

Tesis de Posgrado

Participación de la inervación simpática en la regulación de la secreción de Parathormona y Calcitonina

Ladizesky, Marta Graciela

1988

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:

Ladizesky, Marta Graciela. (1988). Participación de la inervación simpática en la regulación de la secreción de Parathormona y Calcitonina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2124_Ladizesky.pdf

Cita tipo Chicago:

Ladizesky, Marta Graciela. "Participación de la inervación simpática en la regulación de la secreción de Parathormona y Calcitonina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2124_Ladizesky.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

PARTICIPACION DE LA INERVACION SIMPATICA EN LA REGULACION
DE LA SECRECION DE PARATHORMONA Y CALCITONINA

AUTOR

MARTA GRACIELA LADIZESKY

DIRECTOR: PROF. DR. DANIEL PEDRO CARDINALI

CO-DIRECTOR: DR. CARLOS ALFREDO MAUTALEN

LUGAR DE TRABAJO

UNIDAD DE OSTEOPATIAS - HOSPITAL DE CLINICAS - UNBA
CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y PRINCIPIOS NATURALES - CONICET

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1988

2.124
EJ 2

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. Daniel P. Cardinali, quien con su dirección, estímulo y apoyo permanentes hizo posible la realización de esta Tesis.

Al Dr. Carlos Mautalen, Co-Director de la Tesis, con quien me inicié en la investigación. Por todos los años de trabajo en común durante los cuales, con su ejemplo personal, conocimientos y dirección, determinó mi formación científica. Mi agradecimiento especial, además, por posibilitar y alentar mi reingreso a las tareas de investigación.

A los Doctores: Horacio Romeo, que efectuó la cirugía experimental de este Trabajo; Eduardo Slatopolsky y Gerardo Sartorio, en cuyos laboratorios se efectuaron parte de los radioinmunoensayos y Cristina Díaz que desarrolló las técnicas histológicas.

A mis compañeros de laboratorio de la Sección Osteopatías del Hospital de Clínicas por el permanente clima de amistad y compañerismo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo brindado durante todos mis años de trabajo.

A la señorita Verónica Lacoste por su colaboración para el mecanografiado de esta Tesis.

A mi esposo, Félix Roisman, por su apoyo moral, comprensión y ayuda durante el desarrollo de este Trabajo.

A Félix y Dina

ABREVIATURAS

AMP	Amino metil propanol
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CFx	Cresolftalein complexona
COMPT	Catecol-O-metil transferasa
CT	Calcitonina
C-terminal	Carboxi-terminal
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
GCS	Ganglio Cervical Superior
GCSx	Gangliectomía Cervical Superior
i.p.	Intra peritoneal
LEC	Líquido extracelular
MAO	Monoamino oxidasa
NE	Norepinefrina
N-terminal	Amino-terminal
PTH	Hormona paratiroidea (Parathormona)
PTx	Paratiroidectomía
s.c.	Sub cutáneo
TSH	Tirotrofina
1,25(OH) ₂ D	1,25 dihidroxi vitamina D
24,25(OH) ₂ D	24,25 dihidroxi vitamina D
25(OH)D	25 hidroxi vitamina D

INDICE

CAPITULO 1: <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1 <u>FISIOLOGIA DE LA REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO MINERAL</u>	2
1.1.1 CONCEPTOS GENERALES	2
1.1.2 HORMONA PARATIROIDEA	4
1.1.2.A Paratiroides: Anatomía - Histología	4
1.1.2.B Estructura y biosíntesis	5
1.1.2.C Regulación de la secreción	7
1.1.2.D Metabolismo periférico	9
1.1.2.E Mecanismos de acción	10
1.1.2.F Acciones biológicas	10
1.1.2.G Resumen	13
1.1.3 CALCITONINA	14
1.1.3.A Células C-tiroideas: Anatomía - Histología .	14
1.1.3.B Estructura y biosíntesis	15
1.1.3.C Regulación de la secreción	16
1.1.3.D Metabolismo periférico	18
1.1.3.E Mecanismos de acción	18
1.1.3.F Acciones biológicas	18
1.1.3.G Resumen	20
1.1.4 OTROS FACTORES	21
1.1.5 INTEGRACION DE LA REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO DEL CALCIO	22
1.2. <u>EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO</u>	26
1.2.1 ORGANIZACION DE LA INERVACION AUTONOMA	27
1.2.2 EL SISTEMA SIMPATICO	27

1.2.3 LA TRANSMISION NEUROQUIMICA EN EL SISTEMA SIMPATICO	27
1.2.3.A Neurotransmisores	27
1.2.3.B Liberación del transmisor	30
1.2.3.C Adrenoceptores y actividad postsináptica ...	30
1.2.3.D Destrucción del transmisor	32
1.3 <u>GANGLIO CERVICAL SUPERIOR (GCS)</u>	34
1.3.1 ANATOMIA - HISTOLOGIA	34
1.3.2 TERRITORIOS DEL GCS	35
1.3.2.A Tiroides - paratiroides	35
1.3.2.B Otros territorios	37
1.3.3 EFECTOS DE LA GCSx	37
1.4 <u>AMINAS BIOGENAS Y SECRECION DE PTH Y CT</u>	41
1.4.1 SECRECION DE PTH Y AMINAS BIOGENAS	41
1.4.1.A Estudios "in vitro"	41
1.4.1.B Estudios farmacológicos "in vivo"	43
1.4.1.C Deprivación de catecolaminas	44
1.4.1.D Estimulación de nervios adrenérgicos	45
1.4.2 SECRECION DE CT Y AMINAS BIOGENAS	46
1.4.2.A Estudios "in vitro"	46
1.4.2.B Estudios farmacológicos "in vivo"	47
1.4.2.C Deprivación de catecolaminas	48
1.4.2.D Estimulación de nervios adrenérgicos	49
1.4.3 RESUMEN	49
1.5 <u>OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS</u>	51

CAPITULO 2: <u>MATERIALES Y METODOS</u>	52
2.1 Animales y técnicas quirúrgicas	53
2.1.1 Gangliectomía cervical superior	53
2.1.2 Paratiroidectomía	54
2.2 Inducción de respuestas secretoras en la paratiroides y células C-tiroideas	54
2.2.1 Estimulación de la secreción de PTH	54
2.2.2 Estimulación de la secreción de CT	55
2.3 Caracterización farmacológica de receptores adrenérgicos	56
2.4 Obtención y conservación de suero	56
2.5 Determinaciones de calcio sérico	57
2.6 Radioinmunoensayos	58
2.6.1 Determinaciones de PTH sérica	58
2.6.2 Determinaciones de CT sérica	59
2.7 Estudios histológicos	60
2.8 Estadística	61
CAPITULO 3: <u>RESULTADOS</u>	62
3.1 <u>PARTICIPACION DE LA INERVACION SIMPATICA EN LA MODULACION DE LA RESPUESTA BASAL DE LAS CELULAS PARATIROIDEAS Y C-TIROIDEAS</u>	63
3.1.1 Calcemia	63
3.1.2 Parathormona sérica	63
3.1.3 Calcitonina sérica	64
3.1.4 Resumen	64

3.2	<u>MODULACION POR LA INERVACION SIMPATICA DE LA RESPUESTA ESTIMULADA DE LAS CELULAS PARATIROIDEAS Y C-TIROIDEAS</u>	68
3.2.1	Modulación de la secreción estimulada de PTH	68
3.2.1.A	Calcemia	68
3.2.1.B	Parathormona sérica	68
3.2.2	Modulación de la secreción de PTH durante su estimulación supramáxima	69
3.2.3	Resumen	70
3.2.4	Modulación de la secreción estimulada de CT	76
3.2.4.A	Calcemia	76
3.2.4.B	Calcitonina sérica	76
3.2.5	Modulación de la secreción de CT durante su estimulación supramáxima	77
3.2.6	Resumen	77
3.3	<u>PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES α Y β ADRENERGICOS EN LA MODULACION NEURAL SIMPATICA DE LA SECRECION DE PTH Y CT</u>	83
3.3.1	Efecto de bloqueantes adrenérgicos sobre la secreción estimulada de PTH	83
3.3.1.A	Calcemia	84
3.3.1.B	Parathormona sérica	84
3.3.2	Resumen	84
3.3.3	Efecto de bloqueantes adrenérgicos sobre la secreción estimulada de CT	87
3.3.3.A	Calcemia	87
3.3.3.B	Calcitonina sérica	87
3.3.4	Resumen	89

3.4	<u>REGULACION DE LA SECRECION DE PTH DURANTE LA GCSx</u>	
	<u>CRONICA. ESTUDIOS EN RATAS HEMIPTx</u>	93
3.4.1	Niveles séricos de calcio y CT	93
3.4.2	Indice mitótico - Estudios histológicos	94
3.4.3	Resumen	94
3.5	<u>REGULACION DE LA SECRECION DE CT DURANTE LA GCSx</u>	
	<u>CRONICA</u>	100
3.5.1	Resumen	101
CAPITULO 4:	<u>DISCUSION</u>	104
	<u>CONCLUSIONES</u>	120
BIBLIOGRAFIA	122

CAPITULO 1

I N T R O D U C C I O N

1.1- FISIOLOGIA DE LA REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO MINERAL

1.1.1- CONCEPTOS GENERALES

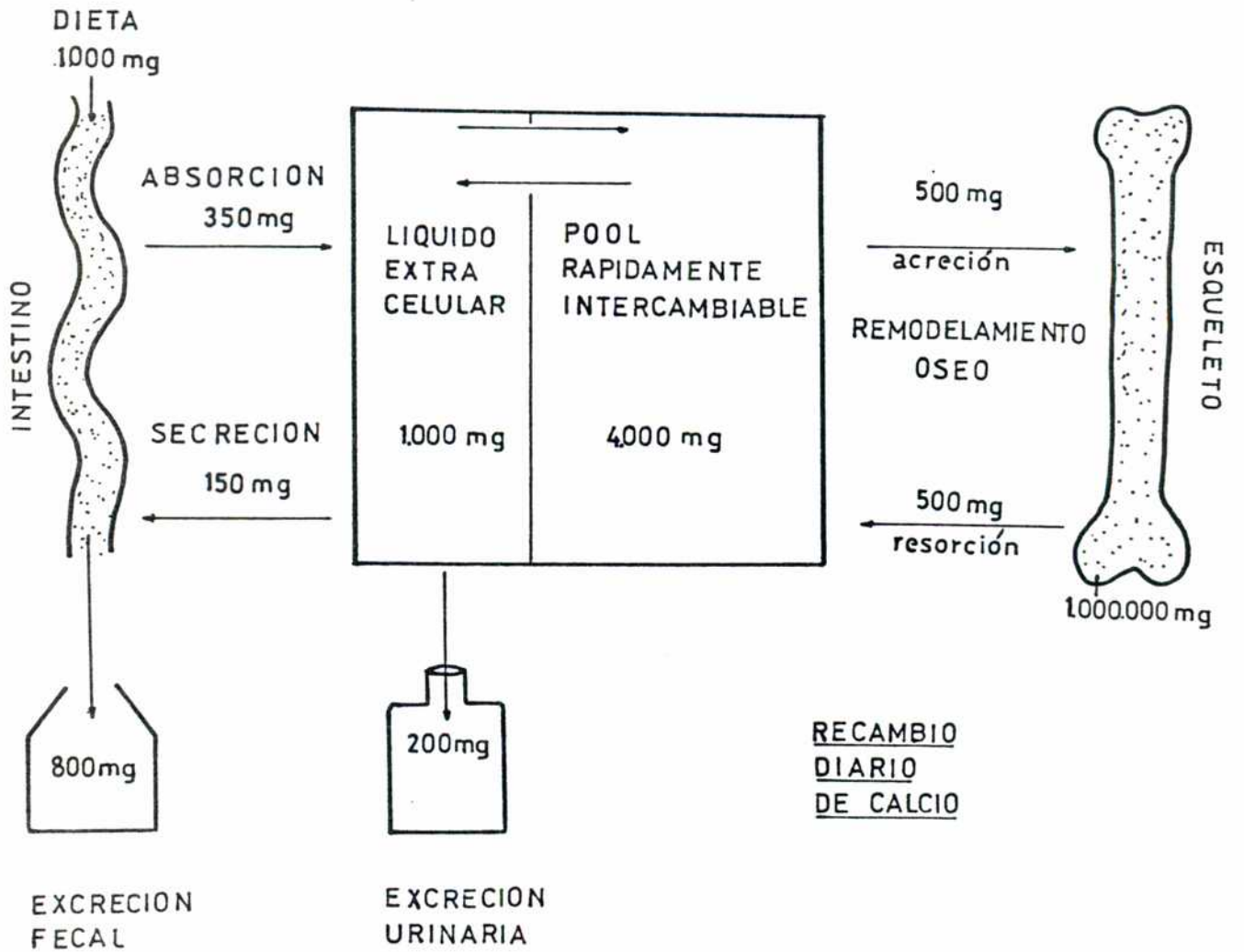
El ion calcio es de fundamental importancia en todos los sistemas biológicos. La concentración de calcio intra o extra celular regula numerosas funciones orgánicas y acciones celulares: participa en reacciones enzimáticas, en los mecanismos de secreción hormonal y es un mediador de efectos hormonales (1).

El calcio iónico se halla íntimamente ligado a la neurotransmisión, la contracción muscular y la coagulación de la sangre. Es el principal catión de la estructura cristalina del hueso y los dientes. Por estas y otras razones resulta de vital importancia que las células estén rodeadas por líquidos en los que la concentración de calcio se mantenga dentro de los estrechos límites de la tolerancia fisiológica, garantizando así la concentración intracelular adecuada para la actividad celular (1). La Fig. 1 muestra el recambio diario promedio de calcio en humanos.

Para mantener este equilibrio, el organismo se vale de un complejo sistema de regulación hormonal que está integrado fundamentalmente por las hormonas paratiroides (PTH), calcitonina (CT) y los metabolitos derivados de la vitamina D, cuyos principales órganos efectores son hueso, riñón e intestino (1). De esta manera se mantiene la concentración de calcio iónico sérico en su nivel fisiológico óptimo: 1,3 milimolar que representa aproximadamente la mitad del calcio total circulante (2,3).

A continuación se analizarán en detalle las fun-

FIGURA 1: RECAMBIO DIARIO PROMEDIO DE CALCIO EN HUMANOS



Después de una ingestión diaria promedio de 1g de calcio se absorbe alrededor del 35%. Para mantener el balance se debe excretar la misma cantidad (350mg). Alrededor de 150mg se segregan en el intestino y se excretan en las heces junto con la fracción no absorbida de la dieta. El riñón filtra alrededor de 10g de calcio por día reabsorbiendo un 98%.

El calcio penetra y sale de un pool extracelular de 1g que está en equilibrio con un pool rápidamente intercambiable. Aproximadamente un 50% de este último proviene del hueso. 500mg de calcio por día, son extraídos del espacio extracelular para la acreción ósea y vuelven a él por resorción ósea en el proceso que conforma el remodelamiento del hueso. El importante almacenamiento de calcio del esqueleto (alrededor de 1Kg) lo hace cuantitativamente el reservorio mas importante que mantiene la estabilidad del calcio plasmático.

ciones de dos de estas hormonas y los mecanismos que regulan su secreción.

1.1.2- HORMONA PARATIROIDEA

La PTH es la principal reguladora de la concentración de calcio en plasma. Su función primordial consiste en mantener los niveles circulantes de calcio cuando éstos tienden a disminuir. Para ello incrementa la incorporación de calcio al líquido extracelular a través de sus acciones directas o indirectas sobre intestino, túbulos renales y esqueleto.

1.1.2.A- Paratiroides: Anatomía-Histología

Las glándulas paratiroides en mamíferos se desarrollan a partir de la 3ª y 4ª bolsas branquiales y finalmente se localizan detrás de la tiroides (4). Su irrigación proviene de las arterias tiroideas y su drenaje venoso se efectúa dentro de las venas yugular y tiroidea inferior (4). Están constituidas en su mayor parte por las células principales en las que se sintetiza y secreta la PTH (5). Su diámetro es de 4-8 μm y poseen un pequeño núcleo central que contiene cromatina densa. Sobre la base de su apariencia ultraestructural, éstas células se han dividido en 2 clases: "activas" que contienen regiones paralelas de retículo endoplásmico en las que es sintetizada la proteína precursora de la PTH, una región de Golgi de apariencia prominente (probablemente el sitio de almacenamiento hormonal) y gránulos secretorios unidos a la membrana. En condiciones fisiológicas normales, la cantidad de hormona almacenada y los gránulos secretorios son escasos. También existen microtúbulos que juegan un papel importante facilitando

el movimiento de los gránulos secretorios hacia la periferia. Las células "inactivas" presentan un retículo endoplásmico disperso, una región de Golgi pequeña, vacuolas con abundante glicógeno y gránulos de lipofucsina. Existe un activo proceso de transformación de células activas a inactivas.

Después de la pubertad, aparecen células oxofílicas de 6-10 μ m de diámetro que contienen pequeños núcleos centrales picnóticos y abundantes mitocondrias. Generalmente presentan un retículo endoplásmico disperso y una región de Golgi pobremente desarrollada. Estas células, que no son secretoras de hormona, incrementan su número con la edad y pueden representar una forma degenerativa de las células principales (1).

Diversos estudios clínicos (6-10) y sólo un trabajo experimental (11) muestran que, con cierta frecuencia, después de una paratiroidectomía parcial el tejido paratiroideo remanente puede desarrollar hiperplasia, aunque no hay acuerdo respecto a los mecanismos que regulan la aparición de este fenómeno ni a la generalidad del mismo (10).

1.1.2.B- Estructura y biosíntesis

Los primeros extractos activos de glándulas paratiroides fueron preparadas en 1924 por Berman (12). En 1970 Brewer y Ronan (13) publicaron la secuencia completa de aminoácidos de la PTH bovina y posteriormente se aclaró la estructura de la PTH humana (14) y porcina (15). Asimismo, la hormona de pollo (16) y de rata (17) son similares en tamaño a las de otras especies. En todos los casos la PTH es una proteína que contiene 84 aminoácidos reunidos en una cadena simple de peso molecular

aproximado 9.600 (18). Las moléculas de diferentes especies difieren entre sí en pocos aminoácidos. Se ha demostrado que sólo el primer tercio de la molécula, la porción 1,34 amino-terminal, es biológicamente activa y posee el 77% de la actividad de la hormona nativa. La región carboxi-terminal es biológicamente inactiva (residuos 37-84) (19).

La PTH no se sintetiza directamente. Habener ha propuesto un modelo que resume el proceso de síntesis (20): La Pre-pro PTH es el producto inicial de la síntesis en los ribosomas; es una proteína de 115 aminoácidos y contiene toda la información estructural codificada en el gen para la PTH. Antes de ser volcado al retículo endoplásmico, este producto es clivado perdiendo primero 2 y luego 23 aminoácidos a partir del extremo N-terminal dando origen a la Pro-PTH de 90 aminoácidos. Este péptido ingresa al retículo endoplásmico 15-20 minutos después de haber comenzado la síntesis. Allí es degradado nuevamente por una enzima triptica, perdiendo el hexapéptido N-terminal, formándose la molécula final de PTH que es volcada al aparato de Golgi. Parte de la PTH resultante se empaqueta para su almacenamiento en gránulos de secreción maduros (30 minutos después de iniciada la síntesis) y es liberada 15 minutos después. Sin embargo, cuando se requiere una rápida liberación de hormona ante un estímulo agudo, la hormona recientemente sintetizada puede ser transportada directamente a través de la célula para su liberación inmediata (21). Asimismo, también ocurre degradación de PTH dentro de las células paratiroides, de modo que no todas las moléculas sintetizadas pasan a circulación (18). Se ha encontrado que también se secretan fragmentos carboxi y en menor medida amino-terminales (22,23).

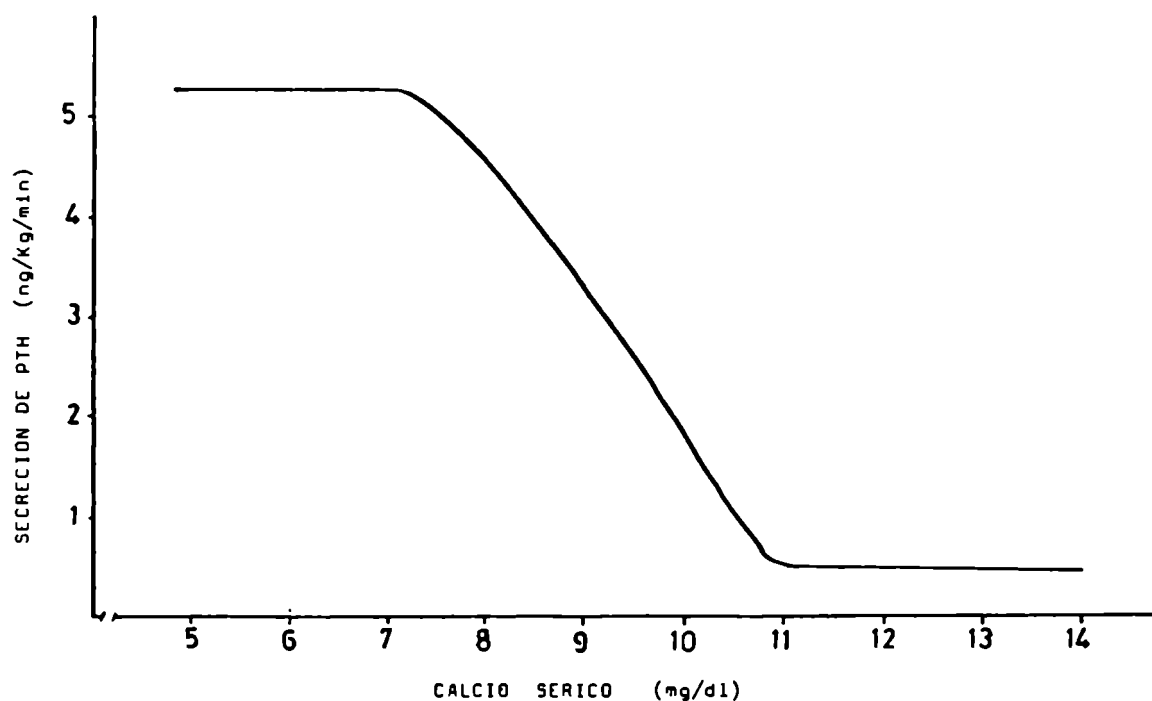
1.1.2.C- Regulación de la secreción

El calcio iónico es el principal agente regulador de la secreción de PTH (1). Existe una relación inversa entre la concentración de calcio que baña la glándula y la cantidad de hormona liberada (24) que varía de manera sigmoidea (Fig.2). La máxima velocidad de secreción ocurre cuando el calcio total sérico es menor que 7 mg/dl. La secreción de PTH se reduce progresivamente a medida que la calcemia aumenta a 11 mg/dl. A partir de este punto hay una secreción basal persistente de PTH liberada que no es suprimida por la elevación del calcio plasmático.

La respuesta secretora a la hipocalcemia ocurre en segundos (25). Bruce y Anderson (26) sugieren que la hipocalcemia provoca una rápida hiperpolarización de la membrana de la célula paratiroidea facilitando la liberación hormonal. Se ha encontrado que el calcio iónico regula la degradación intracelular de la hormona (27, 28) y en menor medida su síntesis (28).

Existen otros agentes que pueden afectar la secreción de PTH aunque no resulta claro si desempeñan un rol activo en la homeostasis del calcio (18). Entre ellos el de mayor importancia es el magnesio que a niveles elevados inhibe la secreción de PTH con una potencia equivalente a 1/3 de la del calcio (29,30). Sin embargo, esta regulación es de menor importancia sobre su rango fisiológico normal (1,5 a 2,5 meq/l). La hipomagnesemia también afecta la secreción de PTH (31). Se ha sugerido que podría jugar un rol directo sobre el proceso de exocitosis vesicular (18).

FIGURA 2: REGULACION DE LA SECRECION DE PTH POR EL CALCIO SERICO



La máxima estimulación de la secreción de PTH se observa cuando la calcemia es menor o igual a 7 mg/dl. La secreción mínima ocurre cuando la calcemia es mayor o igual a 11 mg/dl.

Por otra parte hay evidencias que indican que los metabolitos de la vitamina D afectan la función paratiroidea. En efecto, en las células paratiroideas se han detectado receptores a la 1,25-dihidroxitamina D ($1,25(OH)_2D$) (32,33). También en el material nuclear de éstas células se ha encontrado $1,25(OH)_2D$ (32,34) que, como se verá más adelante es el metabolito activo por excelencia derivado de la vitamina D, sugiriendo que el mismo puede modificar la síntesis de precursores de la PTH (33,35,36). El efecto de los metabolitos de la vitamina D en particular de la $1,25(OH)_2D$ sobre la secreción de PTH es inhibitorio. Se ha encontrado que la 25-hidroxitamina D ($25(OH)D$), la 24,25 dihidroxivitamina D ($24,25(OH)_2D$) y la $1,25(OH)_2D$ pueden inhibir la secreción de PTH y reducir el tamaño de adenomas paratiroideos (37,38). Sin embargo, no hay acuerdo total sobre este punto (39).

Como se verá más adelante, también las catecolaminas pueden afectar la secreción de PTH. Sin embargo, hasta el momento no se han efectuado estudios claros que permitan evaluar la participación de la inervación simpática en la regulación de la secreción de PTH.

1.1.2.D- Metabolismo periférico

Como se mencionó en 1.1.2.B, la paratiroides secreta tanto la hormona entera como fragmentos de la misma. La PTH tiene una vida media de 1 a 10 minutos y es degradada en hígado y riñón (40). La hormona circulante es heterogénea (41) y el fragmento de mayor concentración, ya que posee una vida media plasmática más prolongada que la hormona nativa, es el carboxi-terminal (al menos 1 hora de vida media), biológicamente inactivo y cuyo P.M. es de 6.000 (42). Parte de este fragmento proviene de la se

creción normal de la glándula y el resto del metabolismo periférico de la hormona posterior a su secreción. El fragmento amino-terminal, de P.M. 3.500 es biológicamente activo y su vida media es de 2 a 4 minutos (42).

1.1.2.E- Mecanismos de acción

El control de la PTH sobre la homeostasis del calcio comienza a partir de la interacción entre el fragmento 1-34 de la molécula con receptores específicos de membrana. Estos receptores se han encontrado en diferentes tipos celulares de riñón (43,44) y hueso (45). Tal interacción provoca activación de la adenilato ciclasa y en consecuencia incremento de la síntesis de AMPc intracelular. El AMPc a su vez activa diferentes sistemas que finalmente conducen a la concreción de los efectos hormonales. La interacción de la hormona con la membrana celular también puede inducir cambios directos como modificaciones en el flujo del ión calcio hacia el interior o exterior de las células (1,46).

Las consecuencias que estos mecanismos provocan dependen de cada célula: En los osteoblastos llevan a una inhibición de la síntesis de colágeno. En los osteoclastos activan el sistema de resorción ósea y en las células osteoprogenitoras inducen incremento en la síntesis de ADN que se traduce en una mayor diferenciación a osteoclastos (47,48). En las células renales se modifica el transporte de calcio y fósforo a través de la membrana (1).

1.1.2.F- Acciones biológicas

La PTH actúa sobre el hueso (el principal reservorio de calcio del organismo) a través de 3 mecanismos (47-49):

1- Sobre los osteocitos de superficie incrementando el intercambio de calcio entre el líquido extracelular óseo y la sangre. Este incremento se cumple a través de 3 vías: a) Aumento de la solubilidad del mineral mediado por la inducción de síntesis de ácidos orgánicos por los osteocitos, facilitando así la salida de calcio del hueso. b) La PTH estimula una bomba de calcio presente en los osteocitos incrementando el pasaje de calcio desde el líquido extracelular óseo al sistémico. c) Actúa como vasodilatador arterial asegurando un mayor flujo sanguíneo al hueso durante la salida de calcio desde los osteocitos hacia el líquido extracelular sistémico.

2- Sobre los osteocitos de profundidad: Estos forman un tejido óseo metabólicamente muy activo de ubicación perilacunar. Cuando la PTH aumenta, provoca resorción de la matriz y disolución del mineral, incrementando el tamaño de los espacios perilacunares que pueden confluir entre sí.

3- Sobre el remodelamiento y modelamiento del hueso a través de la activación de osteoblastos y osteoclastos. En dosis menores, la PTH activa los osteoblastos y los osteoclastos en reposo. Dosis mayores estimulan la diferenciación de células osteoprogenitoras a osteoclastos. A través de estos mecanismos la hormona incrementa el metabolismo del hueso, facilitando una rápida liberación de minerales a partir de hueso recién formado como respuesta a las necesidades sistémicas. Es importante resaltar que el tejido óseo recién sintetizado posee una matriz proteica soluble, con un mayor contenido de agua y en consecuencia una mejor disponibilidad de minerales que ofertar.

En resumen, la PTH actúa sobre el hueso de la siguiente manera: 1- Estimula los osteocitos de superficie

que facilitan el pasaje de calcio desde el líquido extracelular óseo al líquido extracelular sistémico. 2- Actúa sobre los osteocitos profundos activando la resorción del tejido óseo perilacunar. 3- Estimula la diferenciación de células osteoprogenitoras a osteoclastos incrementando la velocidad de recambio óseo. La administración crónica de PTH, resulta finalmente en un aumento de la resorción ósea sobre la superficie endosteal y una estimulación de la formación perióstica con predominancia de la primera. Algunas de estas acciones requieren la presencia concomitante de metabolitos de la vitamina D (50).

La PTH tiene numerosas acciones directas sobre el riñon. Uno de los efectos renales más estudiados es su capacidad de inducir fosfaturia a los 15-20 minutos de ser administrada disminuyendo la reabsorción tubular de fosfato y conduciendo a una mayor excreción de fósforo (51). La inhibición de la reabsorción de fosfato por el túbulo proximal está mediada por AMPc (52). En cambio, a nivel de la porción distal no existe mediación del AMPc cuando se administran dosis fisiológicas de PTH (53). También se ha postulado que la PTH incrementa la secreción tubular de fosfato (53) si bien esto no ha sido demostrado.

La hiperfosfaturia provocada por la PTH tiene significado fisiológico. En efecto, dado que la PTH actúa sobre el hueso aumentando la resorción ósea con la consiguiente liberación de calcio, fósforo y otros minerales al líquido extracelular, podría ocurrir un indeseable secuestro por el fósforo del calcio liberado, provocando depósitos de fosfato de calcio en los tejidos blandos. Esto es evitado debido a que la hiperfosfaturia inducida por la PTH elimina el fósforo proveniente de la disolución del mineral óseo, manteniendo los niveles circulantes de

fósforo en tenores tales que no interfieren con el efecto hipercalcemiente de la PTH (47). La PTH incrementa la reabsorción tubular de calcio a nivel del nefrón distal, al mismo tiempo que incrementa la excreción de sodio (54). Por el contrario, en el túbulo proximal disminuye tanto la reabsorción de calcio como la de sodio (54,55) y, como ya hemos visto, también la del fósforo.

Dado que durante la resorción ósea inducida por la PTH existe liberación de bicarbonato además de minerales, la hormona previene la alcalosis incrementando si multáneamente la excreción renal de bicarbonato y la reabsorción tubular de H^+ y NH_4^+ . El resultado es una moderada acidosis (56). Se complementa así la acción de la PTH sobre el hueso, dado que la acidosis facilita la disolución del mineral óseo (47).

La PTH incrementa la síntesis renal de $1,25(OH)_2D$ (57) que coadyuva para elevar la calcemia a través de la estimulación de la resorción ósea y de la absorción intestinal de calcio. Recientemente se ha descrito un efecto directo de la PTH sobre la absorción intestinal de calcio (58).

1.1.2.G- Resumen

El efecto integral de la PTH es mantener un tenor adecuado de calcio en el compartimiento extracelular. La hormona actúa sobre el hueso, incrementando su resorción con el consiguiente aporte de calcio y fósforo a la circulación (59). También actúa sobre el riñón incrementando la retención de calcio (59), la excreción de fosfato (51) y la formación de $1,25(OH)_2D$ (58,60). Este último incrementa la absorción intestinal de calcio y fósforo (61). Las acciones sobre hueso y tubo digestivo, que au-

mentan el ingreso de fósforo al líquido extracelular, son compensadas por los efectos sobre riñón donde la PTH incrementa la excreción urinaria de este mineral. De ésta manera disminuye la concentración de fosfato plasmático cuyo incremento podría interferir con el efecto hipercalcemiante neto de la PTH (47).

1.1.3- CALCITONINA

Mientras la PTH aumenta la concentración plasmática de calcio la CT actúa de modo tal de reducirla. Sin embargo, el rol fisiológico de la CT en humanos aún no está del todo aclarado. Es probable que la CT sea un regulador importante del calcio plasmático en peces que, como el salmón, emigran de aguas de río a aguas de mar (62) en las que la concentración de calcio es 10 veces mayor. En el hombre adulto y otros mamíferos, la supresión de la secreción de CT por tiroidectomía no provoca alteraciones en la regulación del metabolismo mineral (63,64,81), apoyando el concepto de que es una hormona residual de origen acuático. Sin embargo, como se verá más adelante la CT ejerce efectos biológicos bien establecidos que sugieren que, en el hombre, podría tener funciones específicas.

1.1.3.A- Células C-tiroideas: Anatomía-Histología

La CT, como factor hipocalcemiante fue descubierta por Copp y col en 1962 (65). El origen tiroideo de esta hormona fue sugerido por Hirsh en 1963 (66) quien obtuvo un factor con propiedades hipocalcémicas a partir de un extracto de tiroides de rata. Por medio de estudios inmunocitoquímicos y de inmunofluorescencia, se confirmó que las células C-tiroideas, también llamadas parafolicu

lares, ubicadas en la zona central de los lóbulos laterales de la tiroides, constituyen la principal fuente de CT en humanos (67). Las células C-tiroideas se originan en la cresta neural embrionaria (68). En los animales inferiores forman una glándula último branquial que se desarrolla a partir de la 6ª bolsa branquial (peces, reptiles, anfibios, aves). En mamíferos migran a su posición final en la glándula tiroides (69).

Las células parafoliculares presentan diferencias histológicas y citoquímicas con las células foliculares secretoras de tiroxina. Son mayores que éstas últimas y presentan un citoplasma pálido. Componen alrededor del 0,1% de la masa epitelial celular de la tiroides. La observación por microscopio electrónico de las células C-tiroideas muestra gránulos unidos a la membrana celular, abundantes mitocondrias, microtúbulos, una región de Golgi bien desarrollada, ribosomas libres y un retículo endoplasmático poco desarrollado. Se ha encontrado que la hipercalcemia aguda provoca degranulación de estas células (1).

1.1.3.8- Estructura y biosíntesis

En diferentes especies la CT se presenta como un polipéptido de 32 aminoácidos de P.M. 3.500 que posee un puente disulfuro N-terminal y una porción amido-prolina C-terminal (70). El estudio de la secuencia de aminoácidos en la CT de salmón, humana, porcina, bovina, ovina y de rata muestra que las diferentes cadenas polipeptídicas pueden diferir en 19 aminoácidos (1).

Al igual que la PTH, la CT también se sintetiza a partir de una forma precursora. El producto inicial es una Pre-pro hormona; un polipéptido que en la rata tiene

un P.M. de 15.000 (71) y en el humano de 17.500 (1). Después de sucesivos clivajes el producto final es almacenado en gránulos secretorios y posteriormente liberado a la circulación. La CT circula como monómero o como un dímero de 64 aminoácidos cuyos péptidos están unidos por dos moléculas de cistina. La actividad biológica es ejercida por la molécula entera (69). A pesar de la considerable variación entre especies en cuanto a la estructura, las diferentes moléculas de calcitonina son activas sobre los seres humanos (69).

1.1.3.C- Regulación de la secreción

El principal regulador de la secreción de CT es el calcio. La liberación hormonal es estimulada por altas concentraciones de este ión e inhibida si las mismas se hacen mínimas (69,72,73). La magnitud de la respuesta al calcio que se observa en las diferentes especies varía en relación a la necesidad que estas tienen de prevenir la hipercalcemia (4). En efecto, los vertebrados que se originaron en aguas dulces, de baja concentración en calcio, y que luego migraron al mar (con 40 mg de Ca/dl) fueron los primeros en necesitar y desarrollar una hormona reductora de la calcemia. Posteriormente, cuando aparecieron los vertebrados terrestres, fue necesario desarrollar una defensa contra la hipocalcemia antes que contra la hipercalcemia y se desarrolló la PTH (4). Se ha demostrado que un incremento brusco del calcio sérico (1 mg/dl) provoca aumentos de la CT circulante que magnifican entre 2 y 10 veces el valor basal (10 a 100 pg/ml) (69). Sin embargo no se ha podido establecer una relación directa entre los tenores de calcio-CT circulantes, como ocurre en el caso calcio-PTH (1).

Las hormonas gastrointestinales son estimuladores farmacológicos de la secreción de CT. Ellas son gastrina, pentagastrina, glucagón, colecistoquinina y cerulina (74,75). Entre ellas, la gastrina es la más potente. El significado fisiológico de la acción que ejercen las hormonas gastrointestinales sobre la secreción de CT aún está en discusión. Se cree que, en su conjunto, tienen la función de prevenir una hipercalcemia post-prandial aumentando los niveles de CT sérica antes de que se incrementa la entrada de calcio desde el intestino (47,69).

También se discute el rol que desempeñan las hormonas sexuales sobre la secreción de CT. Por ejemplo, se ha encontrado en diversas especies animales que la CT circulante es mayor en hembras que en machos (62,76). Por el contrario, en el humano, las mujeres presentan: niveles séricos menores que los hombres (77), una menor respuesta a estímulos secretorios (77) y declinación de la CT sérica con la edad (78). Se ha postulado que los estrógenos estimulan la secreción de CT previniendo la pérdida de calcio en mujeres embarazadas o en período de lactancia, situaciones en que los niveles circulantes de CT son elevados (79,80,81). Por otra parte, la infusión de somatostatina inhibe la secreción de CT (82).

Por último, se ha encontrado que, además del calcio, existen otros cationes divalentes como el estroncio, bario y magnesio que incrementan la secreción de CT "in vitro" e "in vivo" aunque no hay evidencias de que sean reguladores fisiológicos de la misma (69,83).

Como se verá más adelante, las catecolaminas son capaces de alterar la secreción de CT. Hasta el momento no se han efectuado estudios claros "in vivo" que permitan valorar la participación de la inervación simpática local en la regulación de la secreción de CT.

1.1.3.D- Metabolismo periférico

La vida media de la CT plasmática es de alrededor de 10 minutos (84). La hormona se metaboliza fundamentalmente en el riñón, donde es filtrada, reabsorbida y degradada en los túbulos renales (85). Estudios desarrollados "in vitro" demuestran que existe un factor plasmático capaz de degradar CT (86). Dado que en este caso el tiempo de degradación es prolongado (aproximadamente 20 horas) (84) en relación a la vida media de la hormona, se piensa que este mecanismo representa una pequeña proporción del metabolismo total de la CT "in vivo" (69).

1.1.3.E- Mecanismos de acción

Tanto las células óseas como las renales poseen receptores específicos para la CT (87). Después de la unión hormona-receptor, se activa la adenilato ciclasa, que incrementa el tenor intracelular de AMPc (87,88). Este último desencadena, al menos en parte, la acción hormonal. Se ha postulado que el posterior secuestro de calcio por las mitocondrias; que de esta manera reduce la concentración del mismo en el citosol, es uno de los mecanismos por los que se reduce el eflujo de calcio desde las células óseas al líquido extracelular (4).

1.1.3.F- Acciones biológicas

La CT ejerce una acción directa sobre el hueso, independiente de la PTH, inhibiendo la resorción ósea (89). Esta acción se manifiesta "in vitro" sobre los osteoclastos cuyo borde activo rugoso, desaparece 15 a 30 minutos después de agregar CT al medio de cultivo (90).

La CT inhibe la resorción tanto de la matriz como

del mineral del hueso, impide la diferenciación de nuevos osteoclastos y disminuye la actividad de los existentes (89,91). Estos efectos se traducen en una reducción de la liberación a la circulación de los minerales del hueso y de los constituyentes de la matriz ósea y dan como resultado una disminución de la calcemia, de la fosfate-mia y de la excreción de hidroxiprolina urinaria (47).

Diversos autores han postulado una acción directa de la CT sobre la formación ósea. Se ha encontrado que la hormona provoca aumento de la actividad osteoblástica (92), de la masa ósea (93) y de la síntesis de aminogliconos que participan en la formación ósea (94). No se descarta que estos efectos reflejen un incremento de la actividad osteoblástica, secundaria a la inhibición que la CT ejerce sobre los osteoclastos (64).

La magnitud de la disminución de la calcemia después de administrar CT, es proporcional a la capacidad de recambio óseo que posee el esqueleto. Por ejemplo, los animales jóvenes y en crecimiento presentan una mayor respuesta a la CT que los adultos cuyos esqueletos poseen mayor estabilidad (95). La CT jugaría también un rol importante en la protección del esqueleto. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que durante la lactancia (96) u ovulación (97) los niveles de CT sérica se encuentran elevados. Asimismo, como ya se mencionó en 1.1.3.C la CT circulante es menor en la mujer que en el hombre y además declina con la edad. En consecuencia se ha postulado que esta hormona desempeña un papel funcional en la pérdida de la masa ósea que ocurre después de la menopausia (47).

En relación al aparato digestivo, se ha descrito que la CT incrementa la absorción intestinal de calcio

y disminuye la excreción de calcio fecal (98,99). Independientemente de su posible función sobre el calcio, la CT ejerce otros efectos vinculados al aparato digestivo: inhibe la secreción gástrica (100) y biliar (101). Incrementa la secreción de saliva y la secreción intestinal de agua y electrolitos (102). La gastrina y otras hormonas digestivas, como se menciona en 1.1.3.C, incrementan a su vez la liberación de CT, indicando que existe una relación hormonal de retroalimentación entre ellas.

Se han estudiado las posibles funciones neuroendócrinas de la CT circulante de origen C-tiroideo. La hormona fue localizada en diferentes regiones del sistema nervioso central y en la pituitaria (103,104). En consecuencia se piensa que podría actuar como neurotransmisor. Sin embargo su presencia en dichas regiones podría ser un carácter residual vinculado a su origen neural (64).

Si bien la CT es un antagonista fisiológico de la PTH respecto al manejo del calcio, ambas hormonas actúan en el mismo sentido en relación al fosfato: La administración de dosis farmacológicas de CT provoca en el riñón una disminución de la reabsorción tubular de calcio y fósforo, con el consiguiente incremento de la calciuria y en menor medida de la fosfaturia (85). Su efecto neto se traduce en una disminución de la calcemia y de la fosfatemia. Dado que la CT estimula también la captación de fosfato por ciertos tejidos blandos como el hígado (105), la disminución de la fosfatemia se acentúa.

1.1.3.G- Resumen

A pesar de que la CT se considera una hormona residual en mamíferos que refleja su origen acuático, sus funciones son específicas y se pueden resumir de la siguiente manera (47):

- Durante la gestación y en el recién nacido promueve el crecimiento y la mineralización ósea. Participa también en el control de la composición iónica del líquido extracelular fetal.

- Ejerce un control sobre la fisiología de la digestión y de la absorción intestinal interactuando con las hormonas gastrointestinales.

En síntesis, la CT protegería al esqueleto contra la pérdida de tejido óseo bajo circunstancias en las que existe déficit de calcio tales como el embarazo y la lactancia. Además prevendría la hipercalcemia y la consiguiente pérdida renal de calcio que sigue a la ingestión de alimentos ricos en este mineral.

1.1.4- OTROS FACTORES

La vitamina D y sus metabolitos constituyen el tercer grupo hormonal que participa en la homeostasis del calcio. A continuación se analizará brevemente esta participación.

La vitamina D es un esteroide que ingresa al organismo por dos vías: En piel se sintetiza la vitamina D₃ por irradiación de luz ultra-violeta ambiental. La vitamina D₂ por su parte, se incorpora por alimentación. Ambas formas ejercen acciones biológicas similares (57,106, 107). Una vez que la vitamina D ingresa a la circulación sufre una serie de transformaciones (106,107): 1- Es hidroxilada en el hígado en la posición 25 sintetizándose la 25(OH)D. 2- Este metabolito es transportado al riñón donde puede seguir dos vías alternativas: a) hidroxilación en la posición 1, sintetizándose la 1,25(OH)₂D, considerado el metabolito activo de la vitamina D por excelencia (106). b) hidroxilación en la posición 24 formándose la

24,25(OH)₂D cuya actividad biológica global aún está en discusión.

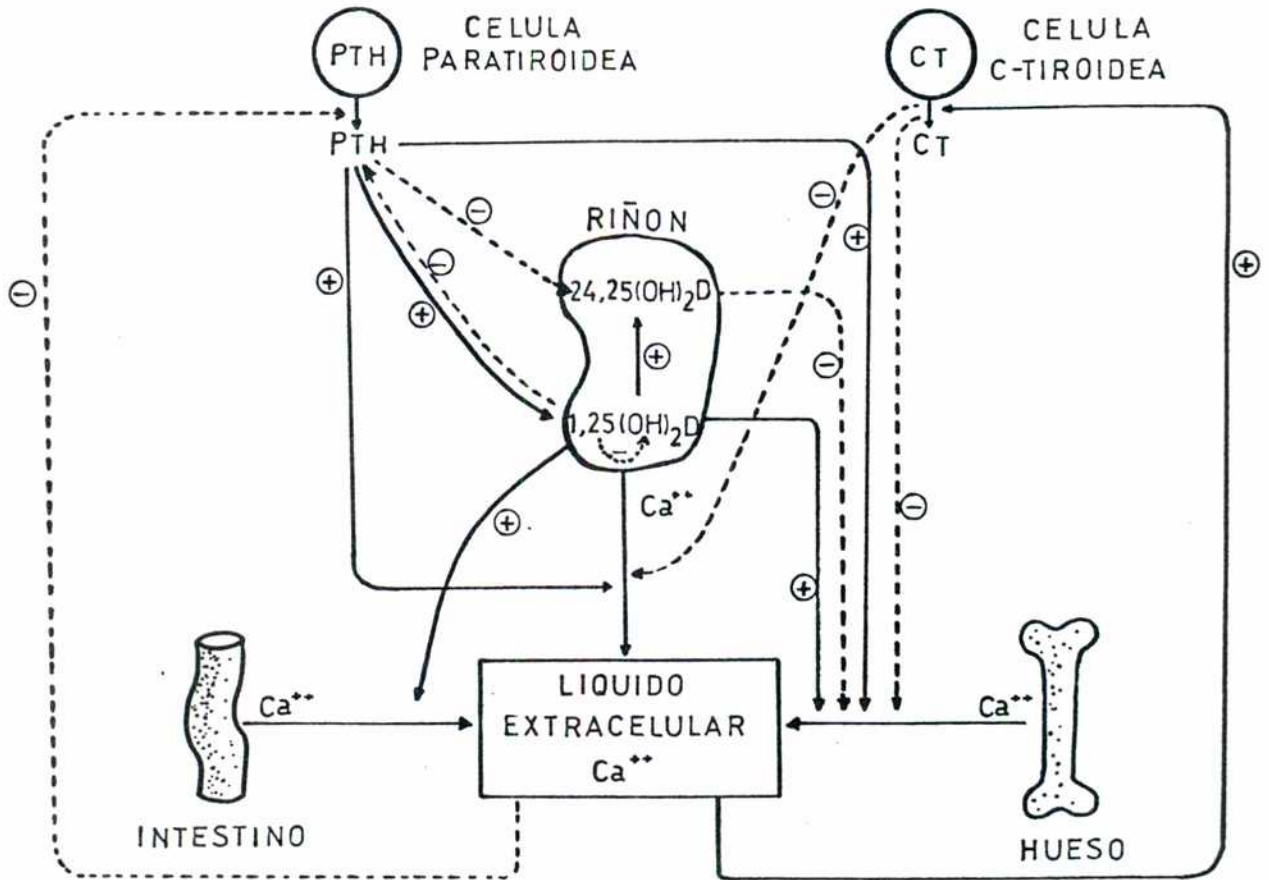
Las acciones biológicas de la 1,25(OH)₂D son las siguientes: 1- Incrementa la absorción intestinal de calcio y fósforo (106). 2- Sobre el hueso estimula la resorción "in vitro" (106). Sus efectos "in vivo" aún no están aclarados aunque se ha postulado que deteriora la mineralización e inhibe la resorción (108). 3- Inhibe la secreción de PTH (32,107). 4- En menor medida, sobre riñón incrementa la reabsorción tubular de calcio y fósforo (57). 5- Niveles elevados de 1,25(OH)₂D sérico provocan: a) estimulación de la conversión de 25(OH)D a 24,25(OH)₂D (107). b) inhibición de su propia síntesis (106). A su vez la 24,25(OH)₂D estimula la formación del hueso y/o su mineralización (50,109).

En síntesis, cuando el organismo necesita incrementar los niveles circulantes de calcio, se activa la síntesis de 1,25(OH)₂D quien apoya las acciones de la PTH movilizándolo desde intestino y hueso hacia el líquido extracelular sistémico. En cambio, cuando la disponibilidad del mineral es abundante, la 25(OH)D es transformada a 24,25(OH)₂D (47).

1.1.5- INTEGRACION DE LA REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO DEL CALCIO

La Fig. 3 resume los puntos principales que componen la regulación hormonal del metabolismo del calcio. La acción hormonal tiende a evitar que ocurran cambios prolongados o rápidos de la calcemia. Cuando esta disminuye, se incrementan la síntesis y secreción de PTH. Esta hormona actúa sobre el riñón provocando un aumento de la reabsorción tubular de calcio y de la excreción de

FIGURA 3: REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO DEL CALCIO



La PTH actúa sobre riñón y hueso estimulando la reabsorción tubular de calcio y la resorción ósea y en consecuencia incrementando el ingreso de calcio al líquido extracelular (LEC). Actúa también inhibiendo la síntesis de $24,25(OH)_2D$ y estimulando la de $1,25(OH)_2D$ que a través de sus efectos sobre intestino y hueso mantiene el aporte de calcio al LEC. En consecuencia se eleva la calcemia.

Por su parte, el incremento de la calcemia provoca la secreción de CT que impide el ingreso de calcio proveniente de hueso y riñón al LEC. Además, la $1,25(OH)_2D$ inhibe la secreción de PTH y frena su propia síntesis estimulando así la formación de $24,25(OH)_2D$ quien estimula la entrada de calcio al hueso. La resultante es una disminución del ingreso de calcio al LEC.

fosfato conduciendo a una elevación del ingreso de calcio al líquido extracelular sistémico. Si el estímulo hipocalcémico no es prolongado, la calcemia retornará a sus valores normales. En caso contrario, la secreción de PTH continúa y se acentúan sus efectos biológicos: Se activa la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y el remodelamiento del hueso. En consecuencia se estimula la absorción intestinal de calcio y se facilita el acceso a la reserva cálcica del esqueleto. Asimismo disminuyen la secreción de CT y la síntesis de $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ evitándose así el flujo de calcio desde el líquido extracelular sistémico hacia el líquido extracelular óseo (47).

Cuando existe un incremento de la calcemia, los cambios provocados son opuestos a los descritos: Al inhibirse la síntesis de PTH desaparece su efecto osteolítico, aumenta la calciuria, disminuye la excreción renal de fosfato y en consecuencia baja el tenor de calcio sérico. El incremento de la secreción de CT provoca una disminución de la actividad osteoclástica y aumenta la excreción renal de calcio, contribuyendo a disminuir el contenido de calcio del líquido extracelular sistémico. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ frena su propia síntesis e inhibe la secreción de PTH. Estimula también la formación de $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ que incrementa la mineralización del hueso. Al mismo tiempo, la disminución de la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ provoca una depresión de la absorción intestinal de calcio y de la resorción ósea. Estos mecanismos conducen también a una disminución de la calcemia.

En síntesis, la acción hormonal previene la hipercalcemia estimulando la salida de calcio del líquido extracelular, a través de su eliminación urinaria y de su ingreso al compartimiento óseo. Simultáneamente, inhibe el ingreso de calcio al líquido extracelular mediante el

bloqueo de la absorción intestinal y de la resorción del hueso (47).

1.2-

EL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO

El Sistema nervioso autónomo inerva los órganos internos. Su función es modular y controlar el medio interno contribuyendo a mantener la homeostasis del organismo. Participa también en situaciones que requieren ajuste a estímulos ambientales tales como adaptación corporal a los cambios de temperatura ambiente o de requerimiento de nutrientes ambientales. Estas funciones son ejercidas en parte bajo el control del sistema nervioso central. La actividad del sistema nervioso autónomo, generalmente involuntaria, se ejerce sobre efectores internos: 1- músculo liso, por ejemplo el intestino. 2- músculo cardíaco. 3- glándulas exócrinas, por ejemplo sudoríparas y salivares. 4- Algunas glándulas endócrinas (110).

La actividad de este sistema provoca rápidos ajustes en respuesta a los cambios del medio ambiente y es ejercido en los ganglios o terminaciones postganglionares mediante la liberación de agentes químicos que actúan transitoriamente en sus sitios inmediatos de liberación. En el caso del sistema simpático, las catecolaminas circulantes actúan sinérgicamente con las neurales. El sistema endócrino, en cambio, regula adaptaciones más lentas y generales liberando agentes hormonales al torrente sanguíneo. Estos agentes actúan en sitios distantes y dispersos durante períodos prolongados.

La teoría neurohumoral puede considerarse como un concepto unitario del funcionamiento de los sistemas nervioso y endócrino en el cual las diferencias son sólo cuantitativas (111).

1.2.1- ORGANIZACION DE LA INERVACION AUTONOMA

Desde el punto de vista funcional y estructural, el sistema nervioso autónomo puede dividirse en dos sectores eferentes que inervan las vísceras: el sistema simpático cuyas prolongaciones parten de la médula espinal a la altura de los segmentos torácico y lumbar y el sistema parasimpático que surge de los segmentos craneales y sacros. Hoy se considera a la inervación vegetativa del tracto gastrointestinal como un tercer factor, independiente del sistema nervioso autónomo (sistema entérico).

La vía final común en la inervación autónoma abarca una cadena bineuronal. En el sistema nervioso central se localizan neuronas preganglionares que se proyectan hacia neuronas postganglionares ubicadas en la periferia.

El sistema simpático está principalmente involucrado en la homeostasis durante la actividad corporal de distintos tipos. En cambio, el parasimpático se vincula con las funciones vegetativas de restauración como digestión y sueño (110).

1.2.2- EL SISTEMA SIMPATICO

La inervación simpática tiende a actuar de modo difuso y prepara al organismo para las emergencias y para la actividad muscular enérgica. Los animales simpatitectomizados, por ejemplo, presentan una resistencia muy disminuida a los extremos de la temperatura ambiental, a la hipoxia y a otros tipos de stress. Se pierde la regulación del sistema cardiovascular con imposibilidad de adaptación a esfuerzos prolongados o intensos (110). Las interconexiones entre los diversos ganglios paravertebrales facilitan la acción difusa del sistema simpático. Simultáneamente,

sus conexiones con la corteza cerebral avalan la presencia de mecanismos capaces de anticipar las necesidades homeostáticas.

La trayectoria común para una fibra simpática pre-ganglionar es la siguiente: Parte de la raíz anterior y recorre un "ramo comunicante blanco" (fibras mielínicas) que constituyen la vía de llegada a los ganglios simpáticos paravertebrales. Esta cadena abarca niveles cervicales a sacros. Las ramas comunicantes blancas sólo se hallan en los niveles que contienen cuerpos celulares pre-ganglionares (segmentos torácico y lumbar superior). Los axones pre-ganglionares se ramifican profusamente en la cadena paravertebral y hacen sinapsis en varios ganglios. A nivel cervical existen 3 ganglios: superior, medio e inferior que reciben estas aferencias. Las neuronas de los ganglios simpáticos originan axones amielínicos pequeños que parten del ganglio para unirse a nervios espinales o viscerales a través del "ramo comunicante gris" (amielínico).

Además de estas sinapsis pre-postganglionares en la cadena paravertebral, existen otras dos estructuras:

- 1- Algunos axones pre-ganglionares continúan su recorrido periféricamente pudiendo efectuar o no sinapsis en la cadena paravertebral. Finalizan en neuronas postganglionares prevertebrales como el ganglio celíaco o el mesentérico.
- 2- La médula suprarrenal es inervada por el nervio esplácnico. Las células ganglionares (en este caso cromafines) son inervadas directamente por axones pre-ganglionares.

1.2.3- LA TRANSMISION NEUROQUIMICA EN EL SISTEMA SIMPATICO

Los transmisores químicos que se liberan en las terminaciones del sistema nervioso autónomo actúan sobre distintos aceptores que a su vez originan una respuesta efectora.

1.2.3.A- Neurotransmisores

El mediador de las fibras preganglionares de los sistemas simpático y parasimpático es la acetilcolina. Las fibras postganglionares del parasimpático también liberan acetilcolina (colinérgicas) (111). Los neurotransmisores liberados por las terminaciones postganglionares del sistema simpático son aminas biógenas y se conocen con el nombre de catecolaminas. Existen dos excepciones a esta regla: tanto el sistema simpático vasodilatador muscular como el que inerva las glándulas sudoríparas están compuestos por neuronas que liberan acetilcolina como neurotransmisor (111).

Las catecolaminas tienen una vía biosintética común que parte de la tirosina. Por acción de la tirosina-hidroxilasa es transformada en L-dopa que a su vez se convierte en dopamina con la intervención de una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Las neuronas adrenérgicas poseen una dopamina β -hidroxilasa que convierte la dopamina en noradrenalina (o norepinefrina (NE)) (111). En otros tipos celulares la NE recibe un grupo metilo que se incorpora al grupo amino de la cadena lateral, sintetizándose adrenalina (o epinefrina). La NE es el neurotransmisor por excelencia de las neuronas simpáticas postganglionares. Las células de la médula suprarrenal liberan fundamentalmente epinefrina. Existen también evidencias de co-transmisión en membranas autonómicas con presencia

simultánea de catecolaminas adrenérgicas y neuropéptidos en las terminales sinápticas (112). Tal es, por ejemplo, el caso del neuropéptido Y que coexiste con NE en las terminales periféricas del sistema simpático cervical (112).

1.2.3.8- Liberación del transmisor

Las catecolaminas se sintetizan probablemente en la región de las terminales sinápticas donde se almacenan dentro de vesículas. Durante el estado de reposo existe una liberación lenta y continua de cuantos aislados del transmisor, generalmente insuficiente para iniciar respuestas postsinápticas evidentes en el punto de unión. Sin embargo se producen cambios de potenciales postsinápticos que se asocian con el mantenimiento de la respuesta fisiológica del órgano efector (113). Un potencial de acción induce la despolarización del terminal provocando la liberación sincronizada del neurotransmisor por un proceso calcio-dependiente. El contenido de las vesículas se descarga al exterior junto con enzimas y otras proteínas. La cuantificación de estos componentes puede suministrar información de utilidad sobre la duración e intensidad de la actividad presináptica (114).

1.2.3.C- Adrenoceptores y actividad postsináptica

El transmisor difunde a través de la hendidura sináptica o de unión y se combina con receptores macromoleculares especializados de la membrana postsináptica. Existen también sitios de unión presináptica. Esta unión neurotransmisor-aceptor lleva a la inducción de modificaciones en la permeabilidad de la membrana (efectos ionotróficos) o resultan en la síntesis de un segundo mensajero intracelular (AMPC, fosfolípidos como el fosfatidil inosi-

tol y otros) provocando efectos metabotróficos (111). Tales respuestas están moduladas específicamente por receptores pre y postsinápticos especializados para el neurotransmisor que inicia la respuesta en la célula efectora (111).

La actividad postsináptica en una célula glandular se refleja en un incremento o depresión de la secreción, de acuerdo al carácter excitatorio o inhibitorio de la señal recibida. La respuesta final es la resultante de la suma algebraica de los estímulos (111).

Se ha descrito que la NE ejerce acciones excitatorias sobre algunos órganos efectores (por ejemplo vasos sanguíneos) y un efecto inhibitorio sobre otros (ciertos músculos). Ahlquist (115) propuso los términos receptores α o β para los sitios de los músculos lisos donde las catecolaminas producen respuestas excitatorias o inhibitorias respectivamente. Más recientemente, en relación a la potencia farmacológica de acción de las catecolaminas en distintos territorios, se han descrito dos tipos de fenómenos. En un caso, por ejemplo músculo vascular, la acción sigue la secuencia NE \gg epinefrina \gg isoproterenol (compuesto sintético formado a partir de la NE por el agregado de un grupo propilo). En otro caso, como la inhibición de ciertos músculos lisos, la secuencia es isoproterenol \gg epinefrina $>$ NE (116).

Ciertas drogas, como la fenoxibenzamina y la fentolamina provocan un bloqueo selectivo de los receptores α y otras, como el propranolol, de los receptores β . De esta manera es posible estudiar por separado los efectos de los impulsos nerviosos adrenérgicos y de los agentes simpático-miméticos sobre ambos tipos de aceptores (111).

Los receptores β se han clasificado en dos subtipos: β_1 (principalmente en corazón) y β_2 (en el resto de los sitios de unión) sobre la base de su capacidad selectiva de respuesta frente a los agentes agonistas y antagonistas (117). Asimismo, existen dos subtipos de receptores α adrenérgicos: los aceptores α_1 se localizan principalmente en los sitios postsinápticos y por ello son responsables de la iniciación de sucesos postsinápticos excitatorios; los aceptores α_2 están ubicados, en parte, en la región presináptica. La activación de los mismos provoca la inhibición de la liberación del transmisor (117). En consecuencia se explica que en las sinapsis adrenérgicas, los receptores α_2 parecen mediar la inhibición de la liberación de NE por retroalimentación. También parece haber receptores α_2 postsinápticos en sitios no inervados por el sistema simpático (117).

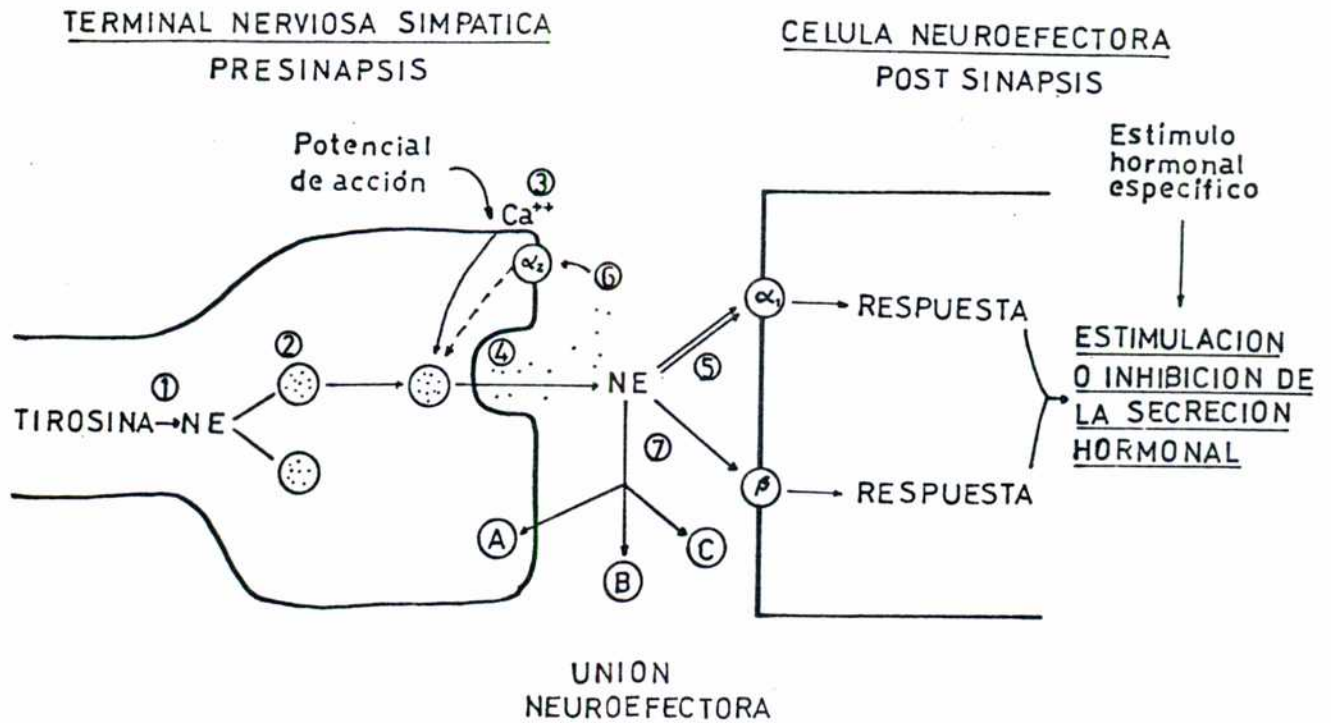
Los efectos resultantes de la acción ejercida por la NE resulta de la diferencia neta entre la actividad provocada por la unión del neurotransmisor con cada uno de los aceptores. La NE provoca una mayor estimulación de los sitios aceptores α que de los aceptores β . (116).

1.2.3.D- Destrucción del transmisor

Una vez desencadenada la acción biológica después de la interacción del neurotransmisor con los sitios adre noceptores, ocurre una desaparición gradual del neurotransmisor. Esta se da a través de 3 vías: 1- Metabolismo enzimático por acción de la monoamino-oxidasa (MAO) y de la catecol-o-metiltransferasa (COMPT). 2- Difusión. 3- Recaptación del mismo por las terminales axónicas (118).

Los procesos descritos en el punto 1.2.3. se resumen en la Fig. 4.

FIGURA 4: ETAPAS DE LA NEUROTRANSMISION QUIMICA EN UNA UNION NEUROEFECTORA SIMPATICA CON UNA CELULA SECRETORA



- 1- Síntesis del neurotransmisor (NE).
- 2- Almacenamiento de NE.
- 3- Un potencial de acción determina el aflujo de calcio a la terminal de la neurona provocando:
- 4- Depolarización de la membrana y exocitosis de las vesículas que contienen NE que es liberada a la hendidura sináptica.
- 5- La NE interactúa con adrenoceptores postsinápticos α_1 y en menor medida β y se inicia la respuesta reflejada en una inhibición o estimulación de la secreción hormonal.
- 6- El neurotransmisor interactúa con receptores α_2 presinápticos inhibiendo la liberación de NE.
- 7- La eliminación de la misma se produce por: A, recaptación; B, difusión; C, metabolización.

1.3- GANGLIO CERVICAL SUPERIOR (GCS)

Como se ha mencionado en el punto 1.2.2, el GCS integra el sistema simpático formando parte de la cadena paravertebral. Se han establecido complejas interacciones entre los ganglios de dicha cadena (119) que sugieren que los mismos se pueden comportar como centros integrativos. En efecto, sus procesos electrofisiológicos pueden ser estimulados o inhibidos por neurotransmisores diversos y varias hormonas afectan las funciones ganglionares (120, 121).

Los axones que parten del GCS o transitan por el mismo provenientes de los ganglios cervicales medio e inferior, proveen inervación simpática a la cara, la mayor parte de la cavidad craneal y parte del cuello, incluyendo tiroides y paratiroides (122).

1.3.1- ANATOMIA-HISTOLOGIA

El GCS de la rata adulta posee estructuras neuronales simples. Cada una de ellas comprende alrededor de 40.000 células y pesa aproximadamente 1 mg (123). Está formado por 4 clases de tipos celulares (124):

1- Vaina conectiva que representa alrededor de un 30% del peso húmedo y que puede ser removida fácilmente por micro disección sin dañar otros componentes del ganglio. 2- Células ganglionares principales. Su diámetro es de 20 a 30 μm y su citoplasma contiene pequeñas vesículas que incluyen gránulos de densidad variable (123). La gran mayoría de estas células son noradrenérgicas aunque también se detectó la presencia de diversos péptidos como neuro péptido Y, somatostatina, encefalina, sustancia P, LHRH, TRH y otros (112). Aún no se conoce el rol fisiológico de estos péptidos. Se postula que podrían actuar como neu

rotransmisores, factores trópicos o como factores involucrados en la modulación a largo plazo de los procesos ganglionares (123). 3- Células de la Glía. Se presentan como células clásicas de Schwann distribuidas alrededor de las fibras amielínicas y también como células satélites que rodean totalmente a las neuronas. Su citoplasma se tiñe con menor densidad que el de las células ganglionares principales y contiene finos filamentos. 4- Células cromafines o SIF (small intensely fluorescent). Contienen gránulos de un diámetro aproximado de 1.500 Å, NE y en algunos casos encefalina (125). Usualmente se agrupan en racimos que forman paraganglios cuyos axones penetran o salen del ganglio o se disponen alrededor de pequeñas vesículas de sangre. Se distribuyen en dos poblaciones: a) células aisladas (SIF Tipo 1) b) células fuertemente unidas alrededor de sinapsis con células SIF Tipo 1 (126).

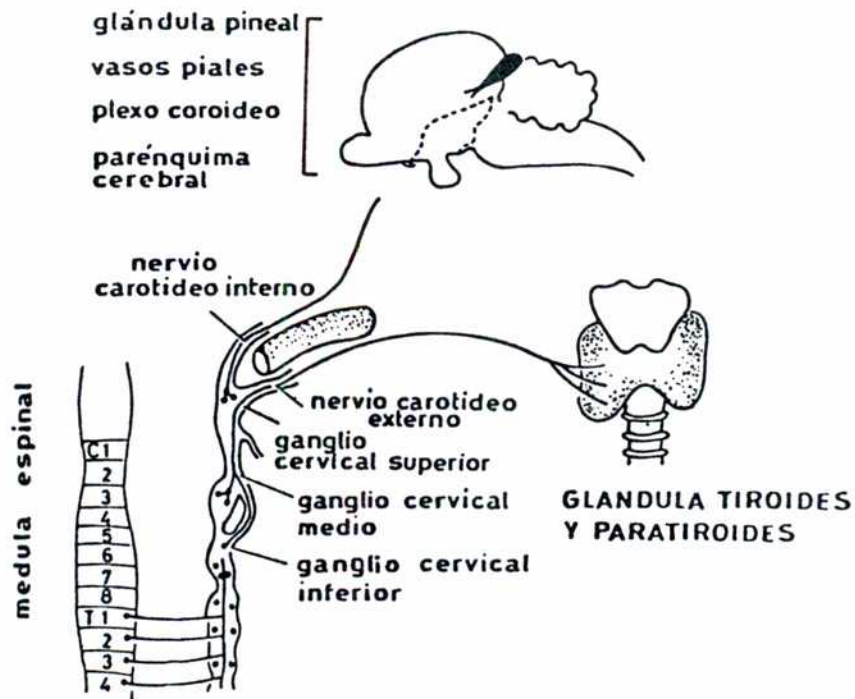
Esta relación anatómica particular entre las células de Tipo II y los capilares que irrigan el GCS puede tener un significado fisiológico doble: 1- Los capilares son vías para la llegada de hormonas extraganglionares (corticoides, estrógenos, gonadotrofinas) disponibles para ser utilizadas por las células SIF. 2- Estos capilares pueden constituirse en canales que transportan catecolaminas desde las células SIF a otras neuronas ganglionares o al pool circulante de catecolaminas (123).

1.3.2- TERRITORIO DEL GCS

1.3.2.A- Tiroides-paratiroides

Entre otras conexiones neuroendócrinas, por el GCS transitan fibras que inervan las glándulas tiroides (incluyendo las células C-tiroideas) y paratiroides (Fig.5).

FIGURA 5: TERRITORIOS INERVADOS POR LAS FIBRAS NERVIOSAS QUE TRANSITAN POR EL GCS



Si bien el origen de las proyecciones neurales es el GCS, en ciertos casos los cuerpos neuronales pueden estar ubicados en ganglios mas caudales, arribar al GCS por el tronco simpático y abandonar el ganglio sin hacer sinapsis intraganglionar.

En la tiroides de diferentes especies, incluyendo el hombre, se han localizado fibras nerviosas procedentes del GCS que contienen NE. Parte de estas fibras se disponen entre y alrededor de los folículos tiroideos (127). Asimismo se ha descrito que existe inervación simpática dentro de la paratiroides y que las terminales nerviosas desembocan cerca de las células del parénquima (128-131). Estas observaciones constituyen una base morfológica que apoya la presencia de una acción directa, no vascular, de la inervación simpática sobre las funciones de las células de la paratiroides y C-tiroideas (123).

1.3.2.8- Otros territorios

Además de tiroides y paratiroides, el GCS inerva otras estructuras ligadas directa o indirectamente al sistema neuroendócrino: glándula pineal, cuerpo carotideo, plexo coroides, neurohipófisis, eminencia media (123) (Fig. 5).

En diversas situaciones experimentales se observó que el incremento o la disminución de la actividad de las neuronas simpáticas en áreas inervadas por el GCS provocan cambios en la secreción de melatonina (132-133), renina-angiotensina (134), hormonas luteinizante y folículo estimulante (135), hormona de crecimiento (136), prolactina (136) y oxitocina (137).

Estos resultados confirman que las vías cervicales simpáticas cumplen un rol funcional e integrado en la regulación endócrina de los territorios que inervan (123).

1.3.3- EFFECTOS DE LA GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR (GCSx)

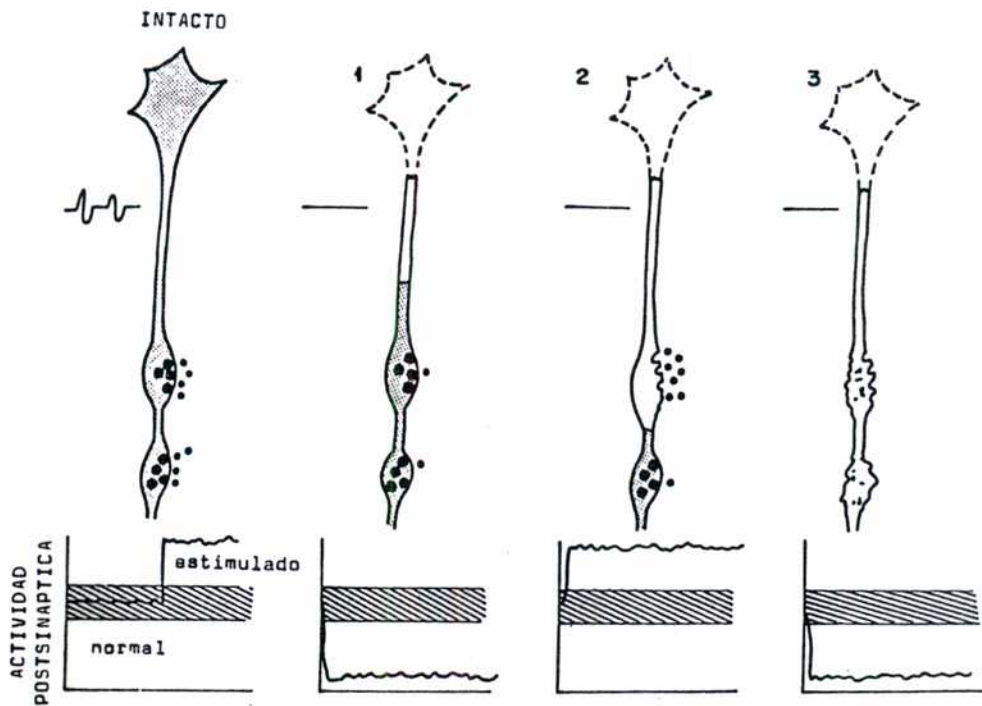
La GCSx provoca alteraciones neuroendócrinas funcionales de las estructuras que inerva. Estas modificacion

nes son de calibre muy diverso como la modificación del balance de agua en ratas desprovistas de pituitaria, alteraciones de la liberación de prolactina y de la conducta bebedora de las ratas y modificación del control fotoperiódico de la reproducción en diversas especies (138). Modifica también la función tiroidea y el crecimiento en carneros (138).

Después de GCSx, cuando las terminales simpáticas eferentes se desintegran durante el proceso de degeneración neuronal, el contenido de las varicosidades, que incluye NE, es liberado en las zonas circundantes a las sinapsis (139-142). La NE liberada es capaz de activar los aceptores de las células efectoras. Esta activación ha sido descrita en varios órganos y reproduce la actividad del nervio intacto (140).

La liberación de NE comienza 8-10 horas después de la GCSx y se prolonga durante aproximadamente 16 horas hasta que se completa la degeneración de las terminales dependiendo estos tiempos del tejido inervado (132,140, 141,143) (Fig. 6). Esta liberación supraliminal temporaria de neurotransmisor, al provocar hiperactividad transitoria de los órganos inervados adrenérgicamente, resulta un procedimiento útil para aclarar el significado fisiológico de la inervación simpática en la regulación de la actividad de dichos órganos (140). Por ejemplo, en estudios efectuados en ratas se ha encontrado que durante el proceso de degeneración neuronal el GCS desempeña un rol inhibitor sobre la respuesta de la tiroides a la TSH. Una vez que la GCSx se hace crónica, este efecto inhibitorio desaparece (144). Además se ha detectado incremento de hipertrofia compensadora de la tiroides durante el proceso de degeneración neuronal (H.Romeo. Tesis presentada en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Fa-

FIGURA 6: ACTIVIDAD POSTSINAPTICA EN DIFERENTES PERIODOS DESPUES DE GCSx



- 1- En el período inmediatamente posterior a la GCSx ocurre una cesación de la actividad postsináptica debido a una parálisis neural.
- 2- En el lapso comprendido aproximadamente entre 10 y 25 horas después de GCSx ocurre una liberación de neurotransmisor por degeneración de las terminales nerviosas, que mimetiza la actividad postsináptica del nervio intacto.
- 3- Después de este período, en ausencia de NE, cae la actividad postsináptica y se pueden analizar los efectos que la denervación crónica causa en el tejido en estudio.

Estos tiempos son variables y dependen del tejido inervado, pudiendo extenderse el período de degeneración neuronal hasta 48 h después de la cirugía.

cultad de Ciencias Exactas y Naturales UNBA; 1987: "Modulación ejercida por el sistema nervioso autónomo simpático sobre el eje hipófiso-tiroideo")

La GCSx será el modelo experimental que se utilizará en la presente Tesis para valorar el rol que juega la presencia o ausencia de la inervación simpática sobre la actividad de las células paratiroides y C-tiroideas.

1.4- AMINAS BIOGENAS Y SECRECION DE PTH Y CT

Como se ha discutido en la Sección 1.1, existe acuerdo general en que la concentración de calcio es el regulador dominante de la secreción de PTH y CT (1). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que una variedad de compuestos no iónicos pueden actuar como poderosos estimulantes o inhibidores de la secreción de estas hormonas. Entre ellas el glucagón (75), prostaglandinas E_2 y F_2 (145,146) y las aminas biógenas (147). Se ha demostrado que las células secretoras de PTH y CT contienen sistemas de adenilato-ciclasa que son fácilmente excitados por las aminas biógenas y que la secreción de ambas hormonas correlaciona directamente con la activación de la enzima o la adición de AMPc a las células. Dichas células también poseen receptores de membrana específicas para ciertas aminas biógenas (147).

Esta información determinó la apertura de un nuevo campo de estudio que valora la posibilidad de la existencia de un mecanismo de regulación ejercido por aminas biógenas de origen circulante o neural sobre la secreción de PTH y CT.

A continuación se exponen algunos de los resultados obtenidos hasta el momento en este terreno.

1.4.1- SECRECION DE PTH Y AMINAS BIOGENAS

1.4.1.A- Estudios "in vitro"

Los agonistas β adrenérgicos incrementan tanto la acumulación de AMPc intracelular como la liberación de PTH del tejido paratiroideo (148,149). Como la adición de propranolol, antagonista β_1 y β_2 , (150) bloquea la induc

ción de estas respuestas por el isoproterenol, se ha sugerido que las mismas ocurren por activación de los adre_noceptores β (150). Posteriormente Kukreja y col (151,152), adicionando agonistas y/o antagonistas específicos en cultivos de paratiroides, demostraron que la liberación de PTH ocurre después de la activación de receptores β_1 .

Brown y col (153) identificaron receptores β adrenérgicos en células aisladas y dispersas de paratiroides y postularon la existencia de una estrecha correlación entre la unión del agonista β adrenérgico con su aceptor, la activación subsecuente de la adenilato ciclasa y el posterior incremento de la secreción de PTH. En contraste con los resultados de Kukreja, que en tejido bovino sólo encuentra receptores β_1 (151,152), Brown y col describen que en preparaciones de paratiroides humana la mitad de los receptores son β_1 y la mitad restante β_2 (150).

Existen otras relaciones interesantes entre agonistas β , AMPc y liberación de PTH. Si bien la hipocalcemia y el isoproterenol estimulan la secreción de PTH, la hipocalcemia puede incrementar los niveles intracelulares de AMPc sólo un 3% de lo que aumenta el isoproterenol (154). También se observó que el bloqueo de los receptores β no modifica de manera consistente la secreción de PTH en respuesta a tenores disminuidos de calcio (154). Los autores concluyen que la estimulación de la secreción de PTH inducida por el calcio, no está mediada primariamente por el AMPc.

El agonista α fenilefrina inhibe la acumulación de AMPc y la secreción de PTH estimulada por agonistas β (155). Además el bloqueo α con fentolamina potencia el efecto estimulante de PTH ejercido por una mezcla de agonistas α y β , como la epinefrina y NE (155). Estos resultados sugieren que las células paratiroides podrían tener re-

ceptores α adrenérgicos cuya activación induce la inhibición de la síntesis de AMPc y en consecuencia de la liberación de PTH.

Varios autores encontraron que las catecolaminas y los niveles disminuídos de calcio, movilizan diferentes pools de hormona almacenada. En el primer caso se secreta hormona almacenada en gránulos de reserva y en el segundo hormona recientemente formada (29). Posteriormente Hanley y col (156) confirmaron estos resultados demostrando que cuando la hormona de reserva se acaba, la secreción de PTH declina aunque se mantenga una activación continua de la adenilato ciclase. En este caso, sólo una disminución del calcio circulante puede estimular la síntesis de nueva hormona y su posterior secreción.

Estos resultados sugieren que tanto los agonistas adrenérgicos como los nucleótidos poseen una capacidad limitada para sostener la liberación de PTH. En definitiva, se requiere siempre la regulación por el calcio. Debe destacarse que la mayoría de estos experimentos utilizan concentraciones de agonistas muy alejadas del rango fisiológico. El valor fisiológico de estos estudios será discutido más adelante.

1.4.1.8- Estudios farmacológicos "in vivo"

La mayor parte de la información "in vivo" referida a las acciones que los agonistas adrenérgicos ejercen sobre la paratiroides fué obtenida mediante la infusión o inyección de agonistas β (generalmente isoproterenol), agonistas α (fenilefrina), bloqueantes β adrenérgicos (propranolol) y antagonistas α adrenérgicos (fentolamina). Los resultados obtenidos no son tan uniformes y reproducibles como los obtenidos "in vitro".

Fischer y col (157) demuestran que la infusión de epinefrina en vacunos incrementa la secreción de PTH en un 200 a 400%, según las dosis utilizadas. Coincidiendo con resultados "in vitro" la respuesta a la epinefrina fué suprimida por inyecciones simultáneas de propranolol o calcio. Kukreja y col administrando isoproterenol a ratas (158) encuentran respuestas similares, además de una falla de efecto del bloqueo de los sitios β sobre la secreción de PTH regulada por calcio, coincidiendo con los estudios "in vitro". Blum y col (159) encuentran que la infusión de agonistas α en vacunos no modifica la PTH sérica. Sin embargo, el bloqueo α con fentolamina provocó un incremento de la hormona circulante, presumiblemente a través de la liberación de la acción de un agonista β . Williams y col (160) muestran también que el bloqueo de receptores α puede restablecer la secreción de PTH, inhibida previamente por infusiones de metoxamina.

Los estudios de Blum y col (161) coinciden con los resultados obtenidos "in vitro" apoyando la idea de que el calcio y las catecolaminas movilizan diferentes sectores de hormona almacenada. Los resultados obtenidos por Epstein y col (162) y Body y col (163) aportan evidencias de que la epinefrina circulante no es un regulador fisiológico de la secreción de PTH en humanos. El posible valor fisiológico de estos resultados se discutirá al finalizar la Sección 1.4.

1.4.1.C- Deprivación de catecolaminas y secreción de PTH

Para estudiar la hipótesis de que las catecolaminas pueden regular la secreción de PTH y la homeostasis del calcio, se ha trabajado con animales sometidos a adrenalectomía quirúrgica (que remueve la fuente primaria de epinefrina) o tratados con 6-hidroxidopamina que provoca

simpatectomía química con la consiguiente eliminación de NE. Bajo ninguna de estas condiciones se observaron modificaciones importantes en la respuesta secretora de la PTH frente a diversos estímulos (164). Vora y col (165) tampoco encuentran modificaciones en la calcemia basal y la PTH después de la deprivación de catecolaminas. La administración de propranolol a estos animales no modificó la secreción de PTH. Estos autores describen que la adrenalectomía disminuye la respuesta de la paratiroides a la hipocalcemia inducida por EDTA.

1.4.1.D- Estimulación de nervios adrenérgicos y secreción de PTH

Como se ha descrito en 1.3.2.A, existen evidencias morfológicas de que fibras nerviosas adrenérgicas provenientes del GCS inervan la paratiroides (128-131,166). Se ha utilizado la estimulación de dichos nervios por medios químicos o eléctricos para valorar su rol sobre la función paratiroidea.

Vora y col (167) aplicaron corrientes eléctricas al tronco nervioso del GCS en rata durante 1 hora y observaron un incremento de la PTH sérica menor que un 30%. Sin embargo, el período de estimulación fué muy prolongado y el cambio en la secreción de PTH muy pequeño. Los autores no efectuaron estudios para valorar si el efecto era α o β adrenérgico, y/o colinérgico u otro. Además la estimulación pudo haber afectado la respiración o modificado los niveles de calcio iónico.

Heath (168) aplica una estimulación eléctrica menor en el tronco cervical vago simpático derecho del perro y encuentra que la liberación de NE no modifica la respuesta secretora de la paratiroides en condiciones normo o

suavemente hipocalcémicas. La secreción hormonal tampoco se modifica después del tratamiento con el antagonista α , fenoxibenzamina. La estimulación de la secreción de NE por administración de tiramina tampoco modificó la respuesta secretora de la paratiroides. Heath concluye que los agonistas β adrenérgicos de origen neural no son reguladores de la secreción de PTH "in vivo". Los resultados de este estudio deben ser tomados con precaución: los animales permanecieron anestesiados durante todo el experimento, factor que estimula la liberación de epinefrina y NE quienes pueden confundir la respuesta de la paratiroides a manipulaciones experimentales. Además la estimulación eléctrica aplicada afecta también la actividad del nervio vago, que puede modificar las respuestas específicas a la inervación simpática.

1.4.2- SECRECION DE CT Y AMINAS BIOGENAS

1.4.2.A- Estudios "in vitro"

En este campo se han efectuado pocos estudios. Bell (169) detectó que la epinefrina incrementa la liberación de CT en cultivos de tiroides porcina. La NE lo hace en menor medida, en relación directa con su potencia β -agonista. El propranolol bloquea el efecto de la epinefrina sobre la secreción de CT. Por el contrario, Cooper y col (170) encuentran que el isoproterenol no incrementa la liberación de CT en cultivo de tiroides de rata. En cambio si se modifican las concentraciones de calcio se altera la secreción hormonal. Otros estudios efectuados con tiroides de rata (171) describen que el agonista β isoproterenol estimula la actividad de la adenilato ciclasa de manera dosis dependiente. Por el contrario el calcio inhibe esta enzima. Otros autores también encuen-

tran que los agonistas β incrementan la secreción de CT (175, 182-184).

1.4.2.B- Estudios farmacológicos "in vivo"

Bates y col (172) en estudios efectuados en cerdos, encuentra que el isoproterenol no modifica la liberación de CT. El agregado de fentolamina a una perfusión hipercalcémica dobla la velocidad de secreción de CT. La administración de epinefrina tampoco fué efectiva pero el agregado de fentolamina incrementó 15 veces la secreción de CT indicando que existe un efecto α -inhibidor. Phillip y col (173) encuentran en carneros que la epinefrina incrementa la secreción de CT. Tanto la fentolamina como el propranolol bloquean este efecto.

Avioli y col (174) describen que la perfusión del lóbulo tiroideo derecho en perros con epinefrina o fentolamina no modifica la liberación de CT. Sin embargo la asociación de ambas drogas incrementa la liberación hormonal. Este último efecto es bloqueado por el propranolol que también bloquea el incremento de la secreción de CT inducido por el isoproterenol. Estos resultados sugieren que la activación de receptores β estimula la liberación de CT.

Care y col (175) muestran que dosis pequeñas de NE incrementan la liberación de CT en cerdos. Cuando la concentración de NE aumenta este efecto ya no se observa, posiblemente porque en dosis mayores predomina la actividad inhibitoria α de la NE. Estudios efectuados en vacunos (176) mostraron que tanto la NE como el isoproterenol incrementan la CT plasmática aunque la NE fué menos activa. En seres humanos Vora y col (177) encontraron que el isoproterenol incrementa la CT sérica. La infusión poste-

rior de propranolol reduce la concentración de CT en un 50%. Si se administra después el antagonista fentolamina, la CT aumenta nuevamente. Vora (177) y Metz (178) postulan, en base a sus resultados, que los receptores β adrenérgicos regulan positivamente la secreción de CT.

También se ha estudiado el efecto del agonista α , metoxamina en humanos (160). Su administración disminuye un 21% la secreción de CT. Este efecto es bloqueado por la fentolamina. Los autores postulan que existe una relación positivo-negativo entre los agonistas adrenérgicos α y β sobre la secreción de CT. Los agonistas β estimulan y los agonistas α inhiben la liberación de CT. Heath (147) observa que no resulta clara la relación que existe entre estos resultados "in vivo" y el efecto biológico de las catecolaminas naturales que poseen una mezcla de especificidad agonista α y β . Harvey y col (179) encuentran que la administración de epinefrina y propranolol en ratas por períodos prolongados de tiempo, incrementan la secreción de CT en un 73%. El propranolol bloquea en un 51%.

1.4.2.C- Deprivación de catecolaminas y secreción de CT

Zileli y Gedik (180) trataron perros con reserpina para deprimir la liberación de NE de los nervios terminales y encuentran reducida la capacidad de respuesta de las células C-tiroideas frente a un estímulo hipercalcémico. Por el contrario, Heath (164) encontró que la adrenalectomía no modifica la secreción de CT en respuesta a diferentes estímulos. La simpatectomía química provocó disminución de la CT sólo durante el ayuno.

Vora y col (165) no encontraron modificaciones de la CT basal después de adrenalectomía y/o simpatectomía química. El propranolol no disminuye la CT en ninguno de los 3 grupos. Finalmente, la deprivación de catecolaminas

incrementó la disminución de la CT inducida por EDTA. Estos resultados apoyan la hipótesis de que las catecolaminas adrenales y/o neuronales modulan la secreción de CT "in vivo" en la rata, aunque no aclaran cuáles son los mecanismos que participan en esta modulación.

1.4.2.D- Estimulación de nervios adrenérgicos y secreción de CT

La administración a ratas del agonista simpático-mimético tiramina, que actúa estimulando la liberación de NE de las terminales nerviosas, no provocó modificaciones consistentes en la secreción de CT a pesar de que en estos animales la inyección de dosis elevadas de epinefrina incrementa la CT plasmática (147). Estos resultados sugieren que la secreción de CT puede ser modificada por las aminos biógenas de origen adrenal y no neuronal.

1.4.3- RESUMEN

Los estudios mencionados permiten puntualizar los siguientes resultados:

- 1- En sistemas "in vitro" se ha encontrado que los agentes que incrementan al AMPc intracelular (entre otros agonistas β como epinefrina, NE o isoproterenol) pueden aumentar la secreción de PTH (149,150,154,181) y CT (175, 182-184). Por otra parte, los agentes que disminuyen la acumulación de AMPc (como antagonistas β adrenérgicos o agonistas α) inhiben la secreción de PTH (146,181,185) y CT (175).
- 2- Los efectos de las aminos sobre la secreción de estas hormonas son de menor duración que las que ejerce el calcio.
- 3- La administración de dosis farmacológicas de las ami-

nas biógenas altera la secreción de PTH y CT en animales enteros de manera aún no aclarada.

Hasta el momento no es posible utilizar esta información para la comprensión de la participación de las aminas neuronales en el control fisiológico "in vivo" de la secreción de PTH y CT. En efecto, la mayor parte de los compuestos utilizados "in vivo" son sintéticos y no existe seguridad de que mimeticen las acciones biológicas de las catecolaminas circulantes o neuronales. Por otra parte los compuestos naturales pueden haber sido administrados en dosis o períodos de tiempo diferentes a las condiciones fisiológicas reales.

Tampoco puede asumirse que la concentración plasmática de un compuesto refleje con precisión sus niveles en los sitios en los que ejerce su función biológica, por ejemplo la sinapsis. Los experimentos en los que se ha inducido deprivación de catecolaminas o estimulación de nervios adrenérgicos no son en su mayoría específicos para la zona inervada y/o perturban la homeostasis global de los animales utilizados durante el período de estudio.

En síntesis, los estudios efectuados hasta el momento no permiten aclarar si las catecolaminas neuronales juegan un rol fisiológico en el control funcional del metabolismo paratiroideo y de las células C-tiroideas.

1.5- OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

- 1- Establecer el rol fisiológico que desempeña la inervación simpática local, provista por fibras provenientes del GCS, sobre la secreción basal de PTH y CT. Para ello se utilizó un modelo experimental (GCSx) que permite reproducir la actividad biológica del nervio intacto durante el período de degeneración walleriana que deviene después de la cirugía y, transcurrido este lapso, valorar los efectos de la ausencia de inervación.
- 2- Analizar el rol fisiológico que juega la inervación simpática durante la estimulación de la secreción de PTH y CT. En este caso se administraron factores hipo o hipercalcemiantes respectivamente en animales GCSx o controles.
- 3- Identificación de los tipos de adrenoreceptores que participan en la regulación neural de la secreción de PTH y CT, mediante la administración de bloqueantes específicos de los adrenoreceptores α o β y el estudio posterior de los niveles circulantes de hormona.
- 4- Establecer si existe desarrollo de hipertrofia compensadora de la paratiroides y su posible regulación por el sistema simpático. Estos estudios se efectuaron en animales simultáneamente GCSx-hemiPTx y controles hemiPTx.
- 5- Valorar los efectos de la deprivación de la inervación simpática local sobre la secreción de PTH y CT mediante la utilización de ratas crónicamente GCSx.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1- ANIMALES Y TECNICAS QUIRURGICAS

Se utilizaron ratas Wistar, machos adultos de un peso que osciló entre 180 y 220 g. Los animales permanecieron bajo luz en el período comprendido entre las 6-7 h y las 19-21 h, teniendo libre acceso al agua y al alimento.

2.1.1- GANGLIECTOMIA CERVICAL SUPERIOR

Las ratas se anestesiaron levemente con éter etílico. Posteriormente se efectuó una incisión ventral en el cuello y se expusieron las glándulas salivares. Estas se apartaron para divulsionar el músculo supraioideo hasta la altura de la bifurcación de la carótida en sus ramas interna y externa. Ambos GCS, ubicados a este nivel, se extirparon totalmente por corte. Las ratas con operación simulada recibieron el mismo manipuleo quirúrgico menos la extirpación bilateral del GCS.

Solo se utilizaron los animales que presentaron la siguiente secuencia temporal de fenómenos, que indican la presencia de GCSx completa:

- A- Ptosis palpebral bilateral entre el momento de la operación y alrededor de 10 h después de efectuada la misma.
- B- Retracción palpebral bilateral (debida a la actividad de las terminales en degeneración del GCS) a nivel de los músculos periorbitales entre 10 y 20 h después de la operación.
- C- Ptosis palpebral irreversible después de 24 h.

Se ha demostrado que las ratas gangliectomizadas

de la manera descripta presentan una reducción de un 95% en el contenido de NE de la tiroides (138).

2.1.2- PARATIROIDECTOMIA

La intervención se realizó bajo éter etílico utilizando un microscopio de disección. Se practicó una incisión ventral en el cuello y se retrotrajeron las glándulas salivares. Después de divulsionar el músculo externo tiroideo, se expuso la tráquea de manera de observar los dos lóbulos tiroideos. Las paratiroides se encuentran en la porción apical de los mismos. La paratiroidectomía (PTx) se efectuó separando cuidadosamente las paratiroides del tejido tiroideo circundante. Junto con la paratiroides se removi6 alrededor de 1/4 de la porción superior del l6bulo tiroideo ipsilateral.

Como criterio para aceptar PTx completa, se tomaron solamente aquellos animales cuya calcemia fu6 menor que 7.5 mg/dl. La hemiPTx se practic6 sobre el l6bulo tiroideo izquierdo. En este caso los animales mostraron un descenso de la calcemia superior a 0.7 mg/dl.

2.2- INDUCCION DE RESPUESTAS SECRETORAS EN LA PARATIROIDES Y CELULAS C-TIROIDEAS

Para incrementar la secreci6n de PTH y CT se aplicaron est6mulos hipo o hipercalcemiantes respectivamente en animales GCSx o con operaci6n simulada.

2.2.1- ESTIMULACION DE LA SECRECION DE PTH

Se indujo hipocalcemia mediante la administraci6n

de ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) disódico. Para ello se preparó una solución de EDTA en agua destilada de 20g/dl llevada a pH 7 con NaOH 5N.

En un primer experimento, la hipocalcemia fué provocada por inyecciones de 0.1 ml de esta solución, equivalentes a 100 mg de EDTA/Kg de peso, administradas cada 30 min durante 3 h por vía intra peritoneal (i.p.). Para inducir una mayor estimulación de la secreción de PTH se utilizó una dosis doble, tóxica, de 200 mg de EDTA/Kg de peso, manteniendo el esquema experimental descripto.

Se obtuvieron muestras de sangre inmediatamente antes, 1 y 3 h después de comenzada la administración de EDTA.

2.2.2- ESTIMULACION DE LA SECRECION DE CT

La secreción de CT fué inducida mediante la aplicación de un estímulo hipercalcemiante. Para ello se preparó una solución de Cl_2Ca en solución fisiológica, de 6.92 g/dl. En diferentes experimentos, ratas GCSx o con operación simulada fueron inyectadas con una dosis de 0.2 ml de esta solución (5 mg Ca/rata) por vía i.p. Las muestras de sangre se extrajeron inmediatamente antes, 10-15 y 20 min después de la administración del Cl_2Ca . Con el objeto de inducir una estimulación mayor de la secreción de CT se administraron dos dosis de 5 mg Ca/rata, separadas por un intervalo de 15 min. En este caso se efectuaron extracciones de sangre inmediatamente antes de la primera y segunda dosis y 15 min después de esta última.

2.3- CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DE RECEPTORES ADRENERGICOS

La participación de los receptores α y β adrenérgicos sobre la regulación de la secreción estimulada de PTH y CT se analizó empleando agentes bloqueantes de dichos aceptores.

En estos experimentos, efectuados durante el período correspondiente a la degeneración walleriana que ocurre después de la GCSx, los animales se inyectaron con los antagonistas adrenérgicos de la siguiente manera: En el caso de la PTH, 4 h 30 min antes de proceder a la estimulación de la secreción hormonal, y en el caso de la CT 30 min antes de la misma (Secciones 2.2.1 y 2.2.2).

Las drogas utilizadas fueron preparadas como se describe a continuación, empleando solución fisiológica como diluyente:

- 1- Antagonistas α adrenérgicos: A) Fentolamina: Solución de 1 g/dl. Se administraron dosis equivalentes a 10 mg/Kg. B) Fenoxibenzamina: Solución de 125 mg/dl. Se administraron dosis equivalentes a 1.25 mg/Kg. Para estudiar la eficacia de dosis menores, se preparó una solución de 25 mg/dl. En este caso la dosis administrada fué de 0.25 mg/Kg.
- 2- Antagonista β adrenérgico: Propranolol; las soluciones utilizadas fueron de 500 o 625 mg/dl. Se administraron dosis de 5 o 6.25 mg/Kg.

En todos los casos las drogas se administraron por vía sub-cutánea (s.c.) en un volumen de 0.2 ml.

2.4- OBTENCION Y CONSERVACION DE SUERO

Las muestras de sangre se obtuvieron, previa anes-

tesia liviana con éter etílico, por corte del extremo distal de la cola o por punción de la vena yugular. La muestra final de cada experimento se recogió por decapitación de los animales. La sangre extraída se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 a 60 min. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 3000 r.p.m. El suero fué separado y conservado a -70°C hasta la realización de las determinaciones de laboratorio.

2.5- DETERMINACIONES DE CALCIO SERICO

Procedimientos utilizados:

- A- Método colorimétrico: Se utilizó un kit provisto por Wiener Lab. (Rosario) (187). Reactivos: El buffer utilizado es una solución de aminometil propanol (AMP) 0.2 mol/l en metanol 35% v/v mantenida a pH 11. La reacción colorimétrica se obtiene con una solución de cresolftaleín complexona (CFx) 3.7 mmol/l. La solución patrón es de CO_3Ca (10 mg Ca/dl). Procedimiento: Cada determinación se efectuó al menos por triplicado bajo el siguiente protocolo: 1- 50 μl de CFx + 3.5 ml de buffer. 2- Lectura en espectrofotómetro a 570 nm. Esta lectura se utilizó como blanco individual para cada muestra. 3- Agregado de 20 μl de muestra o de solución patrón. 4- Nueva lectura. Los resultados se calculan restando a la lectura de cada muestra o patrón su blanco correspondiente. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores que el 5% (187).
- B- Espectrofotometría de absorción atómica (188): Reactivos: Como diluyente se utilizó una solución de óxido de lantano en agua destilada (0.1 g/dl) con el agregado de 0.5 ml/dl de ClH 12N. La solución patrón fué de

CO_3Ca (10 mg/ml). Procedimiento: 0.2 ml de suero o patrón se disolvieron en 3.8 ml del diluyente. Las lecturas se efectuaron al menos por duplicado en espectrofotómetro de absorción atómica (Metrolab).

2.6- RADIOINMUNOENSAYOS

2.6.1- DETERMINACIONES DE PTH SERICA

Exceptuando los estudios realizados con ratas hemiptx, las determinaciones de PTH sérica se realizaron utilizando un kit para PTH humana, modificado para ratas, provisto por Immuno Nuclear Co. (Stillwater, Minn.) (189). Este método provee un anticuerpo sensible a la región 44-68 de la PTH humana que reconoce la región equivalente de la PTH de rata. Como diluyente se utilizó buffer bórico con albúmina bovina sérica al 1%. Procedimiento: 1- Incubación de 50 μl de muestra con 100 μl del primer anticuerpo (suero de pollo anti PTH) a 20 - 25°C durante 15 min. 2- Agregado de 100 μl del marcador (I^{125} -PTH) e incubación durante 2 h a 20 - 25°C. 3- Adición de 250 μl de complejo precipitante formado por "suero de cabra o conejo contra suero de pollo + suero de pollo normal pre-precipitado + polietilenglicol" para separar el trazador libre del unido. 4- Nueva incubación a 20 - 25°C durante 15 min. Centrifugación a 760 g durante 20 min. 5- Una vez descartado el sobrenadante, determinación de radioactividad en el precipitado (contador Packard Instruments) durante un minuto. La curva fué efectuada utilizando un patrón heterogéneo de PTH de rata y los resultados se expresaron como pmol/l equivalentes a PTH humana. La sensibilidad fué de 10 pmol/l o, en otras unidades, 0.1 ng/ml.

En todos los ensayos se colocaron muestras de suero de ratas PTx cuyas calcemias fueron inferiores a 7.5 mg/dl. En este caso la actividad residual de PTH fué de 44 ± 6 pmol/l; en cambio la PTH circulante en ratas normales resultó de 91 ± 7 pmol/l ($p < 0.005$). Estos resultados fueron coincidentes con los mencionados por los proveedores. Se obtuvieron coeficientes de variación intra e inter ensayo inferiores al 8% y al 15% respectivamente.

El procedimiento utilizado para valorar la PTH sérica en los experimentos efectuados con ratas hemiPTx fué desarrollado en el laboratorio del Dr. Eduardo Slatopolsky, St. Louis, USA, a partir del método de Arnaud y col (190). Se utiliza un antisuero de pollo dirigido contra PTH bovina (191) que reconoce tanto la PTH presente en suero de rata como en extractos de paratiroides de este animal (192). Como diluyente se utilizó buffer barbital sódico 0.1 M de pH 8.6 conteniendo 500 U/ml de Trasylol (F BA Pharmaceuticals, Inc. New York). Procedimiento: 1- Incubación a 4°C de 50 μ l de anticuerpo con 50 μ l de muestra durante 3 días. 2- Agregado de 100 μ l del marcador (I^{131} -PTH) y nueva incubación a 4°C durante 3 días. 3- Separación del complejo anticuerpo-PTH mediante el secuestro de la PTH libre por carbón-dextrán. 4- Centrifugación, decantación y determinación de radioactividad en precipitado y sobrenadante (contador Packard Instruments Inc Dover's Grose, I^{11}). Los resultados se expresaron como pg/ml y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 8% y 14% respectivamente.

2.6.2- DETERMINACION DE CT SERICA

Se utilizó un kit para CT humana provisto por Immu-

no Nuclear Co que incluye un anticuerpo de conejo dirigido contra CT humana sintética. Este anticuerpo es sensible a la región 17-32 de la hormona humana y también de rata (193). Los proveedores han efectuado estudios que avalan que la metodología es adecuada para medir CT de rata. Como diluyente se utilizó buffer borato conteniendo albúmina bovina sérica al 5%. En este ensayo se incuban 100 µl de muestra o patrón con 200 µl del primer anticuerpo durante 16 - 24 h a 2 - 8°C. Posteriormente se agregan 100 µl de I¹²⁵-CT y se incuban a igual tiempo y temperatura. Finalmente se agregan 500 µl del segundo anticuerpo (complejo precipitante formado por "suero de conejo normal pre-precipitado + suero de cabra anticonejo + polietilenglicol"), se centrifuga a 760 g durante 20 min a 20 - 25°C, se descarta el sobrenadante y se determina la actividad del precipitado. (contador Packard Instruments). La curva se realizó utilizando un patrón de CT sintética humana y los resultados se expresaron como pg/ml. La sensibilidad fue de 1.5 pg/tubo equivalentes a 15 pg/ml y los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron menores que 8% y 16% respectivamente.

2.7-

ESTUDIOS HISTOLOGICOS

Para valorar el índice mitótico en la paratiroides remanente de animales hemiPTx, se desarrolló el siguiente procedimiento: 1- Ablación unilateral de la paratiroides simultánea a GCSx o a operación simulada ipsilateral al lóbulo remanente. 2- Transcurridas 48 h, inyección de colchicina (Sigma) (2 mg/Kg), disuelta en solución fisiológica (vía i.p.) y sacrificio 2 h después. La colchicina es un alcaloide antimitótico que se asocia a la proteína microtubular interfiriendo en la función de los husos mi-

tóticos provocando la desaparición de los microtúbulos y deteniendo el proceso mitótico generalmente en metafase. 3- Fijación de la paratiroides remanente en líquido de Bouin (solución acuosa saturada de ácido pícrico, 71%; formol al 37%, 24%; ácido acético glacial, 5%) durante 10 h y posterior deshidratación gradual pasando la pieza desde etanol 50% hasta etanol absoluto. Cada deshidratación se efectuó durante 2 h a 37°C. 4- Parafinado y cortes de 4 a 6 μ m. Tinción de contraste con hematoxilina-eosina.

El índice mitótico se valoró determinando el número de mitosis presentes en 1000 células paratiroides.

2.8-

ESTADISTICA

Para el análisis estadístico de comparaciones múltiples se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por un Test de Dunnet (194). Para efectuar comparaciones simples de muestras independientes y apareadas se utilizó el Test de Student.

CAPITULO 3

R E S U L T A D O S

3.1- PARTICIPACION DE LA INERVACION SIMPATICA EN LA MODULACION DE LA RESPUESTA BASAL DE LAS CELULAS PARATIROIDEAS Y C- TIROIDEAS

Como se ha descrito en la Introducción (Sección 1.3.2), las glándulas tiroides y paratiroides reciben innervación simpática de fibras provenientes del GCS. Para estudiar el rol que juega el sistema simpático periférico sobre la regulación de la secreción basal de PTH y CT, se han efectuado experimentos valorando la calcemia y los niveles séricos hormonales en diferentes períodos de tiempo después de GCSx: antes de que ocurra la liberación supraliminal de transmisores simpáticos que acompaña a la degeneración anterógrada de las terminales nerviosas (8 h post GCSx), durante la misma (período de degeneración walleriana) (16 o 24 h post GCSx) e inmediatamente después de terminada ésta (28 h post GCSx). Estos períodos son descriptos en detalle en la Sección 1.3.3.

3.1.1- CALCEMIA

En la Tabla I se muestran las calcemias de ratas sacrificadas a diferentes tiempos luego de GCSx. La extirpación quirúrgica bilateral del GCS no modificó los niveles circulantes de calcio, que fueron determinados antes y durante la degeneración walleriana.

3.1.2- PARATHORMONA SERICA

Los niveles séricos de PTH en muestras obtenidas durante la degeneración walleriana se representan en la Fig. 7. Del mismo modo que la calcemia, la PTH sérica tam-

poco se modifica durante los momentos inicial y final de dicho período, 16 y 24 h después de la GCSx respectivamente, no presentando diferencias significativas respecto al grupo que recibió operación simulada.

3.1.3- CALCITONINA SERICA

La Tabla II muestra que durante (16 h post GCSx) y después (28 h post GCSx) del proceso de degeneración walleriana, los niveles de CT sérica no difieren de los que presenta el grupo control.

3.1.4- RESUMEN

En síntesis, los resultados que se muestran en la Fig. 7 y en las Tablas I y II indican que en condiciones fisiológicas normales, los niveles séricos de calcio, PTH y CT no se modifican, ya sea durante como en los períodos inmediatamente previo y posterior a la sobreactivación simpática temporal que sigue a la GCSx.

TABLA I

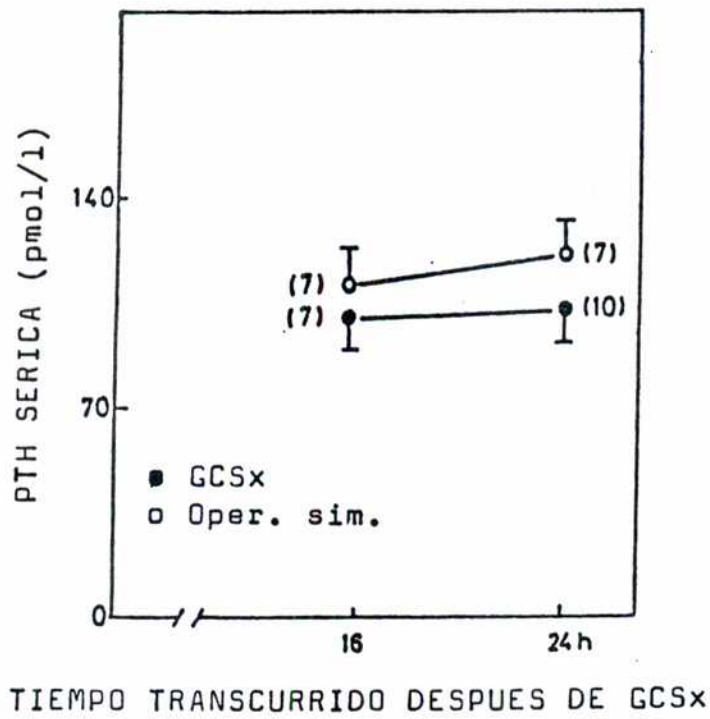
NIVELES SERICOS DE CALCIO EN RATAS GCSx

Horas después de GCSx	Calcio sérico (mg/dl)	
	Operación simulada	GCSx
8	9.5 \pm 0.2 (8)	9.5 \pm 0.1 (8)
16	9.1 \pm 0.2 (7)	9.3 \pm 0.4 (7)
24	9.6 \pm 0.5 (10)	9.4 \pm 0.4 (10)

Los valores representan la media \pm ES del número de animales indicado entre paréntesis.

No se observan modificaciones estadísticamente significativas.

FIGURA 7: NIVELES DE PTH CIRCULANTE DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx



Cada punto representa la media \pm ES del número de animales indicado entre paréntesis.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA II

NIVELES SERICOS DE CT DURANTE (16 H) Y DESPUES (28 H)
DE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx

Horas después de GCSx	Calcitonina sérica (pg/ml)	
	Operación simulada	GCSx
16	188 _± 18 (11)	178 _± 15 (16)
28	178 _± 14 (8)	165 _± 14 (7)

Los valores representan la media_±ES del número de ratas indicado entre paréntesis. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

3.2- MODULACION POR LA INERVACION SIMPATICA DE LA RESPUESTA ESTIMULADA DE LAS CELULAS PARATIROI- DEAS Y C-TIROIDEAS

Dado que la GCSx no modificó los niveles circulan-
tes basales de calcio, PTH y CT, el siguiente paso fué
estudiar el rol modulador que pueden jugar las fibras sim-
páticas que inervan las células C-tiroideas y paratiroi-
deas sobre la respuesta de las mismas después de la apli-
cación de estímulos secretorios específicos.

3.2.1- MODULACION DE LA SECRECION ESTIMULADA DE PTH

Como estímulo secretorio, se indujo hipocalcemia
mediante la administración de EDTA (100 mg/Kg i.p.) cada
30 min durante 3 h a ratas sometidas a GCSx 23 h antes
(durante la estimulación simpática temporal provocada por
degeneración walleriana de las terminales).

3.2.1.A- Calcemia

La Fig. 8 muestra las modificaciones individuales
de la calcemia en estos animales. El EDTA provocó hipocal-
cemia tanto en ratas controles como GCSx. Sin embargo,
la disminución del calcio sérico fué significativamente
mayor en este último grupo. Los valores promedio de estos
resultados se resumen en la Fig. 9.

3.2.1.B- Parathormona sérica

En la Fig. 10 se muestran los niveles individuales
de PTH sérica en los mismos animales cuya calcemia se re-

sume en las Fig. 8 y 9. Las ratas sometidas a operación simulada presentaron un incremento de la PTH sérica de 32% y 145%, 1 y 3 h después respectivamente de comenzar las inyecciones de EDTA. En las ratas GCSx, en cambio, estos aumentos fueron considerablemente menores o no se observaron.

Por análisis de la varianza de datos apareados se demuestra que, a diferencia de las ratas GCSx, los animales con operación simulada presentan un incremento significativo de la PTH sérica en función del número de inyecciones de EDTA ($p < 0.01$). El promedio de estos valores se grafica en la Fig. 11 en la que, con el objeto de facilitar la integración de resultados, también se muestran los valores de la calcemia ya graficados en la Fig. 9.

3.2.2- MODULACION DE LA SECRECION DE PTH DURANTE SU ESTIMULACION SUPRAMAXIMA

Con el objeto de averiguar si un estímulo hipocalémico mayor era capaz de modificar la inhibición de la respuesta paratiroidea observada durante el período de estimulación simpática correspondiente a la degeneración walleriana, un grupo de 7 ratas fué tratado con dosis dobles de EDTA (200 mg/Kg) manteniendo el mismo esquema experimental descrito en 3.2.1.

Solo 3 animales GCSx sobrevivieron a esta dosis tóxica de EDTA. En este grupo, la PTH sérica se elevó significativamente en respuesta al EDTA, a diferencia de la respuesta provocada en ratas GCSx por dosis menores de este compuesto (Fig. 12). Es de destacar que las dosis de quelante utilizadas en este caso no provocaron caídas mayores de la calcemia que las inducidas por dosis meno-

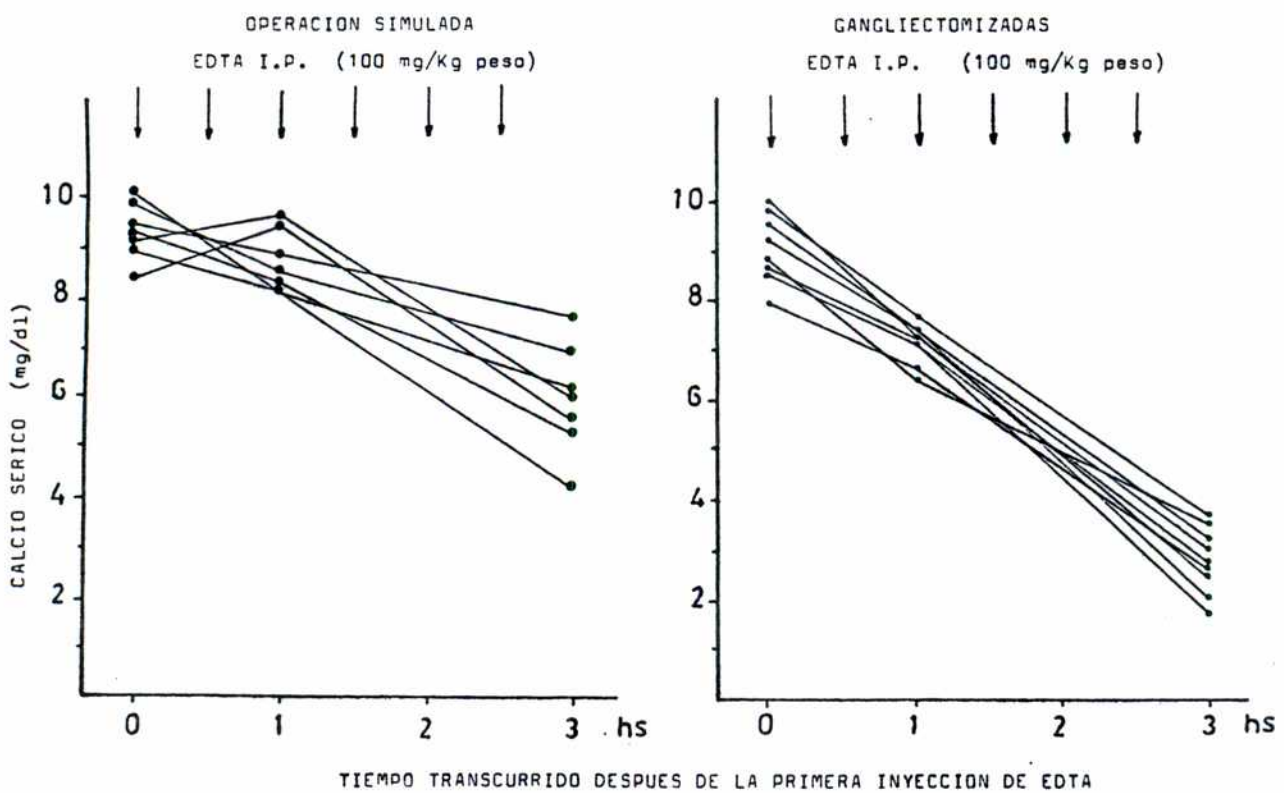
res de EDTA en animales GCSx.

3.2.3- RESUMEN

En conclusión, los resultados de las secciones 3.2.1 y 3.2.2 indican que la estimulación de la secreción de PTH inducida por hipocalcemia severa está fuertemente inhibida después de la GCSx, durante el período correspondiente a la degeneración walleriana (situación experimental que reproduce una estimulación simpática transitoria de la zona inervada).

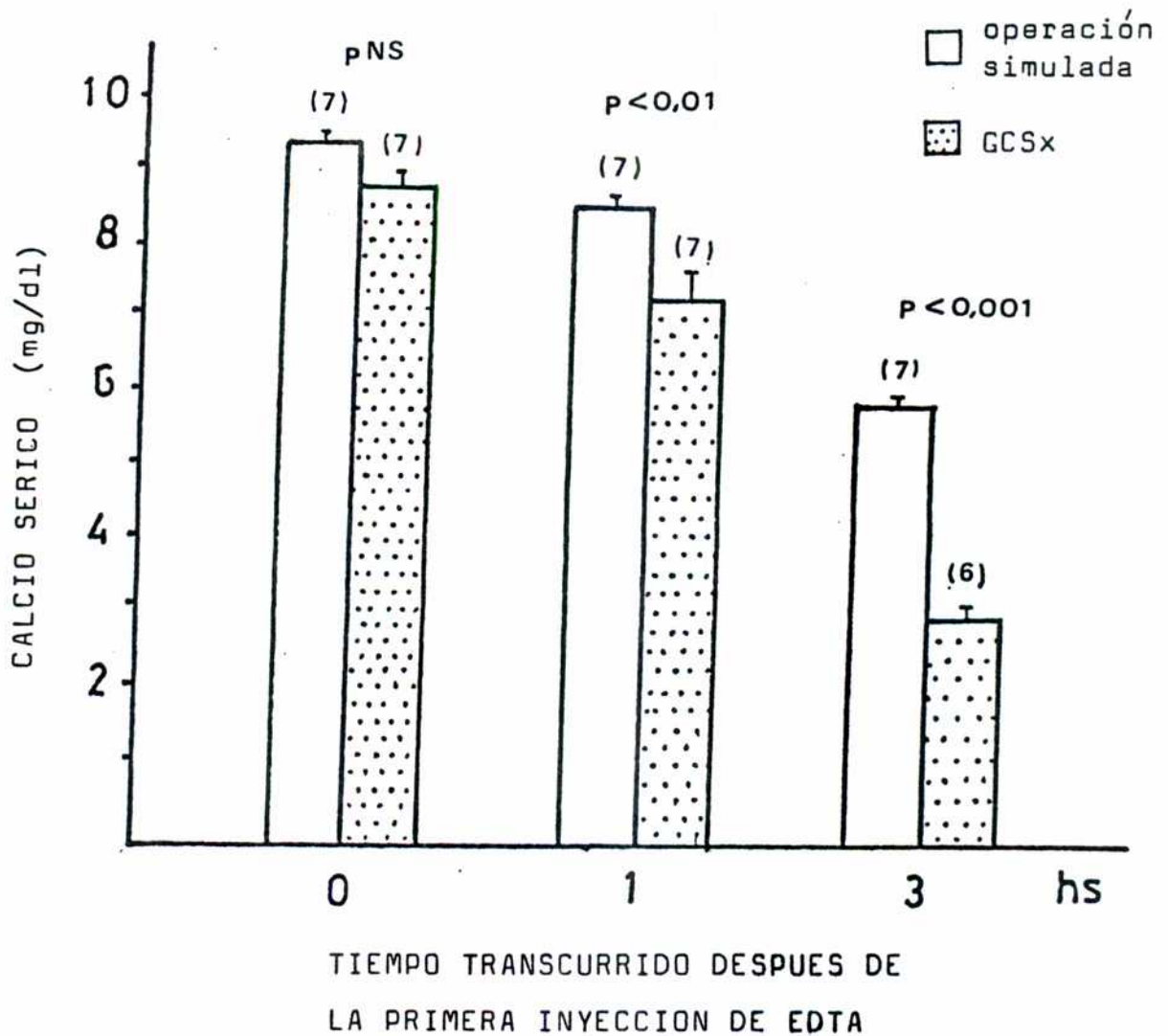
La inhibición de la secreción de PTH en los animales GCSx es revertida por dosis supramáximas de EDTA.

FIGURA 8: INCREMENTO DE LA HIPOCALCEMIA INDUCIDA POR EDTA DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx. VALORES INDIVIDUALES



Los animales fueron sometidos a cirugía 23 horas antes de la primera inyección de EDTA.

FIGURA 9: INCREMENTO DE LA HIPOCALCEMIA INDUCIDA POR EDTA DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx. VALORES PROMEDIO

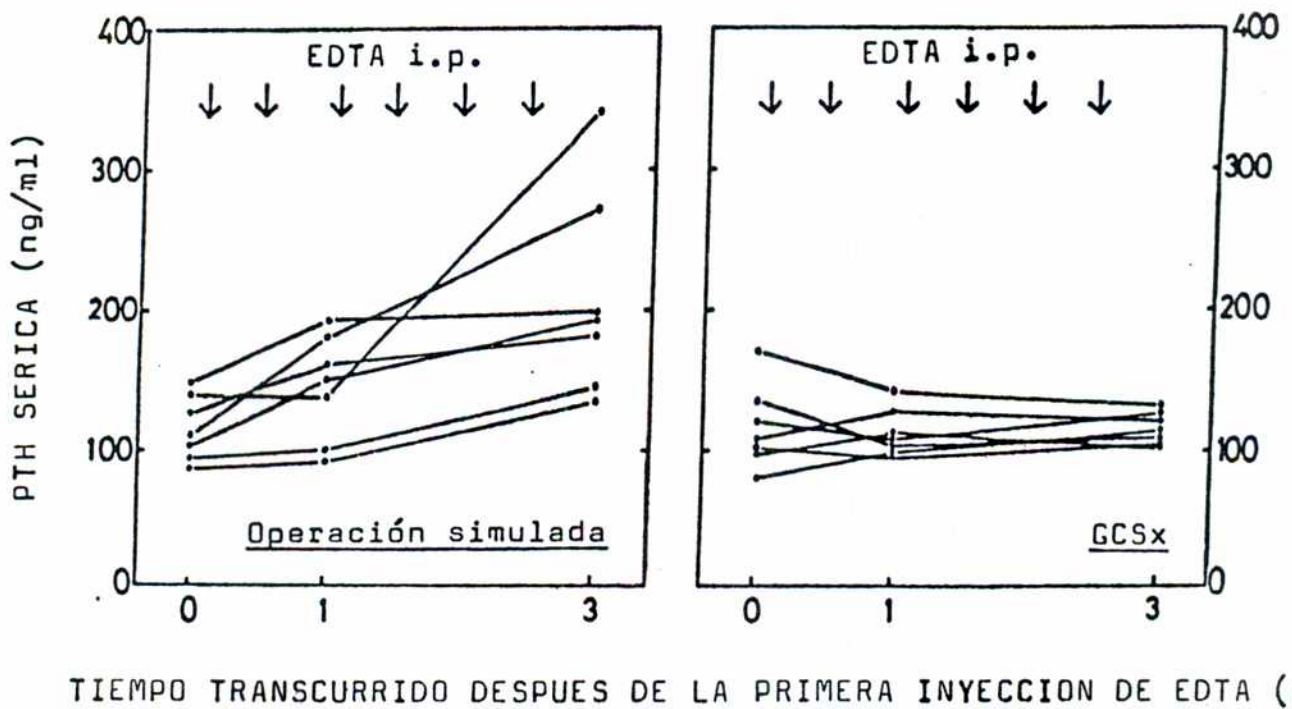


Los animales fueron sometidos a cirugía 23 h antes de la primera dosis de EDTA.

El EDTA disódico (100mg/Kg) se administró cada 30 min durante 3 h.

Las barras representan la media_±ES del número de animales indicado entre paréntesis. La estadística entre grupos se efectuó por el Test de Student. Un análisis de varianza efectuado por datos apareados muestra diferencias significativas dentro de cada grupo en función del tiempo. (p < 0.01).

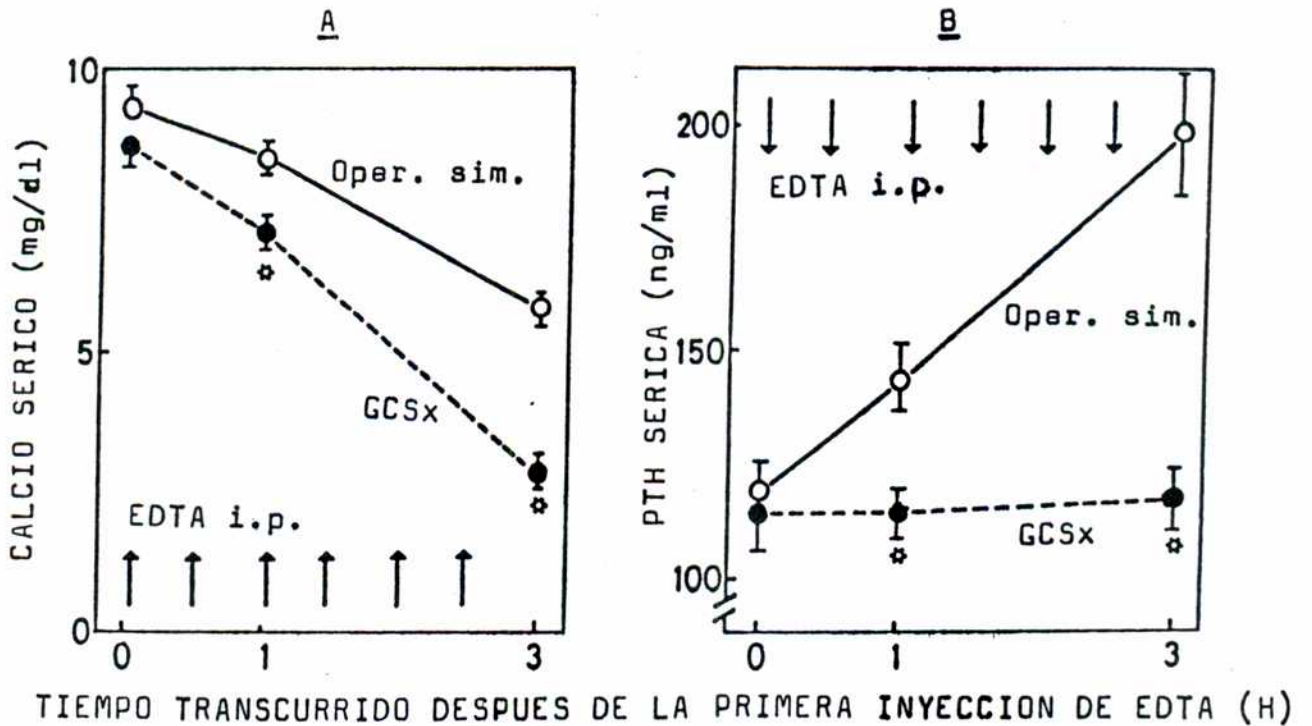
FIGURA 10: EFECTO DE LA DEGENERACION WALLERIANA SOBRE LA LIBERACION ESTIMULADA DE PTH. VALORES INDIVIDUALES



Los animales fueron sometidos a cirugía 23 h antes de la primera inyección de EDTA (100mg/Kg/dosis).

Por análisis de la varianza de datos apareados se encuentran diferencias significativas en función del tiempo en las ratas con operación simulada ($p < 0.001$). Los animales GCSx no presentan alteraciones en los niveles séricos de PTH.

FIGURA 11: EFECTO DE LA DEGENERACION WALLERIANA SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE CALCIO Y PTH DESPUES DE ESTIMULACION CON EDTA.
VALORES PROMEDIO



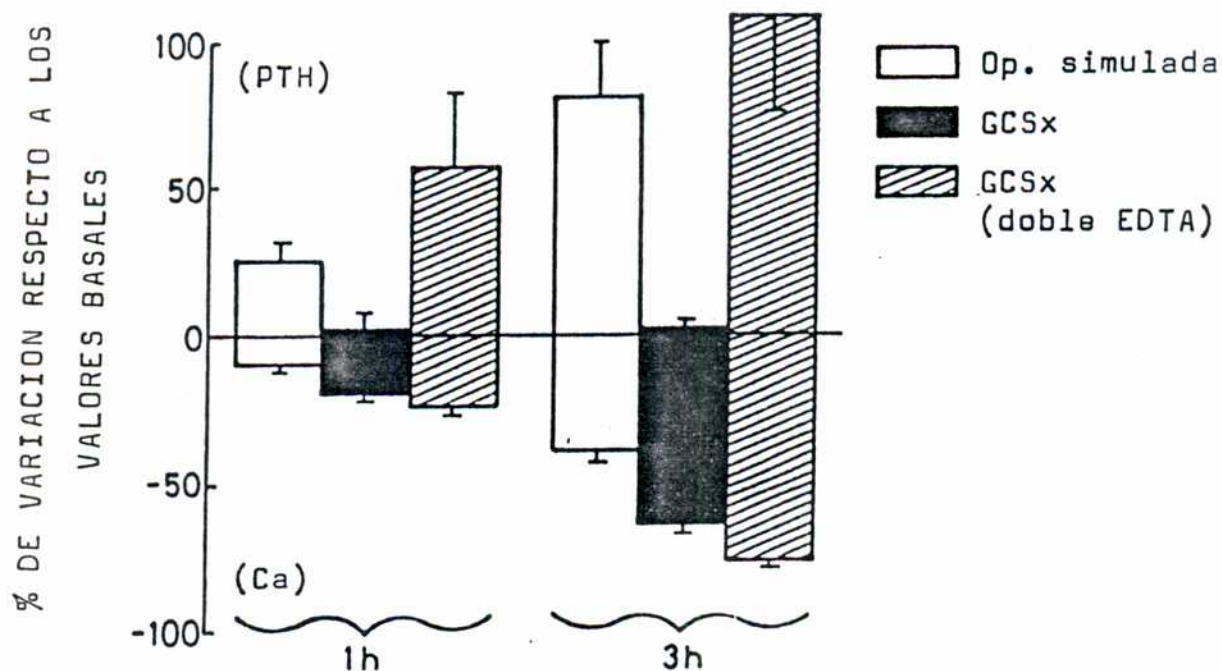
Las dosis de EDTA (100mg/Kg) comenzaron a administrarse 23 h después de la cirugía.

Cada punto representa la media_±ES de 7 ratas.

* $p < 0.01$ si se compara el grupo GCSx con el que recibió operación simulada (Test de Student).

Con el objetivo de facilitar la integración y comprensión de los resultados, se incluyen los niveles séricos de calcio que ya fueron graficados en la Fig. 9.

FIGURA 12: EFECTO DE LA GCSx SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE CALCIO Y PTH DESPUES DE ESTIMULACION SUPRAMAXIMA CON EDTA. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA.



TIEMPO TRANSCURRIDO DESPUES DE LA PRIMERA DOSIS DE EDTA

23 h después de GCSx, los animales recibieron inyecciones i.p. de EDTA (□ y ■ : 100mg/Kg, ▨ : 200mg/Kg) cada 30 min durante 3 h.

Las barras representan la media_±ES de 7 animales para las ratas que recibieron EDTA en dosis menores. De los 7 animales inyectados con doble dosis de EDTA, solo sobrevivieron 3 al finalizar el experimento.

La estimulación supramáxima con EDTA restablece la respuesta secretora de la paratiroides en las ratas GCSx.

3.2.4- MODULACION DE LA SECRECION ESTIMULADA DE CT

En la Tabla II se muestra que durante y después de la degeneración walleriana que ocurre post GCSx los niveles séricos basales de CT no se modifican. El siguiente punto que nos interesó estudiar fué valorar si la secreción estimulada de CT era afectada durante dicho período (al igual que la PTH), y posteriormente al mismo.

Para ello se estudió la respuesta secretora de las células C-tiroideas frente a estímulos hipercalcemiantes que fueron aplicados a diferentes tiempos después de GCSx u operación simulada en ratas. Los animales se inyectaron con una dosis de Cl_2Ca (5mg Ca/rata i.p.) 16, 21 o 28 h post GCSx. Se obtuvieron muestras de sangre basales, 10, 15, 20 o 30 min después de administrar el Cl_2Ca .

3.2.4.A- Calcemia

Como se observa en la Fig. 13, tanto los animales GCSx como con operación simulada efectuadas 16, 21 o 28 h antes, responden de manera similar a la administración de Cl_2Ca presentando incrementos de la calcemia de la misma magnitud, indicando que la GCSx no afecta la distribución y cinética del calcio.

3.2.4.B- Calcitonina sérica

Los niveles individuales de CT sérica en las ratas que fueran GCSx o sometidas a operación simulada 16 h antes se representan en la Fig. 14. Todos los animales controles presentaron incremento de la secreción de CT en respuesta a la hipercalcemia. En cambio, en las ratas GCSx

este incremento fué menor, mas lento y en algunos casos inexistente.

Los valores promedio de este experimento se resumen en la Fig. 15 A, así como los niveles de CT sérica en animales que recibieron el estímulo hipercalcemiente 28 h después de GCSx (inmediatamente después de la culminación de la degeneración walleriana) (Fig. 15 B). En este último grupo de animales la CT sérica no presentó diferencias respecto al grupo control.

3.2.5- MODULACION DE LA SECRECION DE CT DURANTE SU ESTIMULACION SUPRAMAXIMA

Con el objeto de averiguar si un estímulo hipercalcemiente mayor era capaz de revertir la depresión en la respuesta de las células C-tiroideas observada en animales GCSx durante el proceso de degeneración neuronal, se desarrolló el siguiente esquema experimental: Dos grupos de 8 ratas cada uno fueron GCSx o sometidos a operación simulada. Transcurridas 21 y 21h 15 min recibieron sendas dosis de Cl_2Ca i. p. (5 mg Ca/rata). Se obtuvieron muestras de sangre basales, 15 y 30 min después de la primera dosis de Cl_2Ca .

La Fig. 16 muestra que después de la segunda inyección de Cl_2Ca las ratas GCSx presentaron una hipercalcemia significativamente mayor que las controles y que, coincidentemente con esta hipercalcemia, se observó una restauración de la liberación de CT.

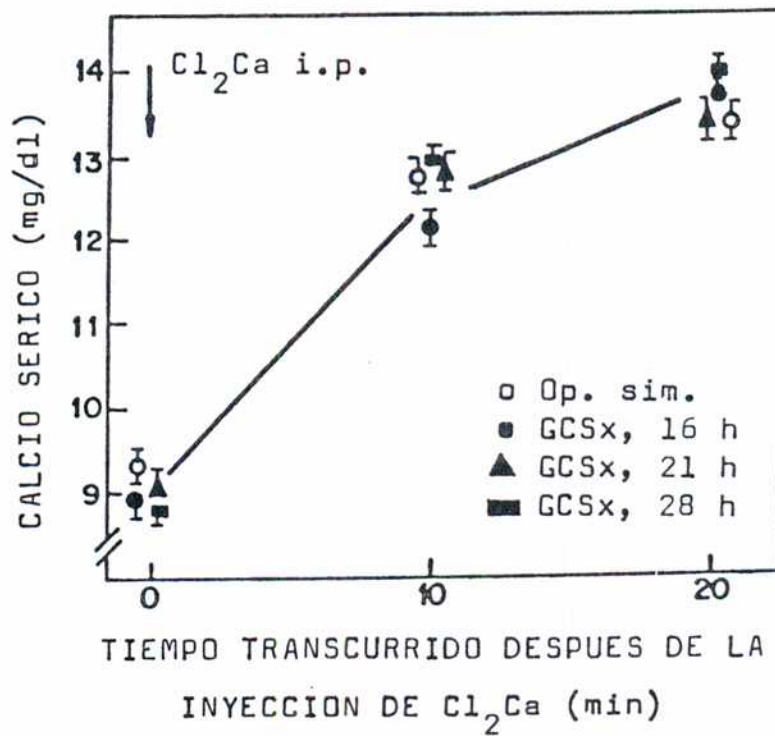
3.2.6- RESUMEN

En conclusión, los resultados obtenidos en esta

serie de experimentos (3.2.4 y 3.2.5) indican que la liberación de CT que ocurre después de aplicar un estímulo hipercalcémico se encuentra deprimida durante el período de actividad simpática provocado temporalmente por la GCSx. Tal efecto se revierte cuando la calcemia se incrementa aún mas mediante la administración de inyecciones repetidas de Cl_2Ca .

La secreción estimulada de CT no es deprimida por la GCSx una vez concluída la degeneración walleriana.

FIGURA 13: NIVELES SERICOS DE CALCIO DESPUES DE LA INYECCION DE Cl_2Ca EN ANIMALES GCSx O CON OPERACION SIMULADA



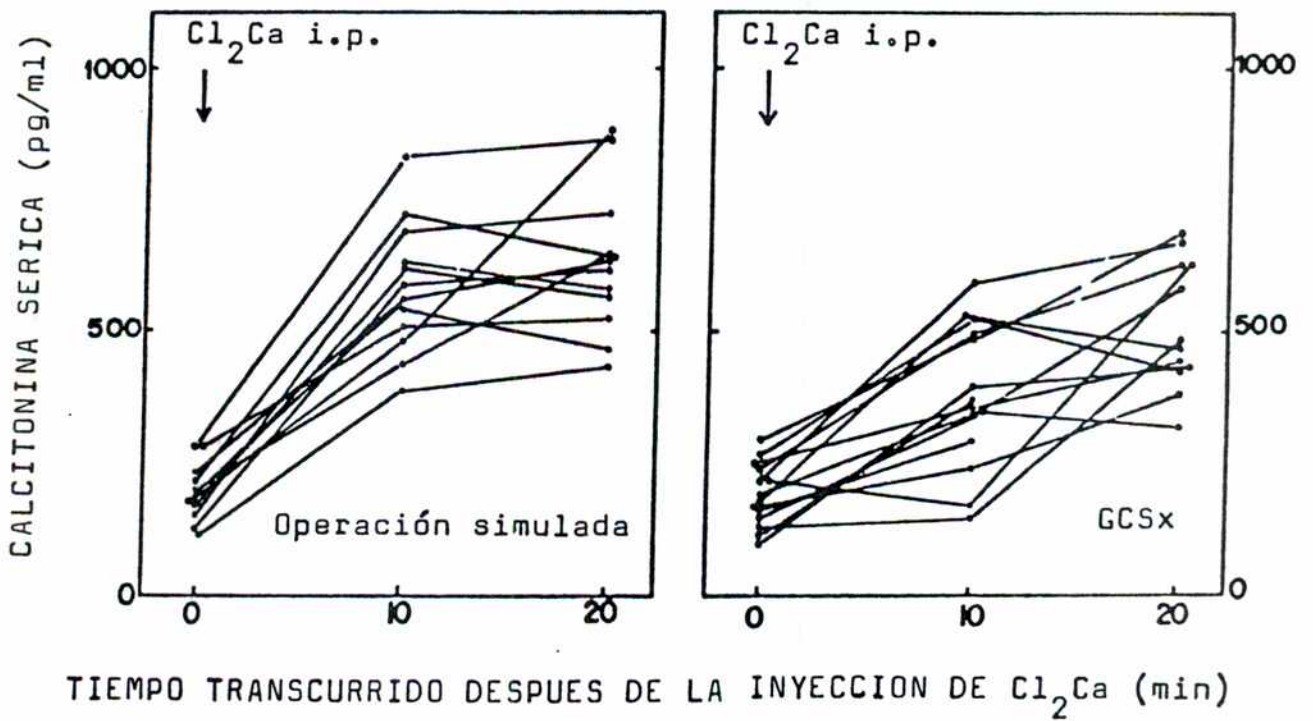
Las ratas fueron sometidas a cirugía 16, 21 o 28 h antes de la administración de Cl_2Ca (5mg Ca/rata).

Cada punto representa la media \pm ES para 8 ratas GCSx o para 16 con operación simulada.

La GCSx no afecta la distribución y cinética del calcio.

FIGURA 14: EFECTO DE LA GCSx SOBRE LA LIBERACION ESTIMULADA DE CT. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLE-RIANA.

VALORES INDIVIDUALES

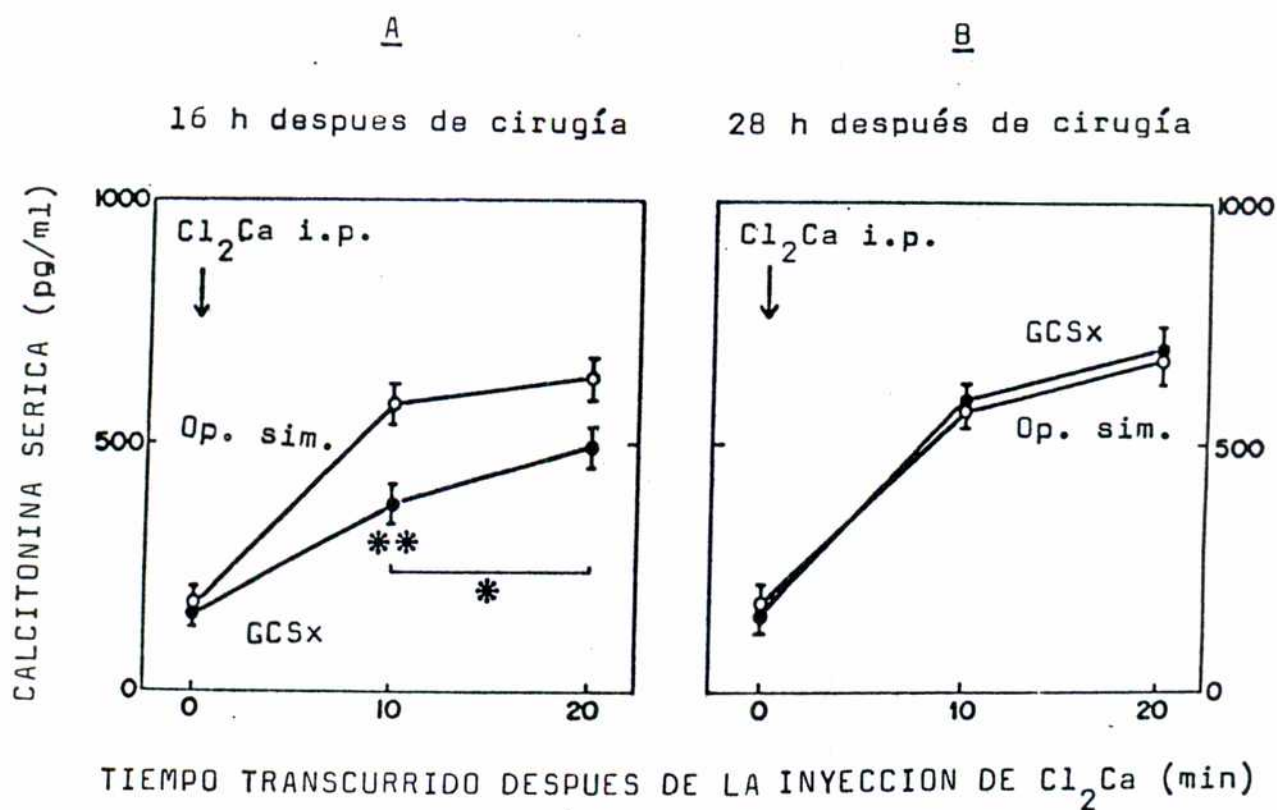


Las ratas fueron sometidas a cirugía 16 h antes de la inyección de Cl₂Ca (5mg Ca/animal).

La respuesta secretora a la hipercalcemia fué menor en los animales GCSx.

FIGURA 15: EFECTO DE LA GCSx SOBRE LA LIBERACION ESTIMULADA DE CT. ESTUDIOS DURANTE (A) Y DESPUES (B) DE LA DEGENERACION WALLERIANA.

VALORES PROMEDIO



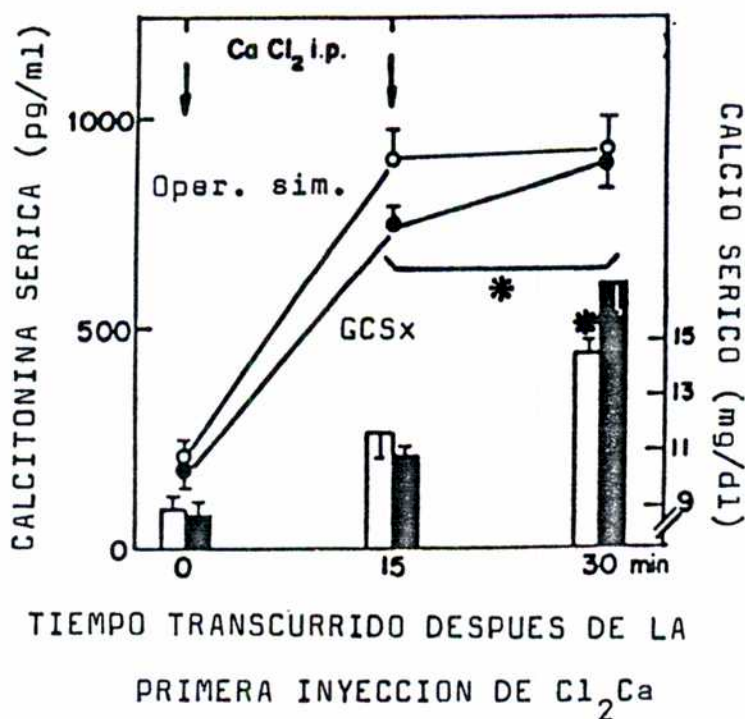
Los valores representan la media \pm ES de 12 u 8 animales cuando la cirugía fué efectuada respectivamente 16 o 28 h antes del Cl₂Ca (5mg Ca/rata).

* p < 0.05 por análisis de la varianza de datos apareados en los animales GCSx.

** p < 0.01 si se comparan los animales GCSx con el grupo que recibió operación simulada (Test de Student).

28 h después de la GCSx, una vez concluído el período de degeneración neuronal, ya no se observa inhibición de la secreción de CT.

FIGURA 16: RESTAURACION DE LA SECRECION DE CT DESPUES DE LA APLICACION DE DOBLE DOSIS DE Cl_2Ca EN RATAS GCSx. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLE-RIANA.



Los animales fueron sometidos a cirugía 21 h antes de la inyección de la primera dosis de Cl_2Ca (5mgCa/rata/dosis).

Cada punto o barra representa la media \pm ES de 8 ratas.

* $p < 0.05$ si se comparan los niveles de CT sérica de las muestras obtenidas a los 15 y 30 min (Test de Student apareado) y los niveles de calcio sérico entre los animales con operación simulada (barras blancas) y GCSx (barras negras) (Test de Student).

3.3- PARTICIPACION DE LOS RECEPTORES α Y β ADRENERGICOS EN LA MODULACION NEURAL SIMPATICA DE LA SECRECION DE PTH Y CT

En la Sección 3.2 se ha establecido que la GCSx induce una depresión en los niveles circulantes de PTH y CT durante el período correspondiente a la degeneración de las terminales nerviosas. Tal depresión se produce en presencia de estímulos secretorios para ambas hormonas.

Como se analizó en la Introducción (Sección 1.3.3, Fig. 6), la degeneración walleriana está caracterizada por un alto incremento de la liberación de NE de las terminales simpáticas en destrucción. Hemos investigado la participación de los receptores α y β adrenérgicos en la modulación neural de la secreción de PTH y CT mediante la administración de antagonistas α adrenérgicos: fenoxibenzamina (0.25 o 1.25 mg/Kg) o fentolamina (10 mg/Kg) y β adrenérgicos: propranolol (5 o 6.25 mg/Kg) durante el período de degeneración walleriana. Los bloqueantes fueron inyectados antes de proceder a la estimulación de la secreción de PTH o CT.

3.3.1- EFECTO DE BLOQUEANTES ADRENERGICOS SOBRE LA SECRE- CION ESTIMULADA DE PTH

18 h 30 min después de efectuada GCSx en tres grupos de ratas, los animales recibieron vía s.c. 0.2 ml de vehículo, propranolol (5 mg/Kg) o fentolamina (10 mg/Kg) respectivamente. Transcurridas 4 h 30 min se inició la administración de una serie de seis inyecciones de EDTA (100 mg/Kg/dosis, i.p.) separadas por intervalos de 30 min.

3.3.1.A- Calcemia

Como se observa en la Fig. 17, la calcemia basal se eleva 4 h 30 min después de administrar el propranolol a animales GCSx 23 h antes. Un análisis de la varianza de datos apareados estableció que la ratas GCSx tratadas con propranolol o fentolamina presentan una hipocalcemia de menor magnitud en respuesta al EDTA que los animales inyectados con vehículo ($p < 0.01$).

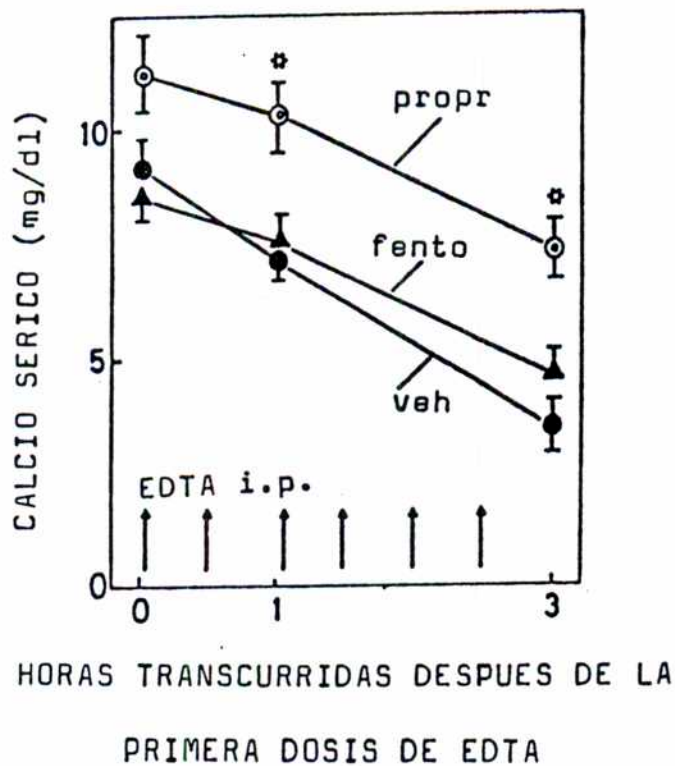
3.3.1.B- Parathormona sérica

En la Sección 3.2 se ha demostrado que la secreción de PTH estimulada por la administración de un agente hipocalcemiante, es inhibida durante la degeneración walleriana después de la GCSx. La Fig. 18 indica que durante este período, si las ratas son tratadas previamente con propranolol o fentolamina: 1- Los niveles basales de PTH circulante no se modifican. 2- Se detecta un incremento significativo de la PTH sérica 1 y/o 3 h después de comenzar la estimulación con EDTA. Esta restauración de la secreción de PTH en respuesta al EDTA no se observa en los animales GCSx tratados con vehículo.

3.3.2- RESUMEN

Los resultados detallados en el punto 3.3.1 indican que la respuesta de la paratiroides a un estímulo hipocalcémico (respuesta que permanece inhibida durante la degeneración walleriana posterior a la GCSx) puede ser restaurada mediante la administración de bloqueantes α y β adrenérgicos en este intervalo.

FIGURA 17: EFECTO DE BLOQUEANTES ADRENERGICOS SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE CALCIO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE EDTA EN RATAS GCSx. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA.

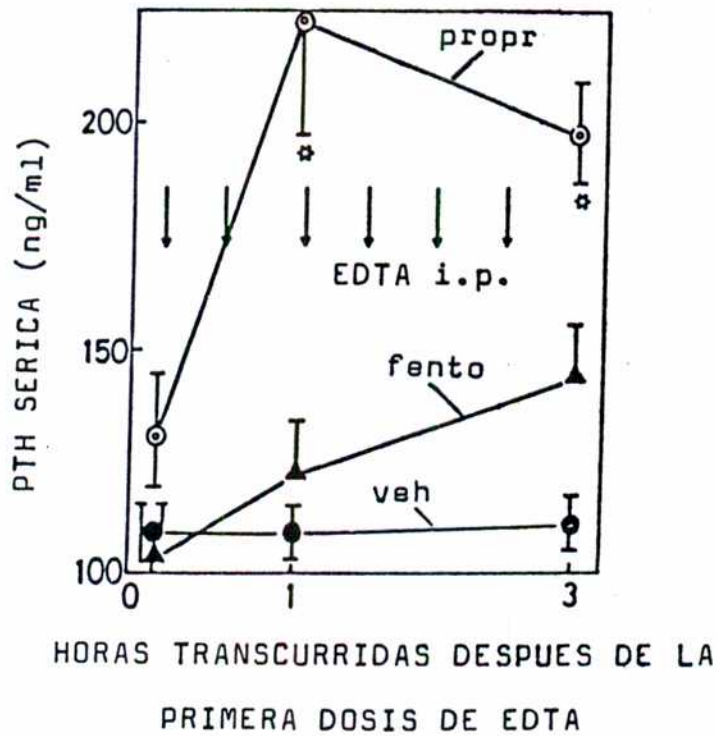


La fentolamina (10mg/Kg) o el propranolol (5mg/Kg) fueron administrados 4 h 30 min antes de la primera inyección de EDTA (100mg/rata/dosis).

Cada punto representa la media_±ES de 6 - 9 ratas. Un análisis de varianza de datos apareados muestra diferencias significativas en función del tiempo en los animales tratados con propranolol y fentolamina (p < 0.01).

* p < 0.05 si se compara el grupo tratado con propranolol con los animales inyectados con vehículo (Test de Dunnet).

FIGURA 18: EFECTO DE BLOQUEANTES ADRENERGICOS SOBRE LA SECRECION ESTIMULADA DE PTH EN RATAS GCSx. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA.



La fentolamina (10mg/Kg) o el propranolol (5mg/Kg) fueron administrados 4 h 30 min antes de la primera inyección de EDTA (100mg/rata/dosis).

Cada punto representa la media_±ES de 6-7 ratas. Un análisis de la varianza de datos apareados indica diferencias significativas en función del tiempo en los animales inyectados con propranolol ($p < 0.05$). 3 h después de la primera inyección de EDTA, las ratas tratadas con fentolamina difieren significativamente de su valor basal ($p < 0.05$).

* $p < 0.05$ si se comparan los animales tratados con propranolol con el grupo tratado con vehículo (Test de Dunnet).

3.3.3- EFFECTO DE BLOQUEANTES ADRENERGICOS SOBRE LA SECRE- CION ESTIMULADA DE CT

Grupos de 6 ratas cada uno, GCSx o sometidos a operación simulada, fueron inyectados con bloqueantes adrenérgicos durante la degeneración walleriana (15 h 30 min después de la cirugía). Las drogas utilizadas fueron fenoxibenzamina (1.25 mg/Kg) y propranolol (6.25 mg/Kg) como bloqueantes α y β adrenérgicos respectivamente. 30 min después de la administración de estos antagonistas todos los animales recibieron una dosis i.p. de Cl_2Ca (5 mg Ca/rata).

3.3.3.A- Calcemia

En la Fig. 19 se observa que la fentolamina y/o el propranolol no modifican la calcemia basal de los animales GCSx o con operación simulada. Estos bloqueantes tampoco provocan cambios sobre la hipercalcemia inducida por la administración de Cl_2Ca .

3.3.3.B- Calcitonina sérica

La Fig. 20 indica que después de la administración de fenoxibenzamina ocurre un incremento significativo de los niveles séricos de CT basal ($p < 0.01$) que, por el contrario, no es modificada por el propranolol. Los animales con operación simulada tratados con cualquiera de estos bloqueantes no presentan cambios en la CT basal.

15 min después de una estimulación de la secreción de CT por administración de Cl_2Ca , se observa que durante la degeneración walleriana los animales GCSx presentan niveles de CT sérica de menor magnitud que las ratas some-

tidas a operación simulada, coincidiendo con los resultados descritos en 3.2.4.B.

El bloqueo de los receptores α por la fenoxibenzamina condujo a un incremento de la secreción estimulada de CT en animales GCSx, indicando una restauración de la capacidad de respuesta de las células C-tiroideas a la hipercalcemia. Las ratas con operación simulada no presentan cambios significativos después de la inyección de fenoxibenzamina, aunque se observó un alto grado de variabilidad en los niveles de CT obtenidos. Por el contrario, la administración de propranolol no modificó la liberación basal o estimulada de CT en ninguno de los grupos estudiados.

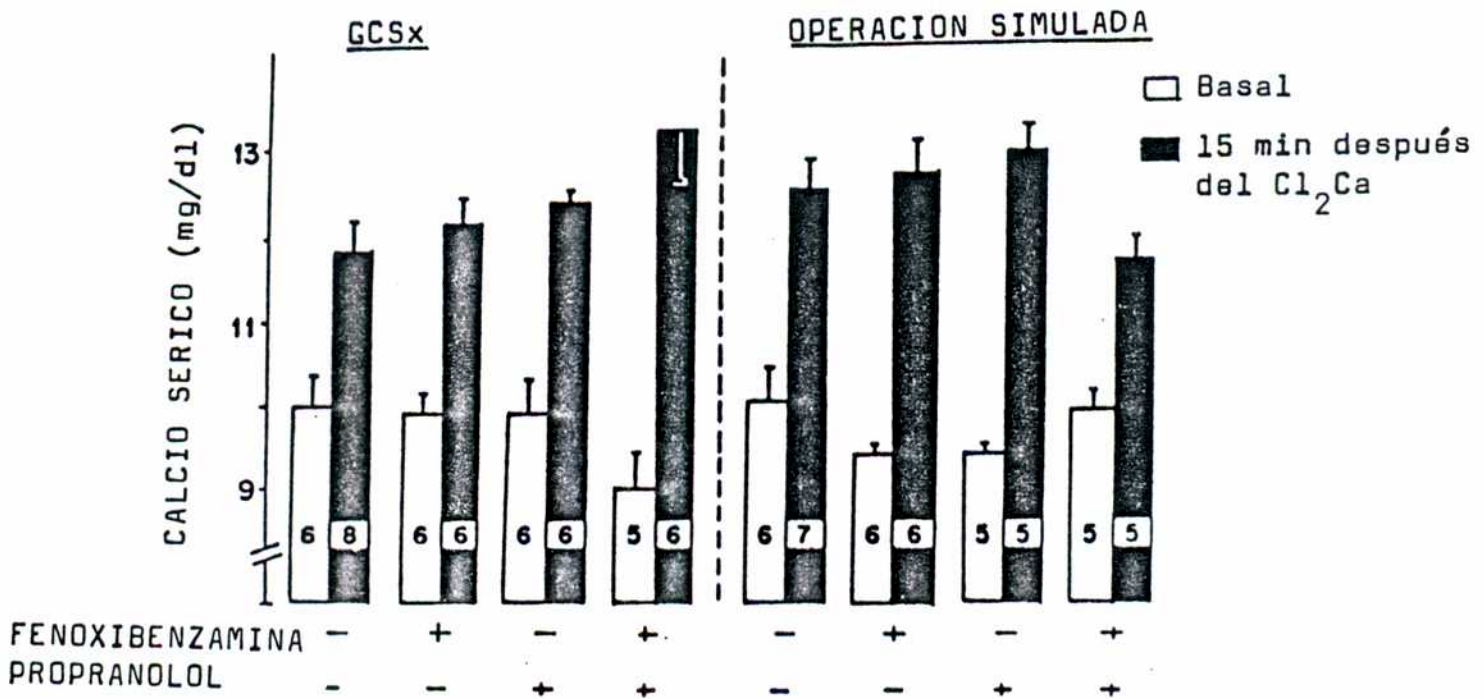
Como se ha visto, la fenoxibenzamina estimuló la secreción de CT basal y estimulada en ratas GCSx durante el período de degeneración walleriana. La administración simultánea de fenoxibenzamina y propranolol deprimió la respuesta inducida por la fenoxibenzamina. Estos cambios no se observaron en los animales sometidos a operación simulada.

Con el objeto de valorar la eficacia de la fenoxibenzamina para revertir la depresión de la secreción de CT que ocurre durante la degeneración walleriana, se ensayaron dosis menores de la droga: 0.25 mg/Kg (1/5 de la dosis empleada anteriormente). Los resultados se observan en la Fig. 21. En las ratas GCSx, el bloqueo de los adrenoceptores α por la fenoxibenzamina revierte tanto la depresión en la respuesta secretora de CT frente a la hipercalcemia como el retardo para alcanzar su máxima respuesta.

3.3.4- RESUMEN

Los resultados obtenidos en estos estudios indican que la respuesta de las células C-tiroideas a un estímulo secretorio, normalmente deprimida durante la degeneración walleriana, es restaurada mediante el bloqueo de los receptores α adrenérgicos por la fenoxibenzamina. Este efecto puede ser bloqueado por el propranolol.

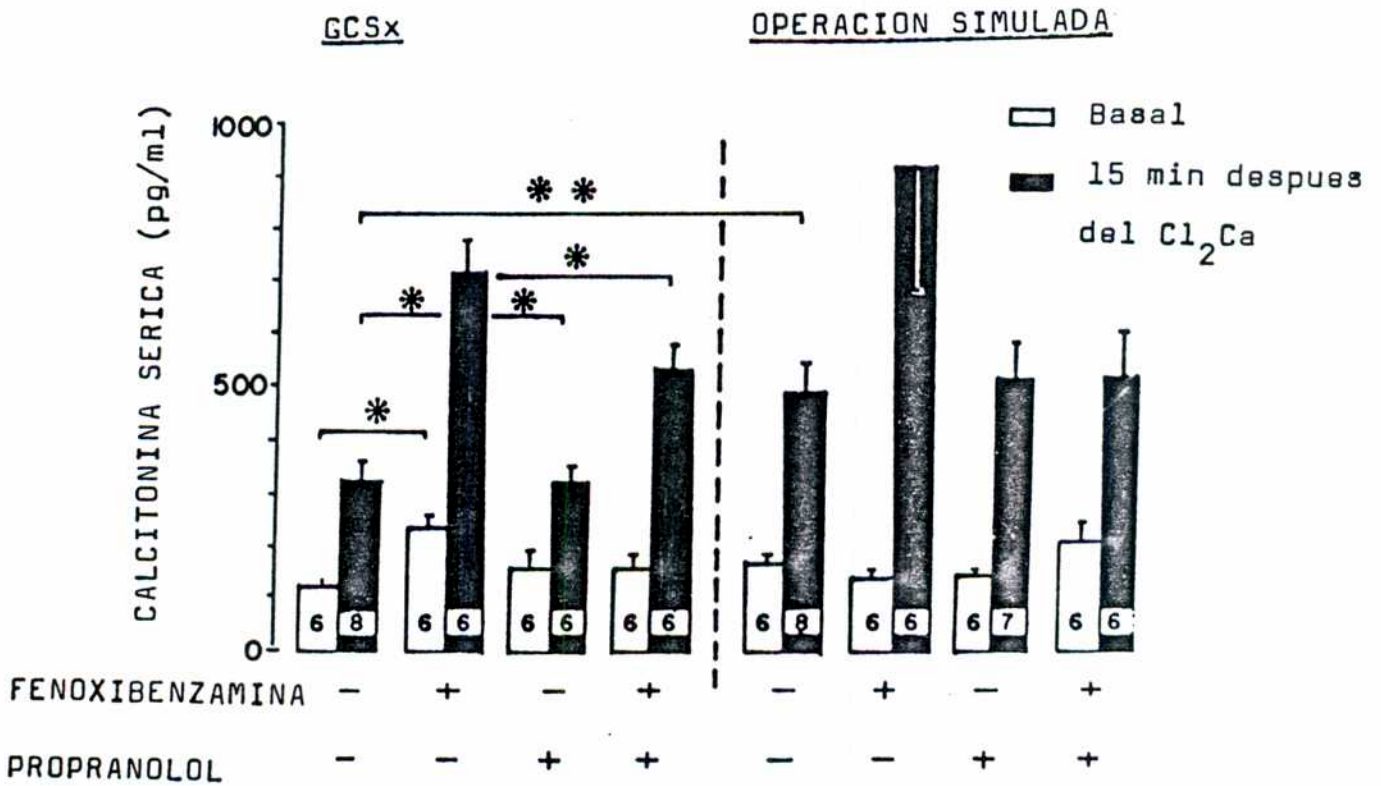
FIGURA 19: HIPERCALCEMIA DESPUES DE UNA INYECCION DE Cl_2Ca EN RATAS GCSx. FALTA DE INTERFERENCIA DE ANTAGONISTAS ADRENERGICOS. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA.



La fenoxibenzamina (1,25mg/Kg) y el propranolol (6.25mg/Kg) se administraron vía s.c. 30 min antes de la inyección de Cl_2Ca (5mg Ca/rata i.p.)

Las barras representan la media \pm ES del número de animales indicado dentro de cada una de ellas.

FIGURA 20: EFECTO DE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx SOBRE LA LIBERACION ESTIMULADA DE CT. INTERFERENCIA POR ANTAGONISTAS ADRENERGICOS.



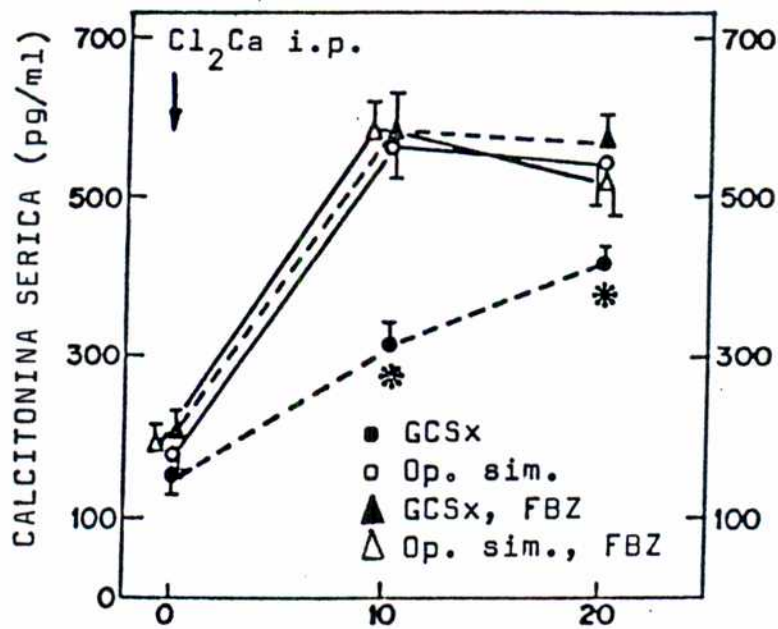
La fenoxybenzamina (1.25mg/Kg) y el propranolol (6.25mg/Kg) se administraron vía s.c. 30 min antes de la inyección de Cl₂Ca (5mg Ca/rata i.p.).

Las barras representan la media_±ES del número de animales indicado dentro de cada una de ellas.

* p < 0.05 por análisis de la varianza seguido del Test de Dunnet.

** p < 0.05 por el Test de Student.

FIGURA 21: EFECTO DE DOSIS MINIMAS DE FENOXIBENZAMINA SOBRE LA SECRECION ESTIMULADA DE CT. ESTUDIOS DURANTE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx.



TIEMPO TRANSCURRIDO DESPUES DE LA INYECCION DE Cl₂Ca (min)

Dosis administradas: Cl₂Ca: 5 mg Ca/rata i.p., fenoxibenzamina: dosis s.c. de 0.25mg/Kg inyectadas 30 min antes que el Cl₂Ca.

Cada punto representa la media±ES para 6 animales.

* p < 0.05 respecto a los 3 grupos restantes (por análisis de la varianza seguido por el Test de Dunnet).

Durante la degeneración walleriana, dosis mínimas de antagonistas α adrenérgicos pueden restablecer la secreción de CT.

3.4- REGULACION DE LA SECRECION DE PTH DURANTE LA GCSx CRONICA. ESTUDIOS EN RATAS HEMIPTx

Los resultados presentados en las Secciones 3.2 y 3.3 indican que la estimulación simpática local provoca una depresión de la función paratiroidea estimulada por hipocalcemia. Asimismo, como se menciona en la Sección 1.3.3, existen antecedentes que demuestran que durante GCSx crónica se acentúa la hipertrofia compensadora de la tiroides remanente después de hemitiroidectomía. Por otra parte, en el punto 1.1.2.A se ha señalado que aún no existe acuerdo en relación al desarrollo de hipertrofia compensadora paratiroidea cuando se efectúa paratiroidectomía parcial. En consecuencia, en esta etapa nos ha interesado estudiar simultáneamente la presencia de hipertrofia compensadora paratiroidea y su posible modulación neural por las fibras provenientes del GCS. Para ello hemos efectuado estudios en los que las ratas fueron sometidas a PTx izquierda + GCSx derecha o a PTx izquierda + operación simulada del GCS derecho.

3.4.1- NIVELES SERICOS DE CALCIO Y PTH

Como se muestra en la Fig. 22, la hemiPTx provocó una disminución significativa de la calcemia 24 h después de la operación. Cuando la hemiPTx se asoció con GCSx ipsilateral a la paratiroides remanente, el descenso de la calcemia se hizo significativo 15 h después de la cirugía.

La asociación de ambas operaciones conduce a una disminución significativa de la PTH circulante 15 h después de la operación. En cambio la PTx no modifica la PTH sérica en este intervalo.

Transcurridas 24 a 72 h de la cirugía los niveles circulantes de calcio y PTH permanecen significativamente disminuídos respecto a los valores basales, tanto en las ratas hemIPTx como hemIPTx + GCSx. Estos resultados, graficados en la Fig. 22, no indican compensación funcional por la paratiroides remanente en ninguno de los grupos estudiados.

La Fig. 23 resume las modificaciones que la hemIPTx y la hemIPTx asociada a GCSx provocan sobre la calcemia transcurridos 3 a 14 días de la operación. Durante todo este período los niveles circulantes de calcio permanecen significativamente disminuídos respecto a los valores basales prequirúrgicos, resultado que respalda la ausencia de compensación funcional después de ablación paratiroides unilateral, independientemente de la presencia o ausencia de inervación simpática local.

3.4.2- INDICE MITOTICO - ESTUDIOS HISTOLOGICOS

El análisis del índice mitótico efectuado en la paratiroides remanente de animales que fueran sometidos a operación simulada, hemIPTx o hemIPTx + GCSx 48 h antes (Tabla III); muestra que no existen diferencias significativas entre los grupos estudiados, indicando la ausencia de hiperplasia compensadora de la paratiroides remanente después de hemIPTx, independientemente de la presencia o ausencia de inervación simpática. Las Fig. 24 A y 24 B muestran el aspecto general de la glándula remanente de una rata hemIPTx 48 h antes.

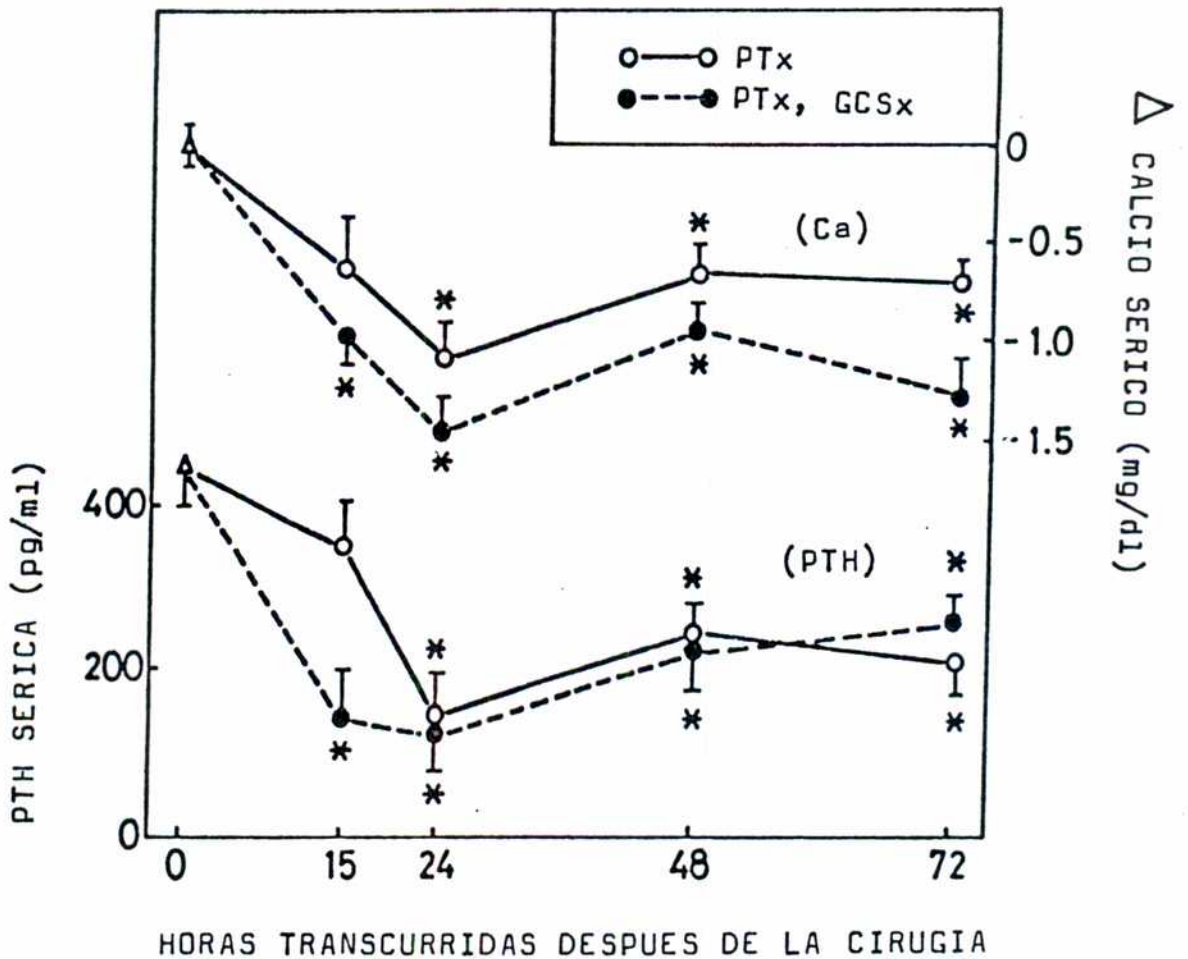
3.4.3- RESUMEN

Los resultados descriptos en el punto 3.4 demues-

tran que después de una hemiPTx no existe compensación funcional y anatómica por parte de la paratiroides remanente.

La secreción de PTH por la glándula no removida se encuentra inhibida durante el período de sobreactivación postsináptica coincidente con la degeneración walleriana (15 h después de GCSx). Por el contrario, durante la ausencia crónica de inervación simpática los niveles séricos de calcio y PTH no presentan cambios relacionados con la denervación.

FIGURA 22: NIVELES SERICOS DE CALCIO Y PTH EN RATAS HEMIPTx. ESTUDIOS DURANTE Y DESPUES DE LA DEGENERACION WALLERIANA POSTERIOR A LA GCSx.



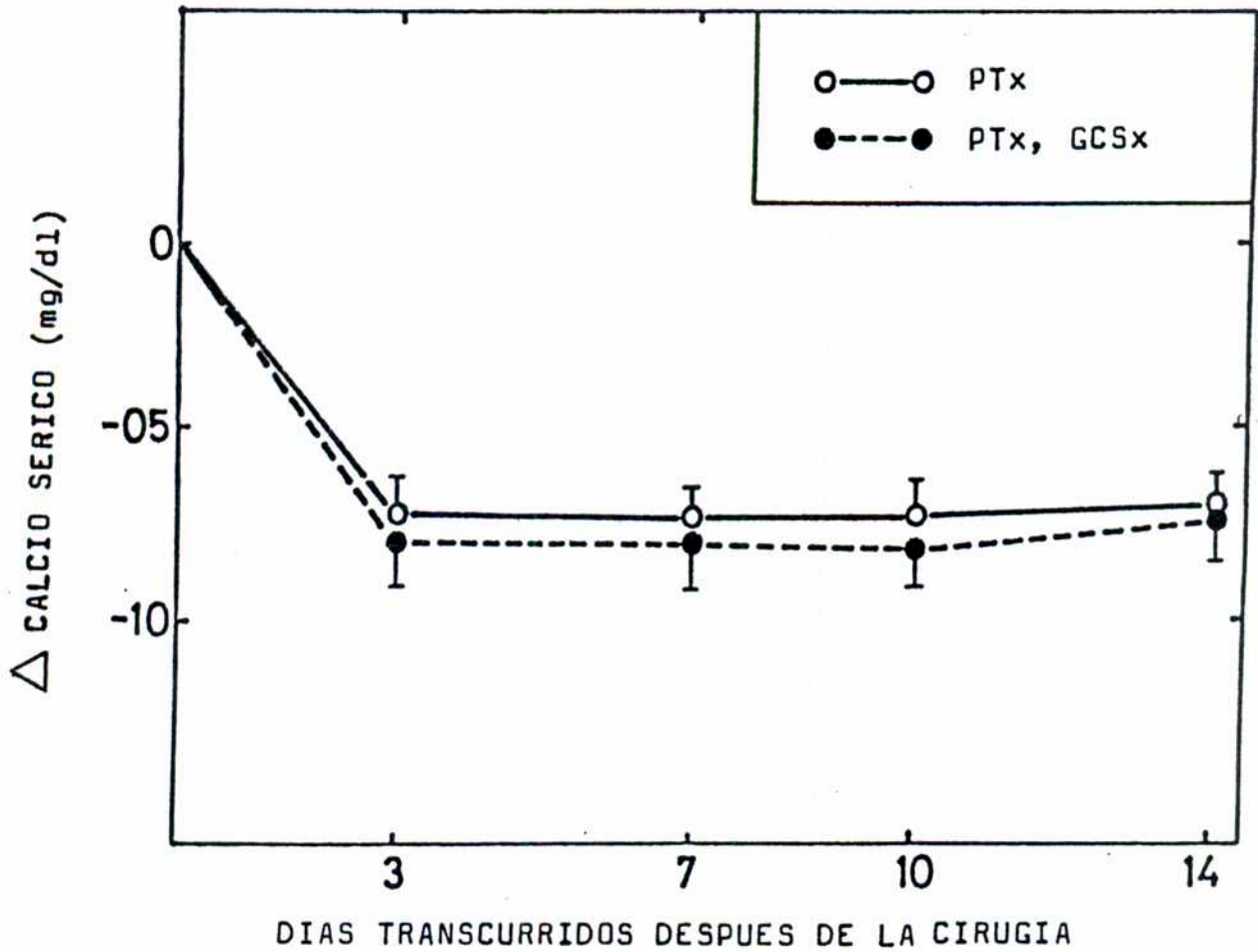
Los animales fueron sometidos a hemiPTx izquierda + GCSx simulada contralateral o a hemiPTx izquierda + GCSx derecha.

Cada punto representa la media_±ES de 6 a 7 ratas.

* $p < 0.05$ respecto a los valores basales prequirúrgicos (por análisis de la varianza).

Durante la degeneración walleriana se observa una disminución temprana de los niveles séricos de calcio y PTH.

FIGURA 23: FALTA DE HIPERTROFIA COMPENSADORA FUNCIONAL EN RATAS HEMIPTx. ESTUDIOS DURANTE GCSx CRONICA



Los animales fueron sometidos a hemiPTx izquierda + GCSx derecha o a hemiPTx izquierda + GCSx simulada derecha.

La calcemia disminuyó significativamente en ambos grupos de ratas, en relación a los valores basales prequirúrgicos (10.0 ± 0.7 mg/dl) ($p < 0.01$ por análisis de la varianza de datos apareados). No se observan diferencias entre grupos.

TABLA IIIINDICE MITOTICO EN LA PARATIROIDES REMANENTE DE RATASHEMIPTx

	Operación simulada	HemiPTx	HemiPTX+GCSx
Nº de mitosis por 1000 células	1.3±0.5 (6)	1.7±0.6 (6)	2.3±0.5 (6)

Los animales fueron sometidos a hemiPTx izquierda + GCSx derecha, a hemiPTx izquierda o a operación simulada.

48 h después de la operación los animales recibieron colchicina (2mg/Kg, i.p.) y fueron sacrificados 2 h después.

Los valores representan la media±ES del número de animales indicado entre paréntesis.

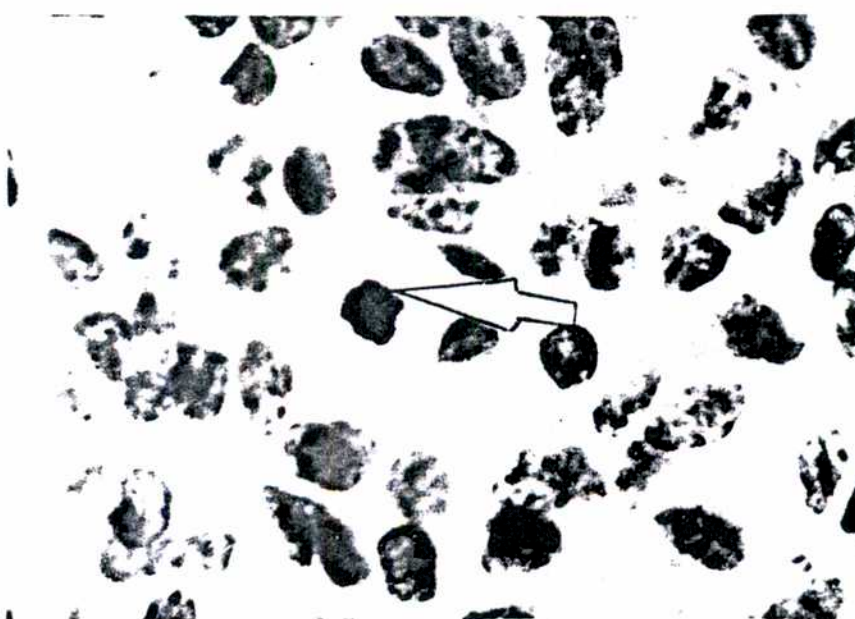
No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

FIGURA 24: ASPECTO DE LA PARATIROIDES REMANENTE LUEGO DE 48 H DE EFECTUADA HEMIPTX.

A



B



A- Campo general. B- Identificación de una mitosis. Los animales fueron inyectados con colchicina (2mg/Kg i.p.) 2 h antes del sacrificio.

No se observan índices que indiquen hipertrofia.

3.5- REGULACION DE LA SECRECION DE CT DURANTE GCSx

CRONICA

Los experimentos descriptos en el punto 3.4 demuestran que la ausencia crónica de inervación simpática local no modifica la respuesta funcional y anatómica de la paratiroides remanente frente a un estímulo hipocalcémico endógeno provocado por la hemiPTx contralateral. Para completar el estudio de las alteraciones que la denervación simpática local crónica pueda producir sobre el metabolismo mineral, nos interesó evaluar la respuesta funcional de las células C-tiroideas en animales sometidos a GCSx crónica.

La Tabla IV muestra que la calcemia de dos grupos de ratas (GCSx o con operación simulada respectivamente) valorada 3,7 y 14 días después de la cirugía, no difiere significativamente entre ambos grupos, indicando que la GCSx crónica no modifica la distribución y cinética del calcio.

Para estudiar la respuesta funcional de las células C-tiroideas de ratas crónicamente GCSx, después de la inducción de hipercalcemia, se administraron dosis de Cl_2Ca (5 mg Ca/rata) en diferentes grupos de animales a los que se les practicó GCSx u operación simulada 5 u 11 días antes del Cl_2Ca . Los resultados se presentan en la Fig. 25 donde se observa que los niveles séricos basales de calcio y CT son similares en ambos grupos de ratas. Después de la estimulación con Cl_2Ca todos los animales responden con una elevación significativa de la calcemia y de la CT circulantes. Estos incrementos son de la misma magnitud en los animales GCSx o con operación simulada.

3.5.1- RESUMEN

En conclusión, esta serie de experimentos muestra que la ausencia crónica de la inervación simpática local obtenida por GCSx no modifica la respuesta basal de las células C-tiroideas y tampoco su capacidad de respuesta después de la aplicación de estímulos secretorios.

TABLA IV

NIVELES CIRCULANTES DE CALCIO (mg/dl) DURANTE GCSx CRONICA

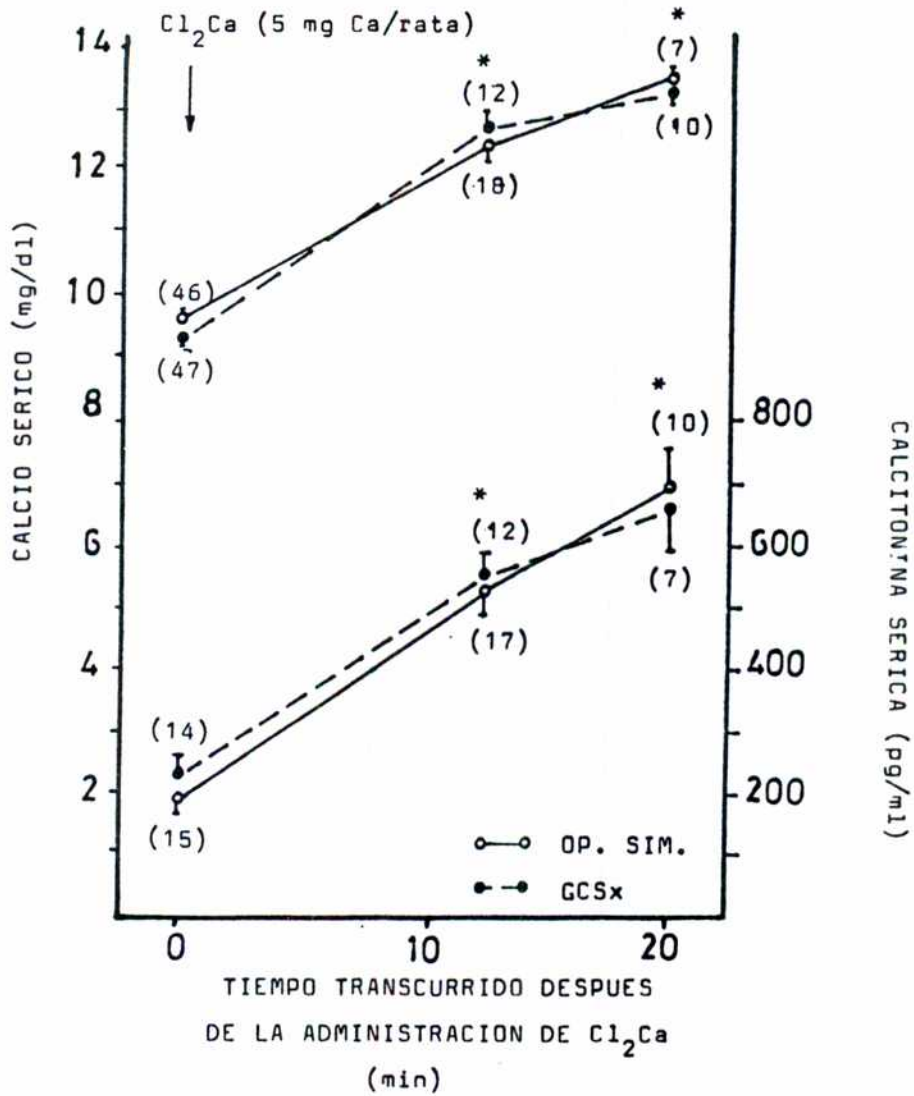
Días transcurridos después de la operación

	3	7	14
GCSx	9.8 \pm 0.1 (6)	9.9 \pm 0.4 (6)	9.7 \pm 0.2 (6)
Operación simulada	9.6 \pm 0.2 (6)	9.4 \pm 0.2 (6)	9.6 \pm 0.2 (4)

Cada punto representa la media \pm ES del número de animales indicado entre paréntesis.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

FIGURA 25: RESPUESTA FUNCIONAL DE LAS CELULAS C-TIROIDEAS EN RATAS CRONICAMENTE GCSx.



Los resultados (media \pm ES del número de animales indicado entre paréntesis) corresponden a diferentes experimentos en que las ratas fueron GCSx o sometidas a operación simulada 5 - 11 días antes de la estimulación con Cl_2Ca .

Para ambos grupos de ratas, los niveles séricos de calcio y PTH se elevan significativamente respecto al valor basal, después de la estimulación con Cl_2Ca : $p < 0.001$ por el Test de Student.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ninguno de los parámetros estudiados.

CAPITULO 4

D I S C U S I O N

Se ha mencionado en la Introducción (Sección 1.1) que el calcio extracelular es el principal regulador de la secreción de PTH y CT. Dentro de los agentes iónicos, el fósforo y el magnesio también desempeñan un rol modulador aunque este último es de menor importancia dentro de su rango fisiológico (1,47). En los últimos años se han acumulado evidencias que indican que también ciertos compuestos no iónicos pueden actuar como secretagogos o inhibidores de la secreción de PTH y CT; entre ellos, los metabolitos de la vitamina D (108), gastrina y otras hormonas gastrointestinales (74,75,194), secretina (194), colecistoquinina (74), glucagón (14), prostaglandinas E_2 y $F_2\alpha$ (145,146) y aminas biógenas (147). En este último caso, diversos estudios efectuados "in vitro" indican que las catecolaminas que incrementan el AMPc intracelular (agonistas β adrenérgicos) pueden estimular la secreción de PTH (149,150,154,181) y CT (182-184). Por el contrario, las aminas que disminuyen el AMPc intracelular (agonistas α adrenérgicos) inhiben la secreción de PTH (181,185,186) y CT (175).

La fuente de origen de las catecolaminas que potencialmente afectan la secreción de PTH y CT es variada. Pueden provenir de la circulación general o ser liberadas localmente a través de las terminales simpáticas que inervan las células C-tiroideas y paratiroides. En las Secciones 1.4.1.B - C y 1.4.2.B - C se describen los estudios que se han efectuado hasta el momento para evaluar el rol fisiológico que desempeñan las aminas biógenas sobre la secreción de estas hormonas. Dichos estudios tienden fundamentalmente a analizar la participación de las catecolaminas circulantes aunque no se han obtenido resultados claros al respecto (Sección 1.4.3). Por otra parte, los

experimentos efectuados para evaluar la presencia de una posible función moduladora de las catecolaminas neuronales sobre la secreción de PTH y CT son escasos (Secciones 1.4.1.C - D y 1.4.2.C - D), utilizan técnicas de estimulación o deprivación neuronal no específicas para la zona en estudio y/o además perturban la homeostasis global de los animales en experimentación.

Uno de los objetivos centrales de este Trabajo de Tesis ha sido determinar el rol que juega la inervación simpática local sobre la secreción de PTH y CT. En la Sección 1.3.2.A se ha descrito que las células paratiroides y C-tiroideas reciben inervación simpática proveniente de fibras que transitan el GCS, sugiriendo que las catecolaminas neuronales liberadas pueden ejercer un rol modulador sobre la secreción de ambas hormonas. En esta Tesis hemos examinado esta cuestión utilizando por primera vez para tal fin ratas deprivadas específicamente de la inervación simpática que reciben la paratiroides y las células C-tiroideas mediante ablación quirúrgica del GCS. Como se describe en la Sección 1.3.3, después de esta operación sobreviene un período de degeneración neuronal caracterizado por una liberación supraliminal temporal de NE capaz de activar los adrenoreceptores de los diversos órganos inervados y reproducir la actividad del nervio intacto (140). En consecuencia, para establecer el rol fisiológico que juega la inervación simpática que reciben tiroides y paratiroides, provista por fibras provenientes del GCS, hemos utilizado un modelo experimental que permite valorar después de GCSx la respuesta funcional de estas estructuras: 1- a la estimulación simpática por liberación de neurotransmisores durante la degeneración neuronal y 2- a la deprivación neuronal que sobreviene a la GCSx.

El objetivo de la primera etapa fué determinar si la secreción basal de estas hormonas era modificada por el estado funcional de la inervación simpática. En el punto 3.1 (Tablas I y II, Fig. 7) se demostró que la presencia o ausencia local de neurotransmisores liberados por las terminales del GCS, no afecta la secreción basal de CT y PTH si no se modifica la condición normocalcémica de los animales. Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por otros autores en condiciones experimentales que no incluyeron estimulación de la secreción de PTH o CT. En efecto, la supresión de catecolaminas circulantes en ratas, efectuada por adrenalectomía o por simpatectomía química inducida por inyección de 6-hidroxi dopamina, no modifica los niveles séricos de calcio, PTH y CT (164,165). Asimismo, Heath y col (168) encuentran que la estimulación eléctrica de los nervios simpáticos cervicales en perros normocalcémicos no produce cambios en la PTH circulante, que tampoco se modifica después de la estimulación química de la liberación de NE de las terminales nerviosas por inyección de tiramina (168). En contraposición con nuestros resultados, Vora y col (167) describen un pequeño incremento de los niveles séricos de PTH en ratas (menos de un 30%) cuando se aplica estimulación eléctrica en el tronco vagosimpático. Sin embargo el período de estimulación fué muy prolongado (1 h) pudiendo afectar la respiración y modificar el calcio iónico (147).

En relación a la CT y también en coincidencia con nuestros resultados, se ha encontrado que la estimulación de liberación de NE mediante la inyección de tiramina en ratas normocalcémicas no modifica los niveles séricos de esta hormona (147).

En consecuencia, nuestros datos y la mayoría de los de la literatura no avalan una función primaria de los terminales simpáticos C-tiroideos y paratiroides en la regulación de los niveles basales (en condiciones normocalcémicas) de PTH o CT. Fué por lo tanto de interés evaluar si la respuesta secretora de ambas hormonas era afectada por la manipulación quirúrgica de dicha vía simpática.

Los experimentos resumidos en el punto 3.2 se diseñaron para analizar el rol regulador que juegan las catecolaminas que se liberan después de GCSx, durante el proceso de degeneración walleriana, sobre la respuesta secretora de la paratiroides y las células C-tiroideas previamente estimulada mediante la inducción de hipo e hipercalcemia respectivamente. Nuestros resultados indican que durante este proceso, caracterizado por un incremento de la actividad postsináptica debido a la liberación aumentada de NE, se presenta una depresión de la respuesta funcional de la paratiroides y células C-tiroideas cuando ocurren cambios en los niveles séricos de calcio. En efecto, la Fig. 11 muestra que, a pesar de la severa hipocalcemia inducida por el EDTA, las ratas bajo GCSx aguda presentan niveles de PTH sérica significativamente deprimidos en relación a los animales controles. Asimismo, después de la administración de Cl_2Ca los animales GCSx presentan tanto una disminución de la máxima liberación de CT como una demora en alcanzar la misma (Fig. 15 A).

Si bien la GCSx aguda deprimió totalmente la secreción estimulada de PTH, en el caso de la CT esta inhibición fué solo parcial indicando una posible sensibilidad diferencial de las células C y las células paratiroides ante cambios en la actividad neural. Un experimento pos-

terior en el que se utilizó un modelo experimental donde los animales fueron simultáneamente hemiptx y GCSx contralateralmente 15 h antes de comenzar el experimento, permitió analizar el rol que juega la inervación simpática local sobre la secreción de PTH cuando el estímulo hipocalcémico (provocado por la hemiptx) es de origen endógeno. Como se observa en la Fig. 22, durante la degeneración neuronal ocurre una depresión temprana en la secreción de PTH y en los niveles circulantes de calcio que no se presenta en los animales controles. En consecuencia, cuando la hipocalcemia es provocada por la hemiptx, la estimulación simpática inducida por GCSx aguda también provoca un deterioro en la respuesta de la paratiroides.

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que la inervación simpática periférica ejerce un rol modulador negativo sobre el control de las funciones de las células C-tiroideas y paratiroides.

Una de las características que definen a los procesos modulatorios neurales es su posible reversión o desaparición cuando se modifican las condiciones funcionales del vínculo principal. Nos pareció de interés examinar si un mayor estímulo podía revertir la depresión de la secreción de PTH o CT durante la degeneración walleriana de los terminales simpáticos. En el caso de la PTH se utilizó una dosis doble de EDTA administrada a los mismos intervalos de tiempo que los descritos para las dosis menores. De 7 animales GCSx inyectados con doble dosis de EDTA solo sobrevivieron 3. Sin embargo, como se observa en la Fig. 12, estas ratas presentaron un incremento significativo de la PTH sérica paralelamente a un suave aumento de la hipocalcemia. En el caso de la CT se utilizó una inyección adicional de Cl_2Ca . La Fig. 16 indica

que después de esta última aplicación a ratas con GCSx aguda, los niveles séricos de CT se recuperan hasta alcanzar valores normales. Este incremento fué simultáneo a una elevación aún mayor de la calcemia.

Se concluye que la inhibición de la respuesta de las células paratiroides y C-tiroideas inducida por transmisores adrenérgicos, puede revertirse mediante la aplicación de estímulos apropiados. Estos resultados son compatibles con el ya mencionado rol modulador de la NE sobre la liberación de PTH y CT.

Nuestros datos (Fig. 15 B) muestran también que una vez completada la degeneración neuronal (28 h después de la GCSx, cuando la NE liberada desaparece del medio circundante) cesa la depresión de la secreción estimulada de CT. Asimismo, en la Fig. 22 se observa que los animales hemiPTx, cuyos niveles séricos de PTH están deprimidos durante la degeneración walleriana, alcanzan valores similares al grupo control sin GCSx después de transcurridas 24 - 48 h. Se concluye que, en ausencia reciente de estimulación simpática, se restablece la respuesta normal de la paratiroides y células C-tiroideas a sus estímulos específicos.

Se pueden intentar varias interpretaciones para explicar la depresión de la respuesta normal de paratiroides y células C-tiroideas durante la degeneración neuronal que sigue a la GCSx:

- 1- Existe información sobre la existencia de receptores adrenérgicos farmacológicamente revelables en las células C-tiroideas y paratiroides (Sección 1.4). En consecuencia el efecto de la NE sobre la secreción de PTH y CT podría ejercerse por estimulación de tales receptores α y/o β .

- 2- La pared vascular es también un sitio de alta concentración de adrenorreceptores α y β adrenérgicos (123,138). Se ha encontrado además que la liberación endógena de NE que ocurre temporalmente durante la degeneración walleriana provoca una disminución en el flujo de sangre que llega a la tiroides, estimado por Rb^{86} (138). En consecuencia podría postularse que los cambios en la secreción de PTH y CT mediados por la NE serían secundarios a estos cambios vasculares.
- 3- La ablación del GCS, además de la denervación de las glándulas tiroides y paratiroides, provoca denervación de las glándulas salivares y pineal, estructuras oculares, cuerpo carotideo y denervación simpática periférica de la hipófisis o el hipotálamo basal (122,123) los que aisladamente o en conjunto podrían teóricamente afectar la homeostasis del calcio.

La posibilidad 3 es remota ya que no se ha descrito participación fundamental de otros sistemas neuroendocrinos en la regulación del metabolismo del calcio, al menos compatible con la dramática disminución de la respuesta que hemos encontrado. En relación a las posibilidades 1 y 2 no estamos en condiciones de discriminar entre ellas en el momento actual, aunque es probable que los cambios descritos se deban tanto a efectos directos como vasculares locales de los neurotransmisores. En todo caso, los presentes resultados avalan la existencia de una efectiva modulación neural de la respuesta endócrina de las células C-tiroideas y paratiroides.

La siguiente serie de experimentos (Sección 3.3) fué realizada para identificar los adrenorreceptores que participan en la modulación neural de la secreción de PTH y CT y para estudiar su modo de acción. Con este objeto

se inyectaron antagonistas α y/o β adrenérgicos, aplicados durante el proceso de degeneración walleriana. La administración de estos agentes descubrió varios mecanismos relativos al origen de la inhibición de la liberación de PTH y CT provocada por la inervación simpática local.

En efecto, el antagonista α adrenoceptor fentolamina incrementó los niveles circulantes de PTH que se encontraban deprimidos en las ratas con CGSx durante la administración de EDTA (Fig. 18). Estos resultados indican que el bloqueo de los sitios α adrenoceptores provoca una restauración parcial de la capacidad de respuesta de las células paratiroides ante un estímulo hipocalcémico, y concuerdan con observaciones previas referidas a la acción de las catecolaminas circulantes que indican que en vacunos (159) y humanos (160) la secreción de PTH es inhibida por la inyección sistémica de agentes α adrenérgicos.

Asimismo, el bloqueo de adrenoceptores α inducido por dosis apropiadas de fenoxibenzamina (169) incrementó tanto la CT basal (dosis elevadas) (Fig. 20) como la CT liberada por estimulación hipocalcémica (dosis altas y mínimas del compuesto) (Fig. 20 y 21). Nuestros resultados concuerdan con los trabajos de Vora y col (177) quienes encuentran en humanos que una infusión de fentolamina incrementa la CT sérica alrededor de un 32 %. Williams y col describen también en el hombre (160), que la administración del agonista α metoxamina disminuye la CT sérica y que este efecto es anulado por la fentolamina.

Los resultados descriptos hasta este punto sugieren que la NE resultante de la liberación por destrucción de los terminales simpáticos interactúa con adrenoceptores α de las células C y de la paratiroides para inhibir su respuesta normal.

Cuando en un diseño experimental semejante al utilizado para bloqueantes α , se utilizó el bloqueante β adrenérgico propranolol, los resultados fueron mas dificultosos para analizar. En el caso de la CT, la inyección de dosis de propranolol comunmente utilizadas para bloquear adrenoceptores β (116) no modifica la liberación basal o estimulada de esta hormona en ratas GCSx, según muestra la Fig. 20. Este hecho podría ser tomado como indicador de la ausencia de participación significativa de los adrenoceptores β en la liberación de CT durante la degeneración neuronal. Sin embargo, cuando el propranolol y la fenoxibenzamina se administran juntos, se deprime el incremento de la liberación basal y estimulada de CT que fuera provocado por la fenoxibenzamina (Fig. 20).

Para explicar estos resultados resulta útil analizar previamente la bibliografía publicada al respecto. Se ha sugerido que las catecolaminas pueden modificar la liberación de CT de las células C-tiroideas "in vitro", e "in vivo" en el caso de las aminas biógenas circulantes (147). La epinefrina, que es una catecolamina que muestra mayor actividad sobre los adrenoceptores β que sobre los α (116) incrementa la liberación de CT si se agrega a cultivos de tiroides porcina (169) o si se inyecta sistemáticamente en carneros (173). Tal incremento existe a pesar de la depresión concomitante del flujo sanguíneo que irriga la tiroides (173). En este caso, el efecto de la epinefrina sobre la CT también es inhibido por el bloqueante adrenérgico β propranolol. Por otra parte, la NE, que es un agonista mixto α - β aunque con mayor actividad sobre los adrenoceptores α (116) puede inhibir la liberación de CT en cerdos y vacunos (175,176,195). Esta inhibición de la liberación de CT por las catecolaminas cir-

culantes, también se ha encontrado en el hombre (74,175).

En consecuencia, en el caso de la CT, nuestros resultados concuerdan con estudios farmacológicos previos que indican que las catecolaminas circulantes afectan su liberación por acción sobre los adrenoreceptores α inhibitorios y β estimulatorios (147,174,175,177,178,195). La comparación de la actividad de la fenoxibenzamina y el propanolol indica la existencia de un estímulo β adrenoreceptor menor sobre la liberación de CT, solo revelado cuando se bloquea la inhibición predominante α adrenérgica. Lo antedicho concuerda también con el hecho de que la NE despliega mayor actividad sobre los adrenoreceptores α que sobre los β .

En el experimento en el que se estimuló la secreción de PTH con EDTA, comenzando 4 h 30 min después de la inyección de propanolol, se observó un efecto hipercalcémico de esta droga (revelado por los elevados niveles basales de calcio) (Fig. 17). Esta situación, compatible con datos de la literatura en humanos (196) complicó el análisis ulterior del efecto estimulatorio del EDTA sobre la secreción de PTH. La Fig. 18 muestra que el propanolol incrementó la respuesta de la paratiroides a la hipocalcemia. Si bien estos resultados concuerdan con los experimentos de Christensen y col (197), quienes encuentran que en el hombre el propanolol bloquea el efecto depresor del isoproterenol sobre la secreción de PTH, la mayor parte de la literatura publicada hasta el momento no respalda estos resultados. En efecto, se ha encontrado que los agonistas β adrenérgicos, que incrementan la síntesis de AMPc, elevan la secreción de PTH "in vitro" (149,154,155,198). Al menos en lo que respecta al rol de las catecolaminas circulantes, también los estudios

realizados "in vivo" indican una acción estimulante de los aceptores β : El agonista β adrenérgico isoproterenol aumenta la liberación de PTH en ratas intactas (158), ganado (157,161,199) y humanos (196). La administración de propranolol disminuye la PTH sérica en vacunos (157), ratas (158) y en el hombre (196). Por otra parte, otros autores no encuentran efecto del propranolol sobre la secreción de PTH estimulada por hipocalcemia en la rata (200).

Es sabido que el propranolol tiene varios efectos tóxicos no relacionados con el bloqueo de adrenoreceptores β , que incluyen perturbaciones de la membrana lipídica y modificaciones en el transporte de calcio (116,201-204) así como el ya mencionado efecto hipercalcémico (196). La prolongada exposición al propranolol de los animales GCSx tratados con EDTA (4 h 30 min) pudo facilitar la manifestación de estos efectos tóxicos que no se observaron en los experimentos restantes en los que el propranolol fué administrado 30 min antes de la toma de las muestras de sangre. Tampoco se descarta una posible interacción química entre el EDTA y el propranolol que modifique sus efectos biológicos.

En conclusión, los resultados hasta aquí presentados indican que cuando se activan los nervios simpáticos que transitan por el GCSx y que inervan las células C-tiroideas y la paratiroides, se produce una modificación significativa de la respuesta homeostática de la CT y la PTH. La NE liberada reacciona con adrenoreceptores α inhibidores en las células de la paratiroides y C-tiroideas y con receptores β estimulatorios en estas últimas, predominando el primero de estos efectos. La posible función de los adrenoreceptores β en las células paratiroides es incierta a partir de nuestra experiencia.

Una vez establecido el rol modulador negativo que juega la inervación simpática sobre la función paratiroides y considerando los antecedentes que demuestran que el desarrollo de hipertrofia compensadora de la tiroides se ve afectado por la supresión quirúrgica del GCS (Sección 1.3.3) nos interesó estudiar simultáneamente la existencia de compensación funcional y/o anatómica de la paratiroides remanente después de hemiPTx y la posible participación del sistema simpático en este fenómeno. Como se ha mencionado en la Introducción (Sección 1.1.2.A), los datos de la literatura, en su mayoría estudios clínicos post quirúrgicos, son contradictorios en relación a la ocurrencia de hipertrofia compensadora después de paratiroidectomía parcial. En el punto 3.4 se describen los estudios que hemos realizado para aclarar estas cuestiones, utilizando animales hemiPTx sometidos a GCSx o a operación simulada.

En las ratas hemiPTx, los niveles séricos de calcio, determinados 3 - 14 días después de la cirugía (Fig. 23) y de PTH, 3 días después (Fig. 22) se mantuvieron significativamente disminuídos respecto a los valores basales prequirúrgicos, sin demostrar compensación. Tampoco se registraron alteraciones morfológicas ni aumentos en el índice mitótico de la paratiroides remanente (Tabla III). Pavlov (11), en el único estudio experimental publicado hasta el momento, observó compensación histológica de la paratiroides remanente en ratas hemiPTx. Los niveles circulantes de calcio disminuyeron moderadamente 2-3 días después de la operación retornando al valor basal al cuarto día del experimento. Sin embargo, en este trabajo el análisis de la compensación funcional no es completo ya que los autores no determinaron niveles circulantes de PTH .

Nuestros estudios no avalan el desarrollo de hipertrofia compensadora después de hemiPTx en la rata, como lo indican la valoración de los niveles séricos de calcio y PTH, los estudios de la morfología celular paratiroidea y la determinación del índice mitótico.

Mas arriba hemos discutido las alteraciones inducidas por GCSx aguda en la respuesta funcional de la paratiroides. Los resultados descritos en el punto 3.4 muestran que la denervación simpática local crónica no modifica la respuesta funcional de la paratiroides remanente en presencia de un estímulo hipocalcémico endógeno provocado por la hemiPTx. En efecto, los niveles séricos de PTH y calcio en ratas simultaneamente GCSx y hemiPTx, estudiados respectivamente 3 y 3 - 14 días después de la operación, no difieren de los controles hemiPTx (Fig. 22 y 23). Coincidentemente con estos resultados, aunque en condiciones experimentales menos específicas, Heath (164) encontró que la deprivación total crónica de catecolaminas provocada por la administración de 6 hidroxidopamina, no alteró las concentraciones séricas de calcio ni la respuesta homeostática de la paratiroides en la rata.

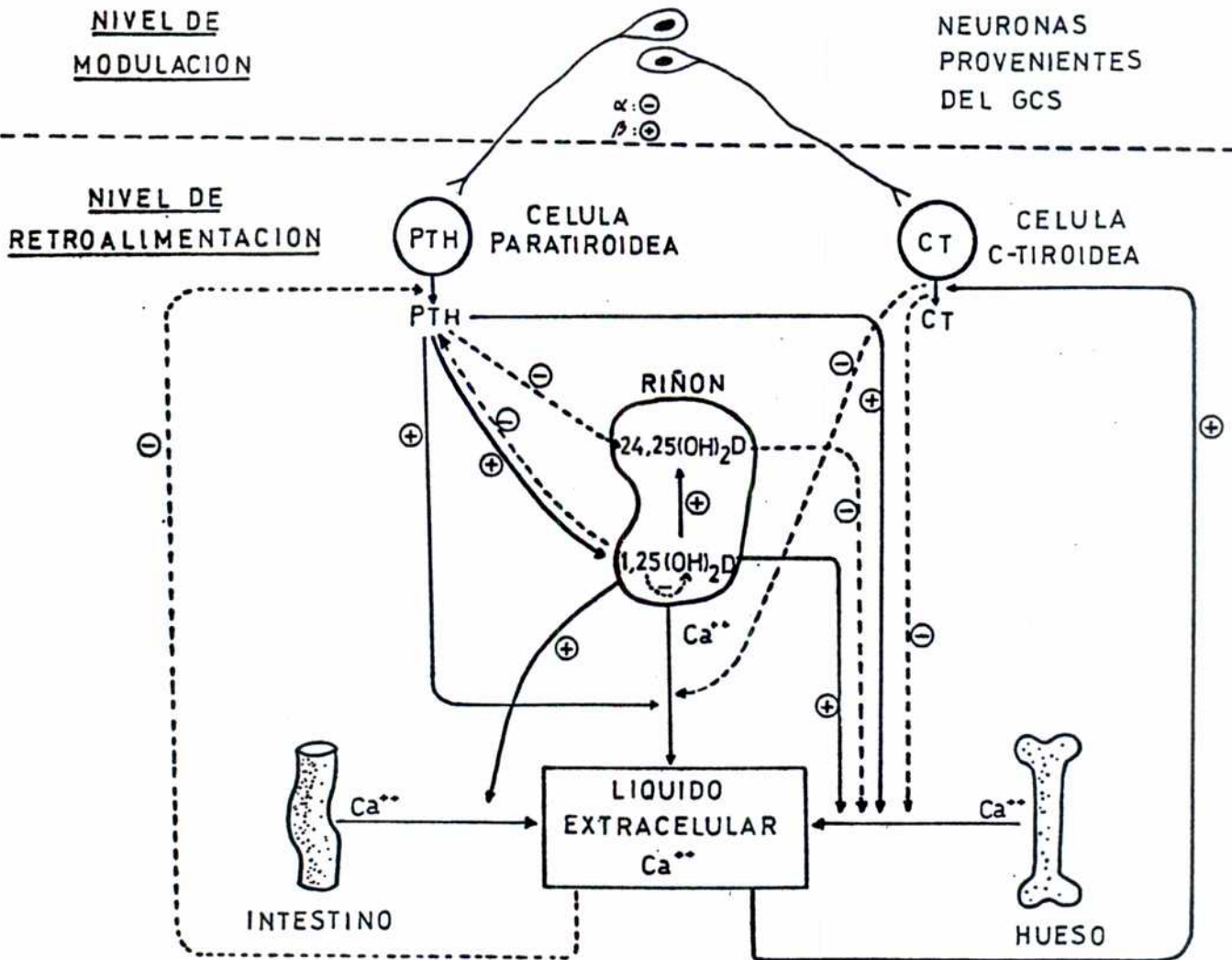
Una vez establecido que el rol modulador del GCS sobre la secreción estimulada de PTH es compensado en animales cronicamente GCSx, nos interesó estudiar si este fenómeno también se registra en relación a la secreción de CT. Los resultados se muestran en el punto 3.5 e indican que, coincidentemente con las observaciones efectuadas para PTH, no se modifican los niveles séricos de calcio y CT durante GCSx crónica (Fig. 25, Tabla IV). La aplicación de un estímulo hipercalcemiante elevó significativamente ambos parámetros tanto en animales GCSx como con operación simulada aunque no hubo diferencias entre

ellos (Fig. 25). De acuerdo con nuestros resultados se ha descrito que la depleción de catecolaminas circulantes por adrenalectomía no modifica la respuesta basal de las células C-tiroideas ni su respuesta a la hipercalcemia. Asimismo, la simpatectomía total química no modifica la respuesta al calcio (164) ni la CT basal (165).

Se concluye que el GCS ejerce un rol modulador sobre la respuesta homeostática de las células C-tiroideas y paratiroideas que es sin embargo compensado en ausencia crónica del mismo. En que medida la inervación colinérgica (proveniente del nervio laríngeo superior) o peptidérgica (205) median esta compensación es un tema de interés para futuras investigaciones.

Los resultados descritos en esta Tesis permiten completar el cuadro que muestra la regulación hormonal del metabolismo del calcio presentado en la Fig. 3 de la Introducción. En efecto, según se muestra en la Fig. 26 hemos presentado evidencias que demuestran que la respuesta funcional de las células paratiroideas y C-tiroideas a sus estímulos específicos también está modulada por neuronas simpáticas que provienen del GCS. Esta modulación ocurre a través de la interacción de los neurotransmisores liberados con adrenoceptores α inhibitorios (PTH, CT) y secundariamente de tipo β estimulatorio (CT).

FIGURA 26: REGULACION NEURAL DE LA SECRECION DE PTH Y CT



Las neuronas simpáticas que transitan el GCS modulan la respuesta de las células C-tiroideas y paratiroideas a sus estímulos específicos. Esta modulación se ejerce a través de adrenoceptores α inhibitorios (PTH, CT) y secundariamente β de tipo estimulatorio (CT).

Compárese con la Fig. 3.

CONCLUSIONES

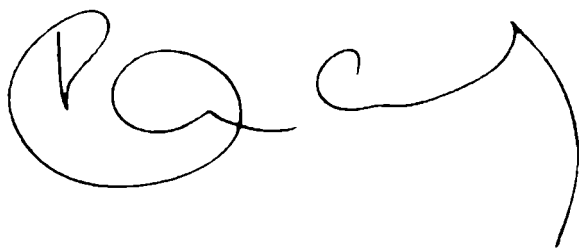
Los trabajos efectuados en esta Tesis estudian el rol que juegan las catecolaminas neuronales en la regulación de la secreción de PTH y CT, utilizando un modelo experimental que incluye manipulación quirúrgica de la inervación simpática local (GCSx), que puede reproducir la actividad del nervio intacto.

Hemos encontrado que:

- 1- Durante el proceso de degeneración neuronal, que involucra un incremento de la actividad postsináptica por liberación incrementada de NE, ocurre un deterioro de la secreción estimulada de PTH y CT.
- 2- Este deterioro puede revertirse mediante la aplicación de estímulos apropiados, avalando la existencia de una modulación neural negativa de la respuesta endocrina de las células paratiroides y C-tiroides.
- 3- La respuesta secretora de las células C-tiroides está regulada por un estímulo inhibitorio α adrenérgico predominante y un estímulo β adrenoreceptor menor, solo revelado cuando se bloquea el efecto α .
- 4- La respuesta secretora de las células paratiroides está regulada por estímulos α inhibitorios.
- 5- No se manifiesta hipertrofia compensadora de la paratiroides.
- 6- El rol modulador que el GCS ejerce sobre la respuesta homeostática de las células C-tiroides y paratiroides es compensado en ausencia crónica del mismo.

Finalmente, la comparación de las Fig. 3 y 26 resume los aportes efectuados en esta Tesis: La Fig. 26

indica que la homeostasis del calcio estaría regulada por dos niveles de acción sobre las células secretoras: 1-Modulación neural por fibras simpáticas provenientes del GCS. 2-Retroalimentación ejercida por factores humo-
rales ya descritos, fundamentalmente agentes iónicos y metabolitos de la vitamina D.



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

- 1- Aurbach G.D, Marx S.J., Spiegel M.M. : Parathyroid hormone, Calcitonin and the Calciferols. En: Text book of Endocrinology. Ed. Wilson and Foster. W.B. Saunders Co., Pag. 1137 (1985)
- 2- Copp D.H. : Endocrine regulation of calcium metabolism. Annu Rev Physiol, 32:61 (1970)
- 3- Phang J.M., Weiss I.W. : Maintenance of calcium homeostasis in human being. En: Aurbach G.D. (Ed). Handbook of physiology, sect 7. American Physiological Society, Washington D.C., 7:157 (1976).
- 4- Berne R.M., Levi M.N. : Regulación endócrina del metabolismo del calcio y del fosfato. En: Fisiología, Capítulo 51. Ed Med Panam Bs As, Pag. 955 (1986)
- 5- Capen C.C., Roth S.L. : Ultrastructural and function relationships of normal and pathologic parathyroid cells. Pathobiol Annu, 3:129 (1973)
- 6- Block M.A., Frame B., Kleerekoper M., Rao D.S. : Surgical management of persistence or recurrence after subtotal parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism. Am J Surg, 138:561 (1979)
- 7- Preinz R.A., Gamvros O.I., Sellu D., Lynn J.A. : Subtotal parathyroidectomy for primary chief cell hyperplasia of the multiple endocrine neoplasia Type 2 syndrome. Ann Surg, 193:26 (1981)
- 8- Bruining H.A., van Houten H., Juttman J.R., Lamberta S. W.S., Birkenhager J.C. : Results of operative treatment of 625 patients with primary hyperparathyroidism. World J Surg, 5:85 (1981)
- 9- Purnell D.C., Scholz D.A., Beahrs O.H. : Hyperparathyroidism due to single gland enlargement: prospective postoperative study. Arch Surg, 112:365 (1977)
- 10- Block M.A. : Primary hyperparathyroidism: The continuing saga of surgical problems. Henry Ford Hop Med J, 30:181 (1982)
- 11- Pavlov A.V. : Compensatory hypertrophy of the rats parathyroid glands. Arkh Anat Cistol Embriol, 85:75 (1983)
- 12- Berman L. : Crystalline substance from the parathyroid gland that influences the calcium content of the blood. Proc Soc Exp Biol Med, 21:465 (1924)

- 13- Brewer H.B., Ronan R. : Bovine parathyroid hormone: amino acid sequence. Proc Natl Acad Sci USA, 67:1862 (1970)
- 14- Keutmann H.T., Sauer M.M., Hendy G.N., O' Riordan J.L.H., Potts Jr.J.T. : Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. Biochemistry, 17:5723 (1978)
- 15- Sauer R.T., Niall H.D., Hogan M.L., Keutmann H.T., O' Riordan J.L.H., Potts Jr.J.T. : The amino acid sequence of porcine parathyroid hormone. Biochemistry, 13:1994 (1974)
- 16- MacGregor R.R., Huang W.Y., Cohn D.V. : Identification of chicken proparathormone: comparison of its amino acid sequence to that of chicken parathormone. (Abstract) Fed Proc, 35:1695 (1976)
- 17- Chu L.L.H., MacGregor R.R., Anast C.S., Hamilton J.W., Cohn D.V. : Studies on the biosynthesis of rat parathyroid hormone and proparathyroid hormone: adaptation of the parathyroid gland to dietary restriction of calcium. Endocrinology, 93:915 (1973)
- 18- Cohn D.V., MacGregor R.R. : The biosynthesis, intracellular processing and secretion of parathormone. Endocr Rev, 2: 1 (1981)
- 19- Tregear G.W., van Rietschoten J., Green E., Keutmann H.T., Niall H.D., Reit B., Parsons J.A., Potts Jr.J.T. : Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity. Endocrinology, 93:1349 (1973)
- 20- Habener J.F. : Regulation of parathyroid hormone secretion and biosynthesis. Ann Rev Physiol, 43:211 (1981)
- 21- Brown E.M. : Parathyroid secretion in vivo and in vitro. Regulation by calcium and other secretagogues. Min Elect Metab, 8:130 (1982)
- 22- Mayer G.P., Keaton J.A., Hurst J.G., Habener J.F. : Effects of plasma calcium concentration on the relative proportion of hormone and carboxyl fragments in parathyroid venous blood. Endocrinology, 104:1778 (1979)
- 23- Hanley D.A., Takatsuki K., Sultan J.M., Schneider A.B., Sherwood L.M. : Direct release of parathyroid hormone fragments from functioning bovine parathyroid glands in vitro. J Clin Invest, 62:1247 (1978)

- 24- Sherwood L.M., Mayer G.P., Ramberg Jr.C.F., Kronfeld D.S., Aurbach G.D., Potts Jr.J.T. : Regulation of parathyroid hormone secretion:proportional control by calcium, lack of effect of phosphate. *Endocrinology*, 83:1043 (1968)
- 25- Blum J.W., Fischer J.A., Schwoerer D., Hunziker W., Binswanger U. : Acute parathyroid hormone response:sensitivity, relationship to hypocalcemia and rapidity. *Endocrinology*, 95:753 (1974)
- 26- Bruce B.R., Anderson Jr.N.C. : Hyperpolarization in mouse parathyroid cells by low calcium. *Am J Physiol*, 236:C15 (1979)
- 27- Morrissey J.J., Cohn D.V. : Secretion and degradation of parathormone as a function of intracellular maturation of hormone pools. *J Cell Biol*, 83:521 (1979)
- 28- Habener J.F., Potts Jr.J.T. : Relative effectiveness of magnesium and calcium on the secretion and biosynthesis of parathyroid hormone in vitro. *Endocrinology*, 98:197 (1976)
- 29- Morrissey J.J., Cohn D.V. : The effects of calcium and magnesium on the secretion of parathormone and parathyroid secretory protein by isolated porcine parathyroid cells. *Endocrinology*, 103:2081 (1978)
- 30- Mayer G.P. : Effect of calcium and magnesium on parathyroid hormone secretion rate in calves. En: Talmage R.V., Owen M., Parsons J.A. (eds) *Calcium Regulating Hormones*. Excerpta Medica, Amsterdam, Pag. 122 (1975)
- 31- Chase L.R., Slatopolsky E. : Secretion and metabolic efficacy of parathyroid hormone in patients with severe hypomagnesemia. *J Clin Endocrinol*, 38:363 (1974)
- 32- Hughes M.R., Haussler M.R. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in parathyroid glands. *J Biol Chem*, 253:1065 (1978)
- 33- Wecksler W.R., Ross F.P., Mason R.S., Posen S., Norman A. W. : Biochemical properties of the 1 25-dihydroxyvitamin D₃ cytoplasmic receptors from human and chick parathyroid glands. *Arch Biochem Biophys*, 201:95 (1980)
- 34- Wecksler W.R., Henry H.L., Norman A.W. : Studies on the mode of action of calciferol. Subcellular localization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in chicken parathyroid glands. *Arch Biochem Biophys*, 183:168 (1977)

- 35- Norman A.W. : 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxy vitamin D₃ : key components of the vitamin D endocrine system. *Contrib Nephrol*, 18:1 (1980)
- 36- Brumbaugh P.F., Hughes M.R., Haussler M.R. : Cytoplasmic and nuclear binding components for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in chick parathyroid gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:4871 (1975)
- 37- Dietel M., Dorn G., Montz R., Altenähr E. : Influence of vitamin D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on parathyroid hormone secretion, adenosine, 3', 5' monophosphate release and ultrastructure of parathyroid glands in organ culture. *Endocrinology*, 105:237 (1979)
- 38- Chertow B.S., Baylink D.J., Wergedal J.E., Su M.H.H., Norman A.W. : Decrease in serum immunoreactive parathyroid hormone in rats and in parathyroid hormone secretion in vitro by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J Clin Invest*, 56:668 (1975)
- 39- Golden P., Greenwalt A., Martin K., Bellowrin-Font E., Mazey R., Klarh S., Slatopolsky E. : Lack of a direct effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on parathyroid hormone secretion by normal bovine parathyroid glands. *Endocrinology*, 107:602 (1980)
- 40- Martin K.J., Hruska K.A., Freitag J.J., Klarh S., Slatopolsky E. : The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N Engl J Med*, 301:1092 (1979)
- 41- Berson S.A., Yalow R.S. : Immunochemical heterogeneity of parathyroid hormone in plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 28:1037 (1968)
- 42- Segre G.F., Habener J.F., Powell D., Tregear G.W., Potts Jr J.T. : Parathyroid hormone in human plasma. Immunochemical characterization and biological implications. *J Clin Invest*, 51:3163 (1972)
- 43- Klarh S., Peck W.A. : Cyclic nucleotides in bone and mineral metabolism. II. Cyclic nucleotides and the renal regulation of mineral metabolism. *Adv Cyc Nucl Res*, 13: 133 (1980)
- 44- Chambers D.J., Schafer D.H., Laugham J.A.Jr., et al. : Dose-related activation by PTH of specific enzymes in various regions of the kidney. *Ed* : Copp D.H., Talmage R.V., eds. *Endocrinology of Calcium Metabolism*. Amsterdam Excerpta Medica, Pag. 216 (1978)

- 45- Peck W.A., Klahr S. : Cyclic nucleotides in bone and mineral metabolism. *Adv Cyclic Nucl Res*, 11:89 (1979)
- 46- Livesey S.A., Kemp B.E., Re C.A., et al. : Selective hormonal activation of cyclic AMP-dependent protein kinase isoenzymes in normal and malignant osteoblasts. *J Biol Chem*, 257:14983 (1982)
- 47- Mautalen C. : Regulación hormonal del metabolismo mineral: hormona paratiroidea, calcitonina y vitamina D. En *Endocrinología molecular*. Ricardo S. Calandra, Alejandro de Nicola. Ed El Ateneo, Pag. 137 (1985)
- 48- Rasmussen H., Bordier Ph. : The physiological and cellular basis of metabolic bone diseases. Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 49- Labarrere C. and Mautalen C. : Parathyroid activity and bone formation. *Metabolism*, 25:135 (1976)
- 50- Tam Ch., Heersche N.M., Jones G., Murray T.M., Rasmussen H. : The effect of vitamin D on bone in vivo. *Endocrinology*, 118:2217 (1986)
- 51- Knox F.G. and Lechene C. : Distal site of action of parathyroid hormone on phosphate reabsorption. *Am J Physiol.*, 229:1556 (1975)
- 52- Chabardes D., Imbert M., Clique A., Montegut M., and Morel F. : PTH sensitive adenyl cyclase activity in different segments of the rabbit nephron. *Pflugers Arch*, 354:229 (1975)
- 53- Puschett J.B., and Sylk D. : Renal tubular effects of physiologic and pharmacologic doses of parathyroid hormone. *Kidney Internat.*, 12:460A (1977)
- 54- Sutton R.A.L., Wong N.L.M., and Dirks J.H. : Effects of parathyroid hormone on sodium and calcium transport in the dog nephron. *Clin Sci Molec Med*, 51:345 (1976)
- 55- Wen S.F. : Micropuncture studies of phosphate transport in the proximal tubule of the dog: The relationship to sodium reabsorption. *J Clin Invest*, 53:143 (1974)
- 56- Arruda J.A.L., Nascimento L., Westenfelder C., Kurtzman N.A. : Effect of parathyroid hormone in urinary acidification. *Am J Physiol*, 232:F429 (1977)

- 57- De Luca H.F. : Metabolism and mechanism of action of vitamin D. En: Peck W.A. ed. Bone and Mineral Research Annual 1. Princeton: Excerpta Medica, Pag. 7 (1983)
- 58- Nemere I., Norman A.W. : Parathyroid hormone stimulates calcium transport in perfused duodena from normal chicks: comparison with the rapid (transcaltachic) effect of 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. Endocrinology, 119:1406 (1986)
- 59- Talmage R.V., Meyer Jr R.A. : Physiological role of parathyroid hormone. En: Aurbach G.D. (ed) Handbook of Physiology, sect 7. American Physiological Society, Washington DC, 7:343 (1976)
- 60- Garabedian M., Holick M.F., DeLuca H.F., Boyle IT. : Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. Proc Natl Acad Sci USA, 69:1673 (1972)
- 61- Wasserman R.H., Taylor A.N. : Gastrointestinal absorption of calcium and phosphorus. En: Aurbach G.D. (ed) Handbook of Physiology, sect 7. American Physiological Society Washington D.C., 7:137 (1976)
- 62- Watts E.G., Copp D.H., and Deftos L.F. : Changes in plasma calcitonin and calcium during the migration of salmon. Endocrinology, 96:214 (1974)
- 63- Grubb S.A., Decker S.A., Taft T.N., Talmage R.V. : Effect of long-term thyroidectomy on post-prandial plasma calcium changes in man. J Endocrinol Invest, 2:75 (1979)
- 64- Rico Lenza H., Hernandez Díaz E.R. : Calcitonina: Aspectos Generales. Rev Ibero Amer Invest Clin, 2:129 (1983)
- 65- Copp D.H., Cameron E.C., Cheney B.A., Davidson A.G.F., Henze K.G. : Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. Endocrinology, 70:638 (1962)
- 66- Hirsch P.F., Gauthier G.F., Munson P.L. : Thyroid hypocalcemic principle and recurrent laryngeal nerve injury as factors affecting the response to parathyroidectomy in rats. Endocrinology, 73:244 (1963)
- 67- McMillan P.J., Hooker W.M., Deftos L.J. : Distribution of calcitonin-containing cells in the human thyroid. Am J Anat, 140:73 (1974)

- 68- Pearse A.G.E., Polak J.M., van Noorden S. : The neural crest origin of the C-cells and their comparative cytochemistry and ultrastructure in the ultimobranchial gland. En: Talmage R.V., Munson P.L., eds. Calcium, parathyroid hormone and thyrocalcitonin. Amsterdam: Excerpta Medica, Pag. 29 (1972)
- 69- Austin L.A., Heath III H. : Calcitonin Physiology and Pathophysiology. New Engl J Med, 304:269 (1981)
- 70- Potts J.T.Jr., Aurbach G.D. : Chemistry of the calcitonins. En: Greep R.O., Astwood E.B. eds. Handbook of Physiology Section 7: Endocrinology (Vol VII. Parathyroid gland). American Physiological Society. Baltimore: William & Wilkins, Pag. 423 (1976)
- 71- Jacobs J.W., Goodman R.H., Chin W.W., et al. : Calcitonin messenger R.N.A. encodes multiple polypeptides in a single precursor. Science, 213:457 (1981)
- 72- Parthermore J.G., Deftos L.J. : The regulation of calcitonin in normal human plasma as assessed by immunoprecipitation and immunoextraction. J Clin Invest, 56:835 (1975)
- 73- Parthemore J.G., Deftos L.J. : Calcitonin secretion in normal human subjects. J Clin Endocrinol Metab, 47:184 (1978)
- 74- Care A.D., Bruce J.B., Boelkins J., Kenny A.D., Conaway H., Anast C.S. : Role of pancreozymin-cholecystokinin and structurally-related peptides as calcitonin secretagogues. Endocrinology, 89:262 (1971)
- 75- Sizemore G.W., Go V.L.W. : Stimulation tests for diagnosis of medullary thyroid carcinoma. Mayo Clin Proc, 50:53 (1975)
- 76- Ross B.A., Cooper C.W., Frelinger A.L., Deftos L.J. : Calcitonin in murine physiology. Acute and chronic fluctuations in biologically active calcitonin. Endocrinology, 103:2180 (1978)
- 77- Heath H., and Sizemore G.W. : Plasma calcitonin in normal man: differences between men and women. J Clin Invest, 60:1135 (1977)
- 78- Deftos L.J., Weisman M.H., Williams G.W., Karpf D.B., Frumar A.M., Davidson B.J., Parthermore J.G., and Judd H.L. : Influence of age and sex on plasma calcitonin in human Beings. N Eng J Med, 302:1351 (1980)

- 79- Samaan N.A., Anderson G.D., Adam-Mayne M.E. : Immuno-reactive calcitonin in the mother, neonate, child and adult. *Am J Obstet Gynecol*, 121:622 (1975)
- 80- Stevenson J.C., Hillyard C.J., MacIntyre I, Cooper H., Whitehead M.I. : A physiological role for calcitonin: protection of the maternal skeleton. *Lancet*, 2:769 (1979)
- 81- Becker D.I., Towerud S.U., Ontjes D.A., Cooper C.W. : Circulating calcitonin in lactating women. *J Endocrinol Invest*, 2:159 (1979)
- 82- Gordin A., Lamberg B.A., Pelkonen R., Almqvist S. : Somatostatin inhibits the pentagastrin-induced release of serum calcitonin in medulary carcinoma of the thyroid. *Clin Endocrinol*, 8:289 (1978)
- 83- Pento J.T., Glick S.M., Kagan A., Gorfein P.C. : The relative influence of calcium, strontium and magnesium on calcitonin secretion in the pig. *Endocrinology*, 94:1176 (1974)
- 84- Huwyler R., Bora W., Ohnhaus E.E., Fischer J.A. : Plasma kinetics and urinary excretion of exogenous human and salmon calcitonin in man. *Am J Physiol*, 236: E15 (1979)
- 85- Ardaillou R. : Kidney and calcitonin. *Nephron*, 15:250 (1975)
- 86- Baylin S.B., Bailey A.L., Hsu T-H., Foster G.V. : Degradation of human calcitonin in human plasma. *Metabolism*, 26:1345 (1977)
- 87- Marx S.J., Woodward C.J., Aurbach G.D. : Calcitonin receptors of kidney and bone. *Science*, 178:999 (1972)
- 88- Murad F., Brewer H.B., Vaughan M. : Effect of thyro-calcitonin on adenosine 3'5' cyclic phosphate formation by rat kidney and bone. *Proc Natn Acad Sci*, 65:446,USA (1970)
- 89- Talmage R.V., Cooper C.W., Toverud S.V. : The physiological significance of calcitonin. *Bone Min Res*, 1: 74 (1983)
- 90- Kallio D.M., Garant P.R., Minrin C. : Evidence for an structural effect of calcitonin on osteoclast in tissue

- culture. En: calcium, parathyroid hormone and calcitonins. Talmage R.V., y Munson P.L. (Ed.) Excerpta medica. Amsterdam Pag. 383 (1972)
- 91- Chambers T.J., Magnus C.J. : Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. J Pathol, 136:27 (1982)
- 92- Gaillard P.J. : Bone culture studies with thyrocalcitonin. Proc K Ned Wet Ser C, 70:309 (1967)
- 93- Wase A.W., Solewski J., Rickes E. y Seidenberg J. : Action of thyrocalcitonin on bone. Nature, 214:388 (1967)
- 94- Baxter E., Frase J.R., Harris G.S., Martin T.J., y Melick R. : Stimulation of glycosoaminoglycan synthesis by thyrocalcitonin preparations. Med J Aust, 1:216 (1968)
- 95- Coop D.H. : Parathyroid hormone and thyrocalcitonin (calcitonin). Excerpta Med Int Cong Ser, 159:25 (1968)
- 96- Toverud S.U., Cooper C.W., y Munson P.L. : Calcium metabolism during lactation: elevated blood levels of calcitonin. Endocrinology, 103:472 (1978)
- 97- Orimo H., Shiraki M., Yamauchi H., y Hiranot T. : Secretion and action of calcitonin in the eel. (Abstract) Sixt Intern Congress Endocrinol Melbourne (1980)
- 98- Olson E.B., De Luca H.F., y Potts J.T. : The effect of calcitonin and parathyroid hormone on calcium transport of isolated intestine. En: Calcium, parathyroid hormone and calcitonins. Talmage R.V. y Munson P.L. (Ed) Excerpta Medica. Amsterdam, Pag. 240 (1972)
- 99- Gray T.K., Bieberdorf F.A., y Fordtran J.S. : Thyrocalcitonin and the jejunal absorptions of calcium, water and electrolytes in normal subjects. J Clin Invest, 52: 3084 (1973)
- 100- Bieberdorf F.A., Gray T.K., Walsh J.H., y Fordtran J.S. : Effect of calcitonin on meal-stimulated gastric acid secretion and serum gastrin concentration. Gastroenterology, 66:343 (1974)
- 101- Dangoumau J., Bussiere C., Noel M., y Balahaud C. : Influence of calcitonin on bile production in the rat. J Pharmacol, 7:69 (1976)
- 102- Korlitz H.R., Drack G.T., Blum A.L. : Effect of calcium

- and calcitonin on gastrin and gastric secretion in cats. Am J Physiol, 225:277 (1973)
- 103- Pavlinav D.M., Lenhard L.W., Parthermonre J.G., y Deftos L.J. : Immunoreactive calcitonin in human cerebrospinal fluid. J Clin Endocrinol Metab, 50:717 (1980)
- 104- Wolfe H.J., De Lellis R.A., O'Briain D.S., y Tashjian A.H. : Immunocytochemical localization of calcitonin-like material in the pituitary gland. (Abstract) Lab Invest, 40:292 (1979)
- 105- Talmage R.V., Grubb S.A., Norimatsu H., VanderWiel C.J. : Evidence for an important physiological role for calcitonin. Proc Natl Acad Sci USA, 77:609 (1980)
- 106- Norman A.W., Roth J., Orci L. : The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone, receptors and biological response (calcium binding proteins). Endocrinol Rev, 3:331 (1982)
- 107- Marx S.J., Liberman U.A., Eil C. : Calciferols: actions and deficiencies in action. Vitamins and Hormones, 40: 235 (1983)
- 108- Wronski T.J., Halloran B.P., Bikle D.D., Globus R.K., Morey-Holton E.R. : Chronic administrations of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Increased bone but impaired mineralization. Endocrinology, 119:2580 (1986)
- 109- Lidor C., Dekel S., Edelstein S. : The metabolism of vitamin D₃ during fracture healing in chicks. Endocrinology, 120:389 (1987)
- 110- Berne R.M., Levi M.N. : En: Fisiología. Capítulo 20. El sistema nervioso autónomo y su control central. Edit Med Panam Bs.As., Pag. 329 (1986)
- 111- Weiner N., Taylor P. : Transmisión neurohumoral: los sistemas nerviosos autónomo y motor somático. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman y Gilman. Ed Med Panamericana Bs.As., Pag. 79 (1986)
- 112- Burnstock G., Hökfelt T., Gerson M.D., Iversen L.I., Kostelitz H.W., Szurszewski J.H. : Non-adrenergic, non-cholinergic autonomic neurotransmission mechanisms. N R P Bull, 17: 379 (1979)
- 113- Changeux J.P. : The acetylcholine receptor: an allosteric membrane protein. Harvey Lect, 75:85 (1981)

- 114- Weiner N. : Multiple factors regulating the release of norepinephrine consequent to nerve stimulation. Fed Proc, 38:2193 (1979)
- 115- Ahlquist R.P. : A study of the adrenotropic receptors. Am J Physiol, 153:586 (1948)
- 116- Weiner N. : Drugs that inhibit adrenergic nerves and block adrenergic receptors. En: Goodman-Gilman, Goodman, Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. Mac Millan New York, Pag. 176 (1980)
- 117- Molinoff P.B., Wolfe B.B., and Weiland G.A. : Quantitative analysis of drug-receptor interactions. II. Determination of the properties of receptor subtypes. Life Sci, 29:427 (1981)
- 118- Iversen L. : Uptake processes for biogenic amines. En: Handbook of Psychopharmacology, Vol 3 (Iversen L.L.: Iversen S.D. and Snyder S.H.: eds.) Plenum Press, New York, Pag. 381 (1975)
- 119- Williams T.F., Black A.C., Chiba T., Jew J. : Interneurons/SIF cells in sympathetic ganglia of various mammals. En: Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells (Coupland R.E., Fujita T., eds.) Amsterdam: Elsevier, Pag. 95 (1976)
- 120- Cardinali D.P., Vacas M.I., Valenti C.E., Solveyra C.G. : Pineal gland and sympathetic cervical ganglia as sites for steroid regulation of photosensitive neuroendocrine pathways. J Steroid Biochem, 11:951 (1979)
- 121- Libet B. : Slow postsynaptic actions in ganglionic functions. En: Integrative Functions of the Autonomic Nervous System (Brooks C. Mc.C., Koizumi K., Sato A., eds.) Tokyo: University of Tokyo Press, Pag. 197 (1979)
- 122- Cardinali D.P., Vacas M.I., Gejman P.V. : The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. J neural Transm, 52:1 (1981)
- 123- Cardinali D.P., Vacas M.I., Gejman P.V., Pisarev M.A., Barontini M., Boado R.J., Juvenal G.J. : The sympathetic superior cervical ganglia as little neuroendocrine brains. Acta physiol latinoam, 33:205 (1983)
- 124- Dolivo M. : Metabolism of mammalian sympathetic ganglia. Fed Proc, 33:1043 (1974)
- 125- Elfvin L.G., Hökfelt T., Goldstein M. : Fluorescence

- microscopical, immunohistochemical and ultrastructural studies on sympathetic ganglia of the guinea pig with special reference to the SIF cells and their catecholamine content. *J Ultrastruct Res*, 51:377 (1975)
- 126- Matthews M.R. : Synaptic and other relationships of small granulo-containing cells (SIF) in sympathetic ganglia. *En: Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells*. Coupland R.E., Fujita T., Eds, Elsevier, Amsterdam, Pag. 131 (1976)
- 127- Melander A., Ericson L.E., Sundler F. : Sympathetic regulations of thyroid hormone secretion. *Life Sci*, 14: 237 (1974)
- 128- Altenahr E. : Electron microscopical evidence for innervation of chief cells in human parathyroid glands. *Experientia*, 27:1077 (1971)
- 129- Norberg A.A., Persson B., Granberg P.O. : Adrenergic innervation of the human parathyroid glands. *Acta Chir Scand*, 141:319 (1975)
- 130- Atwal O.S. : Nerve fibers with perineural epithelial cell covering in the parathyroid gland of the dog. *Abl Vet Med C Anat Histol Embryol*, 8:181 (1979)
- 131- Shoumura S., Iwasaki Y., Ishizaki N., Emura S., Hayashi K., YamaHira T., Shoumura K., Isono H. : Origin of autonomic nerve fibers innervating the parathyroid gland in the rabbit. *Acta Anat (Basel)*, 115:289 (1983)
- 132- Vacas M.I., Keller Sarmiento M.I., Pereyra E.N., Cardinali D.P. : Early changes in cAMP and melatonin levels of rat pineal gland after superior cervical ganglionectomy. *Neuro endocrinol Lett*, 4:267 (1982)
- 133- Ebadi M. : Regulation of the synthesis of melatonin and its significance to neuroendocrinology: *En: Reiter, The pineal gland*. Raven Press, New York, Pag. 1 (1984)
- 134- Nahmod V.E., Balda M.S., Pirola C.J., and Cardinali D.P. : Changes in plasma aldosterone levels and renin activity after bilateral superior cervical ganglionectomy in two strains of rats. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam*, 34: 263 (1984)
- 135- Chiocchio S.R., Cardinali D.P., Vacas M.I., Tramezzani J.H. : Acute superior cervical ganglionectomy depresses the postcastration rise of gonadotropins in male rats. *Brain Res*, 309:354 (1984)

- 136- Cardinali D.P., Boado R.J., Vacas M.I. and Deza S. : Changes in growth hormone and prolactin release after superior cervical ganglionectomy of rats. *Brain Res*, 363:350 (1986)
- 137- Lipinska S., Orłowska-Majdak G.R., Traczyk W.Z. : Oxytocin release from neurohypophysis evoked by preganglionic stimulation of the rat superior cervical ganglion. *Endokrinologie*, 79:385 (1982)
- 138- Cardinali D.P., Pisarev M.A., Barontini M., Juvenal G.J., Boado R.J., Vacas M.I. : Efferent neuroendocrine pathways of sympathetic superior cervical ganglia. Early depression of the pituitary-thyroid axis after ganglionectomy. *Neuroendocrinology*, 35:284 (1982)
- 139- Almgren O., Dahlstrom A., Häggendal J. : Degeneration secretion and noradrenaline disappearance in rat salivary glands following proximal or distal axotomy. *Acta physiol scand*, 98:457 (1976)
- 140- Emmelin N., Trendelenburg U. : Degeneration activity after parasympathetic and sympathetic denervation. *Rev Physiol Biochem exp Pharmacol*, 66:148 (1972)
- 141- Häggendal J. : The disappearance of dopamine- β -hydroxylase from the rat salivary gland after extirpation of the superior cervical ganglion. *J neural Transm*, 48:249 (1980)
- 142- Stefano F.J.E., Perec C.J., Tumilasci O.R. : Changes in neural uptake and metabolism of and sensitivity to norepinephrine during the degeneration secretion in the rat submaxillary gland. *J Pharmac exp Ther*, 191:403 (1974)
- 143- Luchelli-Fortis M.A., Stefano F.J.E., Perec C.J. : Degeneration activity of the pineal gland after sympathetic deervation. *Arch Pharmacol*, 321:298 (1982)
- 144- Pisarev M., Cardinali D.P., Juvenal G.J., Vacas M.I., Barontini M., Boado R.J. : The role of the sympathetic nervous system in the control of the goitrogenic response in the rat. *Endocrinology*, 109:2202 (1981)
- 145- Gardner D.G., Brown E.M., Windeck R., Aurbach G.D. : Prostaglandin E₂ stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and parathyroid hormone release in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 103:577 (1978)
- 146- Gardner D.G., Brown E.M., Windeck R., Aurbach G.D. :

- Prostaglandin F₂ inhibits 3',5'-adenosine monophosphate accumulation and parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 104:1 (1979)
- 147- Heath H. : Biogenic amines and the secretion of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocr Rev*, 1:319 (1980)
- 148- Sherwood L.M., Abe M. : Adrenergic receptors and the release of parathyroid hormone. (Abstract) *J Clin Invest*, 51:88a (1972)
- 149- Williams G.A., Hargis G.K., Bowser E.N., Henderson W.J., Martinez N.J. : Evidence for a role of adenosine 3',5'-monophosphate in parathyroid hormone release. *Endocrinology*, 92:687 (1973)
- 150- Brown E.M., Gardner D.G., Windeck R.A., Hurwitz S., Brennan M.F., Aurbach G.D. : β -adrenergically stimulated adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in and parathyroid hormone release from dispersed human parathyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 48:618 (1979)
- 151- Kukreja S.C., Banerjee P., Ayala G., Bowser E.N., Hargis G.K., Henderson W.J., Williams G.A. : Selective beta₁ receptor mediation of parathyroid hormone secretion. (Abstract) *Clin Res*, 24:363 (1976)
- 152- Kukreja S.C., Banerjee P., Ayala G., Bowser E.N., Hargis G.K., Williams G.A. : Further evidence for selective beta₁ adrenergic mediation of parathyroid hormone secretion. (Abstract) *Clin Res*, 24:528 (1976)
- 153- Brown E.M., Hurwitz S., Woodard C.J., Aurbach G.D. : Direct identification of beta-adrenergic receptors on isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 100:1703 (1977)
- 154- Brown E.M., Hurwitz S., Aurbach G.D. : Beta-adrenergic stimulation of cAMP content and parathyroid hormone release from isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 100:1696 (1977)
- 155- Brown E.M., Carroll R.J., Aurbach G.D. : Dopaminergic stimulation of cyclic AMP accumulation and parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:4210 (1977)
- 156- Hanley D.A., Takatsuki K., Birnbaumer M.E., Schneider A.B., Sherwood L.M. : In vitro perfusion for the study of parathyroid hormone secretion: effects of extracellular calcium

- concentration and beta-adrenergic regulation on bovine parathyroid hormone secretion in vitro. *Calcif Tissue Int*, 32:19 (1980)
- 157- Fischer J.A., Blum J.W., Binswanger U. : Acute parathyroid hormone response to epinephrine in vivo. *J Clin Invest*, 52:2434 (1973)
- 158- Kukreja S.C., Johnson P.A., Ayala G., Banerjee P., Bowser E.N., Hargis G.K., Williams G.A. : Role of calcium and beta-adrenergic system in control of parathyroid hormone secretion. *Proc Soc Exp Biol Med*, 151:326 (1976)
- 159- Blum J.W., Guillebeau A., Binswanger U., Kunz P., DaPrada M., Fischer J.A. : Effects of alpha adrenergic stimulation and blockade on plasma parathyroid hormone concentration in cows. *Acta endocr Copenh*, 88:535 (1978)
- 160- Williams G.A., Vora N.M., Kukreja S.C., Hargis G.K., Bowser E.N., Jackson B.L., Kawahara W.J., Johnson B.L., Longley R.S. : Role of alpha-adrenergic system in control of parathyroid hormone and calcitonin secretion in man. (Abstract) *Clin Res*, 26:722A (1978)
- 161- Blum J.W., Fischer J.A., Hunziker W.H., Binswanger U., Picotti G.B., DaPrada M., Guillebeau A. : Parathyroid hormone responses to catecholamines and to changes of extracellular calcium in cows. *J Clin Invest*, 61:1113 (1978)
- 162- Epstein S., Heath III H., Bell N.H. : Lack of influence of isoproterenol, propranolol, and dopamine on immunoreactive parathyroid hormone and calcitonin in normal man. *Calcif Tissue Int*, 35:32 (1983)
- 163- Body J.J., Cryer P.E., Offord K.P., Heath III H. : Epinephrine is a hypophosphatemic hormone in man. Physiological effects of circulating epinephrine on plasma calcium, magnesium, phosphorus, parathyroid hormone, and calcitonin. *J Clin Invest*, 71:572 (1983)
- 164- Heath H. : Provocative tests of parathyroid and C cell function in adrenalectomized and chemically sympathectomized rats. *Endocrinology*, 107:977 (1980)
- 165- Vora N.M., Kukreja S.C., Browser E.N., Johnson P.A., Hargis G.K., Williams G.A. : Role of endogenous adrenergic tone in parathyroid hormone and calcitonin release (Abstract) *Clin Res*, 26:685 (1978)

- 166- Norberg K.A., Persson B., Granberg P.O. : Adrenergic innervation of the human parathyroid glands. Acta Chim Scand, 141:319 (1975)
- 167- Vora N.M., Bowser E.N., Hargis G.K., Johnson P.A., Kukreja S.C., Williams G.A. : Effect of cervical sympathetic stimulation on parathyroid hormone secretion in the rat. (Abstract) Clin Res, 28:409 (1980)
- 168- Heath III H., Fox J., Fryer M., Laakso K. : Electrical and chemical stimulations of cervical sympathetic nerves in the dog does not affect secretion of parathyroid hormone. Endocrinology, 116:1497 (1985)
- 169- Bell N.H. : Further studies on the regulation of calcitonin release in vitro. Hormone Metabol Res, 7:77 (1975)
- 170- Cooper C.W., Ramp W.K., Becker D.J., Ontyer D.A. : In vitro secretions of immunoreactive hot thyrocalcitonin. Endocrinology, 101:304 (1977)
- 171- Boorman G.A., Hollander C.F. : Animal model of human disease: medullary carcinoma of the thyroid in the rat. Am J Pathol, 83:237 (1976)
- 172- Bates R.F.L., Bruce J.B., Care A.D. : The effect of catecholamines on calcitonin secretion in the pig. J Endocrinol , 46:xi (1970)
- 173- Philippo M., Bruce J.B., Lawrence C.B. : The effect of adrenaline on calcitonin secretion in conscious sheep (Abstract). J Endocrinol , 46:viii (1970)
- 174- Avioli L.V., Shieber W., Kipnis D.M. : Role of glucagon and adrenergic receptors in thyrocalcitonin release in the dog. Endocrinology, 88: 1337 (1971)
- 175- Care A.D., Bates R.F.L., Gitelman H.J. : Evidence for a role of cyclic AMP in the release of calcitonin. Ann N Y Acad Sci , 185:117 (1971)
- 176- Fischer J.A., Blum J.W., Binswanger U. : Epinephrine and the regulation of parathyroid hormone and calcitonin secretion in vivo (Abstract). Clin Res, 21:623 (1973)
- 177- Vora N.M., Williams G.A., Hargis G.K., Bowser E.N., Kawahara W., Jackson B.L., Henderson W.J., Kukreja S.C. : Comparative effect of calcium and of the adrenergic system on calcitonin secretion in man. J Clin Endocr Metab , 46:567 (1978)

- 178- Metz S.A., Deftos L.J., Baylink D.G., Robertson R.P. : Neuroendocrine modulation of calcitonin and parathyroid hormone in man. *J Clin Endocr Metab* , 47:151 (1978)
- 179- Harney A.N., Kukreja S.C., Hargis G.K., Johnson P.A., Bowser E.N., Williams G.A. : Effect of long-term administration of epinephrine and propranolol on serum calcium parathyroid hormone and calcitonin in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, 159:266 (1978)
- 180- Zileli M.S., Gedik O. : Influence of reserpine on high calcium perfusion of thyroparathyroid glands of dogs. *Endocrinology*, 98:176 (1976)
- 181- Brown E.M., Gardner D.G., Windeck R.A., Aurbach G.D. : Relationship of intracellular 3',5'-adenosine monophosphate accumulation to parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 103:2323 (1978)
- 182- Ziegler R., Delling G., Pfeiffer E.F. : The secretion of calcitonin by the perfused ultimobranchial gland of the hen. *En: Calcitonin. Proceedings of the Second International Symposium. William Heineman Ltd. London, Pag. 301 (1969)*
- 183- Bell N.H. : The effects of glucagon, dibutyryl cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and theophylline on calcitonin secretion "in vitro". *J Clin Invest*, 49:1368 (1970)
- 184- Pantzer E., Queener S.F., Bell N.H. : Characterization of a GTP-responsive adenylate cyclase system in a transplantable medullary carcinoma of the rat. (Abstract) *Clin Res*, 26:721 (1978)
- 185- Brown E.M., Hurwitz S.H., Aurbach G.D. : α -adrenergic inhibition of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 103:893 (1978)
- 186- Gardner D.G., Brown E.M., Aurbach G.D. : Inhibition of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and parathyroid hormone release by sodium nitroprusside. *Endocrinology*, 105:360 (1979)
- 187- Lorenzo L.E., y Drappo G.A. : Reevaluación y experiencia con nuestros métodos colorimétricos para la determinación de calcio y fosfato en líquidos biológicos al cabo de 10 años de uso continuado. *Primer Congreso Argentino de Osteología y Metabolismo mineral. Rosario (1984)*

- 188- Trudeau D.L., Freier E.F. : Determination of calcium in urine and serum by atomic absorption spectrophotometry (AAS) Clin Chem, 13:101 (1967)
- 189- Ross B.A., Lindall A.W., Aron D.C., Orf J.W., Yoon M., Huber M.B., Pensky J., Ellis J., Lambert P.W. : Detection and characterization of small midregion parathyroid hormone fragment (s) in normal and hyperparathyroid glands and sera by immunoextraction and region specific radioimmunoassay. J Clin Endocr Metab, 53:709 (1981)
- 190- Arnaud C.D., Tsao H.S., and T.Littledike T. : Radioimmunoassay of human parathyroid hormone in serum. J Clin Invest, 50:21 (1971)
- 191- Hruska K.A., Kopelman R., Rutherford W.E., Klahr S., and Slatopolsky E. : Metabolism of immunoreactive parathyroid hormone in the dog. J Clin Invest, 56:39 (1975)
- 192- Chanard J., Black R., Purkerson M., Lewis J., Klahr S., Slatopolsky E. : The effects of colchicine and vinblastine on parathyroid hormone secretion in the rat. Endocrinology, 101:1792 (1977)
- 193- Rosenblatt M. : Structure-activity relations in the calcium regulating peptide hormones: En: Parsons, Endocrinology of calcium metabolism. Raven Press, New York, Pag. 103 (1982)
- 194- Snedecor G.W., Cochran W.G. : Statistical methods, 6th ed Iowa University Press, Ames (1967)
- 195- Brown E.M., Aurbach G.A. : Role of cyclic nucleotides in secretory mechanisms and actions of parathyroid hormone and calcitonin. Vitams Horm, 38:205 (1980)
- 196- Kukreja S.C., Hargis G.K., Bowser E.N., Henderson W.J., Fisherman E.W., Williams G.A. : Role of adrenergic stimuli in parathyroid hormone secretion in man. J Clin Endocrinol Metab, 40:478 (1975)
- 197- Christensen M.S., Brandsborg O., Christensen N.J. : Inhibition of parathyroid hormone secretion by isoproterenol. Adv Exp Med Biol, 81:363 (1977)
- 198- Brown E.M., Thatcher J.G. : cAMP-dependent protein kinase and the regulation of parathyroid hormone release by divalent cations and agents elevating cellular cAMP in dispersed bovine parathyroid cells. Endocrinology, 110:1374 (1982)

- 199- Blum J.W., Kunz P., Fischer J.A., Binswanger U., Lichtensteiger W., DaPrada M. : Parathyroid hormone response to dopamine in cattle. *Am J Physiol*, 239:E255 (1980)
- 200- Mayer G.P., Hurst J.G., Barto J.A., Keaton J.A., Moore M. P. : Effect of epinephrine on parathyroid hormone secretion in calves. *Endocrinology*, 104:1181 (1979)
- 201- Godin D.J., Av T., Garnett M.E. : Membrane perturbational effects of antiarrhythmic drugs. *J mol cell. Cardiol*, II: 261 (1979)
- 202- Noack E., Kurzmack M., Verjovski-Almeida S., Inesi G. : The effect of propranolol and its analogs on Ca⁺⁺ transport by sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Pharmac exp Ther*, 206:281 (1978)
- 203- Feldman D.A., Weinhold P.A. : Calcium binding properties of rat heart plasma membrane and inhibition by structural analogues of dl-propranolol. *Biochem Pharmacol*, 26:2283 (1977)
- 204- Dietrich J.W., Mundy G.R., Raisz L.G. : Inhibition of bone resorption in tissue culture by membrane stabilizing drugs. *Endocrinology*, 104:1644 (1979)
- 205- Ahren B.O. : Thyroid neuroendocrinology: Neural regulation of thyroid hormone secretion. *Endocrine Reviews*, 7:149 (1986)