un valor mínimo a las 1100 hs, 5 horas después de iniciarse la fase luminosa y un máximo a las 2300 hs, en plena fase de oscuridad. Los datos se comprobaron por análisis de la varianza (ANOVA), según test de Tukey, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$).

La E, ver Fig. 20, al igual que NE exhibe un pico máximo diario durante la noche, aunque en este caso se registra a las 0200 hs, con un incremento en el contenido a partir de las 2300 hs (ANOVA, test de Tukey, $p < 0,05$).

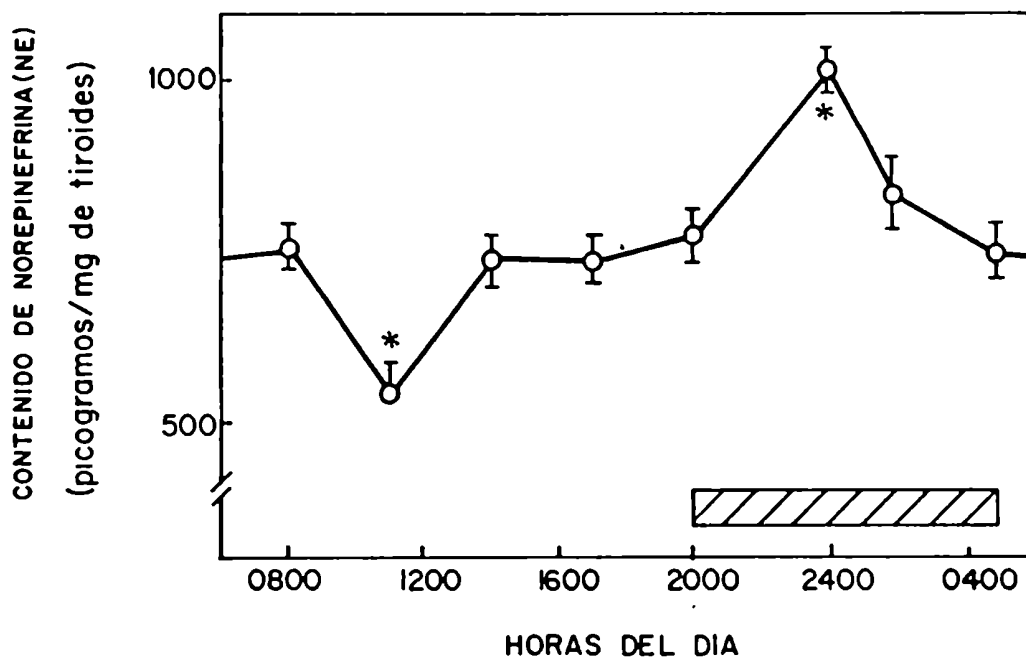
Contrariamente, la DA, Fig. 21, no muestra ninguna forma de secreción rítmica, pues no se observan diferencias estadísticamente significativas en su contenido intratiroideo, en los distintos tiempos del experimento.

2.4- RESPUESTA DE TSH AL TRH EN RATAS DURANTE LA DEGENERACION ANTEROGRADA POST GCSx bil.

Este experimento fué realizado a fin de determinar la sensibilidad hipofisaria al TRH, durante el período de liberación supraliminar de neurotransmisores, como consecuencia de la degeneración walleriana post GCSx bil.

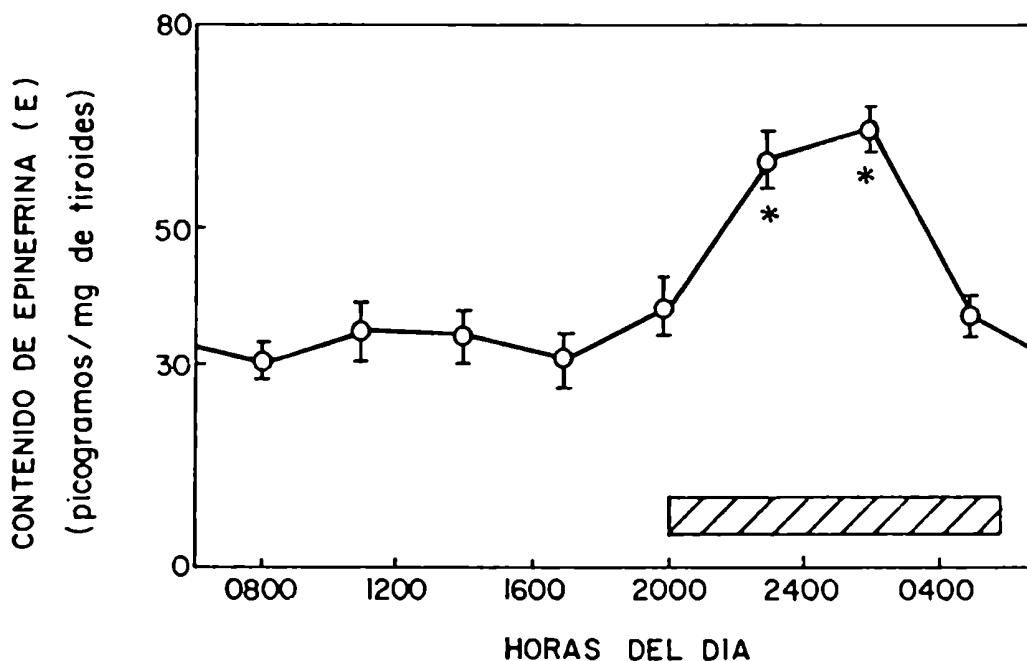
Dos grupos de ratas: con GCSx bil. u operación simulada efectuada 14 horas antes fueron inyectados, por vía intravenosa, con TRH obteniéndose una muestra sanguínea basal y otra 10 minutos después de la inyección (ver Fig. 22). Los niveles basales fueron significativamente menores en las ratas GCSx bil. ($p < 0,02$ por test de Student), pero la respuesta hipofisaria resultó similar en ambos grupos sugiriendo que los efectos postsinápticos de la degeneración walleriana se manifiestan principalmente a nivel hipotalámico.

FIGURA N° 19: RITMO DIARIO DE NE EN GLANDULA TIROIDES.



Variaciones en el contenido intratiroideo de NE a lo largo del día. Los animales fueron sacrificados en horarios establecidos, sus tiroides rápidamente resecadas y procesadas como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm ES de 10 determinaciones en cada intervalo de tiempo. Los asteriscos indican diferencias significativas mediante ANOVA empleándose el test de Tukey $*p < 0,05$. El contenido intratiroideo de NE exhibe un máximo a las 2300 hs. y un mínimo a las 1100 hs.

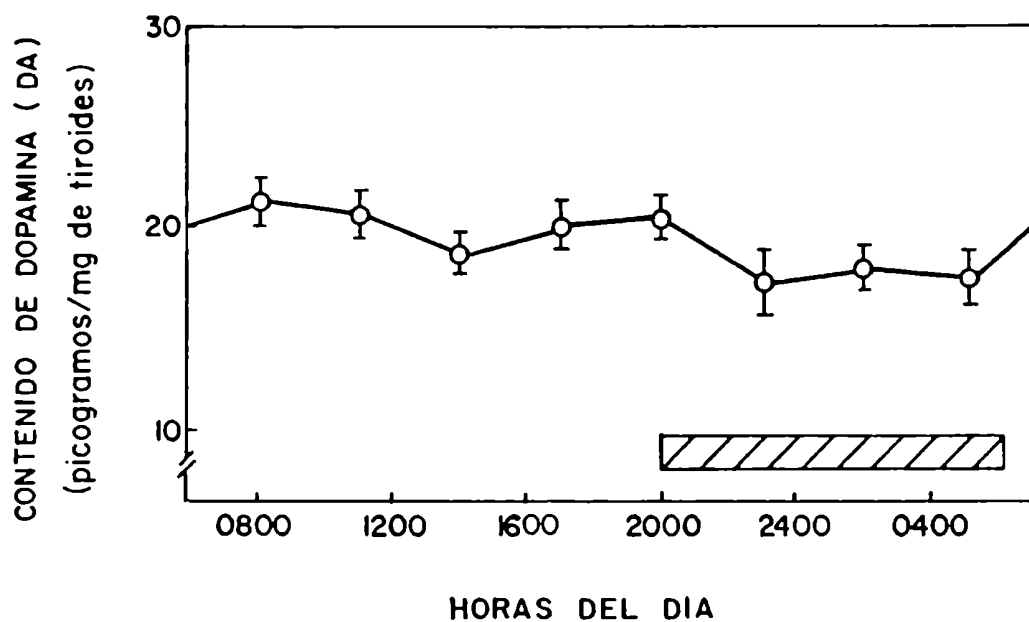
FIGURA N° 20: RITMO DIARIO DE E EN GLANDULA TIROIDES.



Variaciones en el contenido intratiroideo de E a lo largo del día. Los animales fueron sacrificados en horarios establecidos, sus tiroides rápidamente resecadas y procesadas como se describe en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio \pm ES de 10 determinaciones en cada intervalo de tiempo. Los asteriscos indican diferencias significativas mediante ANOVA empleándose el test de Tukey * $p < 0,05$.

El contenido intratiroideo de E se incrementa a partir de las 2100 hs y alcanza el valor máximo a las 2300 hs.

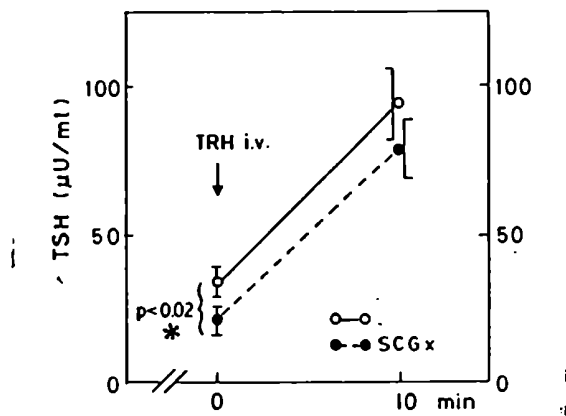
FIGURA N° 21: RITMO DIARIO DE DA EN GLANDULA TIROIDES.



El contenido intratiroideo de DA no muestra variaciones significativas a lo largo del día.

Los animales fueron sacrificados en horarios establecidos, sus tiroides rápidamente resecadas y procesadas tal como se describe en Material y Métodos. Cada punto representa el valor promedio \pm ES de 10 determinaciones.

FIGURA N° 22: RESPUESTA HIPOFISARIA AL TRH DURANTE LA DEGENERACION ANTEROGRADA POST GCSx bil.



Los animales fueron sometidos al GCSx bil. u operación simulada 14 horas antes de la inyección intravenosa de TRH. El muestreo basal (previo a la inyección) indica diferencias significativas entre ambos grupos (test de Student* $p < 0,02$). Cada punto representa el promedio \pm ES de 10 determinaciones. Obsérvese que 10 minutos después de la inyección las diferencias iniciales desaparecen. ●--● GCSx bil. ○--○ operación simulada.

2.5- RECEPTORES ADRENERGICOS INVOLUCRADOS EN LA INHIBICION DE TSH DURANTE LA DEGENERACION ANTEROGRADA.

Para identificar el tipo de receptor adrenérgico involucrado en las respuestas inhibitorias del eje hipófiso tiroideo durante la degeneración walleriana, se emplearon distintas drogas antagonistas. Como antagonista α adreno receptor se utilizó fenoxibenzamina, mientras como antagonista β adreno receptor se empleó propranolol. Estas drogas, individualmente o en combinación, fueron administradas por vía intraperitoneal 30 minutos antes del sacrificio, en animales que habían sido operados 14 horas antes por GCSx bil. u operación simulada.

En la Fig. 23 se observan como el antagonista α , la fenoxibenzamina, revierte la inhibición (33% con respecto a los controles) de la secreción de TSH producida por la degeneración anterógrada, restableciéndose el valor hormonal a niveles normales. El propranolol, antagonista β , resulta inefectivo para revertir tal inhibición y tampoco afecta, cuando se administra conjuntamente con la fenoxibenzamina, el efecto de esta última ($p < 0,05$ ANOVA, Test de Tukey).

Estos resultados permiten postular que la inhibición en la secreción de TSH durante la degeneración walleriana de los terminales simpáticos cervicales, está mediada por un receptor adrenérgico del tipo α (posiblemente α_1).

2.6- RECEPTORES ADRENERGICOS INVOLUCRADOS EN LA INHIBICION DE LA LIBERACION DE T₄ DURANTE LA DEGENERACION ANTEROGRADA.

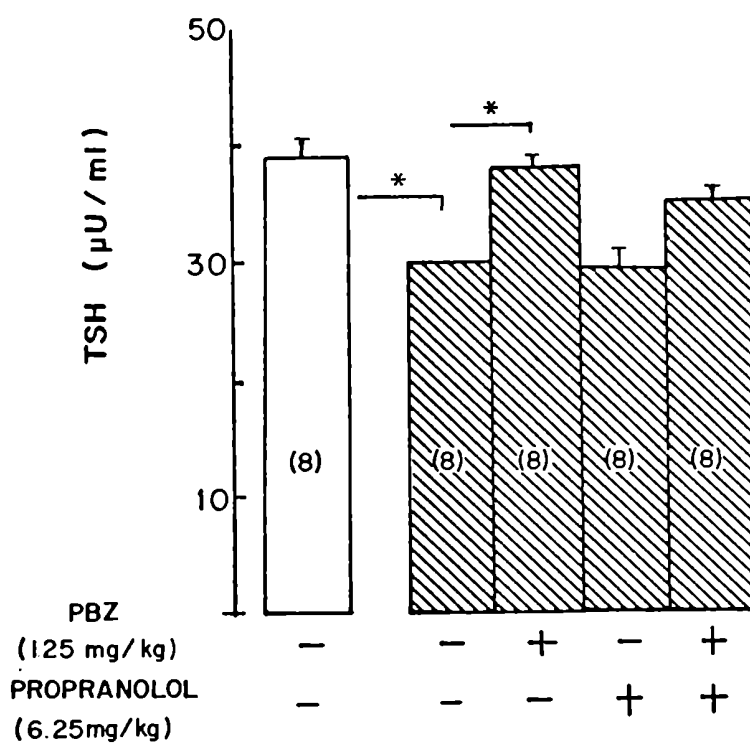
En la glándula tiroides, la degeneración post GCSx bil. provoca una pronunciada depresión en la secreción de T₄ de aproximadamente 30%.

El antagonista α , la fenoxibenzamina, revierte esta inhibición contrariamente al antagonista β , el propranolol, que la potencia aún más; experimento resumido en la Fig. 24. El máximo de inhibición en la liberación hormonal tiroidea durante la degeneración anterógrada aparece con el empleo asociado de ambos bloqueantes. Debe tenerse en cuenta, como se puede ver en la Fig. 23, que la aplicación conjunta de ambas drogas mantiene los niveles de TSH en sus valores normales en éstos animales.

Estos datos sugieren que en la glándula tiroides, los receptores α adrenérgicos juegan un rol inhibitorio, mientras que los β adrenérgicos tienen una

función estimuladora débil. También es probable la existencia de otro mediador no adrenérgico, que se libera durante la degeneración walleriana, ejerciendo un efecto inhibitorio potente.

FIGURA N° 23: EFECTO DE LA GCS x bil. SOBRE LA TSH SERICA. EMPLEO DE α y β ADRENOCEPTORES ANTAGONISTAS.





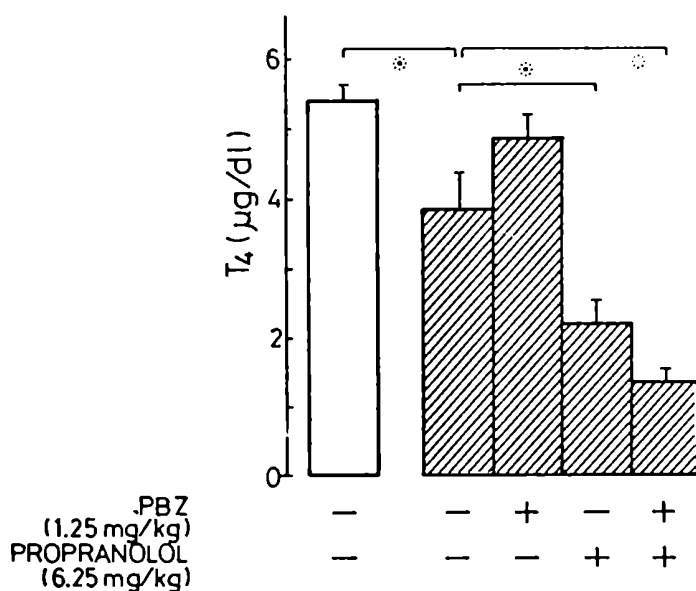


Los animales fueron GCSx bil. 14 horas antes de su sacrificio. La inyección de las distintas drogas (en 0,2 ml. de solución salina al 0,9% como vehículo) se realizó 30 minutos antes de la decapitación y obtención de las muestras sanguíneas para el RIA. Las barras representan el promedio \pm ES de 8 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas mediante ANOVA, empleando el test de Tukey * $p < 0,05$.  GCSx bil.  operación simulada.

FIGURA N° 24: EFECTO DE LA GCSx bil. SOBRE LA T₄ SERICA. EMPLEO DE α Y β ADRENOCEPTORES ANTAGONISTAS.



Los animales fueron GCSx bil.; 14 horas antes de su sacrificio. La inyección de las distintas drogas (en 0,2 ml. de solución salina al 0,9% como vehículo) se realizó 30 minutos antes de la decapitación y obtención de las muestras sanguíneas para el RIA. Las barras representan el promedio \pm ES de 8 determinaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas mediante ANOVA, empleando el test de Tukey *p < 0,05.  GCSx bil.  operación simulada.

3- EFECTOS DE GCSx BIL. EN LA ADAPTACION DE LAS RATAS A AMBIENTES

FRIOS:

Con el objeto de analizar el valor fisiológico de la actividad de GCSx sobre el eje hipófiso-tiroideo; decidimos examinar la adaptación al frío de grupos de ratas durante la degeneración walleriana post GCSx bil.. La exposición aguda a dicho stress desencadena la secreción de TSH en los roedores y el consiguiente aumento de las hormonas tiroideas en el plasma.

Un ambiente adecuado para los ensayos se consiguió en una cámara fría (temperatura de $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$), donde los animales contaban con abundante comida y agua "ad libitum".

Durante la degeneración anterógrada simpática, se produce la muerte dentro de las primeras 48 horas, de casi todos los animales sometidos al frío (Test χ^2) en comparación con los controles de operación simulada, datos expuestos en la Tabla II. En un segundo experimento se procedió a preadaptar a los animales, durante un mes, a las condiciones de la cámara fría antes de ser operados. Los resultados de la tabla III exhiben igualmente la mortalidad de los animales GCSx bil., similar a la producida en el experimento anterior.

Estos datos parecen indicar que el funcionamiento normal del sistema simpático cervical, resulta un requisito indispensable para la adaptación de las ratas a un ambiente frío.

Tabla II: Sobrevida de ratas expuestas al frío ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante las primeras 48 horas tras GCSx bil. u operación simulada.

GRUPO EXPERIMENTAL	Animales	Animales	% de Sobrevida
	Vivos	Muertos	
Operación Simulada	9	1	90 %
GCSx bil.	1	9	10 %

Cada grupo experimental cuenta con 10 animales.

Las diferencias entre los animales GCSx bilateral y aquellos con operación simulada son significativas según Test de χ^2 ($p < 0,01$).

Tabla III: Sobrevida de ratas expuestas al frío ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante las primeras 48 horas tras GCSx bil. u operación simulada. Animales preadaptados a dicho ambiente.

GRUPO EXPERIMENTAL	Animales		% de Sobrevida
	Vivos	Muertos	
Operación simulada	10	0	100 %
GCSx bil.	0	10	0 %

Cada grupo experimental cuenta con 10 animales los que antes de ser intervenidos quirúrgicamente fueron preadaptados a las condiciones frías ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), durante 1 mes en la cámara fría. Las diferencias entre los animales GCSx y aquellos con operación simulada son significativas según Test de χ^2 $p < 0,01$.

4- ESTUDIOS SOBRE LOS CAMBIOS TARDIOS TIROIDEOS POST GCSx UNIL.

En esta sección se estudiaron los cambios, tanto ponderales como bioquímicos tiroideos, cuando ya ha finalizado el período de degeneración anterógrada y se ha completado la desnervación. Se utilizó el modelo experimental de la hipertrofia compensadora inducida por ablación quirúrgica unilateral de un lóbulo tiroideo, para analizar la influencia ejercida por la inervación simpática, en una situación con niveles de TSH circulantes elevados.

4.1- HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS.

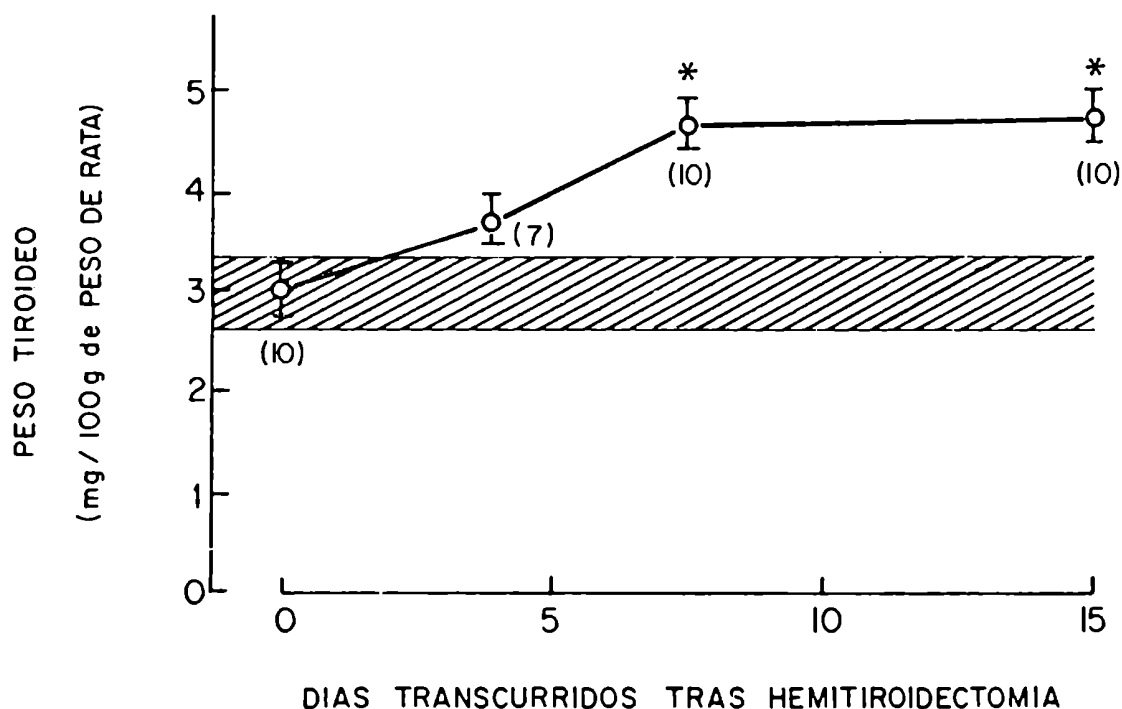
La ablación unilateral o parcial de un órgano endócrino (o no endócrino), induce el fenómeno de hipertrofia compensadora del tejido remanente. Este fenómeno se analizó en la tiroides en el experimento resumido de la Fig. 25. Tras la hemitiroidectomía, el lóbulo remanente aumenta de peso en forma lineal hasta el 7^{mo} día, para luego estabilizarse hasta el día 15 (tiempo máximo de duración del experimento). Este incremento en el peso de lóbulo hipertrofiado fue de 45%, con respecto al peso promedio de lóbulos individuales tomados de animales control. Es decir no se observó, en nuestras condiciones experimentales, una compensación completa tras la hemisección tiroidea.

4.2- HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS SOMETIDAS A GCSx unil. DEL LOBULO REMANENTE.

La Fig. 26 exhibe los resultados de una serie de experimentos donde se practicó una GCSx unil. ipsilateral del lóbulo remanente, tras la hemitiroidectomía.

La destrucción de las fibras simpáticas responsables de la inervación tiroidea, produce una ampliación del fenómeno hipertrófico. En los lóbulos desnervados el incremento de peso alcanza un 79% con respecto a los controles, superando en casi un 50% al peso de los lóbulos hipertróficos en animales con inervación intacta ($p < 0,01$).

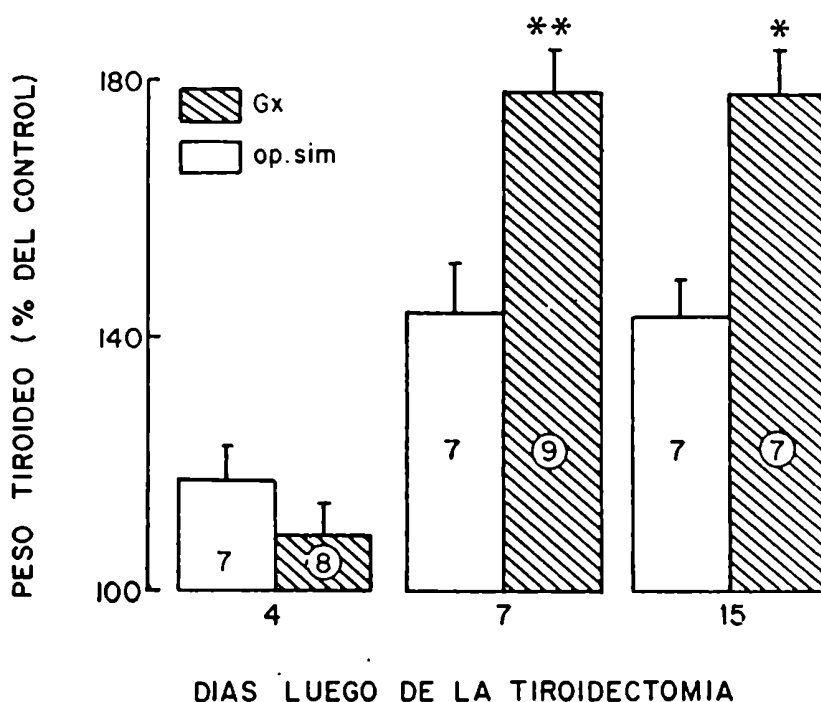
FIGURA N° 25: HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS TRAS HEMITIROIDECTOMIA.
CURVA DE TIEMPO.



Los animales fueron hemitiroidectomizados, sacrificados a distintos tiempos y sus lóbulos tiroideos remanentes pesados (el valor en peso está referido a 100 g de peso de rata). La barra rayada en la zona media, representa el promedio \pm ES de 10 lóbulos tiroideos extraídos de animales controles con operación simulada. Cada punto representa el valor promedio \pm ES de un número variable (valor entre los paréntesis) de muestras para cada caso.

La curva demuestra que el peso referido del lóbulo remanente se incrementa hasta alcanzar una meseta a los 7 días y se mantiene hasta el día 15, tiempo máximo de duración del experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los controles y los hipertróficos empleando el test de Student $*p < 0,05$.

FIGURA N° 26: HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS SOMETIDAS A GCSx unil. IPSILATERAL AL LOBULO REMANENTE TRAS HEMITIROIDECTOMIA. CURVA DE TIEMPO.



Los animales fueron hemitiroidectomizados y se practicó GCSx unil. al lóbulo remanente. Tras el sacrificio, a distintos tiempos, los lóbulos remanentes fueron pesados y referidos al peso corporal de cada animal.

Cada barra representa el promedio \pm ES de 7 determinaciones en el caso de hemitiroidectomía únicamente y un número variable (valor entre los paréntesis) para los hemitiroidectomizados y GCSx unil.

La hipertrofia ampliada se desarrolla a partir del 7º día tras la cirugía.

Los asteriscos indican diferencias significativas entre los lóbulos hipertrofos y aquéllos con hipertrofia ampliada por GCSx unil., empleando el test de Student *p < 0,05 **p < 0,01.

4.3- CAMBIOS HORMONALES DURANTE LA HIPERTROFIA COMPENSADORA EN ANIMALES GCSx unil. Y CON OPERACION SIMULADA.

Una pregunta que surge en este punto del trabajo es si los cambios ponderales observados durante la hipertrofia compensadora y la hipertrofia ampliada por la GCSx unil. se acompañaban de cambios correspondientes en la función glandular.

Las tablas IV y V muestran los resultados del experimento diseñado para responder a dichos interrogantes.

Los animales fueron intervenidos quirúrgicamente 15 días antes de su sacrificio y las muestras de sangre para los RIA se recogieron por decapitación. Corroborando la observación ponderal (compensación incompleta, en ratas hemitiroidectomizadas), los niveles de T₄ en animales con un sólo lóbulo (hipertrofico) fueron 33% menores a los obtenidos de animales controles intactos respectivos. Se observó así mismo, un incremento del 80% en la concentración de TSH con respecto a similar parámetro hormonal registrado en los animales intactos ($p < 0,05$ Test de Student). En cambio la hipertrofia compensadora ampliada por GCSx unil., se acompaña de una real compensación funcional con valores hormonales indistinguibles de los controles.

4.4- HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS HIPOFISOPRIVAS.

La siguiente serie de experimentos fue programada con objeto de examinar la producción o no de hipertrofia compensadora en ausencia de TSH hipofisaria. Para ello utilizamos animales hipofisectomizados por la técnica transauricular, detallada en Materiales y Métodos.

En la Fig. 27 se puede apreciar que la hipofisectomía provoca una marcada regresión ponderal, como revela el estudio estadístico por ANOVA factorial ($p < 0,05$). Siete días después de la hemitiroidectomía no se afecta la involución inducida por la hipofisectomía, pero a los 15 días se manifiesta en los animales hipofisoprivos un crecimiento del lóbulo remanente de 30% de su peso ($p < 0,01$ por Test de Student). Los animales sometidos a hipofisectomía simulada mostraron el incremento esperado para 7 y 15 días post hemitiroidectomía, indistinguible del que se observa en la Fig. 25.

La ausencia de una interacción estadísticamente significativa por ANOVA

Tabla IV: Niveles séricos de TSH en animales con hipertrofia compensadora inducida por hemitiroidectomía y con hipertrofia compensadora ampliada por GCSx.unil. al lóbulo remanente.

<u>Grupos Experimentales</u>	<u>TSH μU/ml</u>	
	Hemitiroidectomía Simulada	Hemitiroidectomía
Operación simulada	56,1 \pm 7,5 (7)	101,5 \pm 17,2 (6)*
GCSx unil.	52,2 \pm 7,6 (6)	77,2 \pm 17.0(6)

Los animales fueron sometidos a las distintas manipulaciones quirúrgicas 15 días antes de su sacrificio para obtener las muestras sanguíneas y los lóbulos tiroideos. Cada valor representa el promedio \pm ES de el número de determinaciones que figura entre los paréntesis.

El asterisco indica diferencias significativas entre hemitiroidectomía y controles por comparación simulada, test de Student. *p < 0,05.

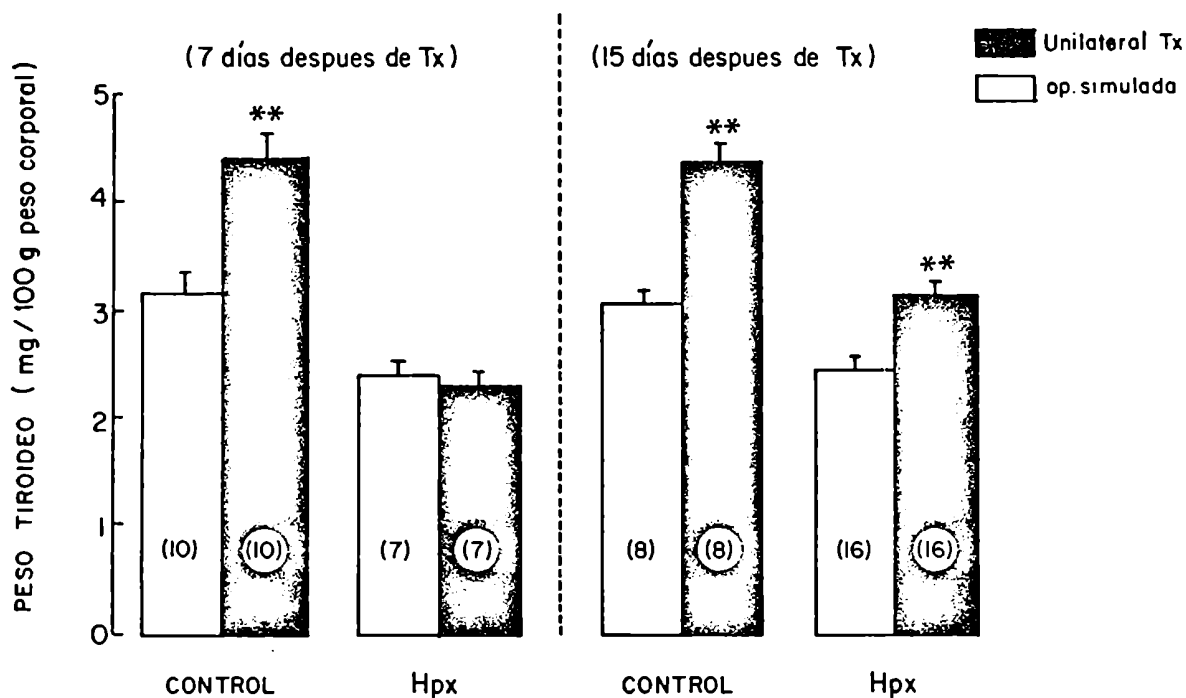
Tabla V: Niveles séricos de T4 en animales con hipertrofia compensadora inducida por hemitiroidectomía y con hipertrofia compensadora ampliada por GCSx. bil al lóbulo remanente.

<u>Grupos Experimentales</u>	<u>T4 μg / dl.</u>	
	<u>Hemitiroidectomía simulada</u>	<u>Hemitiroidectomía</u>
Operación simulada	4,5 \pm 0,5 (6)	3,0 \pm 0,4 (6)*
GCSx unil.	4,9 \pm 0,5 (5)	4,8 \pm 0,8 (6)

Los animales fueron sometidos a las distintas manipulaciones quirúrgicas 15 días antes de su sacrificio para obtener las muestras sanguíneas y los lóbulos tiroideos. Cada valor representa el promedio \pm ES de un número de determinación que figura entre los paréntesis.

El asterisco indica diferencias significativas entre hemitiroidectomía y controles con operación simulada por test de Student *p < 0,05.

FIGURA N° 27: HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS HIPOFISOPRIVAS. CURVA DE TIEMPO.



Los animales fueron sometidos a hipofisectomía, por el método transauricular, 2 días antes de practicárseles la hemitiroidectomía. Las barras representan el valor promedio \pm ES de un número de determinaciones que figuran entre los paréntesis. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los hemitiroidectomizados y sus respectivos controles según test de Student $**p < 0,01$. Estos datos analizados por ANOVA factorial indican efectos significativos de la hemitiroidectomía ($p < 0,01$) y la hipofisectomía ($p < 0,01$) 7 días después de la cirugía.

Una interacción entre la hemitiroidectomía e hipofisectomía sólo es aparente a partir del 7° día de la cirugía ($p < 0,05$).

factorial, entre la hipofisectomía y la hemitiroidectomía, cuando los datos se obtienen a los 15 días de transcurrida la cirugía, sugieren que ocurre similar: crecimiento hipertrófico independiente de la presencia o no de la hipofis.

4.5- HORMONAS PLASMATICAS EN LA HIPERTROFIA COMPENSADORA DE RATAS HIPOFISOPRIVAS

Los niveles de T4 y TSH, Tablas VI y VII, caen a valores en el límite de detección por el método de RIA (0,4 μ g/dl para T4 y 11 μ U/ml para TSH), como consecuencia de la hipofisectomía. En ratas con esta operación simulada, se observaron cambios semejantes a los detectados en los animales descriptos en el apartado 4.3.; es decir una caída del 30% en T4 y un aumento del 80% de TSH sérica en las ratas hemitiroidectomizadas.

4.6- EFFECTOS DE LA GCSx unil. SOBRE LA HIPERTROFIA COMPENSADORA EN ANIMALES HIPOFISECTOMIZADOS.

Como se ha visto en el punto 4.2., la desnervación simpática del lóbulo hipertrófico, amplifica su crecimiento. Quisimos entonces examinar si tal amplificación era también detectable en las ratas hipofisectomizadas.

La GCSx unil. ipsilateral al lóbulo remanente tras hemitiroidectomía, en animales hipofisoprivos, indujo una marcada atrofia de dicho lóbulo, haciendo desaparecer el fenómeno hipertrófico, Fig. 38 (ANOVA Test de Scheffé $p < 0,01$). Esta atrofia también se observa en animales hipofisectomizados con ambos lóbulos tiroideos intactos, sobre uno de los cuales se le practica la GCSx unil.. El lóbulo desnervado disminuye su peso un 15% con respecto al lóbulo que mantiene su inervación: Tabla VIII (test de Student apareado $p < 0,01$).

Estas observaciones nos hacen suponer que, en condiciones de hipofisectomía, la inervación simpática cervical posee algún factor trófico para el mantenimiento glandular.

Tabla VI: Niveles séricos de TSH en animales Hipofisoprivos y Hemitiroidectomizados.

<u>Grupos experimentales</u>	<u>TSH μU / ml.</u>	
	<u>Hemitiroidectomía simulada</u>	<u>Hemitiroidectomía</u>
Hipofisectomía simulada	51,1 \pm 6,7 (6)	93,7 \pm 12,2 (11)*
Hipofisectomía	18,0 \pm 2,7 (7)	15,7 \pm 1,8 (11)

Los animales fueron hipofisectomizados, 2 días después hemitiroidectomizados y 15 días más tarde sacrificados para obtener las muestras sanguíneas y los lóbulos tiroideos. Cada valor de la tabla representa el promedio \pm ES del número de determinaciones que figuran entre los paréntesis.

Hay diferencias significativas entre los animales controles y los hemitiroidectomizados (ambos con operación simulada de hipofisectomía) según el test de Student *p < 0,05.

No hay diferencias entre ambos grupos de animales hipofisoprivos, los niveles de TSH caen en el límite de detección del RIA.

Tabla VII: Niveles séricos de T₄ en animales hipofisoprivos y hemitiroidectomizados.

<u>Grupos Experimentales</u>	<u>T₄ μg / ml.</u>	
	<u>Hemitiroidectomía simulada</u>	<u>Hemitiroidectomía</u>
Hipofisectomía simulada	4,8 \pm 1,3 (5)	3,1 \pm 0,3 (6)*
Hipofisectomía	0,6 \pm 0,2 (6)	0,4 \pm 0,03 (11)

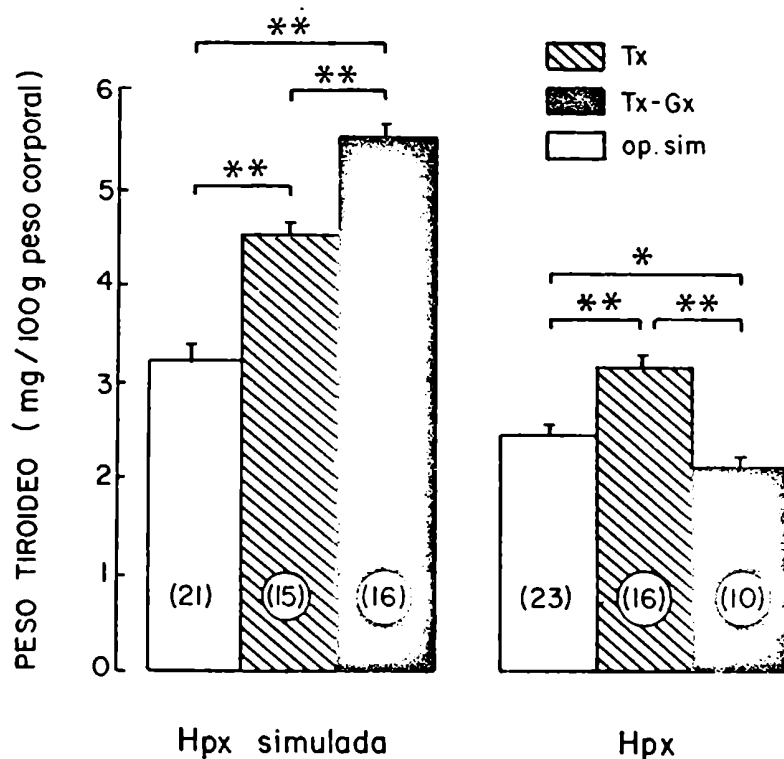
Los animales fueron hipofisectomizados, 2 días después hemitiroidectomizados y 15 días más tarde sacrificados para obtener las muestras sanguíneas y los lóbulos tiroideos

Cada valor de la tabla representa el promedio \pm ES del número de determinaciones que figura entre los paréntesis.

Hay diferencias significativas entre los animales controles y los hemitiroidectomizados (ambos con operación simulada de hipofisectomía) según test de Student (* $p < 0,05$).

No hay diferencias entre ambos grupos de animales hipofisoprivos, los niveles de T₄ caen en el límite de detección del RIA.

FIGURA N° 28: HIPERTROFIA COMPENSADORA TIROIDEA EN RATAS NORMALES E HIPOFISO PRIVAS. EFECTOS DE LA GCSx unil. CRONICA IPSILATERAL AL LOBULO REMANENTE.



Los animales fueron hipofisectomizados, por vía transauricular, 2 días antes de la hemitiroidectomía y la GCSx unil. ipsilateral al lóbulo remanente. El sacrificio se realizó 15 días después de la última cirugía; los lóbulos tiroideos resecados, pesados y referidos al peso corporal animal. Las barras representan el valor promedio \pm ES del número de determinaciones que figura entre los paréntesis. Los asteriscos indican diferencias significativas por ANOVA empleando el test de Scheffé *p < 0,05 **p < 0,01.

Obsérvese la atrofia inducida por la GCSx unil al lóbulo remanente en los animales hipofisoprivos.

Tabla VIII: Efecto de la GCSx unilateral en animales hipofisoprivos.

Muestra	Peso tejido tiroideo mgr.	100 gr. de peso corporal del animal
Lóbulo tiroideo izquierdo	2,18 ± 0,11*	(desnervado)
Lóbulo tiroideo derecho	2,45 ± 0,11	(inervado)

Las ratas fueron sometidas a hipofisectomía 2 días antes de practicárseles GCSx unil. izquierda y sacrificadas 15 días después. Los valores presentados en la tabla muestran el promedio ± ES en el peso del lóbulo tiroideo para 7 animales. El test de Student para muestras apareadas determina diferencias significativas entre el lóbulo inervado y el desnervado (*p < 0,01).

4.7- CAMBIOS HORMONALES DURANTE LA HIPERTROFIA COMPENSADORA DE ANIMALES HIPOFISOPRIVOS.

La hipofisectomía provoca la caída, tanto de TSH (por extirpación de la glándula) como de T4, a niveles en el límite de detección del RIA, datos mostrados en las tablas IX y X. Ninguno de los procedimientos quirúrgicos fue capaz de modificar esta situación.

Tabla IX: Niveles séricos de TSH en animales hipofisoprivos 15 días después de la hemitiroidectomía y GCSx unil. ipsilateral al lóbulo remanente.

<u>Grupos Experimentales</u>	TSH μ U / ml.
Hemitiroidectomía simulada	17,0 \pm 8,7 (6)
Hemitiroidectomía	18,2 \pm 1,8 (6)
Hemitiroidectomía + GCSx unil.	17,1 \pm 2,4 (6)

Los animales fueron sometidos a hipofisectomía transauricular 2 días antes de practicárseles las distintas operaciones.

Los valores presentados en la tabla muestran el promedio \pm ES de seis determinaciones (números entre los paréntesis).

Nótese que no hay diferencias significativas entre los distintos procedimientos quirúrgicos sobre los niveles de TSH, deprimidos por la hipofisectomía y que están en el límite de detección del RIA.

Tabla X: Niveles séricos de T₄ en animales hipofisoprivos 15 días después de la hemitiroidectomía y GCSx unil. ipsilateral al lóbulo remanente.

<u>Grupos Experimentales</u>	T ₄ Ag / dl.
Hemitiroidectomía simulada.	0,7 ± 0,1 (6)
Hemitiroidectomía	0,4 ± 0,04 (6)
Hemitiroidectomía + GCSx unil.	0,6 ± 0,1 (6)

Los animales fueron sometidos a hipofisectomía transauricular 2 días antes de practicárseles las distintas operaciones.

Los valores exhibidos en la tabla representan el promedio ± ES de 6 determinaciones (número entre los paréntesis).

Nótese que no hay diferencias significativas entre las distintas operaciones sobre los niveles de T₄ deprimidos tras la hipofisectomía.

Esos niveles séricos de T₄ se encuentran en el límite de detección del RIA.

5- EFECTO DE LA GCSx SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DURANTE EL DESARROLLO DE LA HIPERTROFIA COMPENSADORA EN RATAS HEMITIROIDECTOMIZADAS

Ante los cambios ponderales y funcionales de los lóbulos tiroideos inervados o desnervados, durante el desarrollo de la hipertrofia compensadora, nos propusimos analizar las modificaciones en el índice mitótico que podrían acompañar a este proceso. Animales sobre los cuales se practicaron, 48 hs. antes, las distintas manipulaciones quirúrgicas, fueron inyectados con colchicina (2,2 mg/Kg) y sacrificados 3 hs. después. Esta droga, un agente antimitótico, permite valorar la tasa de división celular (deteniéndola principalmente en metafase) y por lo tanto es un buen índice de la hiperplasia folicular.

Los lóbulos se resecaron, fijaron y procesaron, siguiendo el procedimiento histológico reseñado en Materiales y Métodos. Los cambios en el índice mitótico se resumen en la Tabla XI; la actividad mitótica se incrementa casi 20 veces durante la hipertrofia compensadora. La desnervación simpática, que amplía ponderalmente la hipertrofia (ver III. 4.2), provoca un incremento celular significativamente mayor que en el caso anterior del lóbulo inervado ($p < 0,01$) y unas 40 veces superior con respecto a los controles.

La foto 1 muestra una vista panorámica de un corte histológico de la glándula tiroidea, donde se observan los folículos. En la Foto 2 se exhiben células foliculares en división mitótica, detenida por la acción de la colchicina.

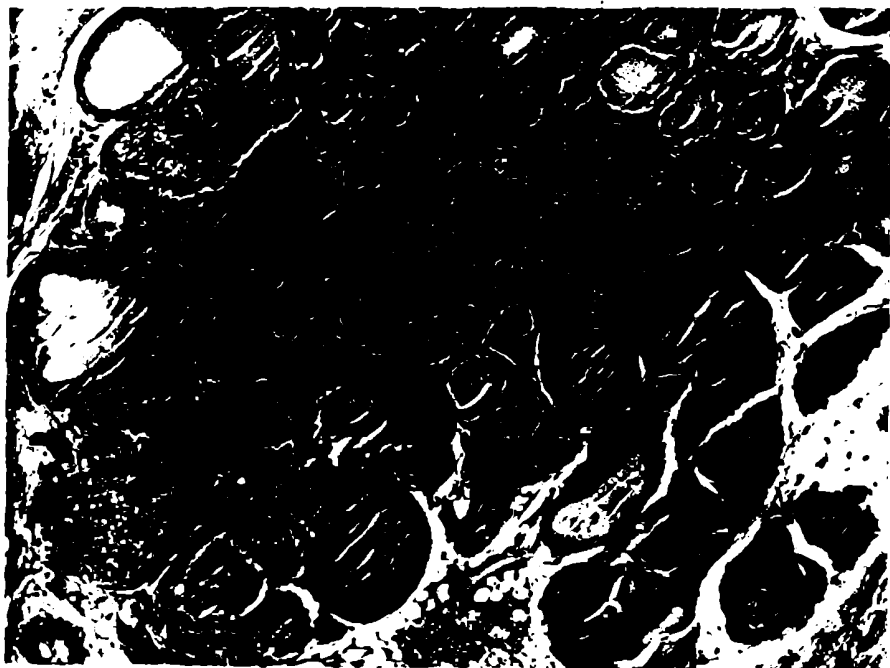
Los estudios histológicos de animales operados 15 días antes y por tanto con hipertrofia desarrollada plenamente, no mostraron diferencias entre los lóbulos que conservaban su inervación simpática o habían sido desnervados.

Tabla XI: Índice mitótico durante la hipertrofia compensadora.

<u>Grupos Experimentales</u>	<u>por 1000cel. foliculares</u>	<u>por 100 folículos</u>
Controles	1,9 ± 0,23 (10)	3,3 ± 0,26% (10)
Hemitiroidectomia	18,2 ± 5,41 (5)*	22,2 ± 9,09% (5)*
Hemitiroidectomia + GCSx unil.	41,8 ± 2,83 (7)*	46,5 ± 7,53% (7)*

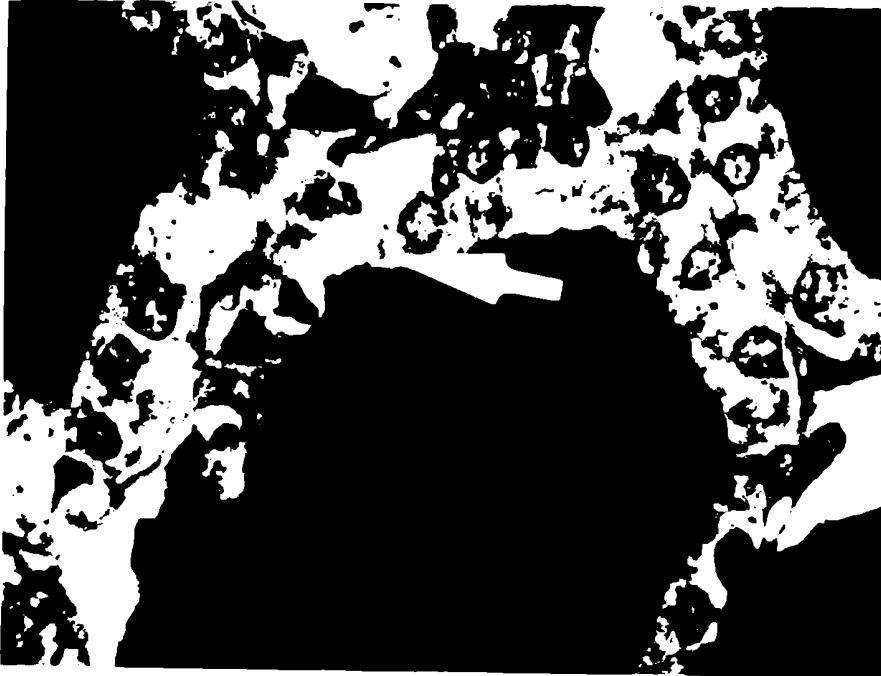
Dos días después de las operaciones los animales fueron inyectados intraperitonealmente con colchicina (2,2 mg./Kg.) y sacrificadas 3 horas después. Los lóbulos tiroideos se procesaron histológicamente según se describe en Materiales y Métodos. Los valores en la tabla representan el promedio ± ES de varias determinaciones; los números entre los paréntesis indican la cantidad de lóbulos estudiados en cada caso. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos por ANOVA según test de Scheffé *p < 0,01.

FOTO N° 1



Folículos tiroideos: aumento 400x.

FOTO N° 2



Células foliculares en división mitótica detenida en metafase: 2000x.

6-ORIGEN DE LA INERVACION SIMPATICA TIROIDEA

Como se ha mencionado en la Introducción (I.2.2) hay detallados estudios sobre la anatomía e histología del GCS que constan en la bibliografía (35)(39) (40). Por el contrario, es poca la información referente a los grupos neuronales involucrados en la inervación de las estructuras comprendidas en el territorio de las proyecciones simpáticas cervicales. Una excepción en este aspecto lo constituye la glándula pineal (40), pero nada hay descrito para la tiroidea. Basándonos en estos antecedentes nos propusimos, como último experimento de esta Tesis, localizar la vía de proyección y la ubicación de los cuerpos neuronales involucrados en la inervación tiroidea.

6.1- EFECTO DE LA Dc Y LA GCSx unil. SOBRE EL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS INTRATIROIDEAS.

Los efectos de la GCSx unil y la Dc sobre el contenido tiroideo de NE y E se muestran en las tablas XII y XIII respectivamente. Ambos procedimientos quirúrgicos provocan una marcada caída en el contenido de catecolaminas intratiroides, disminución que equivale del 84 al 94% con respecto al lóbulo contralateral inervado, cuyos valores de NE y E son normales (268) ($p < 0,01$ para NE y $p < 0,001$ para E). El hecho de que la Dc tenga las mismas consecuencias que una desnervación (GCSx) sugiere que los cuerpos neuronales responsables de la inervación tiroidea, no tienen asiento anatómico en el GCS.

6.2- EFECTO DE LA Dc Y LA GCSx unil. SOBRE EL CONTENIDO DE CATECOLAMINAS EN LA GLANDULA PINEAL.

La Tabla XIV resume los resultados obtenidos cuando se determina el contenido en la glándula pineal de ratas con las mismas operaciones citadas en 6.1. La GCSx unil., pero no la Dc., provoca una disminución significativa del contenido de neurotransmisores ($p < 0,01$). Los valores de NE pineal en ratas Dc. fueron normales, dentro del orden de los observados en éste y otros laboratorios (282), para ratas de la misma cepa Wistar.

Tabla XII: Contenido de cotelaminas intratiroides en animales con GCSx unil. 7 días antes.

	<u>Glándula Tiroides</u>	
	<u>Lóbulo Ipsilateral</u>	<u>Lóbulo Contralateral</u>
pg. NE/mg. tejido	33,8 ± 11,5*	505,2 ± 40,8
pg. E/mg. tejido	4,2 ± 1,3**	25,7 ± 7,4

Los niveles de NE y E se determinaron por el método radioenzimático, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores presentados en la tabla muestran los promedios ± ES de 8 animales en cada grupo.

Los asteriscos indican diferencias significativas entre el lóbulo ipsilateral (desnervado) y el lóbulo contralateral (inervado) como lo demuestra el test de Student para muestras apareadas *p < 0,01 **p < 0,01.

Tabla XIII: Contenido de catcolaminas intratiroides en animales con Dc cervical 7 días antes.

	<u>Glándula Tiroides</u>	
	<u>Lóbulo ipsilateral</u>	<u>Lóbulo contralateral</u>
pg. NE/mg. tejido	26,9 ± 6,5*	436,1 ± 72,0
pg. E/mg. tejido	4,3 ± 1,2**	20,7 ± 3,5

Los niveles de NE y E se determinaron por el método radioenzimático como se describe en Materiales y Métodos. Los valores exhibidos en la tabla muestran los promedios ± ES de 8 animales en cada grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el lóbulo ipsilateral (Dc del ganglio) y el lóbulo contralateral (ganglio completo) empleando el test de Student para muestras apareadas *p < 0,001 **p < 0,01.

Tabla XIV: Contenido de catecolaminas intrapineales en animales GCSx unil. o Dc unil 7 días antes.

Glándula Pineal

A. GCSx unil	
Pg NE/mg tejido	287,0 ± 51,2
Pg E/mg tejido	14,1 ± 2,5
B. Dc unil	
Pg NE/mg tejido	1.098 ± 129 *
Pg E/mg tejido	54,1 ± 17,7*

Los niveles de catecolaminas intrapineales se midieron por el método radioenzimático. Los valores mostrados en la tabla representan el promedio ± ES de 8 animales en cada grupo. El contenido de catecolaminas intrapineales resulta significativamente menor en los animales GCSx unil que en los Dc unil según lo revela el test de Student *p < 0,001.

6.3- CAPTACION NEURONAL DE [3H] NE EN TIROIDES LUEGO DE GCSx unil, o Dc.

Para evaluar la integridad de la inervación simpático tiroidea luego de los distintos procedimientos quirúrgicos, se estudió la captación neuronal de [3H] NE "in vitro" en tiroides de ratas GCSx o Dc.unilateralmente. La captación es un método que permite tener una idea acerca de la densidad o concentración relativa de terminales neurales y una confirmación adicional de la desnervación antes observada con cualquiera de ambas cirugías practicadas. Como control para medir la captación inespecífica utilizamos la droga DMI en concentraciones de 10 μ M, fármaco inhibidor de la captación neuronal de NE.

Obsérvese en la tabla XV que, tanto la GCSx unil. como la Dc., llevan a la desaparición de la captación específica de [3H] NE; por lo tanto el lóbulo tiroideo queda eficazmente desnervado con cualquiera de la operaciones citadas. La desaparición de la captación resulta total (obsérvese captación inespecífica con el empleo de DMI), siendo la comparación con el lóbulo inervado contralateral, altamente significativa ($p < 0,01$ por test de Student apareado).

6.4- EFEECTO DE NCEx unil. del GCS SOBRE LA CAPTACION [3H] NE EN TIROIDES Y PINEAL.

Con el objeto de evaluar si las fibras simpáticas que inervan la tiroides arriban a la glandula vía NCE que es una de la 2 referencias principales del GCS, se seccionó unilateralmente dicho nervio y se estudió la captación de [3H] NE en pineal y tiroides.

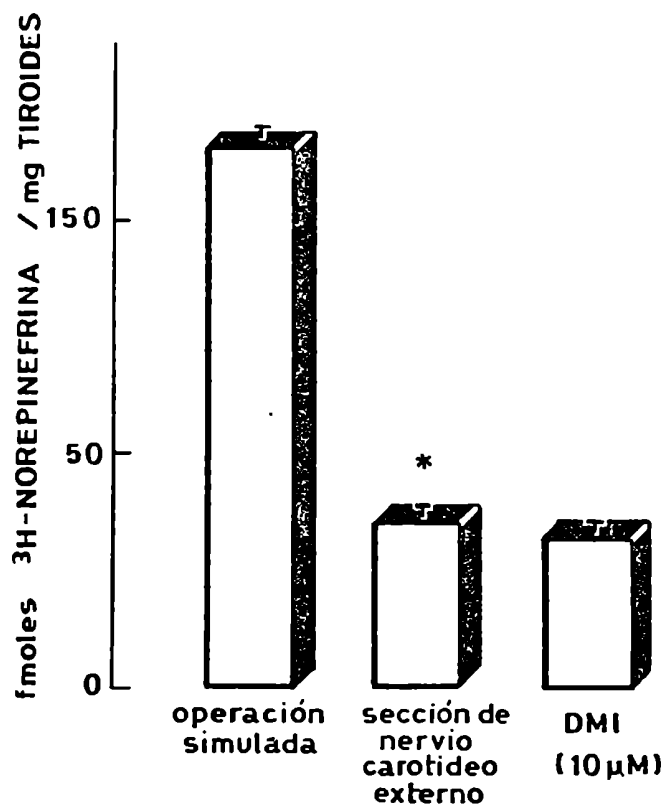
La NCEx unil. se traduce en una desaparición total de la captación específica de [3H] NE. (no hay diferencias significativas con el tratamiento por DMI) en el lóbulo ipsilateral a la operación (ver Fig. 29). La captación no se ve afectada en el lóbulo tiroideo contralateral (diferencia significativa con respecto al desnervado por NCEx, $p < 0,01$ por Test de Student apareado), así como tampoco en la glándula pineal (ver Fig. 30).

Tabla XV: Captación de [³H] NE "in vitro" de glándulas tiroideas sometidas a GCSx uni1 o con Dc uni1. 7 días antes.

<u>Grupos Experimentales</u>	<u>Glándula tiroideas</u>		
	<u>Lóbulo ipsilateral</u>	<u>Lóbulo contralateral</u>	<u>DMI (10 μM)</u>
GCSx uni1	29,2 \pm 5,6*	77,9 \pm 6,4	30,5 \pm 7,7
Dc uni1.	29,4 \pm 2,3*	75,4 \pm 3,2	28,9 \pm 3,6

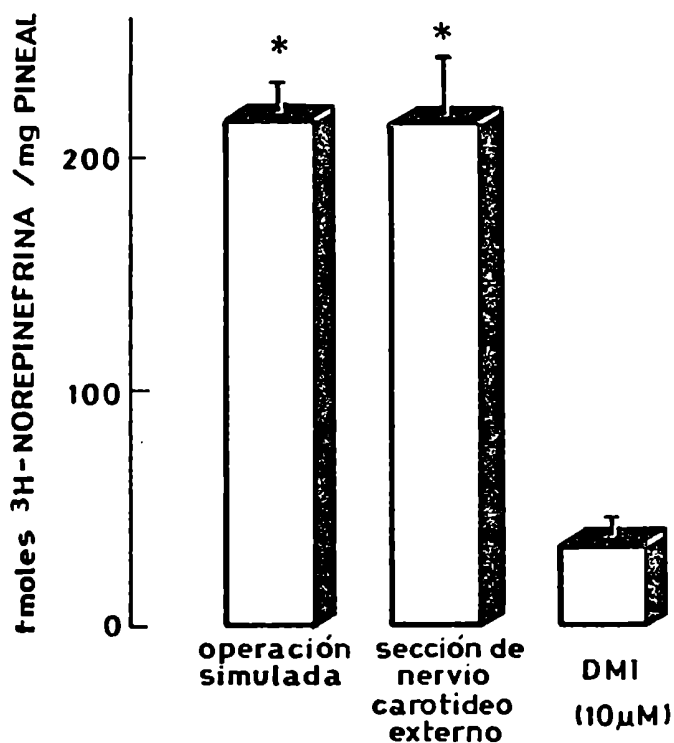
Las captación se determinó incubando fragmentos con 0.5 μ M [³H] NE como se describe en Materiales y Métodos. Los datos presentados en la tabla muestran el promedio \pm ES de 6 animales por grupo y se expresan como fmoles de NE/mg de tejido luego de 30 minutos de incubación. Los fragmentos con DMI se preincubaron con la droga durante 5 minutos antes del agregado del radioactivo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los lóbulos desnervados, por cualquiera de ambas cirugías, y sus contralaterales con una inervación intacta empleando el Test de Student para muestras apareadas *p < 0,001.

FIGURA Nº 29: EFECTO DE LA NCEx unil. DEL GCS SOBRE LA CAPTACION DE $[^3\text{H}]$ NE EN TIROIDES.



La captación se determinó incubando fragmentos tiroideos con $0.5 \mu\text{M}$ de $[^3\text{H}]$ NE tal como se describe en Materiales y Métodos. Las barras representan el valor promedio \pm ES de 10 animales por grupo. Los fragmentos tiroideos con DMI se preincubaron con dicha droga durante 5 minutos antes del agregado del radiactivo. El asterisco indica diferencias significativas entre lóbulo desnervado y el contralateral inervado, tal como lo demuestra el test de Student para muestras apareadas $*p < 0,01$. Obsérvese que la caída en la captación, tras la sección del NCE, es total pues su valor es igual al inespecífico determinado por la DMI.

FIGURA N° 30: EFECTO DE LA NCEx DEL GCS SOBRE LA CAPTACION DEL [3H] NE EN LA GLANDULA PINEAL.



La captación se determinó incubando pineales enteras con $0.5 \mu\text{M}$ [3H] NE. Las pineales con DMI se preincubaron con dicha droga durante 5 minutos antes del agregado del radiactivo. Las barras representan el valor promedio \pm ES de 8 pineales en cada grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos, con y sin lesión del NCE y las pineales tratadas con DMI; por test de Student $*p < 0,01$. La sección del NCE no produce alteraciones en la glándula pineal.

6.5- EFFECTO DE LA NCEx unil. Y LA GCSx unil. EN ANIMALES HIPOFISOPRIVOS.

En III 4.6 y en tabla VIII demostramos la marcada atrofia equivalente al 15% de caída en el peso tiroideo, que la GCSx unil. ipsilateral producía en los animales hipofisectomizados. Similares resultados se verifican con NCEx unil. en la Tabla XVI, donde la caída del peso en el lóbulo tiroideo es del 25%, mientras que la GCSx. unil. induce una disminución del 20%. Estas diferencias de porcentajes no son significativas entre sí, pero lo son respecto a los lóbulos contralaterales inervados.

Este experimento avala la suposición de que el NCE es la vía por la cual se proyectan los axones del GCS que inervan a la glándula tiroides.

Tabla XVI: Efectos de la GCSx unil o NCEx unil o NCEx unil sobre el peso tiroideo en animales hipofisoprivos.

	<u>Peso tiroideo en mg/100 g. de peso animal</u>	
	<u>Lóbulo ipsilateral</u>	<u>Lóbulo contralateral</u>
GCSx unil	2,48 ± 0,20*	3,47 ± 0,39
NCEx unil	2,53 ± 0,13*	3,36 ± 0,13

Los animales fueron hipofisectomizados 2 días antes de realizarse las distintas lesiones en el GCS unilateralmente. El sacrificio se llevó a cabo 7 días después de la cirugía, los lóbulos fueron resecados, pesados y referidos al peso corporal del animal. Los datos exhibidos en la tabla representan el promedio ± ES de los lóbulos obtenidos de 6 animales en cada caso. El lóbulo desnervado, por cualquiera de ambos procedimientos quirúrgicos, provoca una marcada atrofia con respecto al contralateral tal cual lo demuestra el Test de Student para muestras apareadas, *p < 0,01.

IV

DISCUSSION

Antes de adentrarnos en la discusión estricta de los resultados presentados y algunas de sus posibles implicancias, creemos que resulta conveniente una breve recapitulación del estado de los conocimientos sobre el tema, previo al comienzo de este trabajo de Tesis. Enumeraremos algunas de las observaciones más importantes realizadas en este laboratorio, descriptas en la Introducción (I.4.1 y I.4.2), las que sirvieron de base para los presentes experimentos.

- 1) Durante la degeneración anterógrada de los terminales simpáticos originados en el GCS se produce la descarga de la NE contenida en ellos, con los consiguientes efectos postsinápticos atribuidos a este neurotransmisor (8-16 hs. después de GCSx. bil.). Dicho período coincide con una depresión en la secreción hormonal del eje hipófiso-tiroideo (87).
- 2) Esta disminución de los niveles plasmáticos de T_4 es independiente del tenor circulante de TSH ya que, inyecciones exógenas de esta hormona, son incapaces de revertir tal inhibición de la secreción tiroidea (87).
- 3) La interrupción crónica de la vía neural simpática provoca un aumento de la respuesta bociógena inducida por TSH exógena o MMI, así como un crecimiento espontáneo de la glándula tiroidea cuatro semanas después de GCSx bil. (268). Los cambios ponderales se acompañan de una mayor incorporación de [3H]Uridina al ARN de los lóbulos desnervados.
- 4) La GCSx bil. crónica provoca un aumento en el número de receptores α adrenérgicos tanto en tiroides como en el hipotálamo medio basal (268) (271).

El propósito de esta Tesis ha sido extender tales conocimientos con nuevos aportes. De ese modo hemos pretendido alcanzar los objetivos propuestos en la Introducción. A continuación enumeraremos los resultados más importantes obtenidos, los cuales serán discutidos en el mismo orden de su presentación.

- 1) Hemos caracterizado en detalle y en el mismo animal los diferentes estadios funcionales del eje hipófiso-tiroideo luego de la GCSx bil.. En la rata, hay un efecto bifásico de la secreción de TSH y T_4 a distintos tiempos de transcurrida la cirugía. Primero se detecta una depresión en los niveles séricos de ambas hormonas (hasta el 4° día) y luego una recuperación en los niveles séricos hasta alcanzar valores que no difieren de los normales.

- 2) La GCSx bil. altera el ritmo circadiano de secreción hormonal en el eje hipófiso-tiroideo. Se describen por primera vez ritmos diarios para las catecolaminas intratiroideas.
- 3) Se identificó el locus de acción de la GCSx bil. (hipofisario o suprahipofisario para inhibir la TSH) y el tipo de receptor involucrado en los cambios secretorios de TSH y T₄ durante la degeneración walleriana. El receptor resulta de tipo α (muy posiblemente α_1).
- 4) La integridad de la proyección simpática cervical es esencial para una respuesta adaptativa trascendente, como es la adaptación al frío en la rata.
- 5) La desnervación crónica induce cambios ponderales y hormonales en el modelo de la hipertrofia compensadora tiroidea, caracterizándose la naturaleza hipertrófica y/o hiperplásica del fenómeno compensatorio.
- 6) Se describieron la hipertrofia compensadora tiroidea y los cambios ponderales producto de la GCSx unil. ipsilateral en animales hipófisoprivos.
- 7) Se identificó la vía eferente y la localización anatómica de las neuronas responsables de la innervación simpática tiroidea-paratiroidea.

Tal como planteamos en el punto 1 de los objetivos logrados, la primera serie de experimentos se diseñó con el objeto de analizar en el mismo animal la evolución, a lo largo del tiempo, de la secreción de TSH y T₄ luego de la GCSx bil. y de ese modo, estudiar la influencia neural sobre el eje hipófiso-tiroideo. Pudimos determinar dos situaciones distintas que transcurren también en tiempos distintos tras la cirugía: a) el período donde se manifiestan los fenómenos de la degeneración anterógrada; b) los cambios posteriores cuando la desnervación se ha completado. La primera situación transcurre entre el 1° y 4° día tras la cirugía, donde se observa una marcada inhibición en la secreción de TSH y T₄; luego los valores de estas hormonas se recuperan alcanzando el nivel de los animales controles (ver Fig. 14 y 15).

El intervalo donde se observan fenómenos endócrinos, efectos de acciones postsinápticas durante la degeneración neuronal, se extienden más allá en el tiempo, excediendo la estricta descarga supraliminal de neurotransmisores, cuya culminación ocurre 24-36 hs. después de la cirugía. La extensión en el tiempo, para estos fenómenos agudos, nos sirvió de fundamento para varios de los experimentos discutidos más adelante. La posibilidad teórica inicial de que la GCSx bil. no actuará en forma directa inhibiendo la secreción

de TSH sino que, por algún mecanismo periférico (por ejemplo hepático y/o renal), alterará el "clearance" metabólico de la hormona, quedó descartada en un experimento previo a esta Tesis (87) en el cual la inyección de TSH exógena no eleva los niveles plasmáticos de esta hormona en forma semejante para los animales controles y aquéllos con GCSx bil..

Contrariamente a lo observado en un trabajo previo (270) no encontramos cambios significativos en el peso tiroideo de los animales GCSx bil. sacrificados 28 días después de la operación, tiempo descripto para la aparición de bocio espontáneo. Probablemente la discrepancia se deba a factores de la dieta la cual haya contenido escaso yodo o bien compuestos bociógenos. Ensayos preliminares mostraron que la administración de IK en el agua de bebida durante 15 días en animales sometidos previamente a GCSx unil., neutralizó las diferencias ponderales entre ambos lóbulos tiroideos.

Para investigar la influencia de la inervación simpática sobre estructuras estrictamente centrales del eje hipotálamo-hipofisario, recurrimos al modelo de tiroidectomía total. Tal operación nos permitía descartar el mecanismo de retroalimentación negativa sobre los tirotrofos pituitarios o las neuronas hipotalámicas ejercido por las hormonas tiroideas (111-120). Nuevamente, durante la degeneración anterógrada, se produce una significativa disminución de la secreción de TSH inducida, en este caso por la tiroidectomía (ver Fig. 16). Dicha inhibición desaparece a las 24 hs. de la GCSx bil. momento en el que la TSH comienza a aumentar su concentración sérica alcanzando valores superiores a los correspondientes de los animales únicamente ti-roprivos, pero con su inervación cervical completa.

Este tipo de respuesta bifásica, disminución primero y luego aumento en la secreción hormonal de la TSH, con respecto a los controles en el modelo de la tiroidectomía total que se produce a distintos tiempos tras la GCSx bil., fue observado también para GH (283). De este modo, no sólo la inervación noradrenérgica central sino también la inervación simpática periférica, desempeñan un rol inhibitorio sobre la secreción de GH y TSH.

Consideramos entonces aplicar el modelo de la degeneración anterógrada para estudiar otros aspectos funcionales del eje hipofiso tiroideo. Actividades con ritmo circadiano tienen lugar dentro del área comprendida por la inervación simpática cervical. A manera de ejemplo, citaremos que la GCSx bil. deprime el ritmo diario pineal, estimado por la secreción de melatonina (284) y también resulta en la desaparición del ritmo circadiano de presión intraocu-

lar en los conejos (285). Varios trabajos (279-282) demuestran, en la rata, la existencia de un ritmo diario para TSH cuyo máximo aparece entre las 1100 y 1500 hs. No hay, por el contrario, consenso acerca de una actividad secretoriarítmica para T_4 . Algunas determinaciones muestran la aparición de un valor máximo, unas dos horas después, tras el correspondiente pico de TSH (286), mientras que otros autores no han logrado detectarlo (282).

Cuando analizamos este ritmo diario de secreción de TSH y T_4 en ratas GCSx bil. detectamos, en nuestros animales control (GCSx simulada), un ritmo de TSH con el máximo descrito a las 1100 hs. Al mismo tiempo, observamos la presencia de dos máximos para T_4 : el primero 3 horas después del correspondiente de TSH y el segundo a medianoche, independiente de tirotrófina. La GCSx bil. 3 días antes de las determinaciones no solo provoca la descrita inhibición secretoria del eje, sino además afecta marcadamente la actividad rítmica del mismo. Así el máximo de TSH sérica de los animales GCSx bil. tiene un corrimiento de 2-3 hs. con respecto a los controles (Fig. 17). Aún más dramática resulta la alteración para T_4 donde el máximo diurno también se desplaza, mientras que el nocturno desaparece totalmente (Fig. 18). Según estos resultados interpretamos que, si bien las hormonas del eje tienen un ritmo propio de secreción, la inervación provista por el GCS desempeña un rol modulador sobre su expresión. Sugerimos que la inervación mantendría en fase correcta la actividad rítmica y al mismo tiempo regularía la amplitud de la respuesta hormonal. Conviene aquí retrotraernos a la introducción y recordar la definición de modulación, de válida aplicación en este caso: la respuesta primaria (actividad rítmica secretoria del eje hipofisotiroideo) se ve afectada por una acción en este caso neural (neurotransmisor liberado durante la degeneración anterógrada) que provoca cambios en la forma y amplitud, pero no altera el sentido de la respuesta primaria.

Analizamos también el ritmo circadiano en el contenido de catecolaminas intratiroideas que no ha sido descrito en especie alguna. La NE en los animales controles, exhibe un máximo diario durante las horas de la noche, registrándose un mínimo en su concentración intratiroidea a las 1100 hs. (Fig. 19). Por su parte la E se comporta igual que la NE, mostrando su máximo en la fase nocturna (Fig. 20), mientras para los niveles de DA fue imposible detectar modificaciones rítmicas durante el período de 24 hs. examinado.

Resulta interesante comparar los ritmos de NE y E intratiroideos con

las variaciones diarias en los niveles séricos de TSH y T₄; el máximo nocturno de T₄, no antecedido por elevación de TSH, coincidió aproximadamente con la máxima concentración de NE en la glándula tiroidea. Ciertas observaciones (263) apoyan un posible rol estimulador "in vitro" de la NE sobre la T₄ en ausencia de TSH o bajas concentraciones de la hormona, sirviendo así de factible explicación a nuestros resultados. Estos también podrían interpretarse como una relación causal entre el aumento de NE y el incremento de T₄. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que los niveles absolutos de un transmisor en un tejido dado, pueden o no vincularse a la liberación aumentada de dicho transmisor (por ej. un contenido elevado de NE puede resultar de inhibición de la MAO o la COMT y no de una mayor síntesis y/o liberación). Contrastando con el posible rol estimulador de la NE en bajas concentraciones de TSH el aumento por descarga supraliminal, durante la degeneración anterógrada, produce una depresión del efecto de TSH sobre la secreción de T₄.

Existen evidencias morfológicas y bioquímicas que avalan la existencia de proyecciones del GCS al hipotálamo (medio basal) (271) y a la adenohipofisis (288). Nos pareció de interés determinar la sensibilidad hipofisaria al TRH durante la degeneración walleriana post GCSx bil. Para este estudio inyectamos TRH (Fig. 20) por vía intravenosa a dos grupos de ratas: uno control y otro con GCSx bil. 14-16 horas antes del ensayo. Las muestras sanguíneas basales confirmaron las diferencias esperadas; 10 minutos después de la inyección de TRH ambos grupos de animales mostraron una respuesta hipofisaria normal de TSH. Concluimos que el efecto inhibitorio, durante la degeneración anterógrada, se ejerce primariamente a nivel hipotalámico y no hipofisario. La naturaleza de esta inhibición es aún incierta; podría deberse a una acción moduladora de los terminales periféricos en el hipotálamo sobre la secreción de TRH o alternativamente a un efecto vascular con disminución del aporte de TRH a la adenohipofisis. Sin embargo la captación de ⁸⁶Rb, método utilizado para valorar el flujo sanguíneo, no resulta modificada ni en la hipófisis ni en el hipotálamo tras la GCSx bil., descartándose así un posible fenómeno vascular (268). Estudios que incluyan la determinación de niveles hipotalámicos y portales de TRH, tras GCSx bil. aguda, podrían corroborar o rechazar esta hipótesis.

El siguiente paso en nuestro trabajo, apoyado en la información acumulada hasta ese momento, consistió en la caracterización farmacológica del receptor adrenérgico involucrado en la inhibición del eje hipófiso-tiroideo

durante la degeneración walleriana post GCSx bil. Como mencionamos en la Introducción (I.3.3), existen evidencias consistentes indicativas que la NE del sistema noradrenérgico central (originado en áreas mesencefálicas como el locus coeruleus) afecta la secreción de TSH; en este sentido el aval proviene de experimentos farmacológicos donde, inyecciones intraventriculares de NE o sus agonistas α_2 incrementan la secreción de TSH (178) (179) mientras agonistas α_1 inyectados periféricamente bloquean la secreción de tirotrófina (180-182). Según se ha demostrado (183) existe una acción estimuladora de la NE sobre TSH y GH mediada por un adrenoceptor α_2 . De este modo el sistema noradrenérgico central ejercería una influencia facilitatoria o un rol tónico estimulador en la secreción de ambas hormonas hipofisarias. Se describe también en el mismo estudio, que la activación de los α_1 adrenoceptores tiene una influencia inhibitoria sobre la secreción de TSH y GH; estos receptores α_1 , en condiciones de reposo, no están tónicamente activados. (183)

En nuestros experimentos la inyección del antagonista α (predominantemente α_1) fenoxibenzamina previa al sacrificio de ratas con GCSx bil., efectuada 14-16 hs. antes del ensayo, revierte totalmente la inhibición de TSH. No ocurre lo mismo con el antagonista β propranolol que resulta inefectivo para tal propósito. Por último, la inyección conjunta de ambas drogas no afecta la inhibición de TSH mediada por el receptor α_1 . Estos datos indican que la acción de la NE liberada de los terminales simpáticos periféricos en la eminencia media, es mediada por receptores α_1 y constituyen, en conjunto, otra evidencia del importante papel modulador de la proyección cervical sobre el área hipotálamo-hipofisaria. En relación a la acción intratiroidea de tales terminales simpáticos deben destacarse los cambios producidos sobre los niveles séricos de T_4 tras la inyección de los antagonistas α y/o β . Estos cambios no acompañan a las concentraciones séricas de TSH, demostrando la independencia glandular durante el período de la degeneración anterógrada cervical. La inyección de fenoxibenzamina reestablece los niveles de T_4 así como los de TSH; sin embargo, la administración de propranolol potencia la depresión de T_4 sin modificar la tirotrófina. La máxima inhibición en la hormona tiroidea se obtiene con la administración conjunta de α y β antagonistas (Fig. 22), mientras que en estas condiciones la TSH recupera sus valores normales.

Estos resultados indican: a) adrenoceptores de tipo α_1 median los efectos inhibitorios intratiroideos de NE sobre la liberación de T_4 .

b) Existe un efecto β estimulador débil de la NE tiroidea.

c) Existe otro mediador neurotransmisor, no catecolaminérgico, inhibitorio en las terminales simpáticas.

Histoquímicamente se ha revelado la presencia de diversos péptidos en los terminales intratiroideos. Un hecho relevante es la coexistencia del neuropéptido Y con NE en los terminales simpáticos periféricos, incluidos los tiroideos (47) (289). El neuropéptido Y reproduce de forma más prolongada las acciones de NE en diversas uniones neuroefectoras autonómicas, convirtiéndolo en un buen candidato como mediador de los efectos inhibitorios no adrenergicos aquí descritos. Recientemente (290) se describe al neuropéptido Y ejerciendo un poderoso efecto inhibitorio, potenciando la inhibición en la secreción de hormonas tiroideas inducida por TSH, ejercida por la NE. Tampoco podemos descartar la posibilidad de otras sustancias, aún no determinadas, con potente acción inhibitoria y distintas al neuropéptido Y; estudios ulteriores podrían resolver esta cuestión en el futuro.

Si bien hasta el momento la discusión de los efectos agudos de la GCSx bil. sobre el eje hipófiso-tiroideo se ha centrado en los aspectos de acción directa de los terminales en degeneración sobre el hipotálamo y la glándula tiroidea, debe analizarse la posibilidad de que, parte de las alteraciones, puedan deberse a cambios hormonales desencadenados en otra zona del territorio simpático cervical. En este sentido un candidato lógico es la glándula pineal. A través de la secreción de melatonina esta estructura modifica la actividad del eje hipófiso tiroideo (291-293). Hay que tener en cuenta que, durante la reacción de degeneración, se incrementa la liberación de melatonina (294) y debe por lo tanto considerarse la participación de tal hormona. Sin embargo la inyección de propranolol previene totalmente la secreción de melatonina durante la degeneración walleriana (294), pero es ineficaz, como hemos visto, en modificar la depresión del eje hipófiso-tiroideo. Esto excluye indirectamente la participación pineal en el fenómeno; por el contrario los receptores α_1 de ubicación posiblemente hipotalámica, operan para inhibir la liberación de TSH.

Ante toda la información recogida, nos interrogamos sobre cuál podía ser la implicancia fisiológica de la inhibición funcional del eje hipófiso-tiroideo durante la degeneración walleriana. Para contestar la pregunta recurrimos a evaluar la respuesta adaptativa al frío, estímulo importante en la

activación de la secreción hormonal del eje. Describimos en la Introducción que la exposición al frío provoca un incremento en la secreción de TSH (223-225) en diversas especies, incluida la rata; dicha elevación hormonal depende de la integridad hipotálamo-hipofisaria pues, puede ser anulada por lesiones en áreas hipotalámicas específicas (222-228). Cuando se examinó la adaptación de las ratas con GCSx bil. 48 hs. antes a una temperatura ambiental de 4°C, la sobrevivencia fué prácticamente nula, hubieran sido o no los animales preadaptados durante un mes a tal temperatura. Similares tasas de baja supervivencia se obtienen en ratas tiroprivas tratadas con dosis reemplazantes de T₃ y mantenidas en ambientes fríos. Pero los mismos animales sobreviven en las mismas condiciones si se los inyecta con T₄. Datos que concuerdan con el hecho de que, durante la degeneración anterógrada post GCSx bil., se inhibe la secreción de T₄, pero no la de T₃ (87).

Esta falta de adaptación al frío de las ratas GCSx bil. ¿Sería debida a la inhibición de T₄ o por un efecto integrado de la inervación en degeneración sobre el centro hipotalámico que controla la temperatura corporal?. No podemos responder este interrogante. Queda claro sin embargo, que el normal funcionamiento del sistema simpático cervical resulta esencial para la adaptación de los roedores a los cambios externos de temperatura, sugiriendo un papel homeostático importante de la inervación sobre un mecanismo tan vital para la supervivencia del organismo.

Hasta este punto del trabajo hemos analizado los efectos agudos de la GCSx bil., aquéllos producidos durante e inmediatamente después de la degeneración anterógrada. Ahora nos referiremos a los cambios inducidos por la desnervación crónica (7 a 15 días tras la cirugía), bastante después de finalizar la liberación de los neurotransmisores de los terminales simpáticos en degeneración. Para ello recurriremos al modelo experimental de la hipertrofia compensadora tiroidea. La ablación quirúrgica de cualquier órgano endócrino induce en el remanente un crecimiento compensatorio, acompañado o no por una recuperación parcial y/o total de la función. Transcurridos 7 a 15 días de la hemitiroidectomía se desarrolla un crecimiento ponderal del lóbulo remanente (145% tomando como 100% el valor del lóbulo tiroideo promedio) que no alcanza a compensar el peso total de la glándula, ni tampoco produce un restablecimiento de la secreción hormonal normal. En este caso el crecimiento hipertrófico no es estrictamente compensador, menos aún en su aspecto funcional, registrándose un aumento en los niveles de TSH, como conse-

cuencia de los niveles insuficientes de T_4 , producidos por un parénquima escaso. Esto revela una exteriorización del mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipófiso-tiroideo, tal como se detalló en la Introducción. Quisimos averiguar cómo influía la inervación simpática sobre el crecimiento hipertrófico; la desnervación (por GCSx unil.) ipsilateral del lóbulo remanente tras una hemitiroidectomía, no sólo afecta al crecimiento glandular sino también provoca modificaciones importantes en la actividad secretoria. Encontramos, en el lóbulo desnervado, una ampliación del crecimiento hipertrófico ponderal del 180% acompañada por una compensación funcional total ya que, estos animales sometidos 15 días antes a ambas cirugías ablatorias simultáneas, recuperan los niveles basales de TSH y T_4 .

Una comprobación adicional a esta observación fue proporcionada por los estudios histológicos emprendidos 48 hs. después de la cirugía para determinar si el fenómeno era netamente hipertrófico o se acompañaba de hiperplasia celular. La valoración del índice mitótico o una variante, el índice folicular, resultó significativa. La hemitiroidectomía desencadena en el lóbulo remanente una proliferación de células foliculares (la actividad mitótica se incrementa 20 veces) y la desnervación multiplica casi al doble la proliferación celular (ver Tabla XI). En tiempos más prolongados, 15 días después de las operaciones, cuando ya la hipertrofia se ha desarrollado totalmente, no encontramos diferencias histológicas entre los tejidos inervados y desnervados.

Nuestros resultados se contraponen con los efectos producidos por desnervaciones químicas empleando 6-OH-dopamina (295). La inyección intratiroidea unilateral del neurotóxico, provoca un aumento en la actividad mitótica del contralateral e incluso previene el crecimiento compensatorio, si se la aplica sobre el lóbulo remanente tras hemitiroidectomía. Las razones de estas discrepancias las atribuimos a acciones citotóxicas de la 6-OH-dopamina, pues existen cuestionamientos acerca de la acción local de la droga, donde sus efectos no se limitan sólo a la destrucción de los terminales adrenérgicos sino que, incluyen además destrucción tisular (296). Resulta probable que la inhibición en el crecimiento hipertrófico, así como la inducción del crecimiento revelado por aumento de la actividad mitótica en el lóbulo contralateral inyectado se deba, en realidad, a una hemitiroidectomía química y no a una acción que involucre directamente las fibras adrenérgicas aferentes.

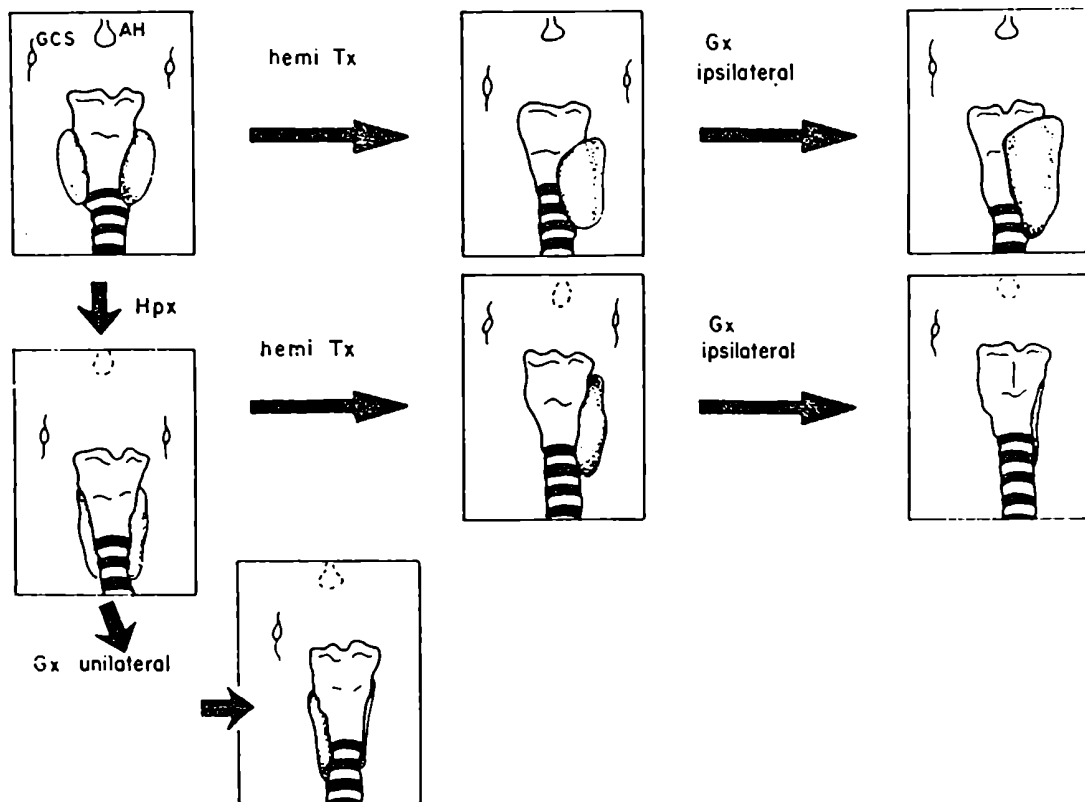
¿Resulta el efecto simpático potenciador de la hipertrofia compensadora,

ejercido en ausencia de TSH?. Para contestar esta pregunta empleamos ratas hipófisooprivas en las que las determinaciones hormonales de TSH, indicaron estar en límite de detección para el RIA. La hipofisectomía provoca una regresión del peso glandular tiroideo y una depresión severa de T_4 circulante, cuyos niveles caen en el límite de detección del RIA para esta hormona. Los animales hipofisooprivos sometidos a hemitiroidectomía desarrollaron, 15 días más tarde, un aumento ponderal del lóbulo remanente. Concuere así con observaciones previas (298), donde se registra hiperplasia celular tiroidea (incremento del índice mitótico y aumento en la incorporación [3H] timidina) dos días después de la hipofisectomía y hemitiroidectomía, en ratas. En conjunto estos resultados contribuyen a avalar la hipótesis de que la hipertrofia o hiperplasia compensadora, por ablación unilateral de glándulas endócrinas: adrenal (299), ovario (300), así como de órganos no estrictamente endócrinos como el riñón (301), es independiente de la presencia o ausencia de la hipófisis. Se ha comprobado también hiperplasia compensadora tiroidea en ratones cepa snell dwarf, caracterizados por ausencia de TSH y GH (302). Por su parte, en contraposición con lo ocurrido en los animales normales, la GCSx unil. del lóbulo remanente, en los hipofisooprivos, no sólo afecta el crecimiento compensatorio sino que provoca una marcada atrofia glandular. De este modo la inervación simpática parece necesaria para el mantenimiento de cierto trofismo glandular (no de su funcionamiento) en ausencia de hipófisis .

Verificamos efectos opuestos de la GCSx unil. crónica sobre el crecimiento hipertrófico glandular dependientes de la TSH circulante. Cuando la función hipofisaria es normal, la inervación simpática ejercería una influencia inhibitoria en el crecimiento inducido por TSH. Por otra parte en ausencia de TSH (hipofisectomía), la inervación resulta imprescindible para mantener el trofismo glandular y el crecimiento compensatorio sin provocar cambios en los ya muy deprimidos niveles hormonales. La Fig. 31 esquematiza los distintos pasos seguidos en los experimentos mostrando, en cada caso, los resultados ponderales obtenidos.

Si bien ignoramos el mecanismo por el cual la inervación desempeña un rol trófico en ausencia de TSH debemos considerar, al menos como posibilidad, la participación de tipo neural. Las neuronas del GCS podrían constituir la última estación de reejevo de un arco neural originado en el lóbulo tiroideo contralateral que, involucraría la médula espinal y centros cere-

FIGURA N° 31: ESQUEMA DE LAS DISTINTAS INTERVENCIONES QUIRURGICAS.



En este dibujo se esquematizan los distintos procedimientos quirúrgicos seguidos con los resultados ponderales observados en cada caso.

Obsérvese la ampliación del fenómeno hipertrófico por deservación simpática cervical; y la atrofia que la misma operación provoca en los animales hipofisoprivos. (Gx=GCSx).

brales. La existencia de este arco reflejo prodría ser entonces responsable del crecimiento hipertrófico en ausencia de la pituitaria. Algunos trabajos neuroanatómicos (303-307), indican la posible participación de centros cerebrales en un control neural de la hipertrofia adrenal, ovárica y testicular, pero no existe información con respecto a la glándula tiroides. Anteriormente mencionamos la coexistencia del neuropéptido Y y la NE en los terminales simpáticos. Dicho neuropéptido u otras sustancias sintetizadas por las neuronas adrenérgicas, podrían ser responsables de mantener el trofismo glandular o bien modular la expresión de un hipotético factor de crecimiento extrahipofisario, por ejemplo factor de crecimiento epidérmico (297), que se hallaría presente en la circulación.

Resumiendo, el conjunto de nuestros resultados para los experimentos crónicos, muestra un rol destacado de la inervación simpática en la regulación tiroidea, con presencia o ausencia de TSH circulante. Si bien es cierto que la GCSx bil. trae aparejada múltiples secuelas endócrinas, los experimentos realizados parecen mostrar una naturaleza local del fenómeno, puesta de relieve en las características ipsilaterales de la hipertrofia; estos estudios sobre modulación neural del fenómeno hipertrófico bien podrían servir de modelo o simplemente como un nuevo enfoque para el estudio fisiopatológico del bocio u otras disfunciones tiroideas.

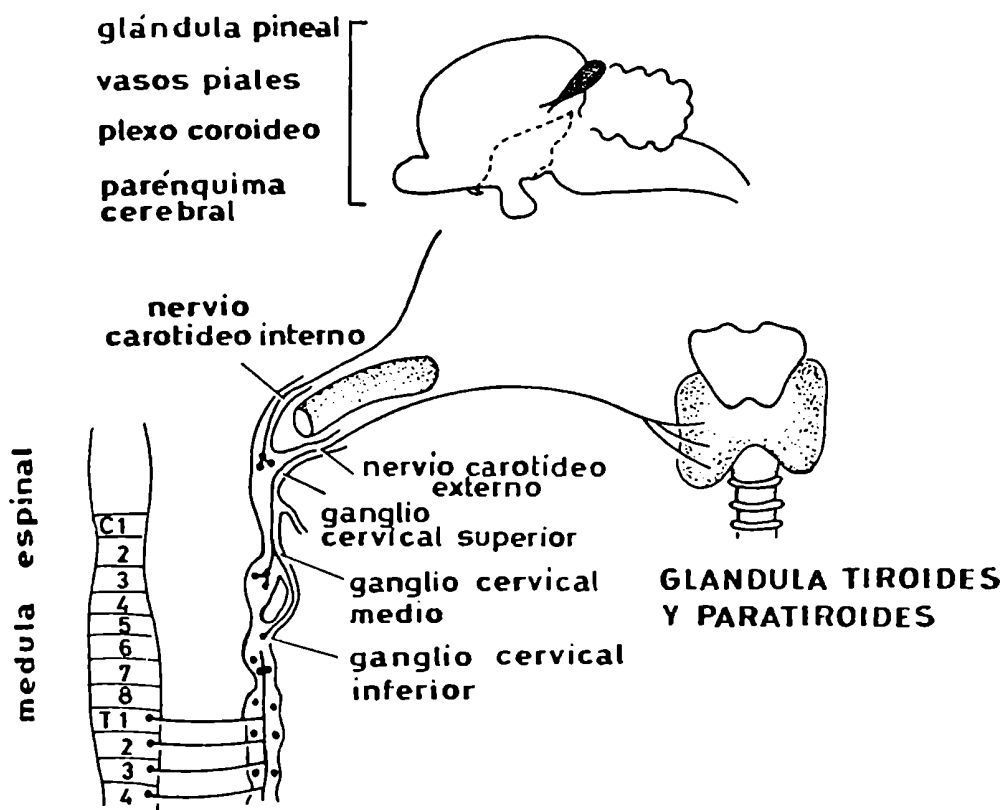
El último de los objetivos que nos propusimos en esta Tesis consistió en identificar y caracterizar, por métodos neuroquímicos, el asiento anatómico de los cuerpos neuronales y las vías de proyección postganglionares responsables de la inervación adrenérgica al territorio tiroideo. Las GCSx unil. o su Dc (sección del TCC), provocan una brusca caída en el contenido intratiroideo de NE (94%) en el lóbulo afectado, con respecto al contralateral intacto. Análogamente, ambas operaciones hacen desaparecer la captación neuronal de [³H] NE en la tiroides. Los resultados neuroquímicos resultan compatibles con la interpretación de que los cuerpos neuronales simpáticos, cuyos axones inervan adrenérgicamente la tiroides, se encontrarían alojados fuera del GCS (probablemente en el GCM y/o GCI pero envían sus axones a través del TCC). La glándula pineal resulta afectada por la GCSx unil. mientras que la Dc no tiene ningún efecto, concordando así con la demostración de distribución neuronal particular dentro del GCS (40). Como sostén de nuestra interpretación, estudios histológicos sobre gatos y conejos (308) (309), demuestran la existencia de fibras postganglionares en el TCC, parte de las cuales se originan

en cuerpos neuronales ubicados en ese tracto nervioso. Se ha identificado también en los conejos (310) un ganglio accesorio, alojado en el TCC, que envía sus axones al GCS. El trabajo anatómico más exhaustivo hecho en la rata (311), apoyaría la interpretación formulada, pues describe unos 300 cuerpos neuronales alojados en el GCM (85%) y en el GCI enviando sus axones, vía TCC, hacia el GCS. Estas fibras postganglionares penetran en el ganglio y sin establecer sinapsis se proyectan por el NCE. Realizamos secciones quirúrgicas del NCE, la lesión de esta vía suprime la captación de [^3H] NE en el correspondiente lóbulo tiroideo ipsilateral a la operación (Fig. 29), sin modificar la captación de la amina biógena en la glándula pineal (Fig. 30). La inclusión de este dato a los recabados anteriormente nos permitió concluir que: los cuerpos neuronales cuyas fibras postganglionares adrenérgicas inervan el territorio tiroideo se encuentran alojados, muy probablemente, en el GCM y GCI. Desde allí proyectan sus axones hacia el GCS, abandonándolo sin establecer sinapsis, vía NCE. Los animales hipofisoprivos proporcionaron una confirmación adicional a la hipótesis del NCE como vía de proyección; la lesión de este nervio (como antes la GCSx unil.) provoca una marcada involución del lóbulo tiroideo afectado, testimoniando así la desnervación simpática del mismo.

Con la nueva información que disponemos nos retrotraeremos nuevamente a la Introducción; la Figura 8 ilustra algunas áreas y estructuras comprendidas en el territorio de inervación cervical (33). Podemos ahora, constituyendo un aporte original de nuestro trabajo, ampliar el esquema en Fig. 32 introduciéndole una vía de proyección precisa y caracterizada, la que se distribuye hacia el complejo tiroides-paratiroides por el NCE.

La identificación y caracterización de esta vía neural tiene interesantes implicaciones que abren perspectivas a futuros estudios. Manipulación y/o lesiones localizadas sobre el NCE nos permitirán modificar la información neural que llega a la glándula tiroides sin alterar otras estructuras, secuelas insalvables producidas por la GCSx. Del mismo modo manipulaciones del NCI, la otra vía de proyección mayor del GCS, servirán para el análisis inverso, modificación de la inervación simpática sobre estructuras centrales que no afecten en forma neural directa a la tiroides. Confiamos en que las desnervaciones quirúrgicas selectivas, efectuadas a distintos tiempos, puedan constituir un modelo experimental de utilidad para nuevos análisis de la participación moduladora del sistema simpático cervical en la regulación neuroendocrina.

FIGURA N° 32: PROYECCION DEL GCS A LA GLANDULA TIROIDES Y PARATIROIDES.



En este esquema se caracteriza la vía de proyección simpática cervical responsable de la innervación tiroidea.

Los cuerpos neuronales se encuentran alojados en el GCN y el GCI y proyectan sus respectivos axones hacia el GCS. Allí, sin establecer sinapsis, lo abandonan vía NCE. Compárese este nuevo esquema propuesto con el de la FIG. N° 8.

V- CONSIDERACIONES FINALES

En el epílogo de esta Tesis podemos reafirmar la validez de la idea central a la cual pretendimos aportar nuevas evidencias: La inervación simpática cervical ejerce una influencia moduladora sobre la función del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo.

Según la clasificación seguida en la Introducción, el tipo correspondiente a los fenómenos observados comprende la categoría de modulación neurohormonal. Durante el desarrollo del trabajo examinamos como la manipulación de la inervación simpática influye marcadamente, tanto sobre el trofismo, como sobre la función glandular en los distintos modelos empleados para los respectivos estudios.

Sin duda la importancia del Sistema Simpático Cervical queda evidenciada en el rol que desempeña sobre la respuesta adaptativa al frío, ya se trate de una acción central o periférica sobre la glándula tiroides o sobre ambos niveles a la vez; incógnita que intentaremos resolver en el futuro.

Es precisamente la identificación de la vía neural responsable de la inervación del territorio tiroideo, un nuevo elemento interesante con que contamos para intentar responder al interrogante anterior. Por otra parte podremos, como ya hemos discutido, manipular las vías nerviosas cervicales adecuadas para obtener respuesta local, menos generalizada que las observadas hasta el momento.

Resulta posible que algunos de los fenómenos descriptos en esta Tesis, estrictamente la hipertrofia compensadora, tenga alguna utilidad teórica o sirvan de referencia para enfocar problemas fisiopatológicos de la glándula tiroides.

VI

B I B L I O G R A F I A

- 1) Elde R, Hokfelt T (1979): Localization of hypophysiotropic peptides and other biologically active peptides within the brain. Ann. Rev. Physiol. 41:587.
- 2) Snyder SH (1985): Base molecular de la comunicación intercelular. Investigación y Ciencia 111:100.
- 3) Saito A, Sankaran H, Goldfine I, Williams J (1980): Cholecystokinin receptors in the brain. Characterization and distribution. Science 208: 1155.
- 4) Trimble ER, Renold AE (1981): Ventral and dorsal areas of rat pancreas islet hormone content and secretion. Am. J. Physiol. 240:E422.
- 5) Mandarian L, Reach G, Itoh M, Blanchard W, Stenner D, Gerich J (1981): Evidence for pancreatic content, release and preferential activity of Somatostatin-28: posible mechanism for selective inhibition of insulin and glucagon secretion. Program of the 63rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Cincinnati OH p 165 (Abst 329).
- 6) Tiscornia O (1985): Hormonas digestivas gastroenteropancreaticas. En: Endocrinología Molecular. Calandra R, De Nicola F (eds). El Ateneo; Bs. As. p 387.
- 7) Hollenberg M (1985): Examples of homoespecific and heterospecific receptor regulation. Trends Pharmacol. Sci. 16:242.
- 8) Flawia M, Torres H (1985): Los nucleótidos cíclicos y su papel en los mecanismos de regulación del metabolismo celular. En Endocrinología Molecular. Calandra R, De Nicola F (eds.). El Ateneo; Bs. As. p 50.
- 9) Exton J (1985): Mechanism involved in α adrenergic phenomena. Am. J. Physiol. 243:A633.
- 10) Krnjevic K (1979): Chemical nature of synaptic transmission in vertebrate. Physiol. Rev. 54:418.

- 11) Adams P (1984): Transmitter-evoked channels in central neurons. Trends Neurosci. 7:135.
- 12) Baulieu E, Atgus M, Best Belpone M, Corvol P, Couvalin J, Mester J, Milgran R, Robel P, Rochefort H, De Catalogne D (1975): Steroid hormone receptor. Vitam. Horm. 33:649.
- 13) Sheridan PJ (1983): Androgen receptors in the brain. What are we measuring?. Endocrine Rew. 4:171.
- 14) Postner B, Khan M, Bergeson J (1982): Endocytosis of peptides hormones ; and other ligands. Endocrine Rew. 3:280.
- 15) Bloom F (1980): Neurohumoral transmission in the central nervous system. En: The pharmacological basis of therapeutics. Goddman S, Gilman A (eds); Mac Millan, New York. p 243.
- 16) Lundberg J, Hokfelt T (1983): Coexistence of peptides and classical transmitters. Trends Neurosci. 6:325.
- 17) Karlin A (1980): Molecular properties of nicotinic acetylcholine receptors. En: The cell surface and neural function. Cotman L, Poste F, Nicolson A (eds). Elsevier, North Holland Biomedical Press. p 191.
- 18) Roberts E (1974): Gamma aminobutyric acid and nervous system function; a perspective. Biochem. 23:2637.
- 19) De Feudis (1977): GABA receptors in the vertebrate neurons system. Prog. Neurobiol. 9:123.
- 20) Rodbell M (1980): The role of the hormone receptors and GTP regulatory proteins in the membrane transduction. Nature 184:17.
- 21) Kretsinger R (1981): Mechanism of selective signalling by calcium. Neurosci. Res. Prog. Bull. 19: (3) 5.
- 22) Berridge M (1981): Phosphatidylinositol hydrolysis: a multifunctional transducing mechanism. Mol. Cell. Endocrinol. 24:115.
- 23) Cardinali DP (1981): Models in neuroendocrinology. Neurohumoral pathways in the pineal gland. Trends Neurosci. 2:250.

- 24) Cardinali DP (1983): Molecular mechanism of neuroendocrine integration in the central nervous system: An approach through the study of the pineal gland and its innervating by sympathetic pathway. Psychoneuroendocrinology 8:3.
- 25) Vacas MI, Lowenstein P, Cardinali DP (1982): Testosterone decrease β adrenoceptors sites in rat pineal gland and brain. J. Neural. Transm. 53:49.
- 26) Gejman P, Cardinali D, Finkielman S, Nahmod V (1983): Hormone effects on muscarinic cholinergic binding in bovine and rat sympathetic superior ganglia. Life Sci 32:965.
- 27) Majewska M, Beserbe JC, Eskay R (1985): Glucocorticoids are modulators of GABA_A receptors in the brain. Brain Res. 339:178.
- 28) Hubbard J (1978): The Peripheral Nervous System. New York, Plenum.
- 29) Saper CB (1979): Anatomical substrate for the hypothalamic control of the autonomic nervous system. En: Integrative functions of the Autonomic Nervous System. Brooks C, Mc M, Koizumi, Sato A (eds). Tokio. University of Tokio Press p 333.
- 30) Bernard C (1878-1879): Lesons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux ét aux vegetaux. Bailliere, Paris (2 tomos).
- 31) Cannon WB (1929): Organization for physiological homeostasis. Physiol. Rew. 9:339.
- 32) Cannon WB (1932): The wisdom of the body. W.W. Norton & Co. Inc. New York.
- 33) Appenzeller J (1982): The Autonomic Nervous System. 2nd edition Elsevier, Amsterdam.
- 34) Nishi S, Karczmar AG, Dun NJ (1979): Physiology and pharmacology of ganglionic synapses as models for central transmission. En: Advances in pharmacology and therapeutics vol 2. Simon P (ed). Pergamon Press. Paris, p 69.

- 35) Petit FP du (1727): Mémoire dans lequel il est démontré que le nerf intercostaux fournissent des rameaux qui portent des esprits dans les yeux. Hist. Acad. Roy. Sci.1: 1.
- 36) Mc Afee DA (1982): Superior cervical ganglion: Physiological considerations. En: Progress in cholinergic biology: Model cholinergic synapses. Goldberg A (ed). Raven Press, New York p 191.
- 37) Marchisio PC (1974): Embryological development of metabolic system in sympathetic ganglia. Fed. Proc. 33:1039.
- 38) Matthews M, Raisman G (1972): A light and electron microscopic study of the cellular response to axonal injury in the superior cervical ganglion of the rat. Proc. R. Soc. Lond B 181:43.
- 39) Bowers CW, Zigmond RE (1979): Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks. J. Comp. Neurol. 185:381.
- 40) Bowers CW, Dahm LM, Zigmond RE (1984): The number and distribution of sympathetic neurons that innervate the rat pineal gland. Neurosci. 13:87.
- 41) Douglas WW, Lywood D, Straub R (1960): On the excitant effects of acetylcholine on structures in the preganglionic trunk of the cervical sympathetic: with a note on the anatomical complexities of the region. J. Physiol (Lond) 153:250.
- 42) Jacobowitz D, Woodward JK (1968): Adrenergic neurons in the cat superior cervical ganglion and cervical sympathetic nerve trunk. A histochemical study. J. Pharmacol. Exp. Therap. 162:213.
- 43) Eranko O, Eranko L (1971): Small intensely fluorescent granule-containing cells in sympathetic ganglion of the rat. En: Histochemistry of Nervous Transmission. Eranko O (ed). Elsevier, Amsterdam. p 39.
- 44) Burnstock G, Hokfelt T, Gerson MD, Iversen LJ, Kosterlitz HW, Szurszewski JH (1979): Non-adrenergic, non-cholinergic autonomic neurotransmission mechanism. Neurosci. Res. Prog. Bull 17:379.

- 45) Konishi S, Tsunco A, Otsuka M (1981): Enkephalin as a transmitter for presynaptic inhibition in sympathetic ganglia. Nature 294:80.
- 46) Dolivo M (1974): Metabolism of mammalian sympathetic ganglia. Fed. Proc. 33:104.
- 47) Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Tatemoto K (1984): Catecholamines, neuropeptide Y and pancreatic polypeptide family: coexistence and interaction in the sympathetic response. En: Neuropharmacology and Central Nervous System. Usdin E, Carlsson A, Dahlstrom A, Engel J (eds) Alan R Liss Inc, New York. p 179.
- 48) Matthews MR (1976): Synaptic and other relationship of small granule containing cells (SIF) in sympathetic ganglia. En: Chromaffin, enterochromaffin and related cells. Couphard RE, Fujita T (eds). Elsevier, Amsterdam. p 131.
- 49) Williams TF, Black AC, Chiba T, Jew J (1976): Interneurons SIF cell in sympathetic ganglia of various mammals. En: Chromaffin, enterochromaffin and related cells. Couphard RE, Fujita T (ed). Elsevier, Amsterdam. p 95.
- 50) Libet B (1979): Slow postsynaptic actions in ganglionic functions. En: Integrative functions of the autonomic nervous system. Brooks C, Mc C, Koizumi K, Sato A (eds). University of Tokyo Press, Tokio. p 197.
- 51) Skok VI, Selyanko AA (1979): Acetylcholine and serotonin receptors in mammalian sympathetic ganglion neurons. En: Integrative functions of the autonomic nervous system. Brooks C, Mc C, Koizumi K, Sato A (eds). University of Tokyo Press, Tokio. p 248.
- 52) Cardinali DP, Vacas MI, Valenti CE, Solveyra CG (1979): Pineal gland and sympathetic cervical ganglia as sites for steroids regulation of photo-sensitive neuroendocrine pathways. J. Steroid. Biochem. 11:951.
- 53) Ciaranello RD, Jacobowitz D, Axelrod J (1973): Effects of dexamethasone in phenylethanolamine-N-methyltransferase in chromaffin tissue of the neonatal rat. J. Neurochem. 20:799.

- 54) Eranko O, Eranko L, Hernonen H (1976): Cultures of sympathetic ganglia and the effects of glucocorticoids on SIF cells. En: SIF cells. Structure and function of small intensely fluorescent sympathetic cells. Eranko O (ed). U.S. Government Printing Office. Washington D.C., p 196.
- 55) Gianutsos G, Moore KE (1977): Effects of pre or postnatal dexamethasone, adrenocorticotrophic hormone and environmental stress on phenylethanolamine-N-methyltransferase activity and catecholamine in sympathetic ganglia of neonatal rats. J. Neurochem. 28:935.
- 56) Lempinen M (1964): Extra adrenal chromaffin tissue of the rat and the effects of cortical hormones on it. Acta Physiol. Scand. 62 Suppl 231.
- 57) Cardinali DP, Vacas MI, Gejman P (1981): The sympathetic superior ganglia as peripheral neuroendocrine centers. J. Neural. Transs. 52:1.
- 58) Kopiu IJ, Silberstein SD (1972): Axons of sympathetic neurons: Transport of enzymes in vivo and properties of axonal sprouts in vitro. Pharmac. Rev. 24:245.
- 59) Dehlstrom A (1971): Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). Phil. Trans. Roy Soc. Lond B 261:325.
- 60) Malawista GE (1975): The action of colchicine in acute gout arthritis. Arthritis Rheum. 18, Supl 6:835.
- 61) Dustin P (1963): New aspects of the pharmacology of antimetabolic agents. Pharmacol. Rev. 15:449.
- 62) Coyle JI (1972): Tyrosine hydroxylase in rat brain. Cofactor requirements, regional and subcellular distribution. Biochem. Pharmacol. 21:1935.
- 63) Costa E, Neff NH (1980): Estimation of turnover rates to study the metabolic regulation of the steady-state level of neuronal monoamines. En: Handbook of Neurochemistry vol. 4. Lajtha A (ed). Plenum Press, New York. p 45.
- 64) DeRobertis E (1964): Histophysiology of synapses and neurosecretion. Pergamon Press, Oxford.

- 65) Anton-Tay F, Wurtman RJ (1971): Brain monoamines and endocrine function. En: *Frontiers in Neuroendocrinology*. Martini L, Gannong WF (eds). Oxford University Press Inc. p 45.
- 66) Euler US von (1972): Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. The effects of drugs. En: *Catecholamines Handb-Exp. Pharmk* col 33. Blaschko H, Muschall E (eds). Springer Verlag, Berlin, p 186.
- 67) De Lorenzo RJ, Freedman SD (1978): Calcium dependent neurotransmitter release and protein phosphorylation in synaptic vesicles. Biochem. Biophys. Res. Comm. 80:183.
- 69) Llinás R, Steinberg ZI, Walton K (1981): Presynaptic calcium currents in Squid giant synapse. Biophys J. 33:289.
- 70) Llinás R, Steinberg ZI, Walton K (1981): Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in Squid giant synapse. Biophys. J. 33:323.
- 71) Thoa NB, Wooten GF, Axelrod J, Kopin IJ (1972): Inhibition on release of dopamine-B-hydroxylase and NE from sympathetic nerves by colchicine vinblastine or cytochalasine B. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 69:520.
- 72) Axelrod J (1973): The fate of noradrenaline in the sympathetic neurone. Harvey Lect. 67:175.
- 73) Golidis C, Neff NH (1971): Evidence for a specific monoamine oxidase associated with sympathetic nerves. Neuropharmacol. 10:557.
- 74) Güldberg HC, Marsden ChA (1975): Catechol-o-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol. Rev.* 27:135.
- 75) Alquist RP (1948): A study of adrenotropic receptors. Am. J. Physiol. 153:586.
- 76) Berthelson S, Pettinger WA (1977): A functional basis for classification of adrenergic receptors. Life Sci. 21:595.

- 77) Lands AM, Arnold A, Mc Auliff JP, Luduena FP, Brown TG (1967): Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. Nature 214:597.
- 78) Ahlquist RP (1979): Adrenoceptors. Trends Pharm. Sci. 1:16.
- 79) Strittmatter WJ, Davies JN, Lekowitz RJ (1979): adrenergic receptors parotid cells II. Desensibilization of receptors binding sites and potassium release. J. Biol. Chem. 253:5478.
- 80) Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ (1967): Differentiation of receptor responsive to isoproterenol. Life Sci. 6:2241.
- 81) Minneman KP, Hegstrand LR, Molinoff PB (1979): Simultaneous determination of Beta-1 and Beta-2 adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. Mol. Pharmacol. 15:286.
- 82) Waller T (1852): Observations sur les effects de la section du racines spinales du nerfs pneumogastrique au-dessus de son ganglion inférieur chez les mammifères. CR. Acad Sci. (Paris) 34:582.
- 83) Almgren O, Dahlstrom A, Haggendal J (1976): Degeneration secretion and NE disappearance in rat salivary glands following proximal or distal axotomy. Acta Physiol. Scand. 98:457.
- 84) Emmelin N, Trendelenburg U (1972): degeneration activity after parasympathetic or sympathetic denervation. Rev. Physiol. Biochem. Exp. Pharmacol 66:148.
- 85) Haggendal J (1980): The disappearance of dopamine-B-hydroxylase from rat salivary glands after extirpation of the superior cervical ganglion. J. Neural Transm. 48:249.
- 86) Stefano FJE, Percec CJ, Tumilasci OR (1974): Changes in neural uptake and metabolism of and sensitivity to NE during the degeneration secretion in the rat submaxillary gland. J. Pharmac. Exp. Ther. 191:403.
- 87) Cardinali DP, Pisarev MA, Barontini M, Juvenal GJ, Goedo RJ, Vacas MI (1982): Efferent neuroendocrine Pathways of sympathetic superior cervical ganglia. Neuroendocrinol. 35:248.

- 88) Niepce B (1851): Traité du goitre et du cretinisme. Balleire, Paris.
- 89) Rogowitsch N (1899): Die veränderungen der hypophyse nach entfernung der schilddrüse. Brith. Pathol. Anat. 4:453.
- 90) Smith PE (1916): Experimental ablation of the hypophysis in the frog embryo. Science 44:280.
- 91) Smith PE (1922): The repair and activation of the thyroid in the hypophysectomized tadpole by the parental administration of fresh cutaneous lobe of the bovine hypophysis. J. Med. Res. 43:267.
- 92) Crew FA, Weisner BP (1930): On the existence of a fourth hormone thyreotropic in nature of anterior pituitary. Br. Med. J. 1:777.
- 93) Aron M, Van Caulaert C, Stahl J (1931): L'équilibre entre l'hormone préhypophysaire et l'hormone thyroïdienne dans le milieu intérieur, à l'état normal et à l'état pathologique. Soc. Biol. (Paris) 107:64.
- 94) Hoskins RG (1949): The thyroid-pituitary apparatus as a servo (Feed-back) mechanism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 9:1429.
- 95) Green JD, Harris GW (1947): The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. J. Endocrinol. 5:136.
- 96) Florsheim WH (1974): Control of thyrotropin secretion. En: Handbook of Physiology. Greep RO, Astwood EB (eds). sec 7, vol 4, part 2. Am Physiol. Soc. Wash. D.C.
- 97) Scalon MF, Lewis M, Werghstrom DR, Chan V, Hall R (1980): The neuroregulation of human thyrotropin secretions. En: Frontiers in Neuroendocrinology. Martini L, Gannong WG (eds). vol 6, Raven Press, New York. p 33.
- 98) Ezrin C, Horvath E, Kovacs K (1979): Anatomy and cytology of the normal and abnormal pituitary gland. En: Endocrinology. DeGroot LJ (ed). Grune and Stratton, New York. p 103.

- 99) Phifer RF, Spicer S (1973): Immunocytochemical and histologic demonstration of thyrotropic cells of the human adenohypophysis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36:1210.
- 100) Pierce JG, Liao T, Howard SM; Shame B, Cornell JS (1971): Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone. Recent Prog. Horm. Res. 27:165.
- 101) Catt KJ, Dufau ML, Tsuruhara T (1973): Absence of intrinsic biological activity in LH and hCG subunit. J. Clin Endocrinol. Metab. 36:73.
- 102) Liao TH, Pierce JG (1970): The presence of a common type of subunit bovine thyroid-stimulating and luteinizing hormones. J. Biol. Chem. 245:4327.
- 103) Pierce JG (1971): The subunits of pituitary thyrotropin, their relationship to other glycoprotein hormones. Endocrinol. 89:1331.
- 104) Pierce JG (1974): Chemistry of thyroid-stimulating hormone. En: Handbook of Physiology. sect 7, vol 2 part 2. Knobil E, Sawyer W (eds) Am. Physiol. Soc. Wash. p 79.
- 105) Knopp J, Stole V, Tong W (1970): Evidence for the induction of iodide transport in bovine thyroid cells treated with stimulating hormone or dibutyryl cyclic adenosine 3'5' monophosphate. J. Biol. Chem. 245:4403.
- 106) DeGroot L, Niepomniszcze H (1977): Biosynthesis of thyroid hormone: Basis and clinical aspects. Metab. 26:665.
- 107) Willems C, Rocmans P, Dumont J (1970): Stimulation in vitro by thyrotropin, cyclic 3'5' AMP, dibutyryl cyclic 3'5' AMP and prostaglandin E₁ of secretion by dog thyroid slices. B. B Acta 222:474.
- 108) Dumont J, Vassart G (1980): Thyroid gland metabolism and the action of TSH. En: Endocrinology, vol 1. Grunny Straton, New York. p 311.
- 109) Dumont J (1971): The action of thyrotropin in thyroid metabolism. Vitam. Horm. 29:287.

- 110) Field J (1878): Pituitary thyrotropin mechanism of action. En: The Thyroid. Harper & Row (eds), New York. p 185.
- 111) Odell WD, Wilber JF, Utiger RD (1967): Studies of thyrotropin physiology by means of RIA. Recent Prog. Horm. Res. 23:47.
- 112) Patel YC, Burger HG, Hudson B (1971): RIA of serum thyrotropin: sensitivity and specificity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:768.
- 113) Ikeda H, Nagataki S (1976): Augmentation of thyrotropin responses to thyrotropin-releasing hormone following inorganic iodide. Endocrinol. J. (Jap) 23:431.
- 114) Saberi M, Utiger RD (1975): Augmentation of thyrotropin responses to thyrotropin-releasing hormone following small decreases in serum thyroid hormone concentrations. J. Clin. Endocrinol. Metab. 40:435.
- 115) Jubiz W, Carlile S, Lagerquist LD (1977): Serum thyrotropin and thyroid hormone levels in humans receiving chronic potassium iodide. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44:379.
- 116) Spira O, Birkenfeld A, Avni A, Gross J, Gordon A (1979): TSH synthesis and release in the thyroidectomized rat (b). Effect of T₃. Acta Endocrinol. (Copenh) 95:502.
- 117) Bakke JL, Lawrence N (1964): Influence of propylthiouracil and thyroxine on synthesis and secretion of thyroid stimulation hormone in the hypothyroid rat. Acta Endocrinol. (Copenh) 46:11.
- 118) Garcia MD, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1976): Thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone interactions on thyrotropin secretion in the rat: lack of inhibitory effects of small doses of triiodo-L-thyronine in the hypothyroid rat. Endocrinol 98:203.
- 119) Surlos MIC, Lifschitz BM (1977): Biphasic thyrotropin suppression in euthyroid and hypothyroid rats. Endocrinol. 101:769.
- 120) Silva JE, Larsen PR (1978): Peripheral metabolism of homologous thyrotropin in euthyroid and hypothyroid rats: acute effects of thyrotropin releasing hormone, triiodothyronine and thyroxine. Endocrinol. 102:178.

- 121) Oppenheimer JH(1979): Thyroid hormone action at cellular level. Science 203:971.
- 122) Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI (1974): Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testes. Endocrinol. 95:897.
- 123) Larsen RP, Silva JE, Kaplan MM (1981): Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinic implications. Endo. Rev. 2:87.
- 124) Kajihara A, Kendall JW (1969): Studies on the hypothalamic control of TSH secretion. Neuroendocrinol. 5:53.
- 125) Knigge KM, Joseph SA (1971): Neural regulation of TSH secretion: sites of thyroxine feedback. Neuroendocrinol. 8:273.
- 126) Chambers WF, Sobel RJ (1971): Effect of thyroxine-agar tube application to the rat hypothalamus. Neuroendocrinol. 7:37.
- 127) Ingbar S, Freinkel N (1956): ACTH, cortisone and the metabolism of iodine. Metab. 5:652.
- 128) Wilber JF, Utiger RD (1969): The effect of glucocorticoids on thyrotropin secretion. J. Clin. Invest. 48:2096.
- 129) Otsuki M, Dakoda M, Baba S (1973): Influence of glucocorticoids on TRH-induced TSH response in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36:95.
- 130) Faglia G, Ferrari C, Beck-Peccoz P, Spada A, Travaqlini P, Ambrosi B (1973): Reduced plasma thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone after dexamethasone administration in normal subjects. Horm. Metab. Res. 5:289.
- 131) Sowers PJ, Carlson HE, Brautbar N, Hershman JM (1977): Effect of dexamethasone on prolactin and TSH responses to TRH and metaclopramide in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44:237.

- 132) Patel YC, Baker HWG, Burger HG, Johns MV, Ledinek JE (1974): Suppression of the thyrotropin circadian rhythm by glucocorticoids. J. Endocrinol. 62:421.
- 133) Jensen J, Norlan G, Jubiz W (1978): The effect of prednisone of serum thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine concentrations in hypothyroid patients. J. Endocrinol. Invest. 2:171.
- 134) Brown MR, Hedge GA (1973): Multiple effects of glucocorticoids on TSH secretion in unanesthetized rats. Endocrinol. 92:1305.
- 135) Brown MR, Hedge GA (1974): Effects of glucocorticoids on TRH and TSH secretion: dose and time consideration. Am J. Physiol. 227:289.
- 136) Mc Ewen BS, de Kloert R, Wallach G (1976): interactions in vivo and in vitro of corticoids and progesterone with cell nuclei and soluble macromolecules from rat brain regions and pituitary. Brain. Res. 105:129.
- 137) Funder JF, Barlow JW (1980): Heterogeneity of glucocorticoids receptors. Circ. Res. 46:1.
- 138) Rapp JR, Pyun LL (1974): A sex difference in plasma thyroxine and thyroid stimulating hormone in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146:1021.
- 139) Fukuda H, Greer MA, Roberts L, Allen CF, Critchlow V, Wilson M (1975): Nictohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine. Endocrinol. 97:1424.
- 140) Kierffer JD, Mover H, Federico P, Maloof F (1976): Pituitary thyroid axis in neonatal and adult rats: comparison of sexes. Endocrinol. 98:295.
- 141) Simpkins JW, Bruni JF, Mioduszewski RJ, Meites J (1976): Serum and pituitary TSH and response to TRH in developing male and female rats. Endocrinol. 98:1365.
- 142) Christianson D, Roti E, Vagenakis AG, Braverman LE (1981): The sex-related differences in serum thyrotropin concentration is androgen mediated. Endocrinol. 108:529.

- 143) D'Angelo SA (1968): Simultaneous effects of estradiol on TSH secretion and adrenocortical function in male and female rats. Endocrinol. 82:1035.
- 144) Chen HJ, Walfish PG (1978): Effects of age and ovarian function in the pituitary-thyroid system in female rats. Endocrinol. 8:225.
- 145) D'Angelo SA, Fisher JS (1969): Influence of estrogen on the pituitary thyroid system of the female rat: mechanism and loci of action. Endocrinol. 84:117.
- 146) Morley JE, Sawin CT, Carlson HE, Longcope C, Hershman JM (1981): The relationship of androgen to thyrotropin and prolactin responses to thyrotropin-releasing hormone in hypogonadal and normal men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52:173.
- 147) Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Ward DN, Vale W, Guillemin R (1970): Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. Nature 226:321.
- 148) Nair RMG, Barret JF, Bowers CY, Schally AV (1970): Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. Biochem. 9:1103.
- 149) Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Vale W, Guillemin R (1969): Derives polypeptidiques de synthase danes d'activite hypophysiotrope TRF. CR. Acad. Sci. (D). Paris. 269:154.
- 150) Folkers K, Enzmann F, Boler J, Bowers CY, Schally AV (1969): Discovery of the synthetic tripeptide-sequence of the thyrotropin releasing hormone having activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37:123.
- 151) Baugh CM, Krundieck CL, Hershman M, Pittman JA (1970): Synthesis and biological activity of thyrotropin-releasing hormone. Endocrinol. 87:1015.
- 152) Koch Y, Godhaber G, Fireman I, Zor U, Shami J, Tal E (1977): Suppression of prolactin and thyrotropin secretion in the rat by serum to thyrotropin-releasing hormone. Endocrinol. 100:1476.
- 153) Szabo M, Frohman LA (1977): Suppression of cold stimulated thyrotropin secretion by antiserum to thyrotropin-releasing hormone. Endocrinol. 101:1023.

- 154) Mori M, Kobayashi I, Wakabayashi T (1978): Suppression of serum thyrotropin concentrations following thyroidectomy and cold exposure by passive immunization with antiserum to thyrotropin-releasing hormone in rats. Metab. 27:1485.
- 155) Harris ARC, Christianson D, Smith SM, Fang SL, Braverman LE, Vagenakis AG (1978): The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. J. Clin. Invest. 61:441.
- 156) Szabo M, Kovathan N, Gordon K, Frohman LA (1978): Effect of passive immunization with an antiserum to thyrotropin-releasing hormone on plasma thyrotropin levels in thyroidectomized rats. Endocrinol. 102:799.
- 157) Greer MA (1952): Role of the hypothalamus in the control of thyroid function. J. Clin. Endocrinol. 12:1259.
- 158) Greer MA (1957): Studies on the influence of the central nervous system on anterior pituitary function. Recent. Prog. Horm. Res. 13:67.
- 159) Martin JB, Reichlin S (1972): Plasma thyrotropin response to hypothalamic electrical stimulation and to injection of synthetic thyrotropin releasing hormone. Endocrinol. 90:1074.
- 160) Halász B, Pupp L, Uhlarck S (1962): Hypophysiotropic area in the hypothalamus. J. Endocrinol. 25:147.
- 161) Aizawa T, Greer MA (1980): Delineation of the hypothalamic area controlling TSH secretion in the rat. Program of the 56th Meeting of Am. Thyroid Asso. San Diego, CA (Abst. T25).
- 162) White WF, Hedlund MT, Weber GF, Rippel RH, Johnson ES, Willer JF (1974): The pineal gland: a supplemental source of hypothalamic-releasing hormones' Endocrinol. 94:1422.
- 163) Schaffer JM, Brownstein MJ, Axelrod J (1977): Thyrotropin-releasing hormone like material in the rat retina: changes due to environmental lighting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3579.

- 164) Holkfelt T, Fuxe K, Johansson O, Jeffcoate S, White N (1975): Thyrotropin-releasing hormone containing nerve terminals in certain brain stem nuclei and in spinal cord. Neurosci. Letts 1:133.
- 165) Morley JE, Meyer N, Pekary AE, Melmed S, Carlson HR, Briggs JE, Hershman JM (1980): A prolactin inhibitory factor with immunocharacteristics similar to thyrotropin releasing hormone is present in rat pituitary tumors (GH₃ and W₅) testicular tissue and a plant material, alfalfa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96:47.
- 166) Eddy LS, Hershman JM, Taylor RE, Baker SB (1973): Binding of thyrotropin releasing hormone to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46:28.
- 167) Hinkle PM, Tashjan AH (1975): Receptors for thyrotropin-releasing hormone in prolactin producing rat pituitary cell in culture. J. Biol. Chem. 248:6180.
- 168) Labrie F, Barden H, Poirier G, DeLean A (1972): Binding of TRF to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:283.
- 169) Grant G, Vole W, Guillemin R (1973): Characteristics of the pituitary receptor for thyrotropin-releasing hormone. Endocrinol. 92:1629.
- 170) Gourdji D, Tixier-Vidal A, Morin A, Pradelles P, Morgat JL, Fromageot P, Kerdelhue B (1973): Binding of tritiated thyrotropin-releasing factor to prolactin secreting clonal cell line (GH₃). Exp. Cell. Res. 82:39.
- 171) Gershengorn MC (1978): Bihormonal regulation of the thyrotropin-releasing hormone receptor in mouse thyrotropic tumor cells in culture. J.Clin. Invest. 62:937.
- 172) Burt DR, Snyder SH (1975): Thyrotropin-releasing hormonal (TRH) apparent receptor binding in rat membranes. Brain Res. 93:309.
- 173) Burt DR (1979): Thyrotropin releasing hormone: apparent receptor in the retina. Exp. Eye. Res. 29:353.

- 174) Burt DR, Taylor RL (1980): Binding sites for thyrotropin releasing hormone in sheep nucleus accumbens resemble pituitary receptors. Endocrinol. 106:1416.
- 175) Taraskenich PS, Douglas WW (1977): Action potentials occur in cells of the normal anterior pituitary gland and are stimulated by the hypophysiotropic peptide thyrotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4064.
- 176) Childs GV, Cole DE, Kubek M, Tobin RB, Wilber JF (1978): Endogenous thyrotropin-releasing hormone in the anterior pituitary: sites of activity as identified by immunocytochemical staining. J. Histochem. Cytochem. 26:901.
- 177) Brunet N, Tixier-Vidal A (1978): Increased binding of concanavalin A at the cell surface following exposure to thyroliberin. Mol. Cell. Endocrinol. 11:169.
- 178) Vijayan E, Krulich L, Mc Cann SM (1978): Catecholaminergic regulation in TSH and GH release in ovariectomized steroid primed rats. Neuroendocrinol. 26:176.
- 179) Annunziato L, DiRenzo G, Lombardi G, Scapaccira F, Schettini G, Prezoni P, Scapagnini U (1977): The role of central noradrenergic neurons in the control of thyrotropin secretion in the rat. Endocrinol. 100:738.
- 180) Krulich L, Giachetti A, Marchlewska-Koj A, Hefeo E, Jameson ME (1977): On the role of the central noradrenergic and dopaminergic systems in the regulation of TSH secretion in the rat. Endocrinol. 100:496.
- 181) Montoya E, Wilber JF, Lorinez M (1979): Catecholaminergic control of thyrotropin secretion. J. Lab. Clin. Med. 93:887.
- 182) Morley E, Brammer GL, Sharp B, Yamada T, Yuwiler A, Hershman JM (1981): Neurotransmitter control of hypothalamic-pituitary-thyroid function in rats. Eur. J. Pharmacol. 70:263.
- 183) Krulich L, Mayfield MA, Steele MK, Millen BA, Mc Cann SM, Koening IJ (1982): Differential effects of pharmacological manipulations of central α_1 and α_2 adrenergic receptors on the secretion of thyrotropin and

- hormone in male rats. Endocrinol. 110:796.
- 184) Mess B, Peter L (1975): Effect of intracerebral serotonin administration on pituitary-thyroid function. Endocrinol. Exp. 9:105.
- 185) Halak H, Baldys A, Jarzov B, Mystrychowski A, Sluzypek I (1978): Changes in serum TSH levels after intraventricular injection of various neuromediators in rats. Acta Endocrinol. (Copenh) 87:279.
- 186) Jordan D, Ponit C, Monex R, Ponsin G (1978): Participation of serotonin in thyrotropin release: evidence for the action of serotonin on thyrotropin-releasing hormone. Endocrinol. 103:313.
- 187) Bruni JF, VanVugt D, Marshall S, Meites J (1977): Effects of naloxone, morphine and methionine-enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulation hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. Life Sci. 21:461.
- 188) Vijayan E, Mc Cann SM (1978): Effects of intraventricular GABA on plasma growth hormone and thyrotropin in conscious ovariectomized rats. Endocrinol. 103:1888.
- 189) Maeda K, Frohman L (1978): Dissociation of systemic and central effects of neurotensin on the secretion of growth hormone, prolactin and thyrotropin. Endocrinol. 103:1903.
- 190) Bowers CY, Wu B, Folkers K (1975): Mechanisms involved in release of TSH and other pituitary hormones. En: Anatomical Neuroendocrinology. Stumph WE, Grant LD (eds). Karger, Basilea. p 333.
- 191) Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, Kordan C (1979): Effects of neurotransmitter on the "in vitro" release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from the medio basal hypothalamus. Endocrinol. 104:801.
- 192) Fuxe K, Hokfelt T (1969): Catecholamines in the hypothalamus and pituitary gland. En: Frontiers in Neuroendocrinology. Ganong W, Martin L (eds). Oxford University Press, New York. p 47.

- 193) Refetoff F, Fang US, Rappaport B, Friessen HG (1974): Interrelationships in the regulation of TSH and prolactin secretion in man: effects of L-dopa, TRH and thyroid hormone in various combination. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:450.
- 194) Spaulding SM, Burrow GN, Donabedian R, Van Woert M (1972): L-dopa suppression of thyrotropin releasing hormone response in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 35:182.
- 195) Lamberg BA, Linnoila M, Fogelholm R, Olkinuora M, Kotilainen P, Saarinen P (1977): The effect of psychotropic drugs on the TSH response to TRH. Neuroendocrinol. 24:90.
- 196) Besses GH, Burrow GN, Spaulding SW, Donabedian RK (1975): Dopamine infusion acutely inhibits the TSH and prolactin response to TRH. J. Clin. Endocrinol. metab. 41:985.
- 197) Delitala G (1977): Dopamine and TSH secretion in man. Lancet 2:760
- 198) Leebaw WF, Lee LA, Woolf PD (1978): Dopamine effects: basal and augmented pituitary hormone secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47:480.
- 199) Massara F, Camanni F, Vergano V, Belforte L, Molinatti GM (1978): Inhibition of thyrotropin secretion by dopamine in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1:25.
- 200) Kaptein EM, Kletzky OA, Spencer CA, Nicoloff JT (1980): Effects of prolonged dopamine infusion on anterior pituitary function in normal males. J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:488.
- 201) Cooper DS, Martoran MA, Maloof F, Ridway EF (1981): Modulations of TSH and its subunits by dopamine in man. Program of the 63rd Annual Meeting of the Endocrine Soc. Cincinnati OH. (Abs. 739).
- 202) Vale W, Rivier C, Brazeau P, Guillemin R (1974): Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. Endocrinol. 30:193.
- 203) Borgeat P, Labrie F, Drouin J, Belanger A, Immer A, Sestanek K, Nelson V, Gotz M, Schally AV, Coy DH, Coy EJ (1974): Inhibition of adenosine 3'5'-monophosphate accumulation in anterior pituitary gland "in vitro" by GH

- release inhibiting hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56:1052.
- 204) Belanger A, Labrie F, Borgeat P, Saverq M, Cote J, Daouin J, Schally AV, Coy DH, Coy EJ, Immer H, Sestaj K, Nelson V, Gotz M (1974): Inhibition of growth hormone and thyrotropin release by growth hormone-release inhibiting hormone. Mol. Cell. Endocrinol. 1:329.
- 205) Hall R, Besser GM, Schally AV, Coy DH, Evered D, Coldie DJ, Kastin AJ, Mc Neilly AS, Mortimer CH, Phenekor C, Turnbridge WMG, Weightman D (1973): Action of the growth hormone-release inhibitory hormone in healthy men and on acromegaly. Lancet 2:581.
- 206) Siler TM, Van der Berg G, Yen SSC, Brazeau P, Vole W, Guillemin R (1974): Inhibition by somatostatin of the release TSH-induced in man by thyrotropin-releasing factor. J.Clin.Endocrinol. Metab. 38:742.
- 207) Weeke J, Hansen AP, Lundbaek (1974): The inhibition by somatostatin of the thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in normal subjects. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33:101.
- 208) Carr D, Gomez-Pan A, Weightman DR, Roy VCM, Hall R, Besser GM, Thornen MO, McNeilly AS, Schally AV, Kastin AJ, Coy DH (1975): Growth hormone release inhibiting hormone:actions on thyrotropin and prolactin secretion after thyrotropin-releasing hormone. Br. Med. J. 3:67.
- 209) Ferland L, Labrie F, Jobin M, Arimura A, Schally AV (1976): Physiological role of somatostatin in the control of growth hormone and thyrotropin secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68:149.
- 210) Arimura A, Schally AV (1976): Increase in basal and thyrotropin-releasing hormone stimulated secretion of thyrotropin by passive immunization with antiserum to somatostatin. Endocrinol. 98:1069.
- 211) Arimura A, Smith WD, Schally AV (1976): Blockade of the stress induced decrease in blood GH by antisomatostatin serum in rats. Endocrinol. 95:540.
- 212) Arimura A, Gordin A, Schally AV (1976): Increases in basal and thyrotropin releasing hormone stimulated secretion of thyrotropin and the effects of

- triiodothyronine in rats passively immunized with antiserum to somatostatin
Fed. Proc. 35:782.
- 213) Dockray GJ (1976): Immunological evidence of cholecystokinin like
peptides in man. Nature 264:568.
- 214) Rehfeld JF (1978): Immunochemical studies on cholecystokinin. J.Biol.Chem.
253:4022.
- 215) Lamers CB, Morley JE, Poitras P, Sharp P, Carlson HE, Hershman
JM, Walsh JH (1980): Immunological and biological studies on
cholecystokinin in rat brain. Am. J. Physiol. 230: E 232.
- 216) Morley JE, Melmed S, Brings J, Carlson HE, Hershman JM, Solomon TE,
Lamers C, Damassa DA (1979): Cholecystokinin octapeptide releases growth
hormone from the pituitary in vitro. Life Sci. 25:1201.
- 217) Vijayan E, Samson WK, McCann SM (1979): In vivo and in vitro effects
of cholecystokinin on gonadotropin, prolactin, growth hormone and
thyrotropin in the rat. Brain Res. 172:295.
- 218) Vijayan E, Samson WK, McCann SM, (1978): Effects of intraventricular
injection of gastrin on release of LH, prolactin, TSH and GH in conscious
ovariectomized rats. Life Sci. 23:2225.
- 219) Halász B, Szentagothai J (1958): Über die unmittelbare rückwirkende
vom hypophysenorderlappen erzeugten subariz auf den hypothalamus. Acta
Physiol. Acad. Hung. (Suppl 6) 14:51.
- 220) Shina D, Meites J (1966): Effects of thyroidectomy and thyroxine on
hypothalamic concentration of thyrotropin-releasing factor and pituitary
content of thyrotropin in rats. Neuroendocrinol. 1:4.
- 221) Motta M, Stereson N, Piva F, Martini L (1969): The participation of
"short" feedback mechanisms in the control of ACTH and TSH release.
Acta Neurol. Belg. 69:501.
- 222) Shenk P (1922): Über den einfluss der schilddrüse auf den stoffwechsel
mit besonderer berücksichtigung des wärmehaushalls. Arch. Exp. Pathol.
Pharmakol. 92:1.

- 223) Florsheim WH (1974): Control of thyrotropin secretion. En: Handbook of Physiology, sect 7, vol. 4, part 2. Knobil E, Sawyer W (eds). Am. Physiol. Soc. Wash. DC p 449.
- 224) D'Angelo SA (1960): Hypothalamic and endocrine function in persistent estrous rats at low environmental temperature. Am. J. Physiol. 199:701.
- 225) Itoh S, Hiroshige T, Koseki T, Nakotsugawa T (1966): Release of thyrotropin in relation to cold exposure. Fed. Proc. 25:1187.
- 226) Uotila UU (1940): The regulation of thyrotropic function by thyroxine after pituitary stalk section. Endocrinol. 26:605.
- 227) Brodin SE (1945): A study of the structural and hormonal reactions of the pituitary body of rats exposed to cold. Acta Anat. Basilea (Suppl 3) 2:51'
- 228) von Euler C, Holmgren B (1956): The role of hypothalamohypophyseal connexions in thyroid secretion. J. Physiol. (Lond) 131:137.
- 229) Mori M, Kobayashi I, Wakabayashi K (1978): Suppression of serum thyrotropin concentrations following thyroidectomy and cold exposure by passive immunization with antiserum to thyrotropin-releasing hormone in rats. Metab. 27:1485.
- 230) Szabo M, Frohman LA (1977): Suppression of cold-stimulated thyrotropin secretion by antiserum to thyrotropin-releasing hormone. Endocrinol. 101:1023.
- 231) Harris ARC, Christianson D, Smith MS, Fang SL, Braverman LE, Vagenakis AG (1978): The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. J.Clin. Invest. 61:441.
- 232) Prasad C, Jacobs JJ, Wilber JF (1980): Immunological blockade of endogenous thyrotropin-releasing hormone produces hypothermia in rats. Brain Res. 193:580.
- 233) Tuomisto J, Ranta T, Mannisto P, Saarinen A, Leppaluoto J (1975): Neurotransmitter control of thyrotropin secretion in the rat. Eur. J. Clin. Pharmacol. 30:221.

- 234) Schettini G, Quattrone A, Direnzo G, Lombardi G, Prezioni P (1979): Effect of 6-hydroxydopamine treatment on TSH secretion in basal and cold-stimulated conditions in the rat. Eur. J. Pharmacol. 56:153.
- 235) Nakayama T, Hammel HT, Hardy JD, Eisenman JS (1963): Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. Am. J. Physiol. 204:1122.
- 236) Cox B, Lomax P (1977): Pharmacological control of temperature regulation. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17:341.
- 237) Andersson B, Ekman L, Gale GC, Sundsten JW (1962): Thyroideal response to cooling of the preoptic "heat loss center". Life Sci. 1:1.
- 238) Andersson B, Ekman L, Gale GC, Sundten JW (1962): Blocking of the thyroid response to cold by local warming of the preoptic region. Acta Physiol. Scand. 59:12.
- 239) Morley JE (1979): Extrahypothalamic TRH: its distribution and functions. Life Sci. 25:1539.
- 240) Prasad C, Matsui T, Williams J, Peterkofsky A (1978): Thermoregulation in rats: opposing effects of thyrotropin-releasing hormone and its metabolites histidyl-proline dihetopiperazine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74:390.
- 241) Stanton TL, Winokur A, Beckman AL (1980): Reversal of natural central nervous system depression by TRH action in the hippocampus. Brain. Res. 181:470.
- 242) Melander A (1971): Thyroid hormone secretion. Its regulation by intrathyroideal amines. Acta Physiol. Scand. (Suppl) 379:1.
- 243) Melander A, Ericson LE, Sundler F, Wetgren U (1975): Intrathyroideal amines in the regulation of thyroid activity. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 73:39.
- 244) Melander A, Bülow K, Burger A, Ericson LE, Ingermansson S, Ljunggren JG, Norberg KA, Persson B, Sundquist SB, Sundler F, Tibblin S, Westgren U, (1976): Influence of the sympathetic nervous system on thyroid activity

- in man. Proceeding of the Seventh International Thyroid Conference. Excerpta Medica, Amsterdam. p 100.
- 245) Melander A (1977): Aminergic regulation of thyroid activity: Importance of sympathetic innervation and of the mast cell of the thyroid gland. Acta Med. Scand. 201:257.
- 246) Melander A, Nilsson E, Sundler F (1972): Sympathetic activation of thyroid hormone secretion in mice. Endocrinol. 90:194.
- 247) Melander A, Ericson LE, Sundler F, Ingbar SH (1974): Sympathetic innervation of the mouse thyroid and its significance in thyroid hormone secretion. Endocrinol. 94:959.
- 248) Melander A, Ericson LE, Ljunggren G, Norberg KA, Persson B, Sundler F, Tibblin S, Westgren U (1974): Sympathetic innervation of normal human thyroid. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:713.
- 249) Melander A, Sundler F, Westgren U (1973): Intrathyroideal amines and the synthesis of thyroid hormone. Endocrinol. 93:193.
- 250) Melander A, Sundler F, Westgren U (1975): Sympathetic innervation of the thyroid: variation with species and with age. Endocrinol. 96:102.
- 251) Mowbray JF, Peart WS (1960): Effects of noradrenaline and adrenaline on the thyroid. J. Physiol. 151:261.
- 252) Falconer IR (1967): The effect of adrenaline and noradrenaline on hormone secretion and blood flow from the thyroid vein in sheep with exteriorized thyroids. J. Physiol. 188:425.
- 253) Brown GK, Gibson JG (1956): The effect of exogenous and endogenous adrenaline on the uptake of radio-iodine by the thyroid gland of the rabbit. J. Physiol. 131:85.
- 254) Botkin AL, Jenssen H (1952): The effect of epinephrine and thyrotropin on thyroid functions in rats. Endocrinol. 50:68.
- 255) Hays MT (1965): Effect of epinephrine on radio iodine uptake by the normal thyroid. J. Clin. Endocrinol. Metab. 25:465

- 256) Juvenal GJ, Kleiman de Pisarev DL, Crenovich L, Pisarev MA (1978): Role of neurotransmitters, prostaglandins and glucose on precursor incorporation into RNA of thyroid slices. Acta Endocrinol (Copenh) 87:776.
- 257) Maayan ML, Ingbar SH (1970): Effects of epinephrine on iodine and intermediary metabolism in isolated thyroid cells. Endocrinol. 87:588.
- 258) Maayan ML, Debons AF, Volpert EM, Krinsky I (1977): Catecholamine inhibitions of thyrotropin-induced secretion of thyroxine: mediation by and α adrenergic receptor. Metab. 26:473.
- 259) Melander A, Rankler E, Sundler F, Westgren U (1975): Beta₂ adrenergic stimulation of thyroid hormone secretion. Endocrinol. 97:332.
- 260) Melander A, Sundler F (1972): Interactions between catecholamines, 5-hydroxytryptamine and TSH on the secretion of thyroid hormone. Endocrinol. 90:188.
- 261) Spaulding SW, Burrow GN (1975): Beta adrenergic stimulation of cyclic AMP and protein kinase activity with thyroid. Nature. 254:347.
- 262) Ahrén B (1985): Effects of α adrenoceptor agonist and antagonist on the thyroid hormone secretion. Acta Endocrinol. (Copenh) 108:184.
- 263) Ahrén B, Bengtsson HI, Hedner P (en Prensa): Effects of NE on basal and TSH stimulated thyroid hormone secretion in the mouse. Endocrinol.
- 264) Maayan ML, Debons AR, Krinsky K, Volpert EM, Fromm A, Dwry F, Siclari E (1977): Inhibition of thyrotropin and dibutyryl cyclic AMP induced secretion of thyroxine and triiodothyronine by catecholamines. Endocrinol. 101:284.
- 265) Sherwin JR, Mills I (1980): Epinephrine inhibits thyrotropin-stimulated adenosine 3'5' monophosphate accumulation in cat thyroid slice. Endocrinol. 106:28.
- 266) Ahn CS, Athans JC, Rosenberg IN (1969): Effects of epinephrine and of norepinephrine alterations in glandular blood flow upon thyroid functions: studies using thyroid vein cannulation in dogs. Endocrinol. 84:501.

- 267) Ericsson LE, Melander A, Dwman CH, Sundler F (1970): Endocytosis of thyroglobulin and release of thyroid hormone in mice by catecholamines and 5-hydroxytryptamine. Endocrinol. 87:915.
- 268) Pisarev MA, Cardinali DP, Juvenal GJ, Vacas MI, Barontini M, Boado RJ, (1981): Role of the sympathetic nervous system in the control of the goitrogenic response in the rat. Endocrinol. 109:2202.
- 269) Cardinali DP, Vacas MI, Gejman PV, Pisarev MA, Barontini M, Boado RJ, Juvenal GJ (1983): The sympathetic superior ganglia as "Little Neuroendocrine Brains". Acta Physiol. Latinoam. 33:205.
- 270) Pisarev MA, Cardinali DP, Juvenal GJ, Boado RJ, Barontini M, Vacas MI (1983): Ipsilateral thyroid growth and depressed thyroid hormone synthesis and content after unilateral superior cervical gangliectomy in rats. Acta Physiol. Latinoam. 33:165.
- 271) Cardinali DP, Vacas MI, Luchelli de Fortis A, Stefano FJE (1981): Superior cervical gangliectomy depresses norepinephrine uptake, increases the density of α adrenoceptor sites, and induces supersensitivity to adrenergic drugs in rat medial basal hypothalamus. Neuroendocrinol. 33:199.
- 272) Cardinali DP, Faigon MR, Scacchi P, Moguilevsky J (1979): Failure of melatonin to increase plasma prolactin levels in ovariectomized rats subjected to superior cervical gangliectomy or pinealectomy. J. Endocrinol. 82:315.
- 273) Naik DY, Scheriff TAQ (1975): An improved technique for transauricular hypophysectomy and autotransplant of isolated pieces of pars-intermedia tissue in the evacuated pituitary capsule of the rat. Acta Endocrinol. (Copenh) 79:677.
- 274) Chopra IJ (1972): A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. J. Clin. Endocrinol. Metab. 34:938.
- 275) Armando I, Levin G, Barontini M (1983): Evaluation of sympathetic nervous system and adrenomedullary activity in normal children. J. Auton. Nerv. Syst. 8:57

- 276) DaPrada M, Zürcher G (1976): Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue E, NE and DA within the femtomole range. Life Sci. 19: 1161.
- 277) DiFiore MSH (1949): Diagnostico Histológico. Tomo 1. El Ateneo Bs. As. 440 p.
- 278) Snedecor GW, Cochran WG (1967): Statistical methods 6th edn. The Iowa State University Press. Ames IA. 593 p.
- 279) Bakke JL, Lawrence N (1965): Circadian periodicity in thyroid stimulating hormone titer in rat hypophysis and serum. Metab. 14:841.
- 280) Fukuda H, Greer MA, Roberts-Allen CF, Critchlow V, Wilson M (1975): Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine and triiodothyromine. Endocrinol. 97:1424.
- 281) Singh DV, Panda JN, Anderson RR, Turner CW (1967): Diurnal variations of plasma and pituitary thyrotropin in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126: 553.
- 282) Vernon Rookh H, Azukizawa M, DiStefano JJ, Ogihara T, Hershman JM (1979): Pituitary-thyroid hormone periodicities in serially sampled of unanesthetized rats. Endocrinol. 104:851.
- 283) Cardinali DP, Boado RJ, Vacas MI, Deza S (1986): Changes in growth hormone and prolactin release after superior cervical gangliectomy of rats. Brain Res. 363:350
- 284) Morgan WW, Hansen JT (1978): Time-course of the disappearance of pineal noradrenaline following superior cervical ganglionectomy. Exp. Brain. Res. 32:429.
- 285) Gregory DS, Aviado DG, Sears MI (1985): Cervical gangliectomy alters the circadian rhythm of intraocular pressure in New Zeland white rabbits. Curr. Eye. Res. 4:1273
- 286) Jordan D, Rousset B, Founier M, Orgiazzi J (1980): Evidence for circadian variations in serum thyrotropin 3'5' triiodothyronine and thyroxine in the rat. Endocrinol. 107:1245.

- 287) Leppaluoto J, Ranta T, Tuomisto J (1974): Diurnal variation of serum immunoassayable TSH concentration in the rat. Acta. Physiol. Scand. 90:699.
- 288) Chiochio SR, Cardinali DP, Vacas MI, Tramezzani JH (1984): Acute superior cervical ganglionectomy depresses the postcastration rise of gonadotropins in male rats. Brain. Res. 309:354.
- 289) Grunditz T, Häkanson R, Rerup C, Sundler F, Uddman R (1984): Neuropeptide Y in the thyroid gland: neuronal localization and enhancement of stimulation thyroid hormone secretion. Endocrinol. 115:1537.
- 290) Ahrén B (en prensa): Neuropeptide Y and pancreatic polypeptide: effects on thyroid hormone secretion. Eur. J. Pharmacol.
- 291) Brammer G., Morley FE, Geller E, Yuwiler A, Hershman JM (1979): Hypothalamus-pituitary-thyroid axis interactions with pineal gland in the rat. Am. J. Physiol. 263:E416.
- 292) Bascheri L, DeLuca F, Cramarossa L, de Martino C, Oliviero A, Negri M (1963): Modifications of thyroid activity by melatonin. Experien. 19:15.
- 293) Gordon J, Morley JE, Hershman JM (1980): Melatonin and the thyroid. Horm. Metab. Res. 12:71.
- 294) Axelrod J (1983): Regulation of circadian rhythm of indolamines in pineal gland. En: The pineal gland and its endocrine role. Axelrod J, Fraschini F, Velo GP (eds). Plenum Press. p. 1.
- 295) Lewinski A (1981): Inhibitory effect of intrathyroidal injections of 6-hydroxydopamine on the compensatory thyroid hyperplasia in rats. Neuroendocrinol. Lett. 3:341.
- 296) Kostrzewa RM, Jacobowitz DM (1974): Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. Pharmac. Rev. 26:199.
- 297) Westermark K, Karlsson FA, Westermark B (1983): Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture. Endocrinol. 112:1680.

- 298) Lewinski A (1981): Pituitary is not required for the compensatory thyroid hyperplasia. Horm. Res. 15:189.
- 299) Engeland WC, Shinsaki J, Dallman MF (1975): Corticosterone and ACTH are required for compensatory adrenal growth. Am. J. Physiol. 229:1461.
- 300) Gerendai I (1979): Less severe ovarian atrophy in hypophysectomized hemiovariectomized rats than in hypophysectomized animals with two ovaries. Neuroendocrinol 39:346.
- 301) Dicker SE, Greenbaun AL, Morris CA (1977): Compensatory renal hypertrophy in hypophysectomized rats. J. Physiol (Lond) 273:241.
- 302) Lewinski A, Bartke A, Smith NKR (1983): Compensatory thyroid hyperplasia in thyroidectomized snell dwarf mice. Endocrinol. 113:2317.
- 303) Gerendai I (1980): Unilateral complete isolation on the medial basal hypothalamus interferes with compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. Neuroendocrinol. Lett. 2:39.
- 304) Gerendai I, Denkova RT (1980): The medial preoptic area and the hypothalamic arcuate nucleus participate in the neural mechanism of the compensatory ovarian growth. Neuroendocrinol. Lett. 2:263.
- 305) Gerendai I, Halász B (1976): Hemigonadectomy induced unilateral changes in the protein-synthetizing activity of the rat hypothalamic nucleus. Neuroendocrinol. 21:331.
- 306) Gerendai I, Halász B (1981): Participation of a pure neuronal mechanism in the control of gonadal functions. Androl. 13:172.
- 307) Mizunuma H, DePaltis LR, McCann SM (1983): Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: evidence for a direct neural conection between testes and CHS. Neuroendocrinol. 37:291.
- 308) Foley JO, Dubois FS (1940): A quantitative and experimental study of the cervial sympathetic trunk. J. Comp. Neurol. 72:587.
- 309) Foley JO (1945): The components of the cervical sympathetic trunk with special reference to its accessory cells and ganglia. J.Comp.Neurol. 82:77.

- 310) Douglas WW, Ritchie JM (1956): The conduction of impulses through the superior cervical and accessory cervical ganglia of the rabbit. J. Physiol. 133:220.
- 311) Bowers CW, Zigmond RE (1981): Sympathetic neurons in lower cervical ganglia send axons through the superior cervical ganglion. Neurosci. 6:1783.

P. C.

~~A. E. Bowers~~