



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION**



**“Examen morfofuncional, y molecular de las vías de señalización
PI3K/Akt y MAPK/ERK, de las aortas de ratas con
hipertiroidismo.”**

T E S I S:
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA

P R E S E N T A:
ANTONIO FRANCO VADILLO

DIRECTORES DE TESIS:
D. en C. ENRIQUE FERNANDO CASTILLO HENKEL
D. en C. RUTH MERY LÓPEZ MAYORGA

Contenido

I.	LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
II.	Resumen.....	5
III.	Abstract	7
1.	Introducción.	9
1.1.	Las hormonas tiroideas.	11
1.1.1.	Síntesis de las hormonas tiroideas.....	12
1.1.2.	Transporte de las hormonas tiroideas por circulación sanguínea.	14
1.1.3.	Transporte transcelular de las hormonas tiroideas.	14
1.1.4.	Desyodinasas periféricas y conversión de T4 a T3.....	15
1.2.	Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas.	16
1.2.1.	Mecanismos genómicos de las hormonas tiroideas.	17
1.2.2.	Receptores de las hormonas tiroideas.....	18
1.2.3.	Receptor de retinoides X.....	20
1.2.4.	Regulación transcripcional de los receptores de hormonas tiroideas.....	20
1.2.5.	Co-Moduladores.....	21
1.2.6.	Mecanismos no genómicos.....	22
1.3.	Efecto de las hormonas tiroideas sobre el sistema cardiovascular.	25
1.3.1.	Efecto de las hormonas tiroideas en la aorta.....	26
1.3.2.	Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.....	27
1.3.3.	La vía de señalización PI3K/Akt acción sobre vasos sanguíneos.....	29
1.3.4.	Alteraciones de Akt en algunos tejidos.....	29
1.3.5.	Vías de señalización MAPK/ERK	30
1.3.6.	Efecto de la vía MAPK/ERK sobre vasos sanguíneos.....	31
1.4.	Remodelación vascular.	32
1.4.1.	Relación entre remodelación vascular y hormonas tiroideas.....	34
2.	Antecedentes y Justificación.	36
3.	Hipótesis.....	39
4.	Objetivo.....	39
5.	Objetivos particulares	39
6.	Materiales y métodos.	40
6.1.	Condiciones generales de trabajo.....	40
6.2.	Inducción del hipertiroidismo	41
6.3.	Cuantificación de hormona tiroidea para asegurar el estado hipertiroideo.	42
6.4.	Valoración de variables fisiológicas por medio del modelo órgano aislado.....	42

6.5.	Diseño experimental	44
6.5.1.	Curvas acumulativas concentración-respuesta contráctil a fenilefrina (agonista alfa1 adrenérgico).....	44
6.6.	Estudio histológico valoración de variables morfométricas.	45
6.7.	Determinación de las proteínas akt, pakt, erk1/2 y perk1/2, en las aortas torácicas de ratas por método de western blot.	48
6.7.1.	Electroforesis.....	49
6.7.2.	Transferencia.....	49
6.7.3.	Bloqueo de membranas e incubación con anticuerpos.....	50
6.7.4.	Revelado mediante quimioluminiscencia.	51
7.	Análisis estadístico	52
8.	Resultados.....	53
8.1.	Valoración del estado hipertiroideo	54
8.2.	Depresión de las respuestas contráctiles del agonista adrenérgico α_1 , fenilefrina, en tejidos aórticos obtenidos de ratas tratadas con T3.....	56
8.3.	Modificaciones histomorfológicas ocasionadas por el tratamiento a corto plazo con T3. 60	
8.4.	El hipertiroidismo agudo y los niveles aórticos de Akt, p-Akt, ERK1/2 y p-ERK1/2.	70
9.	Discusión.....	74
10.	Conclusión.....	81
11.	Bibliografía.....	82

INDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

FIGURA	PAGINA
Esquema 1: Diagrama folículo tiroideo.	9
Esquema 2: Representación molecular de hormonas tiroideas.	11
Esquema 3: Síntesis de hormona tiroidea.	13
Esquema 4: Tinciones realizadas.	47
Figura 1: Valores de masa corporal.	54
Figura 2: Valores de hormonas tiroideas.	55
Figura 3: CACR a fenilefrina 1 día	57
Figura 4: CACR a fenilefrina 3 días.	58
Figura 5: CACR a fenilefrina 10 días.	59
Figura 6: Sección histológica normal.	60
Figura 7: Secciones histológicas teñidas con Hematoxilina- Eosina.	62
Figura 8: Secciones histológicas teñidas con Hart.	64
Figura 9: Secciones histológicas teñidas con Tricromica de Masson.	65
Figura 10: Discontinuidades en las láminas elásticas.	66
Figura 11: Morfometria de paredes aorticas I.	68
Figura 12: Morfometria de paredes aorticas II.	69
Figura 13: Western Blot Erk1, pErk1 y su relación.	71
Figura 14: Western Blot Erk2, pErk2 y su relación.	72
Figura 15: Western Blot Akt, pAkt y su relación.	73

I. LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
4E-BP1	Proteína de Unión del Factor Eucariótico de Iniciación
ADN	Acido Desoxirribonucleico
Akt/PKB	Proteincinasa B
AMPc	Adenosin-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
ATPasa	Cinasa dependiente de Adenosin Trifosfato
CACR	Curvas acumulativas concentración respuesta
CMLV	Células de musculo liso vascular
c-Myc	Factor de transcripción
CREB	Elemento de respuesta de unión a AMPc
DBD	Dominio de Unión al ADN
DIT	Diodotironina
eEF2K	Cinasa del Factor Eucariótico de Elongación
EEM	Error estándar de la media
eIF4E	Factor de iniciación de la célula eucariótica 4
Endo -	Endotelio desnudo
Endo +	Endotelio intacto
ERK	Cinasa Reguladas por Señal Extracelular
GATA4	Factor de transcripción Gen GATA4
GC	Gasto cardiaco
GLUT	Transportador de Glucosa
GRIP	Proteína de Interacción GR
HE	Hematoxilina y Eosina
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HT	Hormonas Tiroideas

HTA	Hipertensión arterial
i.e.	Id est (esto es decir)
IP	Intraperitoneal
LBD	Dominio de Unión al Ligando
MAP3K	Cinasa de la Cinasa de las Proteincinasa Activadas por Mitógenos
MAPK	Proteincinasas Activadas por Mitógenos
MCT	Transportador de monocarboxilato
MEK/MAP2K	Cinasa de las Proteincinasa Activadas por Mitógenos
MeOH	Metanol
MIT	Monoiodotironina
mTOR	Objetivo de la Rapamicina en mamíferos
NADPH	Nicotin adenosin difosfato reducido
NaOH	Hidróxido de sodio
NCoR	Co-represor de Receptores Nucleares
NF-KB	Factor nuclear Kappa B
NIS	Na/I simportador
NOX	Oxidasa mitogenica
ON	Óxido nítrico
p70S6K	Cinasa de la p70 S6 Ribosomal
p-Akt	Proteincinasa B fosfatada
p-Erk	Cinasa Reguladas por Señal Extracelular fosfatada
pH	Potencial de hidrogeniones
PI3K	Fosfatidil-Inositol-3-Cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-Bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PTEN	La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF	Polifluoruro vinilideno
RA	Receptor adrenérgico

Raf	Proteína cinasa Treonina/Serina específica
Ras	Proteína cinasa Treonina/Serina específica
RGD	Dominio Arg-Gly-Asp
RNA	Ácido ribonucleico
rT3	Triodotironina reversa
RVP	Resistencia vascular periférica
RxR	Receptor retinoide X
SERCA	Bomba de Calcio ATPasa del Retículo Sarcoplásmico
SH2	Dominio homólogo Src2
SKB	Solución Krebs bicarbonato
SLC	Acarradeares de solutos
SMRT	Mediador de Silenciamiento para el Ácido Retinoico y Hormonas Tiroideas
SRC	Co-activador del Receptor de Hormonas Esteroideas
TIF	Factor 2 Intermediario de la Transcripción
TRAM	Molécula Activadora del Receptor de Hormonas Tiroideas
STAT	Traductores de Señales y Activadores de la Transcripción
T3	Triodotironina
T4	Tiroxina o tetraiodotironina
TA	Túnica adventicia
TBG	Tiroglobulina
TBS-T	Buffer Tris Salino con Tween 20
Tg	Tiroglobulina
TI	Túnica íntima
TM	Túnica Media
TPO	Tiroperoxidasa
TR	Receptor Nuclear de Hormonas Tiroideas
TRE	Elementos de Respuesta a Hormonas Tiroideas

TRH	Hormona Liberadora de Tirotropinas
TSH	Hormona Estimulante de la Tiroides
TTR	Trantiretina
UBF	Factor de unión upstream
UI	Unidad Internacional
ZAKI	Proteína tipo calcineurina

II. Resumen.

Los efectos del hipertiroidismo sobre la estructura y funcionamiento de las arterias de conductancia no han sido dilucidados. La activación por las hormonas tiroidea de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK - vinculadas con crecimiento, diferenciación, migración y proliferación celulares - ha sido descrita en las células endoteliales y musculares lisas de las aortas ratas, pero la relación entre la activación de estas vías y la remodelación aórtica es desconocida. Nuestro objetivo fue examinar en función del tiempo, las modificaciones en la expresión de las proteínas Akt y ERK1/2 (y sus formas fosforiladas, p-), relacionándolas con los cambios histomorfométricos y de la función motora, de las aortas torácicas aisladas de ratas con hipertiroidismo agudo. Este fue inducido en las ratas mediante la administración de T3 (500 µg/kg/día, s.c.) por 1(T3_{1d}), 3(T3_{3d}) y 10 días (T3_{10d}). Los controles correspondientes recibieron vehículo (solución salina alcalina, s.c.) por 1(V_{1d}), 3(V_{3d}) y 10 días (V_{10d}). El incremento de T3 sérica permitió confirmar el estado hipertiroideo en las ratas. En las aortas de los grupos definidos, se caracterizaron las variaciones histomorfométricas, las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina (agonista adrenérgico α 1), y las expresiones de Akt, p- Akt, ERK1, p-ERK1, ERK2 y p-EK2. Al compararse con los controles temporales respectivos: (i) las aortas torácicas de las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} manifestaron reducción del número de núcleos de las células musculares lisas, desorganización de estos núcleos en relación con las láminas elásticas, y pérdida de compactación y discontinuidades de las láminas elásticas;

(ii) las aortas de los grupos T3_{3d} y T3_{10d} - pero no T3_{1d} - mostraron depresión de la contractilidad inducida por la fenilefrina, independientemente del endotelio funcional; (iii) la expresión de Akt aumentó en el grupo T3_{10d}, sin modificarse en los grupos T3_{3d} y T3_{1d}; en cambio, p-Akt y p-Akt/Akt disminuyeron transitoriamente en las aortas de las ratas T3_{1d} (esto es, la disminución no se manifestó en los grupos T3_{3d} y T3_{10d}); y (iv) ERK1/2 y sus formas activas no fueron modificadas en las aortas de las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d}. Así, durante el tratamiento con T3, el curso temporal de los cambios histomorfométricos y la expresión disminuida de p-Akt fueron coincidentes el primer día; sin embargo, la transitoriedad de la disminución de p-Akt no permitió correlacionarla con los cambios histomorfométricos sostenidos hasta el décimo día. El incremento de Akt total al décimo día, excluye una relación causal con la remodelación aórtica y la depresión de la actividad contráctil de aparición más temprana, en las aortas de ratas con hipertiroidismo agudo. En conclusión, el tratamiento con T3 a corto plazo ocasionó remodelación de la pared aórtica y depresión de la respuesta contráctil inducida por la activación de receptores adrenérgicos α_1 , independientemente del endotelio, sin la participación de las vías de señalización que comprenden a las proteínas Akt y ERK1/2.

III. Abstract

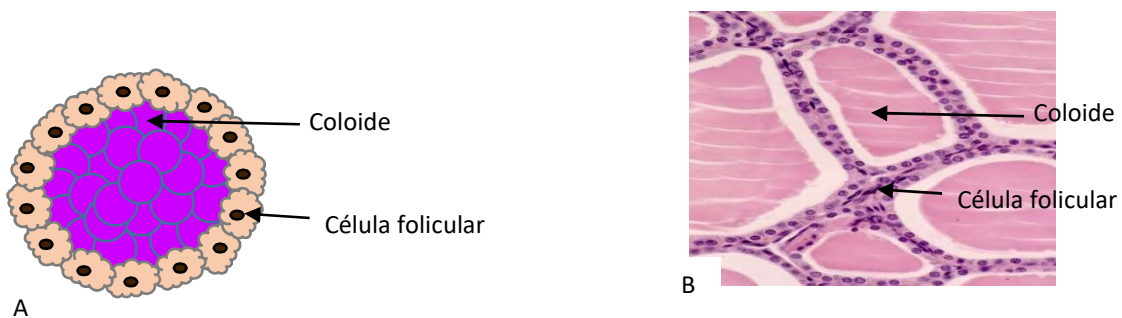
The effects of hyperthyroidism on the structure and function of conductance arteries have not been elucidated. Activation by thyroid hormones of the PI3K / Akt and MAPK / ERK signaling pathways - linked to cell growth, differentiation, migration and proliferation - has been described in the smooth vascular muscle and endothelial cells of the aortas, its relationship with aortic remodeling is unknown. Our objective was to examine, as a function of time, the modifications in the expression of Akt and ERK1/2 proteins (and their phosphorylated forms, p-), relating them to the histomorphometric and motor function changes of Isolated thoracic aortas from rats with acute hyperthyroidism. Which was induced in the rats by daily subcutaneous injection of T3 (500 µg/kg/día, s.c.) by 1(T3_{1d}), 3(T3_{3d}) and 10 days(T3_{10d}). The corresponding controls received vehicle (alkaline saline solution, s.c.) for 1(V_{1d}), 3(V_{3d}) and 10 days(V_{10d}). The increase of T3 in serum allowed to confirm the hyperthyroid state in rats T3_{1d}, T3_{3d} and T3_{10d}. In the aortas of rats of the defined groups, histomorphometric variations, contractile responses induced by phenylephrine (α 1-adrenergic agonist), and the expressions of Akt, p-Akt, ERK1, p- ERK1, ERK2 and p- EK2 was characterized. Compared with the respective temporal controls: (i) the thoracic aortas of the T3_{1d}, T3_{3d} and T3_{10d} rats showed a reduction in the number of smooth muscle cell nucleus, disorganization of these nucleus in relation to the elastic lamellas, and loss of compaction and discontinuations of the elastic lamellas (ii). Aortas of groups T3_{3d} and T3_{10d} -

but not T3_{1d} - showed contractile depression induced by phenylephrine, regardless of functional endothelium (iii). Akt expression increased in the T3_{10d} group, unmodified in the T3_{3d} and T3_{1d} groups; In contrast, p-Akt and p-Akt / Akt decreased temporarily in the aortas of the rats of T3_{1d} (that is, the decrease did not occur in the T3_{3d} and T3_{10d} groups). In conclusion, during the treatment with T3, the temporal course of the histomorphometric changes and the decreased expression of p-Akt were coincident on the first day; however, the transience nature of the p-Akt decrease did not allow it to correlate with the histomorphometric changes sustained until the tenth day. The increase of total Akt to the tenth day, excludes a causal relation with the aortic remodeling and the depression of the contracting activity of earlier occurrence, in the aortas of rats with acute hyperthyroidism. ERK1 / 2 and its active forms were not modified precociously. T3 caused remodeling of the aortic wall and depression of the contractile response induced by the activation of α 1 adrenergic receptors, independently of the endothelium, without the involvement of signaling pathways comprising the Akt and ERK1 / 2 proteins.

1. Introducción.

La glándula tiroides en el humano es localizada en la porción anterior del cuello frente al cartílago tiroides por el cual recibe el nombre, pesa alrededor de 20 g. en el adulto y esta bilobulada unido por istmo de tejido conectivo (Sreekanth et al., 2013).

Las hormonas tiroideas son las únicas hormonas de todo el cuerpo que requiere yodo para ser activas biológicamente y se almacena en forma de coloide tiroideo. Contiene una proteína estabilizadora y de unión a tetrayodotironina (T4) y triyodotironina (T3), la tiroglobulina, y el coloide tiroideo está rodeado por células foliculares formando así múltiples folículos. Las células de los folículos tiroideos son las responsables de la síntesis de hormona tiroidea (Figura 1). (Berne y Levy., 2009).



ESQUEMA 1: A.-Diagrama del folículo tiroideo; se muestra el coloide tiroideo donde se encuentran las hormonas tiroideas acopladas a la tiroglobulina, rodeadas por células foliculares. B.-Fotografía de corte histológico de glándula tiroides, se muestra el coloide rodeado de células foliculares (Finn Geneser, 2015).

Las hormonas tiroideas producen efectos específicos que actúan sobre el crecimiento, diferenciación y metabolismo celular (Aranda et al., 2013). Las hormonas tiroideas 3,5,3'Triyodotironina y 3,5,3',5' Tetrayodotironina, tienen la característica de ejercer efectos importantes sobre el sistema cardiovascular, tanto a nivel central en el corazón, como a nivel periférico en el sistema vascular (Carrillo-Sepúlveda et al., 2009). A nivel cardiaco cuando la hormona tiroidea se encuentra elevada produce un aumento de la fuerza y velocidad de contracción sistólica, además de producir aumento de la velocidad de relajación de las fibras miocárdicas. También, se ha reportado alteraciones en la función eléctrica del corazón evidenciadas como un aumento en la frecuencia cardiaca, aunado a esto se han identificado incremento de la angiogénesis cardiaca, relajación arterial y disminución de las resistencias vasculares periféricas, es decir, disminución de la poscarga cardiaca. (Carrillo-Sepúlveda et al., 2009; Dillmann., 2010; Barreto-Chávez et al., 2010).

Actualmente se estima que alrededor del 10% de la población general padece una enfermedad tiroidea. Un dato clínico muy relevante de los casos de elevación sostenida de hormonas tiroideas es la disminución de las resistencias periféricas incluso mayores al 50%, esto debido a un incremento de liberación de sustancias vasodilatadoras en vasos sanguíneos periféricos como consecuencia de un estado metabólico incrementado. Se ha adjudicado esta acción vasodilatadora a la T3 actuando sobre endotelio vascular sin embargo la acción sobre las células musculares lisas esta pobremente descrita. Se ha evidenciado una acción directa

de T3 como promotor de productos vasodilatadores provenientes de células musculares lisas propiamente. (Carrillo-Sepúlveda et al., 2013).

1.1. Las hormonas tiroideas.

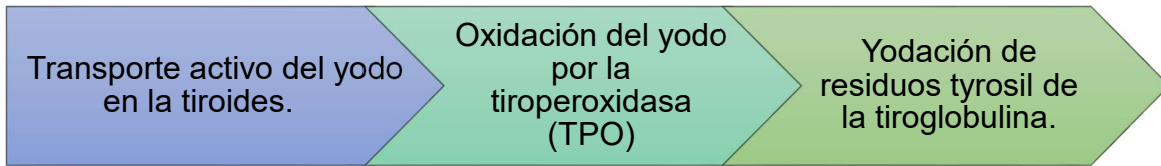
La función de la glándula tiroidea es secretar hormona tiroidea, principalmente secreta dos la tiroxina o tetraiodotironina (T4) y la triiodotironina (T3), aunque en baja proporción también secreta Triiodotironina reversa (T3r). Estas hormonas tienen un precursor común que es la tirosina un aminoácido aromático no esencial. También para la síntesis de estas hormonas se requiere yodo (I-) y selenio, siendo las únicas moléculas biológicas que presentan yodo activamente. Las hormonas tiroideas están unidas a una proteína de alto peso molecular alrededor de los 5000KD llamada tiroglobulina la cual contiene también residuos de tirosina. (Brix et al., 2011). Las hormonas biológicamente activas secretadas por la glándula tiroidea son la tetrayodotironina (T4) y triyodotironina (T3). Poseen una estructura química caracterizada por presentar yodos unidos a los ciclos bencenos y estos a su vez unidos en pares. (Figura 2).



ESQUEMA 2. Representación molecular diseñada en el software molinspiration de las hormonas tiroideas A.- Tetrayodotironina (T4 o Tiroxina) y B.- Triyodotironina (T3)

1.1.1. Síntesis de las hormonas tiroideas

La síntesis de la hormona tiroidea inicia con la captación de yodo en forma de yodo aniónico (I^-) el cual es absorbido por el sistema gastrointestinal mediante transporte activo y llevado por circulación sanguínea hasta la glándula tiroidea donde es captado por un intercambiador Sodio/Iodo (Na/I) (NIS $Na-I$ simportador), localizado en la membrana basolateral de las células foliculares. El yodo sale de la célula folicular y entra a la luz folicular a través de la membrana apical por medio de la pendrina que es un miembro de la familia STAT un intercambiador aniónico intracelular, el yodo aniónico (I^-) viaja en paralelo con moléculas de tiroglobulina una glucoproteína sintetizada de manera importante por la célula folicular que posee un grupo tyrosil el cual será objetivo del yodo aniónico, además las vesículas que contienen yodo aniónico y tiroglobulina se acompañan también de peroxidasa tiroidea que se encargara de la canalización por oxidación del yodo aniónico pasando su valencia a cero para favorecer la interacción entre el grupo tyrosil de la tiroglobulina y el yodo cero durante el proceso de exocitosis a la luz del coloide. Una o dos moléculas de yodo cero (I^0) son incorporadas a la tiroglobulina la cual generará un cambio conformacional que permitirá la conjugación de dos residuos tyrosil yodinados para formar una yodotironina simple. La hormona tiroidea acoplada a la tiroglobulina es almacenada en el coloide dentro del folículo tiroideo. (figura 3). (Sinha and Yen., 2000).



ESQUEMA 3: Esquema de los pasos más importantes en la síntesis de hormona tiroidea. (Mansourian, 2011).

Las hormonas tiroideas permanecen inactivas en el coloide hasta que sea hidrolizada la tiroglobulina, para que esto ocurra las células foliculares endocitan el coloide en la cara apical, las vesículas se acoplan con lisosomas formando lisoendosomas las cuales contienen enzimas que hidrolizaran la tiroglobulina para formar solo T3 y T4 además de algunos yodotironinas menores como la diyodotironina (DIT) y monoyodotironina (MIT), la vesícula es exocitada en la cara basolateral de la célula y es liberada tanto T4 como T3 (relación aproximada de 90% T4 y 10% T3 además de una pequeña fracción de T3 reversa rT3) a la circulación sistémica. Alrededor de 3 cuartas partes del total de T3 aparece en respuesta a la conversión periférica de T4 a T3 que ocurre principalmente en hígado y riñón. (Brix et al., 2011; Berne y Levy., 2009).

1.1.2. Transporte de las hormonas tiroideas por circulación sanguínea.

Las hormonas tiroideas T4 y T3 en circulación sanguínea van acopladas a proteínas séricas como la globulina de unión a tirocinas (TBG) albumina y transtiretina (TTR), alrededor de 99.98% del total de hormonas tiroideas van acopladas con una alta afinidad a estas proteínas. Sin embargo, solo la fracción de hormona tiroidea libre es la que ejerce sus acciones a las células. Las proteínas plasmáticas de unión a tirocinas prolonga de manera extraordinaria la vida media de las hormonas tiroideas T4 y T3, llevando su vida media hasta los 8 días para T4 y T3 de 24 horas, esto tiene cierto sentido lógico porque la mayor concentración de T3 proviene de la conversión periférica de T4 y esta funciona como reserva prohormona para T3. (Mansourian., 2011; Berne y Levy., 2006).

1.1.3. Transporte transcelular de las hormonas tiroideas.

Para poder ejercer sus efectos las hormonas tiroideas viajan por circulación sistémica hasta las células blanco, unidas a proteínas transportadoras como la globulina de unión a tirocinas, la transtiretina y la albumina y una pequeña porción viaja en fracción libre, las hormonas tiroideas son hidrofóbicas, sin embargo posee algunos aminoácidos con carga eléctrica y eso impide su paso a través de membranas plasmáticas, es por eso que requieren transportadores específicos, conocidos como acarreadores de solutos (SLC), el principal transportador es el tipo monocarboxilato 8 (MCT 8), también conocido como acarreador de solutos 16A2

(SLC16A2), este transportador tiene una alta especificidad sobre las hormonas tiroideas. Este acarreador se encarga del transporte bidireccional independiente de energía de la yodotironinas, para lograr este transporte se ha determinado que es obligatorio que se encuentre una molécula de yodo en conjunto a un anillo aromático para poder ser transportado. (Schweizer et al., 2014; Kinne et al., 2010; Brent, 2012).

1.1.4. Desyodinasas periféricas y conversión de T4 a T3.

La relación aproximada de T4 y T3 es 10:1 respectivamente, sin embargo, muchos tejidos tienen la capacidad de desyodinar selectivamente T4 a T3 y esta a su vez puede convertirse en tironinas no activas biológicamente como Diyotironina (DIT) y Monoyodotironina (MIT). Biológicamente hablando T3 es más activo que T4 por lo que esta regulación de conversión periférica asume considerable importancia.

Existen tres tipos de desyodinasas que actúan en el anillo externo tipo 1 que se encuentran en una alta concentración en riñón e hígado y aparentemente son responsables de la mayor conversión de T4 a T3. La isoforma tipo 2 de la desyodinasa se encuentra principalmente en glándula pituitaria, sistema nervioso central y placenta y juega un rol importante proveyendo de T3 a estos tejidos, esta acción toma particularmente importancia en la glándula pituitaria debido a que es la responsable de la acción de retroalimentación negativa para suprimir la secreción de tirotropinas es decir disminuir la secreción de hormona estimulante de tiroides

(TSH). Los cambios fisiológicos o patológicos pueden condicionar la concentración de desyodinasas dependiendo de los requerimientos corporales, además hay una fuerte correlación entre desyodinasas tipo 1 y tipo 2 para la regulación hipotalámica de las concentraciones de T4 y T3 a partir de la concentración de TSH la cual actúa específicamente en el tipo 2 en hipotálamo ejerciendo una acción de retroalimentación negativa sobre este. La conversión local de T4 a T3 es importante como lo mencionamos anteriormente para el control negativo que ejercen estas hormonas sobre la liberación de Hormona liberadora de tirotropinas (TRH) en el hipotálamo y de hormonas estimulante de tiroides(TSH) por la hipófisis y así mantener equilibrado el sistema. (Alexband et al., 2010; Aranda et al., 2013; Cheng et al., 2010).

1.2. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas son moléculas muy importantes para la regulación del metabolismo celular y el control de la homeostasis, clásicamente se conocía que las hormonas tiroideas ejercían su acción por mecanismos genómicos, actualmente se han descrito un número considerable de acciones no genómicas mediadas por receptores membranales o citoplasmáticos, aunado a esto se reconoce una fuerte relación entre mecanismos genómicos y no genómicos, aquellos iniciados por fuera de la membrana nuclear que desencadenan cascadas de señalización que llevarán como consecuencia modificaciones en la expresión genética independientemente

de la propia activación de sus receptores intranucleares. (Davis et al., 2011; Dillman et al., 2010).

1.2.1. Mecanismos genómicos de las hormonas tiroideas.

Se ha considerado por muchos años a la T4 como pro-hormona para la potente acción de la T3 acoplándose a su receptor intranuclear. Mientras no exista hormona tiroidea, el receptor tiroideo (TR) permanece inactivo gracias a moléculas co-represoras, la presencia de T3 produce un cambio conformacional del receptor tiroideo (TR) y desprende el co-represor para permitir la llegada de una molécula co-activadora y permitir su unión a elementos de respuesta tiroideo en la cromatina para comenzar la transcripción. Se han estudiado a conciencia los elementos de respuesta a hormonas tiroideas y se ha descrito claramente y canónicamente una secuencia general, sin embargo otros estudios han descrito que estos sitios de respuesta no son iguales siempre y tiene modificaciones, sin embargo lo que se ha descrito claramente son secuencias de nucleótidos bien establecidos AGGTCA, pero se ha descrito ampliamente que puede lograrse un mejor acoplamiento con una porción más extendida de nucleótidos TAAGGTCA, sin embargo el hexámero nucleótido básico es el mismo, además estas porciones de nucleótidos están unidas por un tetrámero de repetición invertida que funciona como un espaciamiento entre dos hexámeros es decir que el elemento de respuesta tiroidea codificaría así: AGGTCA_nAGGTCA. Cabe destacar que, aunque los TRs pueden unirse a los elementos de respuesta tiroideas (TREs) por si solos, mejoran su acoplamiento

formando homodimeros y más aun heterodimeros con el RXR. (Sinha and Yen., 2000; Paquette et al., 2014).

T3 se liga a su receptor con 10 a 15 veces mayor afinidad que T4. Es impresionante la diferencia de ocupación de receptores tiroideos entre T3 y T4 variando de tejido a tejido esto provee un mecanismo de respuesta complejo ante los niveles circulantes de hormona tiroidea. (Dillman et al., 2010; Sinha and Yen., 2000; Cheng, et al., 2010).

1.2.2. Receptores de las hormonas tiroideas.

Existen dos genes THRA y THRB (α y β) que codifican para producir los receptores nucleares tiroideos (TR), estos genes se encuentran localizados en dos cromosomas distintos el Gen THRA se encuentra en el cromosoma 17 mientras que el TRHB se encuentra en el cromosoma 3, cada gen codifica para dos isoformas de receptores tiroideos por medio de splicing alternativo, es decir que el gen THRA o TR α codifica para el receptor tiroideo TR α 1 y TR α 2 y el gen THRB codifica para los receptores nucleares TR β 1 y TR β 2, TR α 1 se une con una alta afinidad a su ligando T3 y en baja proporción a T4 mientras que el TR α 2 se han descrito acciones levemente antagónicas, en cuanto a los TR β 1 y TR β 2, el receptor TR β 1 se ha vinculado a una alta afinidad hacia T3 y el TR β 2 se ha asociado a acciones sobre sistema nervioso central. (Dillman et al., 2010; Aranda et al., 2013; Bassett., 2009).

Como otros miembros de la súper familia de receptores nucleares, los TRs tienen un dominio central de unión al ADN (DNA-Binding-Domain o DBD) y un dominio carboxi-terminal de unión a ligando (Ligand-Binding-Domain o LBD). Los dos receptores principales TR α y los TR β poseen una gran homología entre ellos, además de poseer ambos un dominio de dimerización similar. Las regiones amino-terminales son más variables entre TR α y TR β y contienen dominios de activación independiente de ligando. Por el contrario, múltiples sub-regiones se encuentran en el dominio de unión a ligando (LBD) para la activación transcripcional dependiente de ligando y la represión basal de los genes diana. El sitio de unión a ADN (DBD) posee dos núcleos de zinc, además los TR poseen un dominio de dimerización con el cual pueden crear homodimeros entre ellos mismos o heterodimeros con el receptor de retinoide X (RXR). La unión entre monómeros se lleva a cabo mediante enlaces peptídicos temporales entre la porción amino terminal y carboxilo proximal de una y otra molécula mediada por la activación del receptor Tiroideo en presencia de T3 y en baja proporción T4 a través del sitio de unión a ligando, además también posee la capacidad de interactuar con los co-represores y co-activadores según sea el estímulo. Cristalografía por rayos X muestran que el TR α 1 está incrustado en un "bolsillo" hidrófobo revestido por tramos discontinuos de secuencias de aminoácidos dentro del Dominio de unión a ligando (LBD). Además, hay varias interfaces hidrófobas dentro del mismo LBD que contribuyen a la homodimerización y heterodimerización con el RXR. También existen zonas de unión crítica para las

interacciones con co-activadores y co-represores. (Cheng et al., 2010; Aranda et al., 2013; Sinha and Yen., 2000).

1.2.3. Receptor de retinoides X

El receptor de retinoide X es una proteína compleja la cual posee la capacidad de vincularse consigo misma o con otros receptores, con las Hormonas tiroides forma heterodimeros a través de la unión amino terminal- carboxilo proximal del receptor Tiroideo (unión proteína-proteína, además de poderse vincular una vez activándose con los TRs a elementos de respuesta tiroidea con la finalidad de establecer un vínculo más estable y generar el inicio de la transcripción. (Cheng et al., 2010; Mullur et al., 2014).

1.2.4. Regulación transcripcional de los receptores de hormonas tiroideas.

Los TRs una vez siendo activados por la hormona tiroidea se unen a elementos de respuesta tiroidea (formando homodimeros o heterodimeros con el RXR), esta unión provoca un cambio en actividad transcripcional de los genes diana, aumentando o disminuyendo su actividad según sea el estímulo. A pesar de que se han descrito modificaciones en la expresión genética mediadas por las hormonas tiroideas a través de sus receptores tiroideos, también se ha visto que pueden afectar la estabilidad de los RNA mensajeros (mRNA) y modificar la regulación de la

traducción a proteínas, esto funciona como un control a múltiples sistemas de la regulación de la expresión génica a través de las hormonas tiroideas. (Sinha and Yen., 2000).

1.2.5. Co-Moduladores.

Los receptores de hormonas tiroideas (TRs) pueden ejercer efectos incluso en ausencia de su ligando actuando como represor de la activación génica a través de la mediación de unión con co-represores, de los más notorios el co-represor de receptores nucleares (NCoR) y el mediador de silenciamiento para el ácido retinoico así como receptores de hormonas tiroideas (SMRT) por mencionar algunos. También los co-represores puede modificar la estructura del DNA para evitar su lectura generando una aglutinación de la cromatina a través de la activación de las histonas deacetilasas. Por el lado contrario en presencia de la hormona tiroidea el receptor a hormona tiroidea es activado formando dímeros o heterodímeros con el RXR y uniéndose a elementos de respuesta tiroideo y a su vez desplazando al co-represor para darle espacio de entrada al co-activador principalmente co-activador del receptor de hormona esteroideas (SRC-1), el factor 2 intermediario de la transcripción (SRC-2/TIF), la proteína 1 de interacción GR (GRIP-1) y la molécula activadora del receptor de hormonas tiroideas 1(SRC-3/TRAM-1). Estos co-activadores actúan de manera contraria a los co-represores, modificando la cromatina o activando la transcripción génica directamente a través de la activación

de enzimas propias para la transcripción. (Aranda et al., 2013; Yen., 2001; Cheng et al., 2010; Sinha and Yen., 2000)

1.2.6. Mecanismos no genómicos

Recientemente se ha establecido que los mecanismos clásicos de las hormonas tiroideas a través de su unión a receptores nucleares y modificando la transcripción génica no es la única, también se han descrito algunos mecanismos mediados por hormonas tiroideas a través de la activación de receptores extra nucleares, conocidos como mecanismos no genómicos. Estos receptores se pueden encontrar en la membrana plasmática o en el citosol y desencadenan tras su activación por las hormonas tiroideas cascadas de señalización que pueden mediar efectos directos o activar indirectamente la transcripción y la modulación de la transcripción.

Estos mecanismos no genómicos pueden estar asociadas al mantenimiento basal de los efectos mediados por las hormonas tiroideas debido a su activación rápida y no sostenida a diferencia de los mecanismos genómicos que son más tardíos, pero con efectos más sostenidos y drásticos. De manera muy interesante se ha descrito que estos mecanismos no genómicos pueden actuar no solo con T3 si no con igual afinidad pueden actuar con T4 o incluso con T3r. (Davis et al., 2008; Aranda et al., 2013; Sinha and Yen., 2000; Davis and Davis., 2002).

Se ha descrito un receptor membranal propio para las yodotironinas, la integrina $\alpha V\beta 3$, las integrinas son una familia de proteínas transmembrana con varios dominios, forman heterodimeros entre sí, particularmente la integrina $\alpha V\beta 3$ posee en su dominio extracelular proteínas de unión a T4 y T3, son capaces de transmitir señales discretas gracias a su gran plasticidad, en su porción de unión a ligando el dominio extracelular es rico en residuos de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) y estos elementos pueden unir además de T3 y T4 otras moléculas como factores de crecimiento, actualmente se reconoce la existencia de sitios específicos de unión a T3 y T4. La activación del receptor de la integrina $\alpha V\beta 3$ desencadena la activación de la cascada de fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y esta a su vez modifica la expresión genética como el factor de hipoxia inducible α (HIF-1 α) activado por el receptor

RGD, parece inducir la activación de la proteína cinasa C (PKC) que conllevara a la activación subsecuente a través de fosforilacion de Ras, Raf1, y MEK, lo que resulta en la fosforilación de tirosinas, además de la activación y translocación nuclear de MAPK (ERK1 / 2) que a su vez interactúa con el TR formando el complejo MAPK/TR que se une y activa al p53 la cual es un supresor de actividad transcripcional de protooncogenes. Y también puede activar a proteínas de la familia STAT, las isoformas 1 y 3, De acuerdo a estas relaciones se ha dicho que MAPK (ERK1 / 2) activada por el receptor de integrina puede producir angiogénesis. Por lo tanto, la activación directa de la vía MAPK/ERK por T4 o T3 puede generar muchos cambios metabólicos y activar varios mecanismos de transporte iónico, un ejemplo es la

modificación en la actividad del transportador ATPasa de Na⁺/K⁺ o la modulación del transporte de Calcio a la célula. (Davis et al., 2004, 2009; Bassett et al., 2003; Cao et al., 2005; Hiroi et al., 2006; Lin et al., 2009).

Estos mecanismos no genómicos se han actualizado constantemente y se ha descrito otra vía importante a nivel citoplasmático activada por las hormonas tiroideas, se menciona la existencia de receptores propios de la hormona tiroidea TR α 1 o TR β 1 ubicados en el citoplasma y estos pueden desencadenar la activación directa de la vía PI3K, al activarse puede generar múltiples efectos uno de los más comúnmente reportados es la fosforilación de la proteína cinasa B (Akt/PKB), esta al ser activada continuara la vía a través de la activación del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) que viajara al núcleo y culminara con la modulación de la transcripción génica a través de genes específicos por nombrar algunos los genes ZAKI-4 que se han descrito con anterioridad, esto lo hace mediante la activación de dos proteínas, la p70 cinasa de la unidad ribosomal S6 (p70S6K) y de la inhibición del inhibidor de la proteína de unión del factor eucariótico de iniciación 4E (4E-BP1). Además, por otro lado, la activación extra nuclear del receptor tiroideo TR α 1 se ha vinculado con la modulación activa de la sintasa de óxido nítrico a nivel vascular mediando la relación vascular produciendo vasodilatación. (Davis et al., 2004, 2008, 2009; Hiroi et al., 2006; Lin et al., 2009).

1.3. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el sistema cardiovascular.

El sistema cardiovascular está compuesto por el corazón, las arterias de gran, mediano y pequeño calibre, el sistema capilar y las venas de pequeño mediano y gran calibre. Existen fuertes vinculaciones de otros órganos al sistema cardiovascular que ayudan a su función y a su regulación como el riñón, los pulmones y el sistema cardiovascular, juntos regulan el flujo constante de sangre a todo el organismo para el aporte de oxígeno, nutrientes y otras sustancias así como para la depuración de sustancias de desecho y tóxicos, además participa en la regulación de procesos importantes para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, sin un sistema cardiovascular óptimo y funcionando los sistemas del organismo comienzan a deteriorarse y a morir. (Berne y Levy., 2009; Towbin et al., 1999).

Esta ampliamente estudiado el efecto que provocan las hormonas tiroideas sobre el sistema cardiovascular y se ha resaltados en múltiples trabajos la importancia de las hormonas tiroideas para el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular, además se ha descrito algunas características del efecto de los niveles anormalmente disminuidos en el caso del hipotiroidismo o niveles incrementados de hormonas tiroideas como en el hipertiroidismo y como estas modificaciones en la cantidad de hormona circulante ejercen efectos característicos sobre el sistema cardiovascular por lo tanto se ha determinado que las hormonas tiroideas son indispensables para el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular y

alteraciones en ellas pueden ejercer cambios metabólicos que traerán un fuerte impacto sobre la homeostasis hemodinámica. (Cini et al., 2009; Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Ojama et al., 2000; Alexband et al., 2010; Moulakakis et al., 2007).

A nivel cardiaco se han evidenciado varios efectos de las hormonas tiroideas tienen sobre las células de musculo liso vascular, sus proteínas contráctiles y sobre el tejido conectivo asociado, además de ejercer efectos sobre su regulación intrínseca y extrínseca propia. Los incrementos anormales de las hormonas tiroideas traerán cambios moleculares sobre la mecánica del corazón, por mencionar algunas modificaciones, produce cambios en las isoformas de las fibras de miosina que van a mejorar la capacidad contráctil del corazón aumentando su velocidad de contracción. Además, incrementa la velocidad de relajación cardiaca modulando la bomba de calcio del retículo sarcoplasmico tipo 2 (SERCa2) y también modulando la bomba sodio-potasio ATPasa y el receptor de rianodina. También aumenta la sensibilidad a factores endógenos como la adrenalina y además puede aumentar la frecuencia cardiaca. (Ojamaa et al., 2000; Axelband et al., 2010; Brix et al., 2011).

1.3.1. Efecto de las hormonas tiroideas en la aorta.

Ademas de los efectos cardiacos las hormonas tiroideas también produce efectos sobre los vasos sanguíneos. Las HTs, tienen la capacidad de aumentar la relajación vascular y disminuir la contractilidad vascular. Algo muy característico en los estados hipertiroideos condicionando una disminución de las resistencias

vasculares periféricas, este efecto es atribuida a la síntesis de óxido nítrico (ON) por parte del endotelio y a través de la activación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 cinasa/Proteína cinasa B (PI3K/Akt). Sin embargo, también se ha demostrado que el sistema renina angiotensina aldosterona juega un papel importante en la regulación de la función vascular e incluso esta característica ha sido reportada en los estados hipertiroideos, como un aumento marcado de la presencia de receptores AT2 (AT2R). (Galli et al., 2010; Carrillo-Sepulveda et al., 2010, Carrillo-Sepulveda et al., 2013).

También se ha reportado una proliferación de células musculares lisas debido a los incrementos anormales de las hormonas tiroideas mediadas por la vía de señalización proteína cinasa activada por mitogeno/ cinasa regulada por señal extracelular (MAPK/ERK). Estos mecanismos actúan modificando la estructura y generando remodelación de la pared aortica, sin embargo, las modificaciones funcionales que acompañan estos cambios no están totalmente establecidas y siguen en investigación. (Wang y Sun., 2010).

1.3.2. Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR

El fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) es reclutado a la membrana gracias a dominios Src Homology 2 (SH2) que es sensible a la fosforilacion de residuos de tirosinas, que ha sido reportado ser activado por las hormonas tiroideas a partir de receptores de hormonas tiroideas beta (TR β 1), presentes en el citoplasma o en la membrana.

El PI3K posee una porción reguladora conocida como proteína 85 (p85) y una porción catalítica conocida como pi 10, responsable de transferir el grupo fosfato del fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2), la proteína PTEN es la principal reguladora negativa en este punto y evita el reclutamiento de la proteína cinasa B (Akt o PKB), la cual es dependiente de la previa activación por PI3K, esto sucede gracias a la interacción con la porción reguladora de AKT la porción homóloga de plectrina. Una vez activa AKT regula la diferenciación, migración y proliferación celular. Se han reportado que puede viajar del citoplasma al núcleo es decir una interacción entre efectos no genómicos y efectos genómicos, activando factores de transcripción como Factor nuclear kB (NF-kB), Factor inducible por hipoxia (HIF-1a) y Elemento de respuesta de unión a cAMP (CREB). La activación de HIF-1a junto con el gen ZAK1 4 y en algunos tejidos como corazón se ha descrito regula la presencia del glucotransportador tipo 1 (GLUT 1) generando un aumento de receptores tipo insulina, además, el AKT una vez activada puede generar la regulación de otras moléculas como el mTOR. al ser activado el mTOR activa a su vez a la proteína de unión del factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E (4E-BP1) y al factor de elongación eucariótico tipo 2 (eEF2), el 4E-BP1 ejerce un efecto regulador sobre la producción de proteínas inhibiendo al factor de iniciación de célula eucariota 4E (eIF4E). Además, la cinasa S6 (p70S6K), son también reguladores en la acción del mTOR al activar a la subunidad 40 S ribosomal, y permitir la traducción del RNA mensajero (mRNA) en sentido 5'- 3' para la generación de nuevas proteínas. (Ojama., 2010; Davis et al., 2008).

1.3.3. La vía de señalización PI3K/Akt acción sobre vasos sanguíneos.

Recientes estudios han descrito relajación independiente de endotelio producido por las hormonas tiroideas, el óxido nítrico (ON) posee la capacidad de actuar sobre las cadenas ligeras de miosina al activar las fosfatasa de la cadena ligera de miosina y producir relajación vascular. Los estudios mencionan esta relajación independiente de endotelio debido a la producción del óxido nítrico por las células musculares lisas de los vasos sanguíneos al ser estimulados con T3, aunque el principal efecto vasodilatador producido por las hormonas tiroideas se debe a un incremento de la estimulación de sintasas de óxido nítrico endotelial y neuronal. También se ha reportado que el musculo liso es capaz de sintetizar óxido nítrico por sí mismo, este efecto sobre las células musculares lisas por parte de las hormonas tiroideas se ha asociado a efectos no genómicos principalmente la activación de la vía PI3K/AKT generando la activación y promoción de la sintasa de óxido nítrico. (Carrillo-Sepulveda et al., 2010).

1.3.4. Alteraciones de Akt en algunos tejidos.

La Proteína cinasa B (Akt) es una proteína de la familia de las Serina/Treonina cinasas y existen 3 isoformas conocidas Akt1, Akt2 y Akt3, tanto la distribución de las diferentes subunidades, así como la activación y desactivación de ellas puede ser tanto fisiológica como patológica y se han implicado a procesos proliferativos malignos como enfermedades cardiovasculares. La proliferación de musculo liso

vascular (VSCM) es un factor importante en la remodelación vascular además de ser un factor importante en patologías como aterosclerosis, por ejemplo, Akt1 se ha observado aumentada en casos de proliferación y migración celular, pero la fosforilación por Akt1 se ha observado disminuida en las células de músculo liso en casos de aterosclerosis y además se ha observado disminución de fosfo-Akt2 en aneurisma aórtico, una inhibición de Akt1 puede disminuir la proliferación de células musculares lisas de manera potente. Además, se ha observado la presencia de Akt2 en las células de músculo liso vascular y su efecto sobre proliferación y migración celular sin embargo la isoforma predominante en células de músculo liso vascular es Akt1. La migración celular mediada por Akt es debido a que esta cinasa puede polimerizar y dimerizar filamentos intracelulares y modificar filamentos de actina para promover la migración celular. (Yu et al., 2015).

1.3.5. Vías de señalización MAPK/ERK

Las vías de las proteínas cinasa activada por mitogeno (MAPK) son cascadas sucesiva de fosforilaciones en orden de tres consecutivas, cada uno con su propia cinasa asociadas a la membrana y generalmente conllevan a la fosforilación de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), Esta cadena de fosforilaciones puede ser iniciada por la activación de un receptor transmembrana de la familia de las integrinas, el receptor $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, el cual es activado por las hormonas tiroideas al portar subunidades sensibles a T4 y también subunidades sensibles a T3 es decir puede ser activado por las dos hormonas tiroideas, al ser activado el receptor induce la

activación de una cinasa de serina/treonina en la membrana celular misma, se activa una cascada de activación de proteínas G monoméricas pequeñas en orden consecutivo conocidas como Ras seguida de Raf y la activación de MAPK y posteriormente la activación de ERK 1 y 2, al activarse ERK1 y 2, provoca la activación y modulación de efectores como el p70S6K y factores de transcripción como el factor de unión upstream (UBF), Elk-1, c-Myc, las proteínas transductoras de señal y activadores de transcripción (STATS) y GATA4. Los cuales tienen como misión la regulación de la síntesis proteica principalmente para la proliferación y crecimiento celular. (Bueno et al., 2000; Davis et al., 2008; Kehat and Molkentin., 2010).

1.3.6. Efecto de la vía MAPK/ERK sobre vasos sanguíneos.

La hormona tiroidea T3 induce la producción de radicales libres a través de la activación del receptor tiroideo alfa (TR α 1), que a su vez genera la producción de estos radicales a través de la proteína homóloga gp 91 con la participación de la enzima NADPH oxidasa (NOX) y activación de la MAPK que conllevará a la activación de ERK1 y 2 y continuar con la vía de señalización a través la activación de factores de transcripción que conllevarán a una proliferación de células musculares lisas. (Davis et al., 2008; Wang and Sun., 2010; Kehat and Molkentin., 2010).

1.4. Remodelación vascular.

Por muchos años se ha definido como remodelación vascular únicamente a los cambios en la luz del vaso sanguíneo asociados a los cambios morfológicos en el material celular o extracelular, sin embargo, esto se compara con la forma en la que los cardiólogos definen remodelación. Se ha propuesto que el término remodelación sea utilizado en situaciones donde los cambios estructuralmente determinados en la luz del vaso sanguíneo sean clasificados como interior (“inward”) o exterior (“outward”) dependiendo si el proceso de remodelación de como resultado un aumento o decremento respectivamente del diámetro. Además, la remodelación puede resultar en aumento, mantenimiento o decremento de cantidad de material celular y extracelular lo que subclasificaría la remodelación como hipertrofia, eutrofia o hipotrofia respectivamente. (Mulvani., 1999).

Una de las principales negativas con esta clasificación es que no provee al lector de la información acerca de los cambios funcionales de importancia que debemos de considerar tales como la luz del vaso sanguíneo, la túnica media, el área de sección transversal, y la relación entre luz del vaso y media. Además, otro punto que se debe considerar es el tiempo al que el vaso sanguíneo está sometido a estímulos externos anormales para que genere esta remodelación. (Mulvani., 1999).

Se cree que el papel principal de la remodelación vascular lo tienen las células del músculo liso, además de ser las células más abundantes en la túnica media de los

vasos sanguíneos, cumplen una función muy importante resistiendo las modificaciones mecánicas producidas en la luz del vaso como tal. Además los vasos sanguíneos gracias a su capacidad contráctil regulan la presión arterial, ante estos estímulos repetitivos y competitivos, provocan cambios celulares, extracelulares y moleculares para poder responder a estos estímulos, en el caso de la edad la aorta se calcifica por lo tanto disminuye la capacidad de distensión de los vasos lo que trae como consecuencia el aumento de presión, esto ocurre parecido en la hipertensión arterial aislada provocando una hipertrofia vascular ante estos estímulos. (Lacolley et al., 2012).

Los grandes vasos sanguíneos poseen la característica de ser muy elásticos esto les da la capacidad de cumplir su función de distenderse captar volumen sanguíneo y después tener un retroceso elástico y regresar a su estado original lo que le permite actuar como filtro hidráulico al utilizar la energía potencial acumulada durante la sístole y la distensión provocada por esta y transformarla en energía cinética para permitir un flujo relativamente continuo de la sangre. (Cheng et al., 2012)

La remodelación vascular es un proceso activo, generalmente adaptativo, de cambios estructurales que involucran al crecimiento, muerte, proliferación y migración celular y a la producción o degradación de sustancias de la matriz extracelular arterial, lo cual es regulado dinámicamente por la interacción de

factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos. La hipertensión arterial provoca en los vasos de resistencia un engrosamiento de su pared, disminuyendo la luz de los vasos, mientras que en las arterias menores la alteración no involucra al crecimiento vascular ni a la hipertrofia de las células musculares lisas, sino que puede deberse al remodelado de las paredes arteriolas o cambio en su función. Esta nueva disposición de la estructura arteriolar se denomina “remodelado eutrófico” y es responsable, al menos en la rata hipertensa, de todos los cambios vasculares de la enfermedad. El sistema renina-angiotensina juega un papel fundamental en la HTA y en otras enfermedades cardiovasculares. La angiotensina II es también muy importante en la génesis de la hipertrofia cardíaca y, sintetizada localmente, es un importante modulador de la función y de la estructura tisular. (Cheng et al., 2012, Schiffrin et al., 2007).

1.4.1. Relación entre remodelación vascular y hormonas tiroideas

Se ha establecido que el hipertiroidismo y el hipotiroidismo que provocan modificaciones cardiovasculares importantes y ambos pueden provocar una patología cardiovascular acelerada, el hipertiroidismo se ha vinculado con un aumento hemodinámico y se ha asociado a un estado de insuficiencia cardíaca mientras que el hipotiroidismo es clásicamente relacionado con aterosclerosis por alteración en el metabolismo de lípidos, en los estudios más recientes se ha vinculado a la hormona tiroidea con efecto anti-ateroescleróticos por la producción de óxido nítrico siendo responsable las células endoteliales principalmente y

también se ha vinculado con proliferación de células musculares lisas en vasos sanguíneos, en general el hipertiroidismo se ha descrito, provoca datos de relajación vascular, angiogénesis y un efecto anti-ateroesclerótico estos datos podrían sugerir relacionarse con remodelación vascular (Ichiki., 2016).

2. Antecedentes y Justificación.

Las hormonas tiroideas (HTs), 3, 5, 3', 5' tetrayodo-L-tironina (T₄) y 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T₃), tienen efectos relevantes fisiológicos y patológicos sobre el sistema cardiovascular (Klein y Ojamaa, 2000; Fazio y Palmieri, 2005; Kahaly y Dillmann, 2005; Lervasi y Nicolini, 2013). Las HTs ejercen sus efectos por mecanismos genómicos (esto es, enlazándose a los receptores nucleares tiroideos y regulando la transcripción génica) o a través de mecanismos no genómicos definidos, simplemente, como aquellos iniciados por fuera del núcleo celular (Davis et al., 2008; Cheng et al., 2010). No obstante, un número importante de vínculos ha sido actualmente reconocido entre las acciones no genómicas y genómicas de las HTs (Cheng et al., 2010). Los incrementos anormales en los niveles de HTs - observados en el hipertiroidismo - causan daño cardiovascular importante. El hipertiroidismo es caracterizado por un estado cardiovascular hiperdinámico con gasto cardiaco incrementado (GC) y disminuida resistencia vascular periférica (RVP) (Klein y Ojamaa, 2000; Fazio y Palmieri, 2005; Kahaly y Dillmann, 2005). Progresivamente, el hipertiroidismo conduce a remodelación cardiaca y vascular (Dillmann, 2010; Ojamaa, 2010; Luidens et al., 2010).

La evidencia experimental reciente, ha llevado a definir el crecimiento cardiaco en respuesta a las HTs como hipertrofia fisiológica (Ojamaa, 2010; Dillmann, 2010). Las vías de señalización de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)/proteína-cinasa B (Akt) y proteína-cinasa activada por mitógenos (MAPK)/cinasa regulada por señal

extracelular (ERK) han sido implicadas en los efectos cardiacos (Dillmann, 2010; Ojamaa, 2010) y angiogénicos (Luidens et al., 2010) de las HTs. Selectos estudios experimentales han demostrado que las HTs rápidamente activan la ruta de señalización Akt/mTOR, proporcionando protección celular, y aumento de la síntesis de las proteínas contráctiles y enzimas metabólicas normales, en el corazón (Kennessey y Ojamaa, 2006; Kuzman et al., 2005, 2007). También hay información que muestra que los cambios inducidos por la HTs en el crecimiento de los cardiomiocitos, involucran el aumento en la actividad de la vía de señalamiento MAPK/ERK (Wakatsuki et al., 2004; Pantos et al., 2007). No obstante, una situación mixta fue propuesta por la evidencia que establece que las HTs tienen un efecto inhibitorio sobre la vía Raf-1/ERK, que depende de la activación previa de la vía PI3K/Akt, lo cual ocasiona hipertrofia del miocardio adaptativa experimental (Suárez et al., 2010).

Es particularmente interesante que la activación por las HTs de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK en el corazón, ha sido asimismo descrita en las células endoteliales y musculares lisas de la aorta; sin embargo, a la vía PI3K/Akt se le ha relacionado con el proceso de relajación vascular inducido por las HTs, mediado por la enzima sintasa de óxido nítrico, con origen en células aórticas endoteliales bovinas (Hiroi et al., 2006) o musculares de rata (Carrillo-Sepúlveda et al., 2010); y a la vía MAPK/ERK se le ha vinculado con la capacidad de la T₃ (previa regulación ascendente de la oxidasa mitogénica NOX₁) para inducir proliferación de las células musculares de la aorta de rata (Wang y Sun, 2010). (Las especies

reactivas de oxígeno generadas por la NOX₁ sirven como señales intracelulares que activan moléculas de señalización, entre ellas las MAPK, que conducen a la proliferación celular.) En conjunto, estos estudios señalaron que las HTs pueden activar las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK en células aórticas, pero la relación entre la activación de estas vías y la remodelación vascular *in vivo* es desconocida. Consideramos que las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK vinculadas con crecimiento, diferenciación, migración y proliferación celulares pueden, en función del tiempo de su activación por las HTs, estar involucradas en el desarrollo de remodelación de la pared vascular. Al respecto, la información que permita establecer de manera comparativa, la evolución temporal de la activación, o inactivación, de ambas vías (PI3K/Akt y MAPK/ERK) durante la generación y mantenimiento de la remodelación vascular por las HTs, es escasa e inconsistente. Nosotros estamos interesados en aportar información sobre la evolución de la actividad de las vías mencionadas en las aortas, en las fases iniciales de desarrollo del hipertiroidismo en ratas.

3. Hipótesis.

Las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK vinculadas con crecimiento, diferenciación, migración y proliferación celulares pueden, en función del tiempo de su activación por las HTs, estar involucradas en el desarrollo de remodelación de la pared aórtica.

4. Objetivo.

Caracterizar la evolución temporal (temprana) de las modificaciones estructurales y funcionales mecánicas, correlacionándolas con la expresión de las proteínas Akt y ERK1/2, de las aortas de ratas con hipertiroidismo.

5. Objetivos particulares

1) Confirmar el estado hipertiroidico de las ratas midiendo su masa corporal y los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas.

2) En las aortas torácicas aisladas de ratas con hipertiroidismo de 1, 3 y 10 días de evolución:

- Estudiar los cambios histológicos y morfométricos.
- Caracterizar las respuestas contráctiles inducidas por el agonista adrenérgico α_1 , fenilefrina.
- Determinar la expresión molecular de las proteínas Akt y ERK.

6. Materiales y métodos.

Los procedimientos realizados en animales de experimentación utilizados para la elaboración de esta tesis, cumplen con los requerimientos que en la materia determina la **NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, SAGARPA; y la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, NATIONAL RESEARCH COUNCIL.**

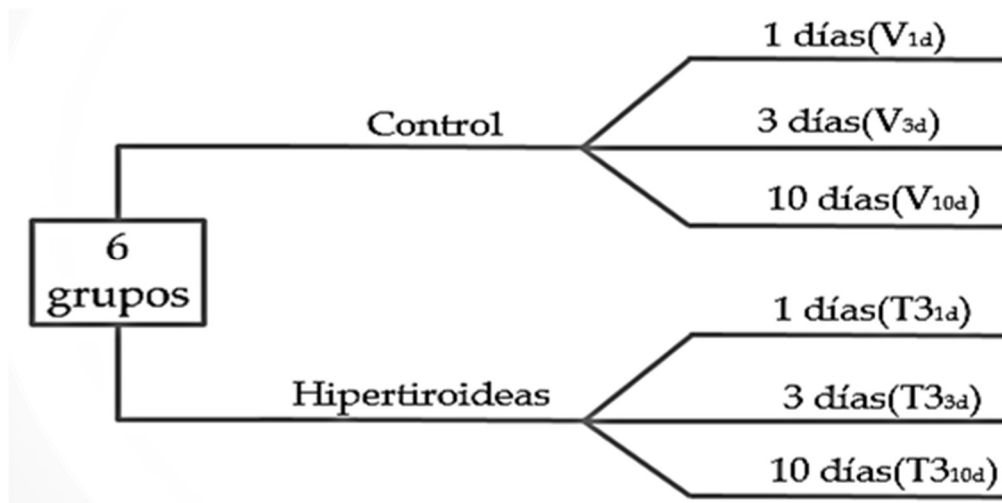
6.1. Condiciones generales de trabajo

Se utilizaron ratas wistar machos con un peso de 250 a 300 gramos, de 10 a 12 semanas de vida, se mantuvieron en un cuarto aislado con control de humedad y a una temperatura estable, se mantuvieron sometidas a ciclos de luz oscuridad normal de 12X12 horas con acceso a agua y comida libremente (ad libitum).

6.2. Inducción del hipertiroidismo

La inducción al hipertiroidismo fue mediante inyecciones de hormona tiroidea, 3, 5,3' Triyodotironina en dosis de 500 µg/Kg/día, la cual estaba disuelta en solución salina alcalina, que contiene solución salina al 0.9% con hidróxido de sodio (NaOH) al 0.1N, fue administrada diariamente por vía subcutánea (SC) y se hicieron cortes temporales para generar los grupos de estudio para el protocolo. Al primer día de tratamiento (T3_{1d}), al tercer día de tratamiento (T3_{3d}) y al décimo día de tratamiento (T3_{10d}). Adicional a esto se formaron grupos control administrando la solución vehículo por vía subcutánea, de solución salina alcalina (solución salina 0.9% con NaOH al 0.1N) diariamente, creando los mismos grupos temporales al primer día de administración (V_{1d}), al tercer día de tratamiento (V_{3d}) y al décimo día de tratamiento (V_{10d}). Los experimentos fueron realizados 24 horas posteriores a la última administración de T3 o Vehículo.

Se crearon los siguientes grupos de estudio.



6.3. Cuantificación de hormona tiroidea para asegurar el estado hipertiroideo.

Como punto final, las ratas de los grupos experimentales antes mencionados fueron anestesiadas y sometidas a una toracotomía para visualizar el corazón, posterior a esto se utilizó una jeringa hipodérmica de 10ml. para ingresar directamente en la aurícula derecha y tomar la suficiente sangre para el estudio, la sangre fue inmediatamente centrifugada a 3200 revoluciones por 15 minutos para separar los componentes celulares de la sangre, se obtuvieron alícuotas de al menos 3 ml. de suero y fue almacenado a -20°C hasta el día en que se realizó el estudio, cuando se obtuvieron todas las muestras de todos los grupos experimentales, se realizó la cuantificación de hormonas tiroidea T3, T4, sus fracciones unidas a proteínas y libres, además de TSH, el análisis se realizó por quimioluminiscencia convencional, el cual está disponible comercialmente.

6.4. Valoración de variables fisiológicas por medio del modelo órgano aislado.

Las ratas utilizadas para el modelo de órgano aislado también fueron tratadas de acuerdo a los grupos de experimentación ya mencionados, estas ratas se les administro pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (i.p.) en dosis de 50 mg/Kg hasta lograr el plano profundo de anestesia, una vez anestesiadas, fueron sacrificadas por decapitación utilizando una guillotina, se realizó rápidamente una toracotomía bilateral para dejar al descubierto los órganos de la caja torácica, la

aorta torácica fue extraída y sumergida en solución de Krebs-Bicarbonato (SKB) cuidadosamente para evitar dañar el endotelio vascular, para el caso de los experimentos con endotelio, una vez en la solución de Krebs la aorta fue limpiada de tejido conectivo y cortada transversalmente en anillos de 4 a 5 mm. En otros experimentos sin endotelio el endotelio fue retirado mediante la frotación del interior del vaso sanguíneo con una pinza pequeña de manera cuidadosa para evitar dañar la capa muscular. Los anillos aórticos para ambos casos fueron colocados en cámaras de órgano aislado los cuales contenían 10ml. de solución de Krebs-Bicarbonato. Además de estar regulados con un baño constante externo de agua caliente a una temperatura constante de 37°C a un pH de 7.4 y con un constante burbujeo de gas carbógeno (con 95% O₂ y 5% CO₂). Para establecer un nivel basal de tensión isométrica los anillos aórticos fueron sujetos con ganchillos de acero inoxidable uno inferior e interno a la cámara de órgano aislado fijo a él y otro superior el cual se conecta a un transductor de tensión (MP 100, Biopac Systems, Inc.; California, USA) que a su vez está conectado a un sistema de adquisición de datos que contiene un software específico para el registro de tensión AcqKnowledge (MP100WSW, Biopac Systems, Inc.). Todos los anillos aórticos fueron sometidos a un periodo de estabilización, estableciendo un estado isométrico con una tensión inicial de 2 gramos, posterior a esto se administrò directamente a la cámara de órgano aislado una sola administración de fenilefrina de 1x10⁻⁶M, hasta llegar al grado máximo de contracción y obtener una meseta lavando posteriormente con solución de Krebs-bicarbonato, hasta llegar al grado basal, este procedimiento se repitió por tres ocasiones y en la tercera ocasión se administró acetil colina en concentración de 1x10⁻⁶M directamente a la cámara una vez alcanzado el estado

de meseta, hasta ver el grado máximo de relajación, se consideró anillos con endotelio aquellos que presentaron una relajación $\geq 70\%$ con y sin endotelio aquellos que tuvieron $\leq 20\%$ de relajación con respecto a la meseta.

6.5. Diseño experimental

6.5.1. Curvas acumulativas concentración-respuesta contráctil a fenilefrina (agonista alfa1 adrenérgico).

Las aortas torácicas obtenidas de las ratas tratadas con T3 y con vehículo de acuerdo a los grupos experimentales antes mencionados. Tanto en experimentos con endotelio y sin endotelio se realizaron curvas acumulativas concentración-respuesta contráctil a fenilefrina que es un agonista selectivo a receptor adrenérgico α acoplado a proteínas G, posterior al periodo de estabilización al llegar al grado basal y mantenerlo estable por 30 minutos, se administraron dosis crecientes consecutivas y sin efectuar lavados (acumulativas) de fenilefrina en concentración de $1 \times 10^{-9} \text{M}$ hasta $1 \times 10^{-4} \text{M}$.

6.6. Estudio histológico valoración de variables morfométricas.

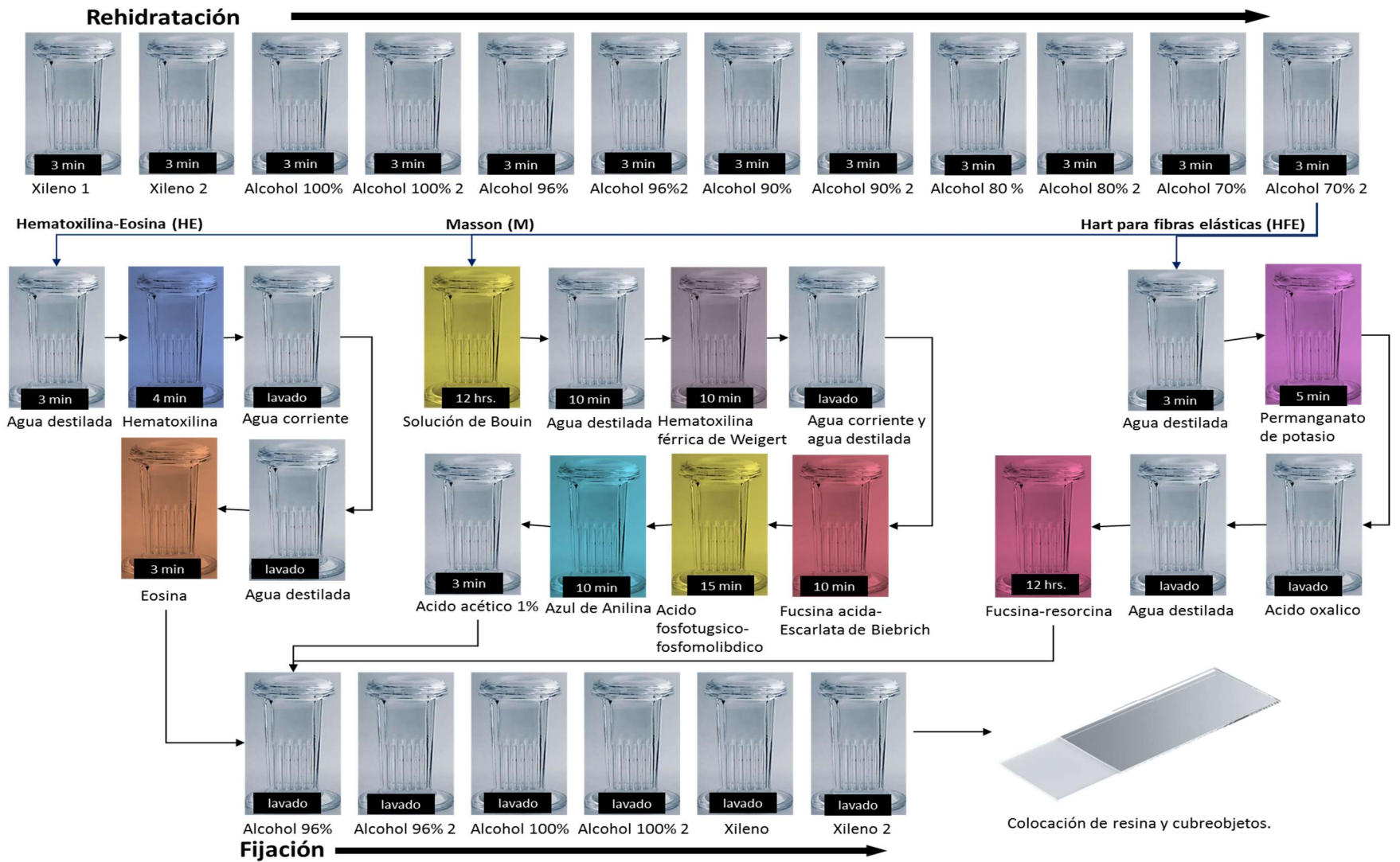
Ratas de los grupos de experimentación ya mencionados, (T3_{1d}, T3_{3d}, T3_{10d}, V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}), fueron anestesiadas y sacrificadas por método de decapitación con guillotina, se realizó una toracotomía y se extrajo su aorta torácica, esta es colocada en solución de Krebs y limpiada de tejido conectivo, posteriormente se coloca en frascos con solución de formaldehído al 4% diluido en solución salina al 0.9% para ser fijado, después se colocan las aortas en canastillas de parafinado y se procede a realizar una deshidratación colocando las aortas directamente en alcoholes de menor concentración hasta mayor concentración de la siguiente manera durante 1 hora en cada concentración: 70%, 80%, 90%, 96%¹, 96%², al 100%¹ y 100%², al final se colocan en xileno absoluto, posterior a esto las aortas ya deshidratadas pasan al proceso de parafinado, las aortas que están contenidas en canastillas de parafinado ya deshidratadas son sacadas del butanol 2 y colocadas en parafina ya disuelta en un horno de temperatura constante a 56°C, pasa por 2 baños de parafinado (Paraplast 1 y 2) cada uno por dos horas, posterior a esto se hacen cubos de parafina con moldes metálicos cuadrados de una pulgada por una pulgada, la aorta es extraída de la canastilla de parafinado y colocada en el centro del cubo de parafina, se dejan ahí hasta que la parafina este completamente fría aproximadamente 12 a 24 horas. Posterior a esto se realizan cortes con micrótomo de 7 micras y los cortes se colocan en un baño caliente a 40°C para ser colocados en portaobjetos alrededor de 3 o 4 cortes por laminilla, posterior a esto se pasa a realizar tinciones. Se realizaron 3 tinciones, Hematoxilina-Eosina, Tinción tricromica de Masson y tinción de Hart para laminas elásticas. Se colocaron cubre objetos y

se dejaron secar por al menos una semana. El análisis se realizó mediante microscopio de alta resolución el cual se encuentra conectado a una cámara digital (SONY, ExwaveHAD), conectada a su vez a una computadora estándar (sistema de computadora IBM).

Las variables morfométricas fueron analizadas en un software IMAGE PRO PLUS, en una computadora IBM estándar. Se realizaron 3 mediciones en campos ubicados de acuerdo al sentido de las manecillas del reloj por cada anillo rotando el sentido para evitar sesgos por elección de campo y se cuantificaron 3 anillos por cada rata, se tomó un número de 5 ratas por cada uno de los 6 grupos experimentales (T3_{1d}, T3_{3d}, T3_{10d}, V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}), esto realizado para cada tinción, los estudios cuantitativos realizados fueron los siguientes:

Variables evaluadas	Numero de núcleos de células musculares lisas
	Grosor de las tunicas Íntima/media.
	Grosor de laminas elásticas
	Numero de laminas elásticas
	Densidad óptica de las laminas elásticas
	Numero de discontinuidades

Esquema 4: tinciones realizadas:



6.7. Determinación de las proteínas akt, pakt, erk1/2 y perk1/2, en las aortas torácicas de ratas por método de western blot.

Para completar los objetivos propuestos en este estudio se usó la técnica de Western Blot para el análisis molecular de las proteínas Akt, pAkt, p44/42 MAPK (ERK1 /2), P p44/42 MAPK (pERK 1 /2) se utilizó las aortas provenientes de ratas tratadas y sus respectivos controles (T3_{1d}, T3_{3d}, T3_{10d}, V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}).

Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación. Se extrajo la aorta torácica, se limpió de tejido conectivo y se colocó en tubos Eppendorf que contenían 1 ml de buffer de homogenizado (TRIS 0.1 M a pH 7.4) adicionado con una mezcla de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini y de fosfatasas phosStop Marca Roche).

Los tejidos fueron triturados en un mortero con nitrógeno líquido y luego con un homogeneizador (Polytron) a 12000 rpm aproximadamente hasta observar que todo el tejido sea triturado. Las muestras pasaron por un proceso de sonicación durante 20 minutos a 4°C. Después de esto los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se toma el sobrenadante y se hacen alícuotas de 100µL y la pastilla precipitada es desechada. Las alícuotas obtenidas fueron guardadas a -80 °C en un refrigerador REVCO hasta el momento de realizar los estudios moleculares.

Antes de realizar la electroforesis las alícuotas de 100 μ L se mezclaron con 11 μ L de buffer de carga el cual fue mezclado con β -Mercaptoetanol y se colocaron a una temperatura de 100°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas.

Posterior a esto se realizó la determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry con una alícuota de cada muestra.

6.7.1. Electroforesis.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%. Para todos los geles se sembraron 100 μ g de proteína utilizando además 2.5 μ L de marcador de peso molecular PageRuler ThermoScientific. La electroforesis se realizará en un equipo MiniProtean tetra cell de Bio-Rad a 88V por un periodo de 2 horas 30 minutos

6.7.2. Transferencia

Al terminar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Inmobilon-P) empleando un sistema semiseco trans-blot SD Electrophoeric Transfer Cell de Bio-Rad. Las membranas (5 cm x 7.5 cm) previamente se activan exponiéndolas a MeOH a 4°C durante al menos 5 minutos, para después pasarlas con buffer de transferencia suficiente para que queden completamente húmedas. De igual forma en un recipiente se humedecen papeles de filtro (2 filtros por cada

membrana), en buffer de transferencia a 4°C. Terminada la electroforesis, se colocó uno de los papeles filtro sobre la base del equipo de transferencia, la cual corresponde a la parte del ánodo. Sobre el papel filtro se colocó la membrana de PVDF, luego el gel de poliacrilamida y por último se colocó el otro papel filtro, procurando no dejar burbujas entre ambos. Finalmente se coloca la tapa la cual funciona como el cátodo del sistema. Las condiciones de transferencia fueron de 21V durante 50 minutos.

6.7.3. Bloqueo de membranas e incubación con anticuerpos.

Una vez terminada la transferencia, se retiraron las membranas y se colocaron con una solución de albumina sérica bovina al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente las membranas se incubaron durante toda la noche en agitación constante a 4°C con TBST de manera separada con los siguientes anticuerpos:

- Akt1(62kDa)- Anti Akt rabbit monoclonal IgG, dilución 1:2000
- β -Actina (43kDa)-Anti β -Actina goat policlonal IgG a una dilución 1:3000.
- p44/42MAPK (Erk1/2) (44-42kDa)-Anti ERK rabbit monoclonal IgG a una dilución 1:2500.
- P p44/42MAPK (Erk1/2) (44-42kDa)-Anti pERK rabbit monoclonal IgG a una dilución 1:4000.
 - Marca Cell Signalling Technology
- pAkt1 (62kDa)- Anti pAkt rabbit policlonal IgG a una dilución 1:400.
 - Marca Santa Cruz Biotechnology

Al día siguiente se lava 3 veces con TBS-T durante 10 min, cada lavado, y se le agrega el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Para Akt, y pErk se utiliza antirabbit a una dilución de 1: 15,000 (Invitrogen), Para pAkt, Erk se utiliza antirabbit a una dilución de 1: 10,000 (Invitrogen) y para β -Actina se utilizó antigoat a una dilución de 1: 10,000 (Invitrogen). Al término de esto se repitieron 3 lavados con TBST durante 10 minutos cada lavado y se realiza el revelado.

6.7.4. Revelado mediante quimioluminiscencia.

Las membranas se incubaron con el sustrato de quimioluminiscencia (luminol), posteriormente se colocan dentro de un casete de revelado, en presencia de una película Amersham Hiperfilm ECL, la exposición se realiza a diferentes tiempos según la proteína de interés. Para el revelado de la película se emplea una solución reveladora (Kodak); luego un baño de paro (Agua) y finalmente una solución fijadora (Kodak). Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3200C. La lectura de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (Quantity One 1-D Image Analysis Software, Bio-Rad) donde se hizo un análisis densitométrico y se normalizó con la intensidad de la β -Actina (control de carga) por medio de la siguiente fórmula:

Índice= Densidad de la Proteína / Densidad de β -actina.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía simple, de una vía de medidas repetidas y de dos vías con sus pruebas post hoc Tukey o Bonferroni respectivamente, en los datos que lo permitieron, en un software Graphpad Prism version 6, considerando como significancia estadística a una $p < 0.005$.

8. Resultados.

El tratamiento con T3 ocasionó pérdida de masa corporal e incremento de T3 sérica en las ratas. La masa corporal de las ratas tratadas con T3 fue significativamente menor - a partir del segundo, hasta el décimo día - que la de las ratas controles temporales (figura 1). También, las ratas tratadas con T3 redujeron la masa corporal y las tratadas con vehículo la aumentaron, a partir del segundo día, en comparación con sus valores respectivos al inicio de los tratamientos (día 0; figura 1). Los niveles séricos de T3 total y libre aumentaron, y los de T4 total y libre disminuyeron, significativamente, en las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} en relación respectiva con los grupos V_{1d}, V_{3d} y V_{10d} (figura 2). En las ratas T3_{10d}, sin embargo, las concentraciones séricas de T3 total y libre disminuyeron de forma significativa en comparación con los valores de los grupos T3_{1d} y T3_{3d} (figura 2).

8.1. Valoración del estado hipertiroideo

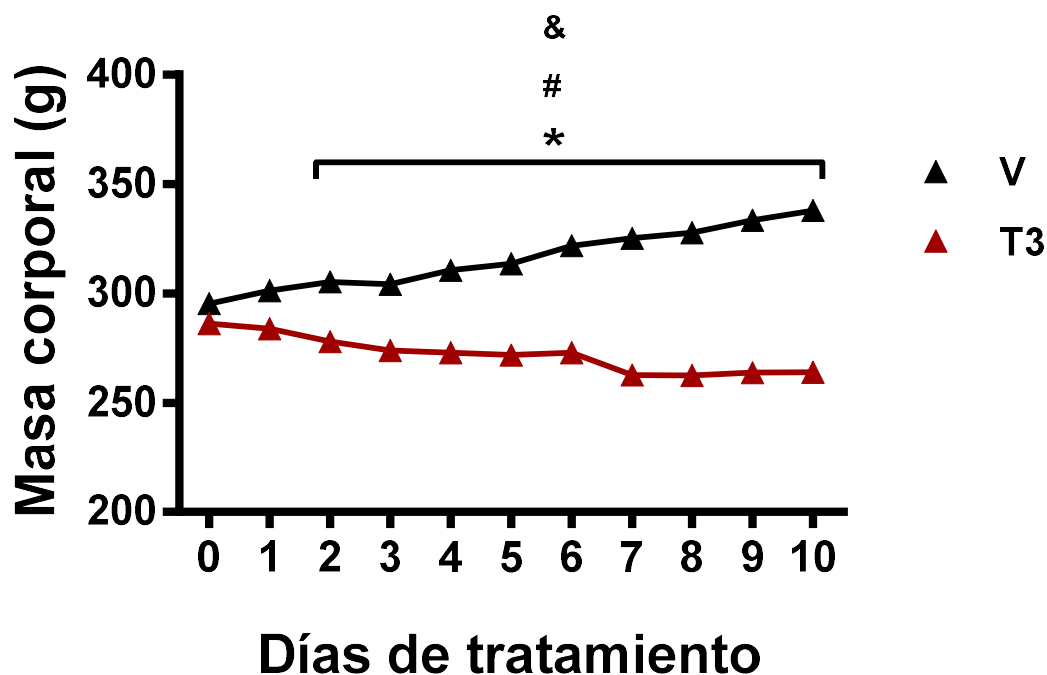


Figura 1. Valores de masa corporal de ratas tratadas con triyodo-L-tironina (T3) o con vehículo (V). El hipertiroidismo agudo fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de T3 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en solución de 0.5 mM NaOH en 0.9% de NaCl) por 10 días. Los animales controles fueron inyectados diariamente con el vehículo (V, 0.1 ml/100g) durante 10 días. Los datos representan las medias \pm EEM (n = 10-22). *P < 0.05 T3 vs. V (ANOVA dos vías). #P < 0.05 vs. T3 día 0, &P < 0.05 vs. V día 0 (ANOVA medidas repetidas).

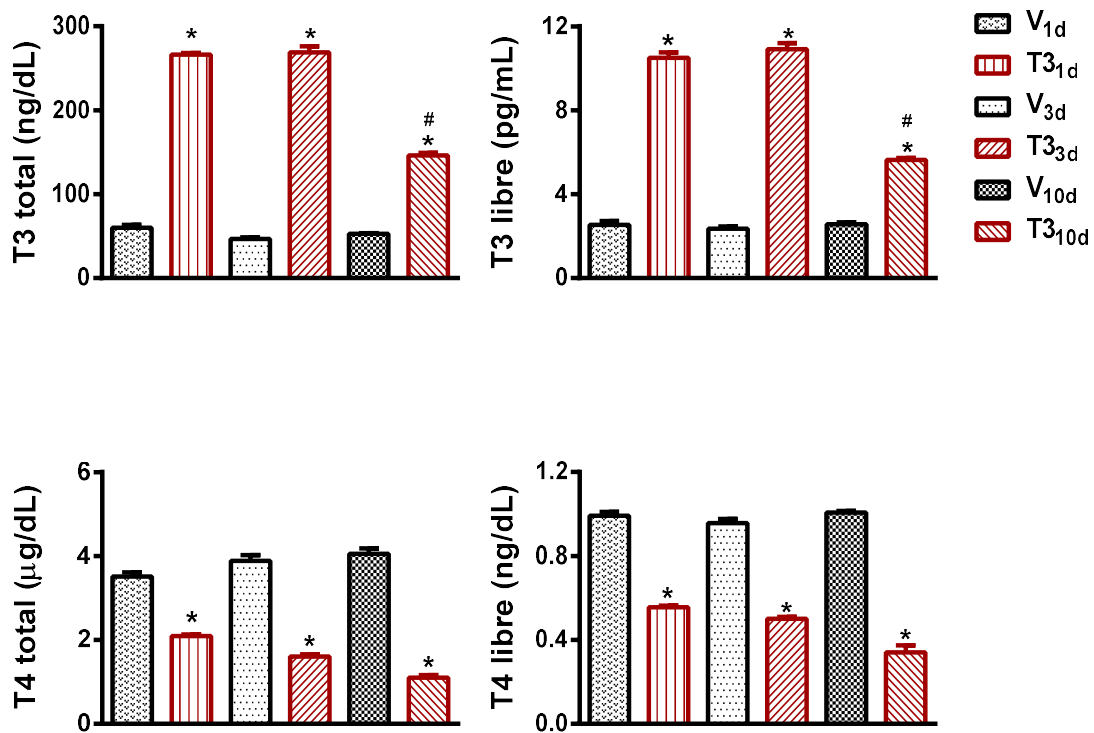


Figura 2. Comparación de los valores de las hormonas triyodo-L-tironina (T3, total y libre) y tetrayodo-L-tironina (T4, total y libre) de ratas tratadas mediante inyección subcutánea diaria con T3 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por 1 (T₃_{1d}), 3 (T₃_{3d}) y 10 (T₃_{10d}) días o vehículo (V; NaOH 0.5 mM, 0.1 ml/100g) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los datos son las medias \pm EEM (n = 4). *P<0.05 vs. V respectivo en el tiempo; #P<0.05 vs. T₃_{1d} o T₃_{3d}. (ANOVA una vía).

8.2. Depresión de las respuestas contráctiles del agonista adrenérgico α_1 , fenilefrina, en tejidos aórticos obtenidos de ratas tratadas con T3.

El tratamiento con T3 por tres y diez días, disminuyó de manera significativa las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina en anillos aórticos con y sin endotelio, en relación con los correspondientes resultados obtenidos con los grupos de ratas V_{3d} y V_{10d} (figuras 4 y 5). El tratamiento $T3_{1d}$ no modificó significativamente las respuestas contráctiles de la fenilefrina en anillos aórticos con (figura 3A) y sin (figura 3B) endotelio, en relación con los respectivos controles. Las CACR para la fenilefrina en los anillos aórticos de las ratas $T3_{1d}$, y de las ratas V_{1d} , fueron claramente desplazadas hacia la izquierda con la denudación del endotelio (figura 3C). Cuando se confrontaron las curvas concentración-respuesta de la fenilefrina en anillos aórticos con y sin endotelio de los grupos $T3_{3d}$ o $T3_{10d}$ por una parte, y V_{3d} o V_{10d} por otra (figuras 4C y 5C), se observó que la actividad contráctil en los anillos sin endotelio fue similar a la de los tejidos con endotelio en los grupos $T3_{3d}$ y $T3_{10d}$, y significativamente mayor en los grupos V_{3d} y V_{10d} . Cabe hacer notar que en los grupos $T3_{3d}$ y $T3_{10d}$, las CACR de la fenilefrina en los anillos aórticos sin endotelio no solamente no difirieron de las obtenidas en los anillos aórticos con endotelio, sino también continuaron francamente deprimidas en comparación con los controles respectivos V_{3d} o V_{10d} (figuras 4C y 5C). Es decir, la presencia del endotelio – en particular de un aumento de su función inhibidora del tono vascular - no es el factor determinante que permita explicar la depresión de las respuestas contráctiles de la fenilefrina en los anillos aórticos de las ratas $T3_{3d}$ y $T3_{10d}$ (ver Discusión).

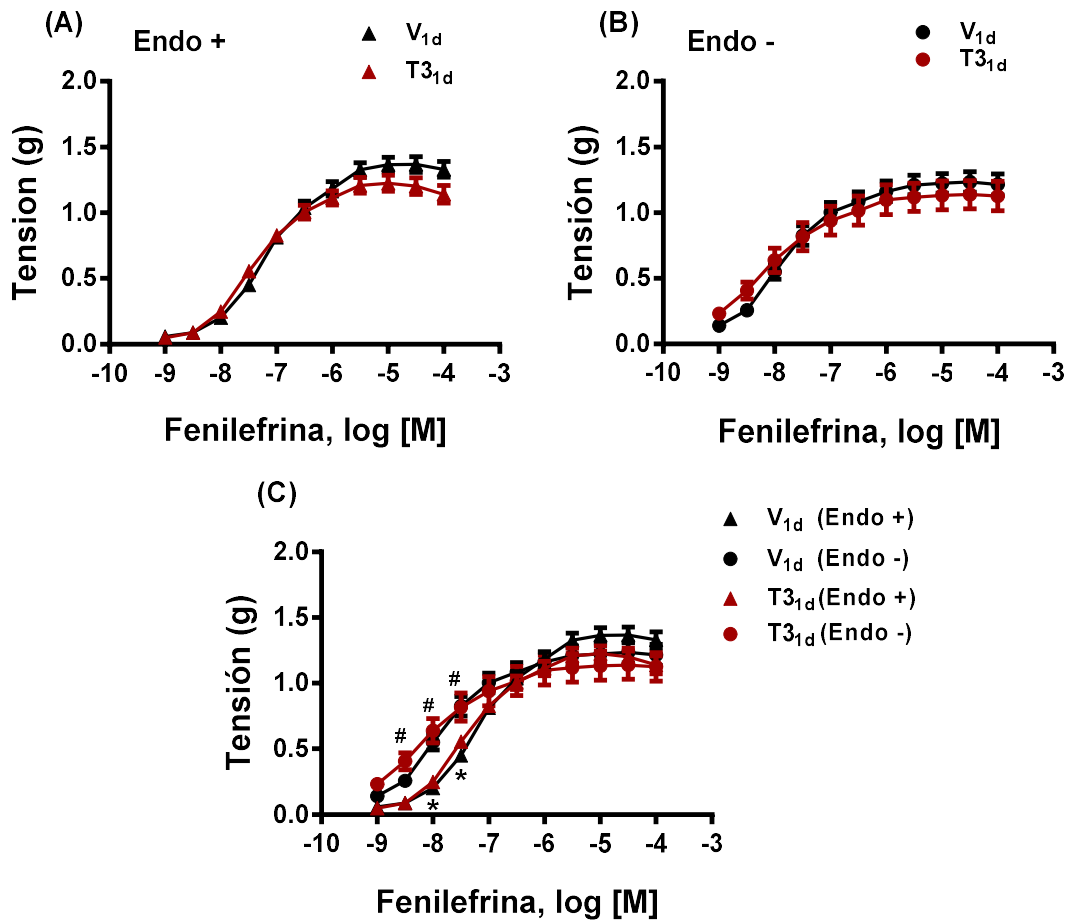


Figura 3. Comparación de las curvas acumulativas concentración-respuesta de fenilefrina en segmentos anulares de aortas con endotelio intacto (Endo +) y denudado (Endo -) provenientes de ratas tratadas por vía subcutánea con triyodo-L-tironina (T3, 500 μ g/kg) un día (T_{31d}) o con vehículo (V, NaOH 0.5 mM, 0.1 ml/100g) un día (V_{1d}). Se compararon las curvas concentración-respuesta de la fenilefrina de la siguiente forma: (A) T_{31d} (Endo +) vs. V_{1d} (Endo +); (B) T_{31d} (Endo -) vs. V_{1d} (Endo -); (C) T_{31d} (Endo +) vs. T_{31d} (Endo -), y V_{1d} (Endo +) vs. V_{1d} (Endo -). Las respuestas contráctiles representan gramos de tensión desarrollada. Los datos son las medias \pm EEM (n = 16-24). *P<0.05 V_{1d} (Endo +) vs. V_{1d} (Endo -); #P<0.05 T_{31d} (Endo +) vs. T_{31d} (Endo -). (ANOVA dos vías).

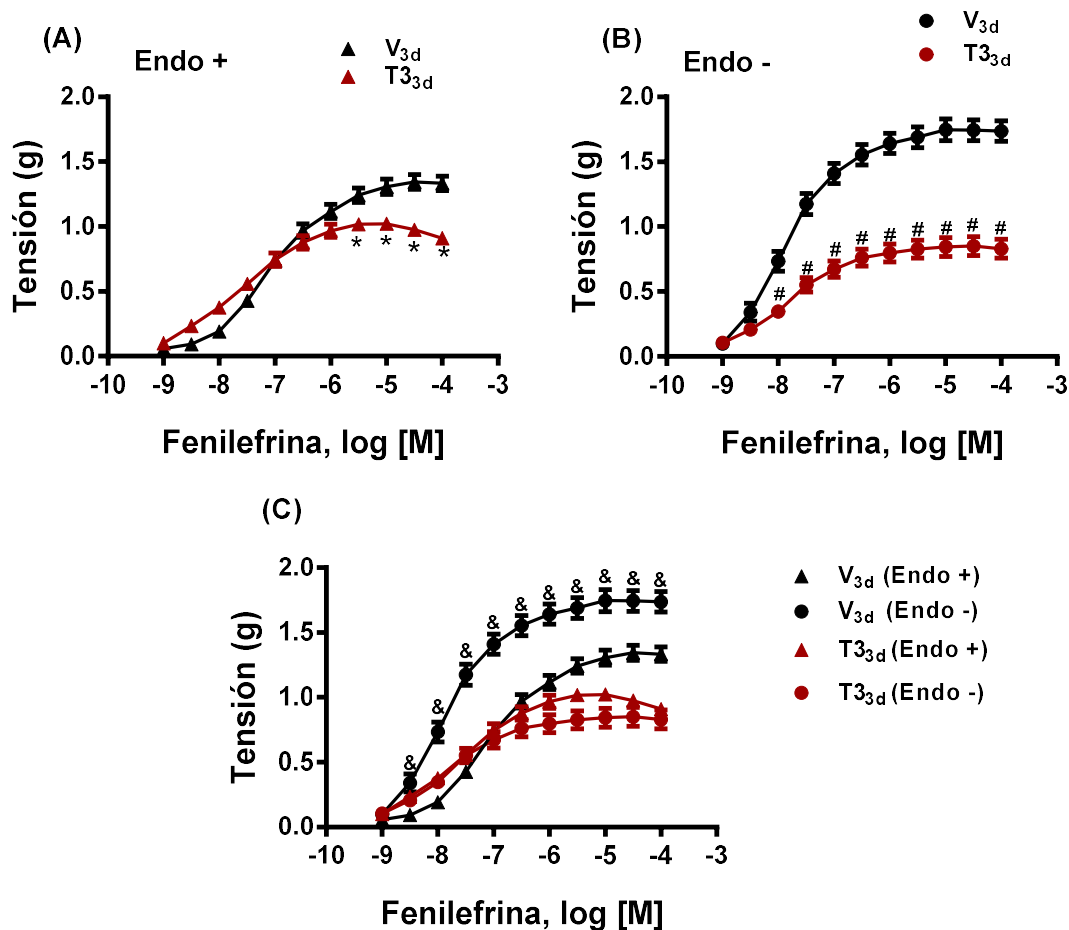


Figura 4. Comparación de las curvas acumulativas concentración-respuesta de fenilefrina en segmentos anulares de aortas con endotelio intacto (Endo +) y denudado (Endo -) provenientes de ratas tratadas por vía subcutánea diariamente con triyodo-L-tironina (T3, 500 μ g/kg) por 3 días (T_{3d}) o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM, 0.1 ml/100g) por 3 días (V_{3d}). Se compararon las curvas concentración-respuesta de la fenilefrina de la siguiente forma: (A) T_{3d} (Endo +) vs. V_{3d} (Endo +); (B) T_{3d} (Endo -) vs. V_{3d} (Endo -); (C) T_{3d} (Endo +) vs. T_{3d} (Endo -), y V_{3d} (Endo +) vs. V_{3d} (Endo -). Las respuestas contráctiles representan gramos de tensión desarrollada. Los datos son las medias \pm EEM (n = 16-24). *P<0.05 T_{3d} (Endo +) vs. V_{3d} (Endo +); #P<0.05 T_{3d} (Endo -) vs. V_{3d} (Endo -); &P<0.05 V_{3d} (Endo +) vs. V_{3d} (Endo -). (ANOVA dos vías).

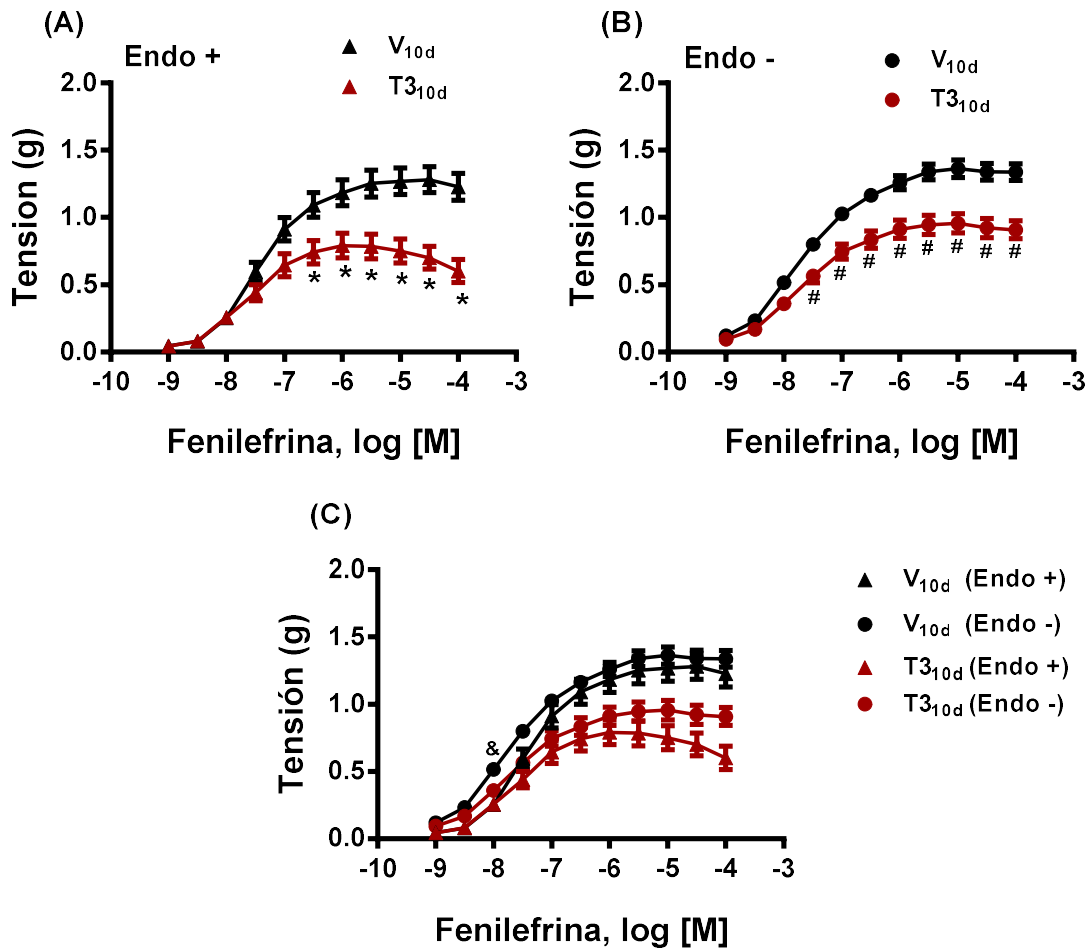


Figura 5. Comparación de las curvas acumulativas concentración-respuesta de fenilefrina en segmentos anulares de aortas con endotelio intacto (Endo +) y denudado (Endo -) provenientes de ratas tratadas por vía subcutánea diariamente con triyodo-L-tironina (T3; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por 10 días ($T3_{10d}$) o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM, 0.1 ml/100g) por 10 días (V_{10d}). Se compararon las curvas concentración-respuesta de la fenilefrina de la siguiente forma: (A) $T3_{10d}$ (Endo +) vs. V_{10d} (Endo +); (B) $T3_{10d}$ (Endo -) vs. V_{10d} (Endo -); (C) $T3_{10d}$ (Endo +) vs. $T3_{10d}$ (Endo -), y V_{10d} (Endo +) vs. V_{10d} (Endo -). Las respuestas contráctiles representan gramos de tensión desarrollada. Los datos son las medias \pm EEM (n = 16-24). * $P < 0.05$ $T3_{10d}$

(Endo +) vs. V_{10d} (Endo +); #P<0.05 T3_{10d} (Endo -) vs. V_{10d} (Endo -); &P<0.05 V_{10d} (Endo +) vs. V_{10d} (Endo -). (ANOVA dos vías).

8.3. Modificaciones histomorfométricas ocasionadas por el tratamiento a corto plazo con T3.

Las secciones teñidas con H-E de los grupos controles mostraron las tres tunicas típicas de la aorta torácica: la túnica íntima, constituida por el endotelio, una lámina basal y una capa conjuntiva sub-endotelial; la túnica media, compuesta por fibras musculares lisas dispuestas de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno; y la túnica adventicia, formada por tejido conjuntivo laxo organizado con fibroblastos y colágena (figura 6).

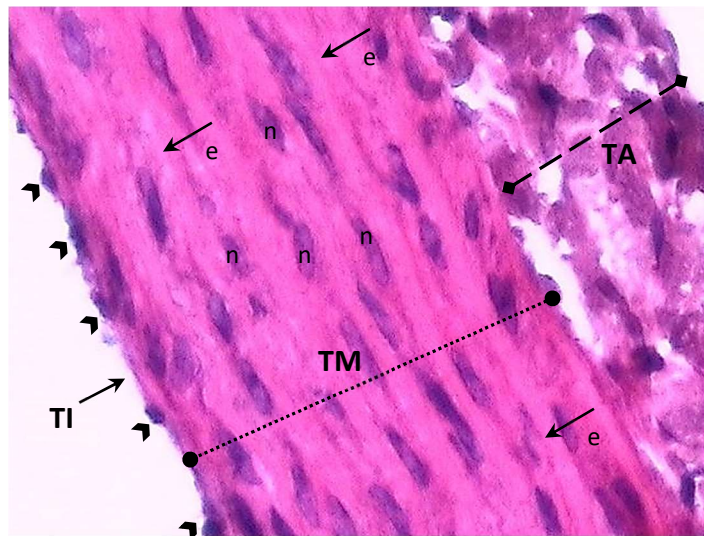


Figura 6. Sección histológica representativa de la pared de la aorta torácica de la rata, teñida con hematoxilina y eosina (×40). Túnica íntima (TI), células endoteliales (^), túnica media (TM), láminas elásticas (e →), núcleos de células musculares lisas (n), túnica adventicia (TA).

Todas las ratas de los grupos hipertiroideos presentaron alteraciones en la organización de los núcleos de las células de músculo liso de la túnica media. En los cortes de las aortas de las ratas tratadas con vehículo (V_{1d} , V_{3d} , V_{10d}), los núcleos de las células musculares lisas muestran una acomodación característica en serie, con su eje mayor paralelo a las láminas elásticas (figura 7), mientras que en los cortes de las aortas de ratas tratadas con hormona tiroidea ($T3_{1d}$, $T3_{3d}$, $T3_{10d}$), ese orden se pierde: los núcleos cambian su orientación en relación con las láminas elásticas, incluso sobreponiéndose unos con otros (figura 7).

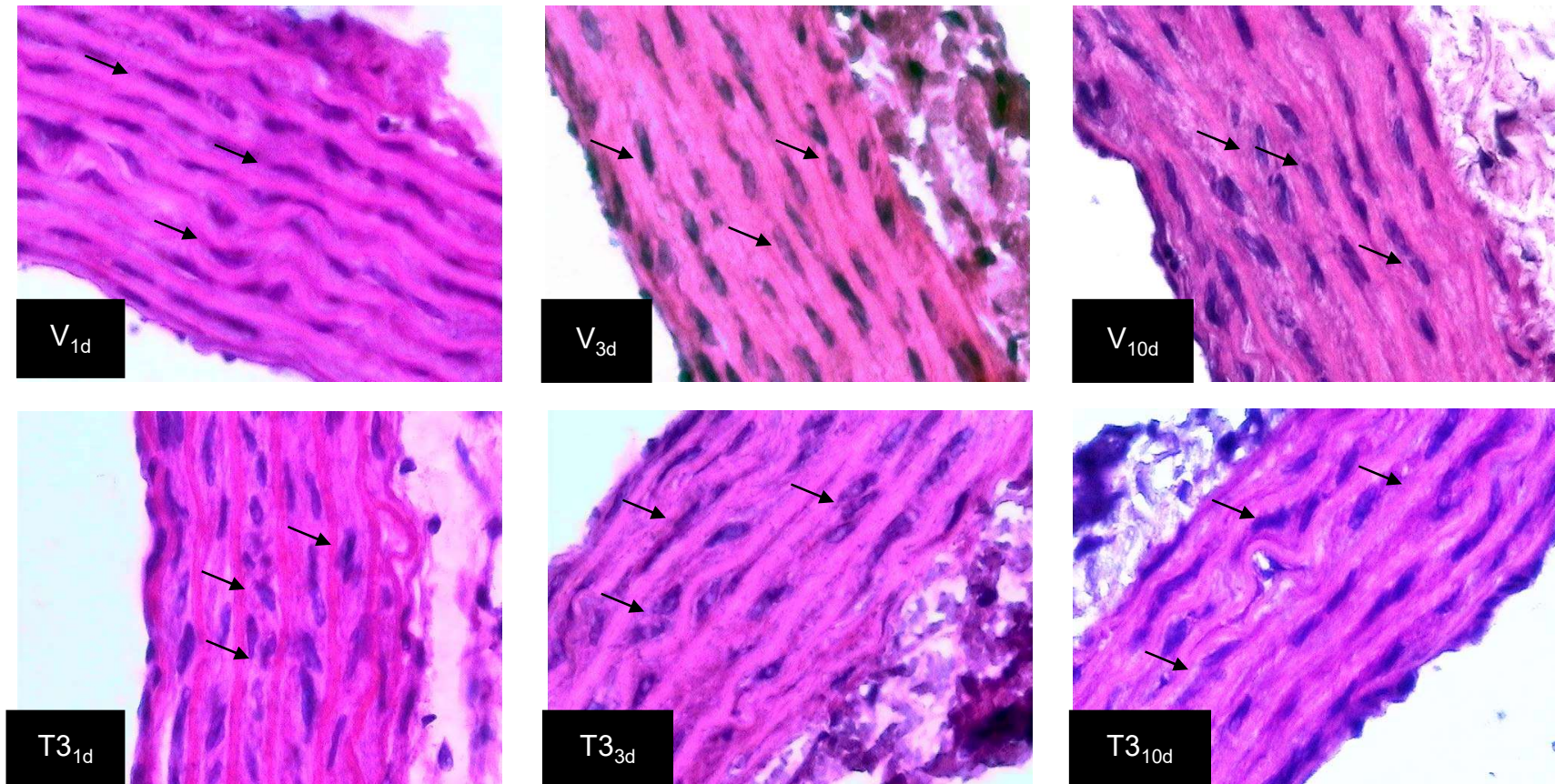


Figura 7. Comparación de las secciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina ($\times 40$), representativas de las paredes de las aortas torácicas de los grupos de ratas tratadas con triyodo-L-tironina (T3; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, s.c.) por 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM; 0.1 ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. En particular, se señalan los núcleos de las células de músculo liso (\rightarrow) presentes en la túnica media.

Las secciones teñidas con la tinción de Hart, mostraron el arreglo de las láminas elásticas de los diferentes grupos estudiados (figura 8). En los cortes de las aortas de las ratas controles (V_{1d} , V_{3d} , V_{10d}), las láminas elásticas se presentaron continuas y paralelas unas con otras, y cada lamina elástica se observó compacta y lineal, mientras que en los cortes de las aortas de ratas tratadas con hormona tiroidea ($T3_{1d}$, $T3_{3d}$, $T3_{10d}$), las láminas elásticas perdieron la definición precisa de sus bordes dispersándose (perdieron compactación), y en algunos casos se sobrepusieron unas con otras (figura 8). También fue observado, utilizando la tinción tricrómica de Masson, un aumento significativo del número de discontinuidades de las láminas elásticas en las túnicas medias de las aortas de ratas $T3_{1d}$, $T3_{3d}$ y $T3_{10d}$, en comparación adecuada con los grupos controles V_{1d} , V_{3d} , V_{10d} (figuras 9 y 10). En algunas de estas discontinuidades los núcleos de las células musculares lisas, se aglomeraron (figura 9). No se encontraron variaciones en las fibras de colágeno de las aortas torácicas de los grupos tratados con T3 en relación con sus controles temporales (figura 9).

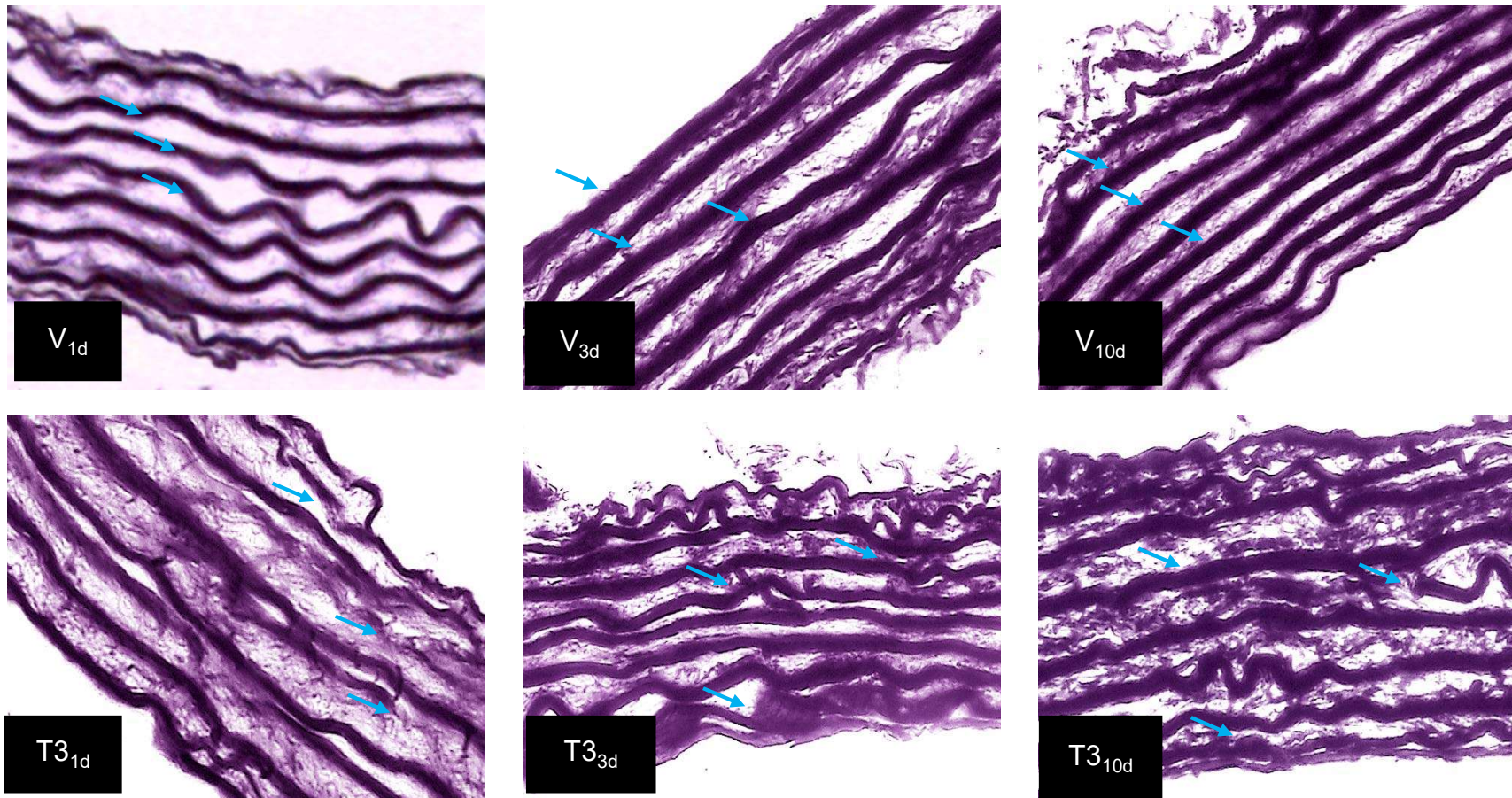


Figura 8. Comparación de las secciones histológicas teñidas con tinción de Hart para láminas elásticas ($\times 40$), representativas de las paredes de las aortas torácicas de los grupos de ratas tratadas con triyodo-L-tironina (T3; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, s.c.) por 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM; 0.1 ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Se señalan las láminas elásticas de la túnica media (\rightarrow).

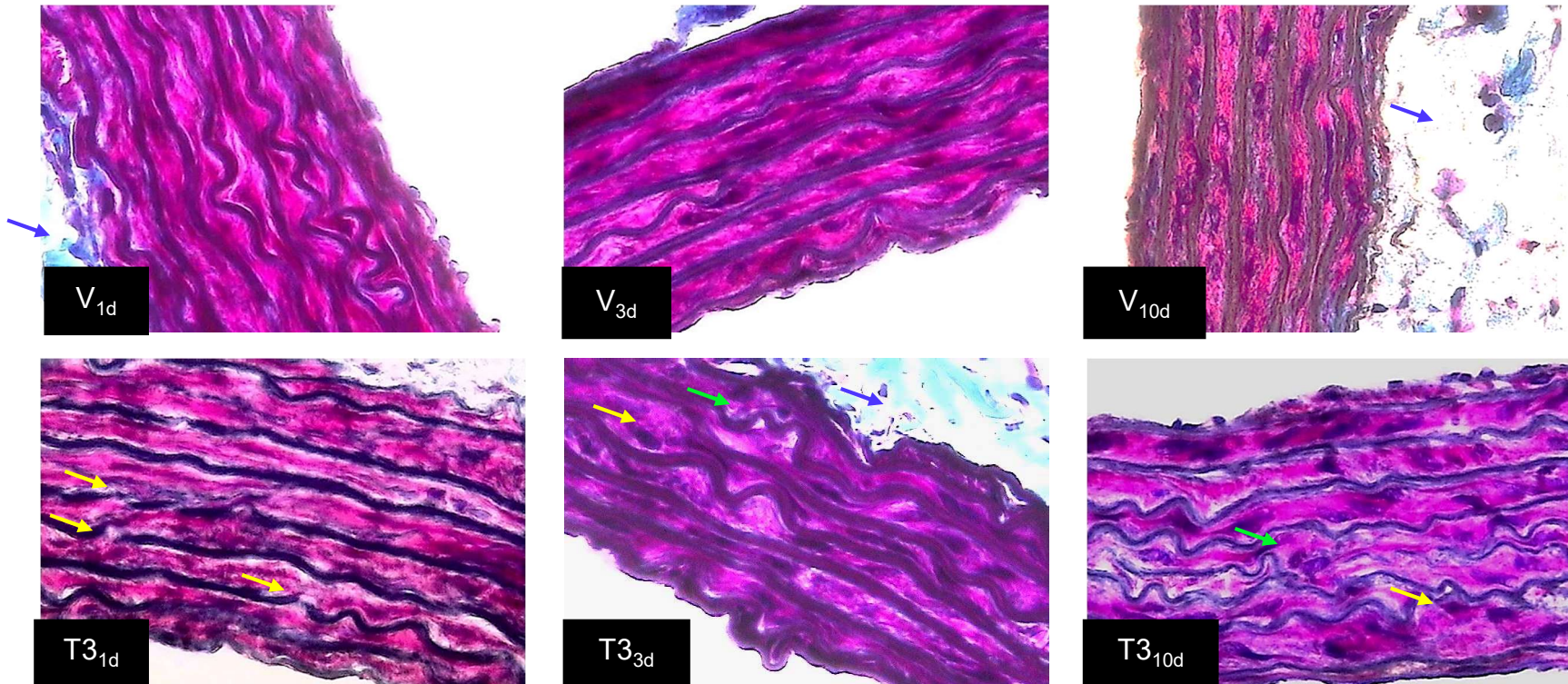


Figura 9. Comparación de las secciones histológicas de las paredes de las aortas torácicas teñidas con tinción tricrómica de Masson ($\times 400$), mostrando las fibras de colágeno entre las láminas elásticas aórticas de ratas tratadas con triodo-L-tironina (T3; $500 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, s.c.) por 1 ($T3_{1d}$), 3 ($T3_{3d}$) y 10 ($T3_{10d}$) días o con vehículo (V; $\text{NaOH } 0.5 \text{ mM}$; $0.1 \text{ ml}/100\text{g}$, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Se ilustran discontinuidades (\rightarrow) de las láminas elásticas en las túnicas medias de las aortas de ratas $T3_{1d}$, $T3_{3d}$ y $T3_{10d}$. También la aglomeración de núcleos de células musculares lisas (\rightarrow). Las fibras de colágeno permanecieron sin anomalías (\rightarrow).

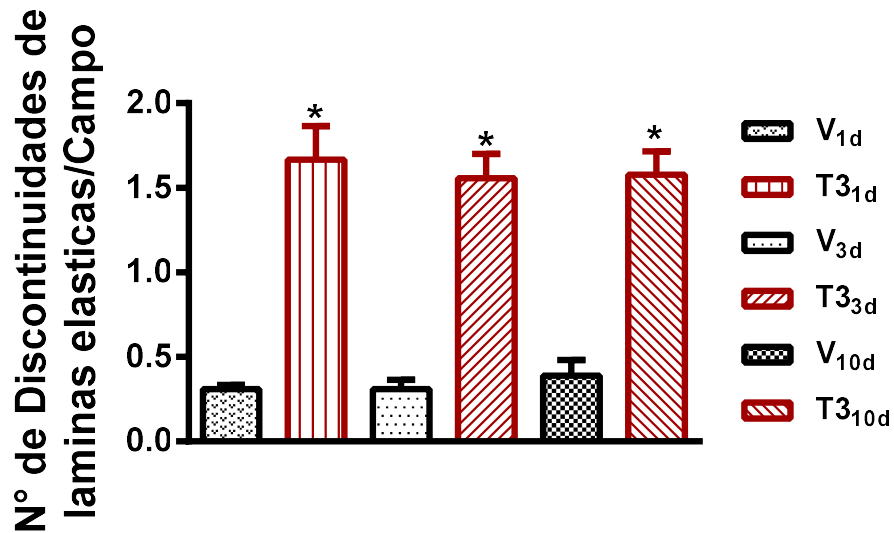


Figura 10. Comparación del número de discontinuidades de las láminas elásticas de las tunicas medias de las aortas torácicas aisladas de ratas con hipertiroidismo agudo. El estudio morfométrico se realizó con secciones histológicas, teñidas con tinción de Masson, de las paredes de las aortas torácicas obtenidas de ratas tratadas con triyodo-L-tironina (T3; 500 µg/kg/día, s.c.) por 1 (T_{31d}), 3 (T_{33d}) y 10 (T_{310d}) días o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM; 0.1 ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Se presentan las medias ± EEM (n = 45 secciones de 5 aortas). *P<0.05 vs. V temporal respectivo. (ANOVA una vía).

El espesor de las tnicas íntima/media de las aortas de los grupos hipertiroideos T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} permaneció inalterado al compararse con los respectivos controles (figura 11A). Destacadamente, el número de núcleos las células musculares lisas de la túnica media de las aortas de los grupos hipertiroideos T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} disminuyó en comparación con los controles V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}, de manera progresiva (figura 11B). Al respecto, no se apreciaron diferencias entre los grupos T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} (figura 11B). Cuando se compararon: (i) el número de láminas elásticas (figura 12A), (ii) el grosor de las láminas elásticas (figura 12B), y (iii) la densidad óptica de las láminas elásticas (figura 12C) de las aortas torácicas aisladas de los grupos T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} de manera correspondiente con los valores obtenidos con los grupos V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}, no se encontraron diferencias significativas.

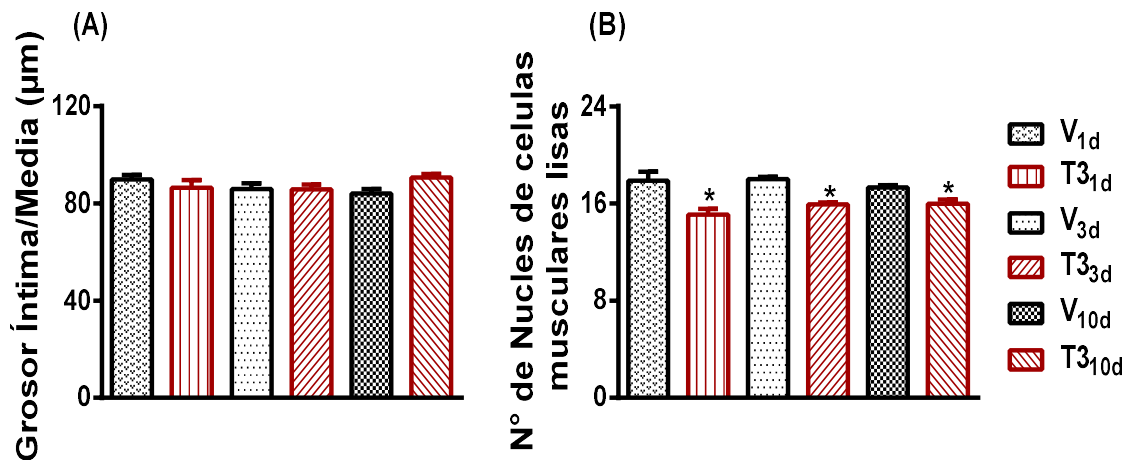


Figura 11. Morfometría de las paredes aórticas de ratas con hipertiroidismo agudo. El análisis cuantitativo se realizó con secciones histológicas, teñidas con hematoxilina y eosina, de las paredes de las aortas torácicas obtenidas de ratas tratadas con triyodo-L-tironina (T3; 500 µg/kg/día, s.c.) por 1 (T₃_{1d}), 3 (T₃_{3d}) y 10 (T₃_{10d}) días o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM, 0.1 ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. (A) Grosor Íntima/Media; (B) Número de núcleos de células musculares lisas. Las medias ± EEM (n = 45 secciones de 5 aortas) son presentados. *P<0.05 vs. V temporal respectivo. (ANOVA una vía).

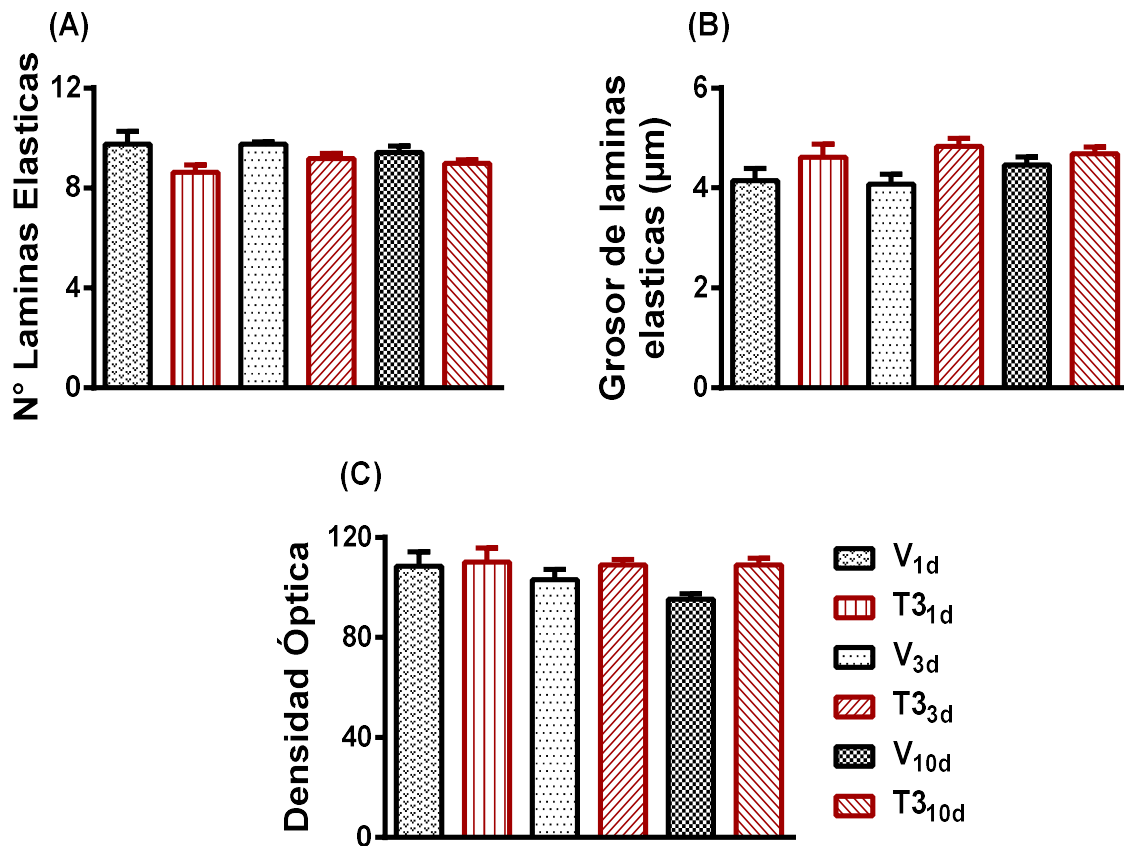


Figura 12. Morfometría de las paredes aórticas de ratas con hipertiroidismo agudo. El análisis cuantitativo se realizó con secciones histológicas, teñidas con tinción de Hart para láminas elásticas, de las paredes de las aortas torácicas obtenidas de ratas tratadas con triyodo-L-tironina (T3; 500 μg/kg/día, s.c.) por 1 (T₃_{1d}), 3 (T₃_{3d}) y 10 (T₃_{10d}) días o con vehículo (V; NaOH 0.5 mM, 0.1 ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. (A) Número de láminas elásticas de la túnica media; (B) Grosor de las láminas elásticas de la túnica media; (C) Densidad óptica de la túnica media. Se presentan las medias ± EEM (n = 45 secciones de 5 aortas). P no significativa. (ANOVA una vía).

8.4. El hipertiroidismo agudo y los niveles aórticos de Akt, p-Akt, ERK1/2 y p-ERK1/2.

Las expresiones de Akt y ERK1/2 (y sus formas fosforiladas: p-Akt, p-ERK1 y p-ERK2) en las aortas expuestas *in vivo* al tratamiento con T₃, son mostradas en las figuras 12 a 15. En las aortas torácicas de las ratas T₃_{1d}, T₃_{3d} y T₃_{10d}: ERK1, p-ERK1 y el cociente p-ERK1/ERK1, así como ERK2, p-ERK2 y p-ERK2/ERK2, fueron iguales a sus controles temporales V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}, respectivamente (figuras 13 y 14).

En las aortas torácicas de las ratas T₃_{1d} y T₃_{3d}, la expresión de Akt total fue similar a la de los controles V_{1d} y V_{3d}, pero se observó significativamente incrementada en el grupo T₃_{10d} comparado con V_{10d} (figura 15). Notablemente, los niveles de expresión de p-Akt y el cociente p-Akt/Akt disminuyeron en las aortas del grupo T₃_{1d}, no mostraron cambios los grupos T₃_{3d} y T₃_{10d} al compararse con los referidos controles temporales V_{1d}, V_{3d} y V_{10d} (figura 15).

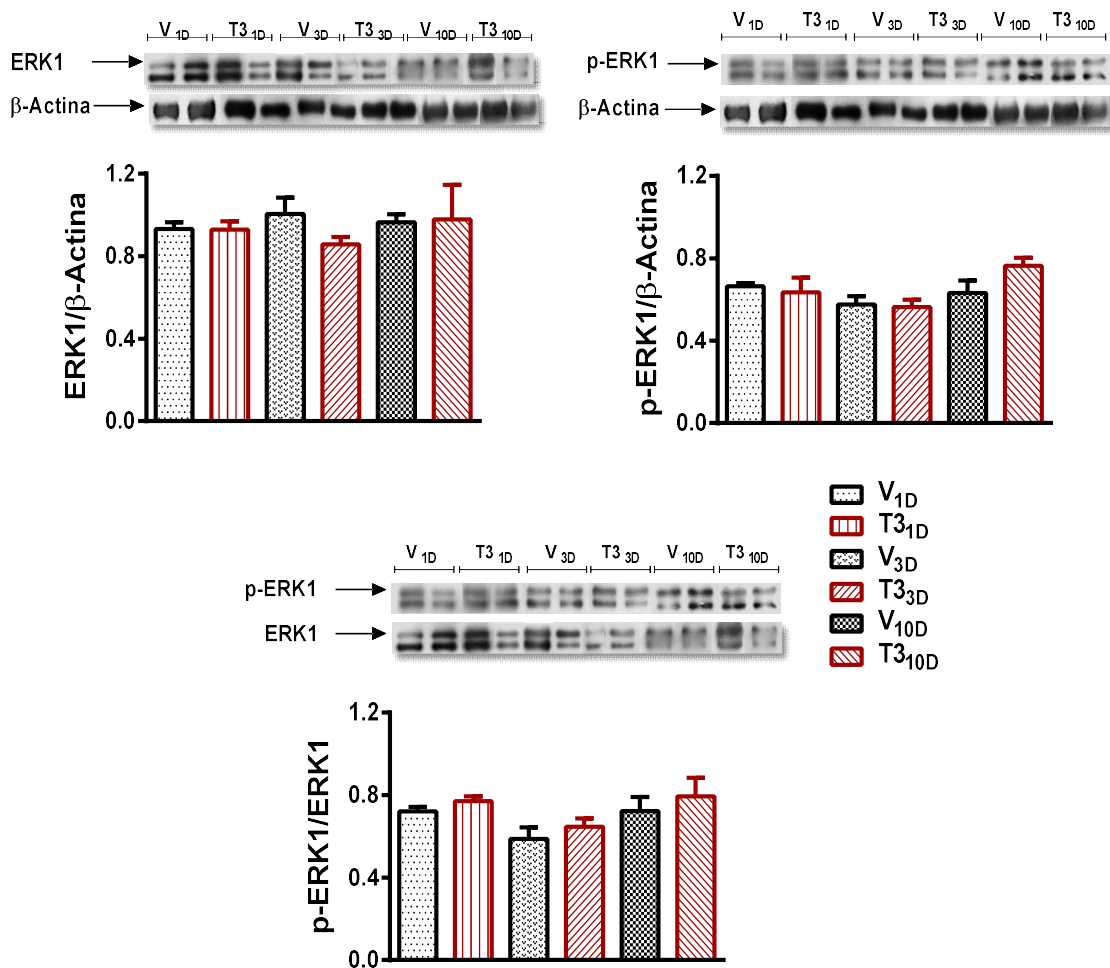


Figura 13. Análisis de inmunotransferencia Western para la proteína ERK1 y su forma fosforilada, p-ERK1, en las aortas torácicas aisladas de ratas con hipertiroidismo agudo. Este fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de triyodo-L-tironina (500 µg/kg) a las ratas por 1 (T_{31d}), 3 (T_{33d}) y 10 (T_{310d}) días. Los grupos controles recibieron el vehículo (V; 0.5 mM NaOH en 0.9% de NaCl, 0.1ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Se muestra un Western blot representativo arriba de cada gráfico. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante análisis densitométrico y normalizó con la correspondiente β-Actina. Además, se graficó el cociente p-ERK1/ERK1. Los valores son los promedios ± ESM (n = 4). P no significativa. (ANOVA una vía).

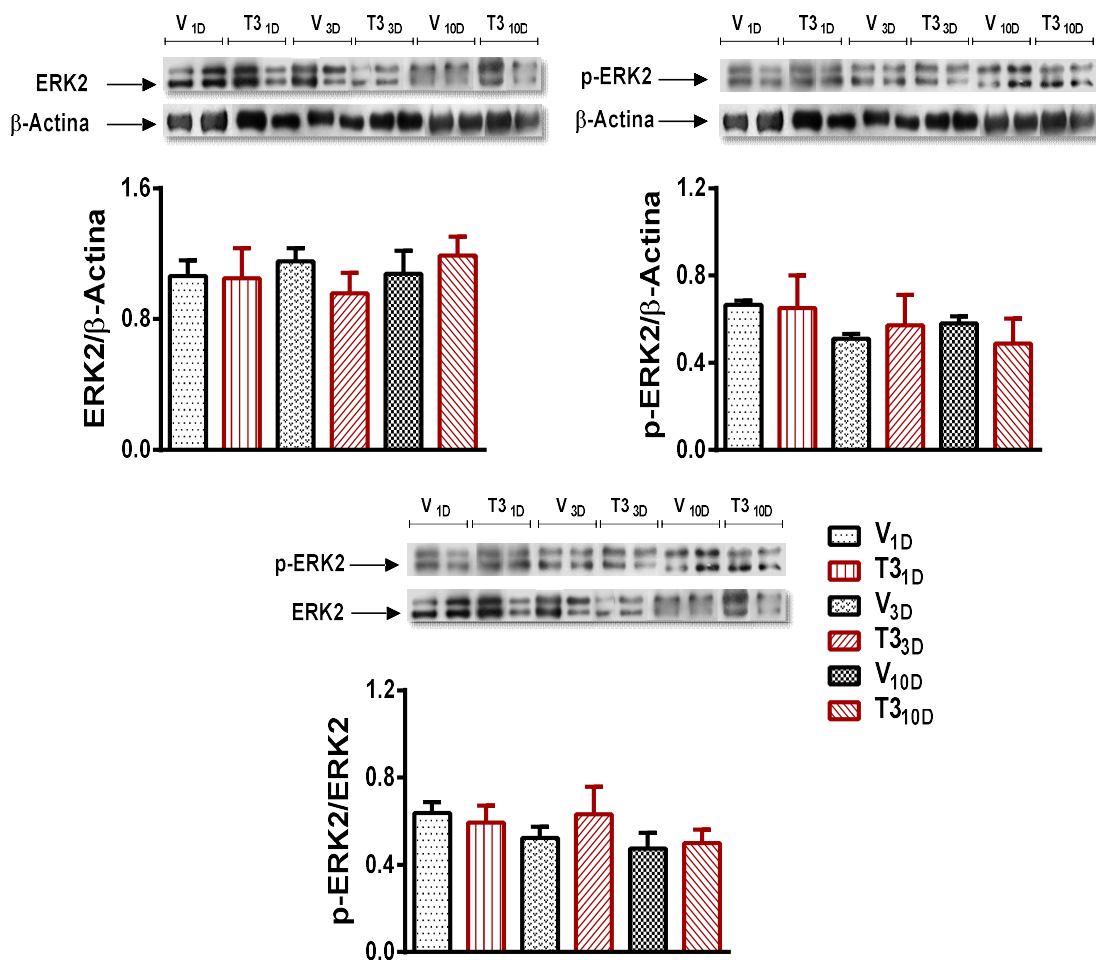


Figura 14. Análisis de inmunotransferencia Western para la proteína ERK2 y su forma fosforilada, p-ERK2, en las aortas torácicas aisladas de ratas con hipertiroidismo agudo. Este fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de triyodo-L-tironina (500 μ g/kg) a las ratas por 1 (T_{31d}), 3 (T_{33d}) y 10 (T_{310d}) días. Los grupos controles recibieron el vehículo (V; 0.5 mM NaOH en 0.9% de NaCl, 0.1ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Se muestra un Western blot representativo arriba de cada gráfico. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante análisis densitométrico y normalizó con la correspondiente β -Actina. Además, se graficó el cociente p-ERK2/ERK2. Los valores son los promedios \pm ESM (n = 4). P no significativa. (ANOVA una vía).

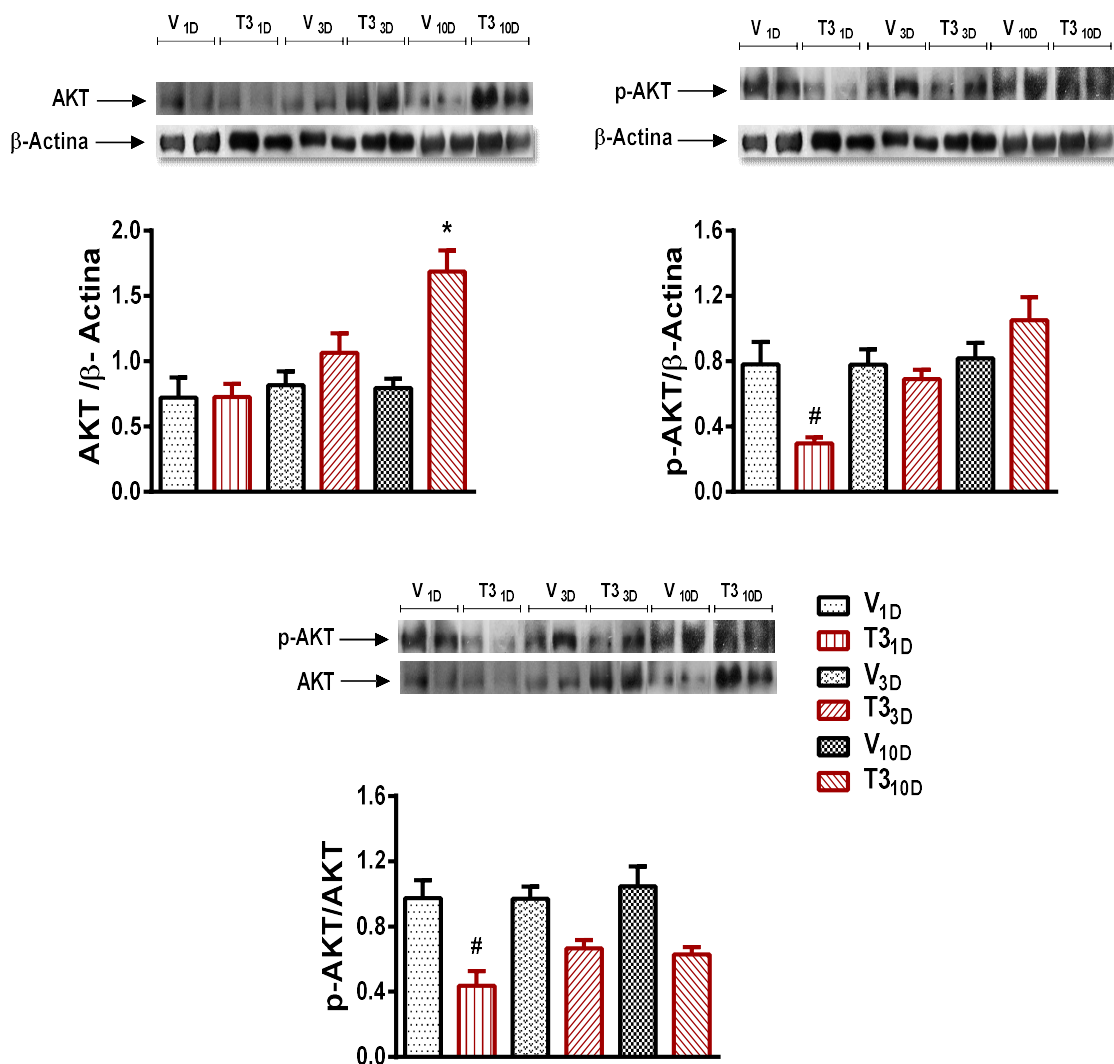


Figura 15. Análisis de inmunotransferencia Western para la proteína Akt y su forma fosforilada, p-Akt, en las aortas torácicas aisladas de ratas con hipertiroidismo agudo. Este fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de triyodo-L-tironina (500 µg/kg/día) a las ratas por 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días. Los grupos controles recibieron el vehículo (V; 0.5 mM NaOH en 0.9% de NaCl, 0.1ml/100g, s.c.) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Se muestra un Western blot representativo arriba de cada gráfico. La intensidad de las bandas se cuantificó mediante análisis densitométrico y normalizó con la correspondiente β-Actina. Además, se graficó el cociente p-Akt/Akt. Los valores son los promedios ± ESM (n = 4 aortas). *P < 0.05 vs. V_{10d}; #P < 0.05 vs. V_{1d}. (ANOVA una vía).

9. Discusión.

En este trabajo investigamos los efectos de la tirotoxicosis aguda (de 1, 3 y 10 días de duración, inducida por T₃ en ratas) sobre la estructura (remodelación), función motora, y la expresión y activación (fosforilación) de las proteínas PKB/Akt y ERK1/2, de las aortas torácicas *ex vivo*; con el objetivo de dilucidar si el tratamiento con T₃ ocasiona remodelación temprana de la pared aórtica mediante vías de transducción de señal que comprendan las proteínas mencionadas. Las aortas torácicas aisladas de las ratas T₃_{1d}, T₃_{3d} y T₃_{10d} manifestaron como cambios histomorfométricos: reducción del número de núcleos de las células musculares lisas, desorganización de estos núcleos en relación con las láminas elásticas, y pérdida de compactación y discontinuidades de las láminas elásticas; efectos que resultaron análogos entre estos grupos. Las aortas de los grupos T₃_{3d} y T₃_{10d} - pero no T₃_{1d} - mostraron depresión de la contractilidad inducida por la fenilefrina, que fue independiente de la presencia funcional del endotelio. La expresión de la cinasa Akt aumentó en el grupo T₃_{10d}, sin modificarse en los grupos T₃_{1d} y T₃_{3d}; en cambio, p-Akt disminuyó transitoriamente en las aortas torácicas de las ratas T₃_{1d} (esto es, la disminución no se manifestó en los grupos T₃_{3d} y T₃_{10d}). Finalmente, la expresión de las proteínas ERK1 y p-ERK1, y ERK2 y p-ERK2, no fue modificada en las aortas torácicas de los grupos T₃_{1d}, T₃_{3d} y T₃_{10d}. De esta forma, el curso temporal de los cambios histomorfométricos y la expresión disminuida de p-Akt coincidieron en el primer día de desarrollo del hipertiroidismo agudo; sin embargo, la transitoriedad de la disminución de p-Akt no permitió correlacionarla con los cambios

histomorfométricos sostenidos hasta el décimo día de tratamiento con T3 (y con base en el mismo argumento, tampoco con la depresión de la contractilidad aórtica).

El incremento de Akt total al décimo día, excluye una relación causal con la remodelación y la depresión de la actividad contráctil, ambas de aparición más temprana en las aortas de ratas con hipertiroidismo agudo.

El incremento de T3 y la disminución de T4 en el suero, así como la pérdida de peso (a partir del segundo día), de las ratas que recibieron T3 diariamente durante 10 días, permitieron confirmar el estado hipertiroidico de estos animales (Honda et al., 2000). La rápida pérdida de peso de las ratas T3 probablemente se deba a un aumento del metabolismo basal inducido por la hormona tiroidea. Los valores séricos elevados de T3 libre y total obtenidos en el presente estudio, indican que el tratamiento con T3 en los grupos definidos (T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d}) llevó al estado hipertiroidico a todas las ratas. El tratamiento con T3 fue suficiente para incrementar los niveles séricos de esta hormona desde el primer día, niveles que permanecieron de igual magnitud al tercer día y disminuyeron al décimo día (en comparación con T3_{1d} y T3_{3d}); aún con esta disminución, sin embargo, los valores séricos de T3 persistieron significativamente elevados en relación con los valores obtenidos en las ratas controles V_{10d}. De esta forma, los datos confirman que el hipertiroidismo se observó en las ratas tan temprano como el primer día después de la iniciación del tratamiento con T3 y continuó manifestándose al décimo día.

Para estudiar los cambios en la actividad contráctil de las aortas de ratas tratadas a corto plazo con hormonas tiroideas, se desarrollaron CACR para la fenilefrina (agonista de receptores adrenérgicos α_1 situados en el sarcolema de las células musculares lisas). Las CACR de la fenilefrina se manifestaron equivalentes en las aortas torácicas con endotelio, y sin endotelio, de las ratas T3_{1d} y V_{1d}. Las CACR inducidas por la fenilefrina fueron desplazadas a la izquierda, potenciadas, con la denudación del endotelio, tanto en las aortas de las ratas T3_{1d} como de las ratas V_{1d}, con similar magnitud. Lo cual se interpreta como evidencia de la participación del endotelio como antagonista funcional del desarrollo de tono vascular (Kaneko y Sunano, 1993; Martin et al. 1986; Matsuda et al. 1995; Vinet et al. 1991). Por otra parte, las CACR de la fenilefrina se observaron deprimidas en las aortas con y sin endotelio tanto de las ratas T3_{3d} como de las T3_{10d} en relación con sus respectivos controles V_{3d} y V_{10d}. Cuando se compararon las CACR de la fenilefrina en anillos aórticos con y sin endotelio de los grupos T3_{3d} y T3_{10d} de manera correspondiente en el tiempo, se observó que la actividad contráctil en los anillos sin endotelio fue similar que en los tejidos con endotelio. En cambio, al comparar las respuestas contráctiles de la fenilefrina en los anillos aórticos con y sin endotelio de los grupos V_{3d} y V_{10d}, se apreciaron potenciaciones significativas de las respuestas contráctiles en los tejidos carentes de endotelio. Los datos sugieren una disminuida función endotelial – la inhibidora del desarrollo de tono - en los tejidos de los grupos T3_{3d} y T3_{10d}; no obstante, también indican claramente que el endotelio no participa en la depresión de las respuestas contráctiles de la fenilefrina en los anillos aórticos de las ratas de los grupos T3_{3d} y T3_{10d}. Si así fuera, la inhibición de las CACR de fenilefrina en los anillos aórticos de los grupos T3_{3d} y T3_{10d}, debería haberse

revertido hacia los valores de control con la denudación del endotelio, de forma significativa, parcial o totalmente. Los datos permiten concluir que una aumentada función vaso-depresora endotelial no parece participar en la inhibición de las respuestas contráctiles de la fenilefrina en los anillos aórticos de las ratas T3_{3d} y T3_{10d}. Queda por explicar por qué la depresión inducida por el endotelio deja de manifestarse en los animales tratados con T3 y, fundamentalmente, el mecanismo por el cual el tratamiento a corto plazo con T3 deprime la contractilidad aórtica per se (es decir, sin la participación endotelial).

Las propiedades viscoelásticas de la pared aórtica básicamente comprenden dos componentes: activo y pasivo; el primero sustentado en la actividad contráctil (tono) del músculo liso, y el segundo, en las propiedades de la elastina y colágena del tejido conectivo (Safar y Laurent, 2003). En el presente estudio, desde el primer día de tratamiento con T3, así como en el tercer y décimo días, las aortas torácicas de las ratas mostraron reducción del número de núcleos de las células musculares lisas, desorganización de estos núcleos en relación con las láminas elásticas, y pérdida de compactación y discontinuidades de las láminas elásticas, al compararse con sus respectivos controles. Los cambios descritos fueron de similar magnitud o características entre los grupos T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d}. En cambio, los valores del grosor íntima/media, el número de láminas elásticas, el grosor de las láminas elásticas, y la densidad óptica de las láminas elásticas (la densidad óptica es proporcional a la cantidad de elastina presente en la túnica media) fueron similares entre los grupos tratados con T3 y los controles temporales.

Considerando que el número de núcleos de células musculares lisas está en relación directa con el número de células musculares lisas existentes (Zaki y Youssef, 2013), la disminución del número de núcleos/campo, en principio, podría indicar reducción de estas células, hipoplasia, en la túnica media. No obstante, la cuantificación de los núcleos se estableció definiendo un campo (área) constante de la túnica media; de esta forma, otra interpretación probable es que las células hubiesen padecido hipertrofia ocupando cada célula un mayor espacio y, en consecuencia, reduciéndose el número total de ellas (núcleos) en el área definida. Comprensiblemente, la ausencia de cambios en el grosor de la íntima/media de las aortas torácicas de todos los grupos tratados con T3, no apoya ni la primera ni la segunda interpretación. Desafortunadamente, la técnica histológica convencional utilizada en este estudio carece de la sensibilidad necesaria para definir los bordes celulares, lo cual imposibilitó medir directamente el tamaño de las células del músculo liso.

En las aortas de ratas tratadas con hormona tiroidea (T3_{1d}, T3_{3d}, T3_{10d}), las láminas elásticas se tornaron menos densas o compactas (perdieron la definición precisa de sus bordes) y en algunos casos se sobrepusieron unas con otras; además, en ellas se observó un aumento notable de discontinuidades en comparación con sus respectivos controles (V_{1d}, V_{3d} y V_{10d}). El aumento significativo en el número de discontinuidades en las láminas elásticas de las aortas de ratas tratadas con hormona tiroidea T3 (T3_{1d}, T3_{3d}, T3_{10d}) fue asociado con la desorganización de los

núcleos de las células musculares lisas (ya mencionada). En algunas de estas discontinuidades los núcleos de las células musculares lisas, se aglomeraron. La pérdida de compactación o densidad de las láminas elásticas puede relacionarse con la modificación molecular de los componentes de la elastina presente en las láminas (por ejemplo, de la fibrilina, proteína de unión de la elastina) y esto podría ocasionar alteraciones funcionales vinculadas con el proceso íntegro de remodelación vascular (Moulakakis et al., 2007; Curran et al., 1993; Zaki y Youssef, 2013). De hecho, la alteración en las láminas elásticas podría participar en modificaciones en la organización de las células musculares lisas.

Nuestros datos muestran que la fosforilación de la cinasa Akt y el cociente p-Akt/Akt se encontraron reducidos en las aortas (remodeladas) de ratas con hipertiroidismo agudo de 1 día de duración, efecto que no se observa a los 3 y 10 días de tratamiento con T₃. La expresión de Akt total en las aortas torácicas se apreció incrementada en el grupo T₃_{10d} comparado con V_{10d}; en las aortas torácicas de las ratas T₃_{1d} y T₃_{3d}, la expresión de esta cinasa fue similar a la de los controles V_{1d} y V_{3d}. Un hallazgo importante en este estudio fue que en los lapsos definidos de 1, 3 y 10 días de tratamiento con altas dosis de T₃ para inducir hipertiroidismo en las ratas, las proteínas ERK1/2, sus formas fosforiladas (p-ERK1 y p-ERK2), y los cocientes p-ERK1/ERK1 y p-ERK2/ERK2 de las aortas torácicas, no difirieron de sus controles temporales respectivos. Estos resultados conducen a proponer que la reducción transitoria de la actividad de la Akt en las aortas del grupo T₃_{1d} representa una inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt - como parte del mecanismo de

transducción activado por la T3 - que no ha sido reportada y cuya función, obviamente, debe esclarecerse. Por otra parte, los datos permiten considerar la posibilidad de que T3 incremente al mediador Akt (i.e., Akt total) en puntos temporales relativamente tardíos antes de aumentar su activación (i.e., p-Akt). Al respecto, también es posible que la activación de la vía MAPK/ERK1/2 por la T3 requiera un tiempo mayor a los 10 primeros días de tratamiento. De forma que el incremento en la actividad, inducido por la T3, de una u otra vía, o ambas, pudiera manifestarse con latencias mayores. No obstante, estos datos considerados en conjunto contradicen los reportados en la literatura, con respecto a la rápida activación (minutos a horas) por las HTs de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK en las células endoteliales y musculares lisas de las aortas de ratas y bovinas (Hiroi et al., 2006; Carrillo-Sepúlveda et al., 2010; Wang y Sun, 2010). En conjunto, los estudios citados señalaron que las HTs pueden activar las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK en células aórticas, pero la relación entre la activación de estas vías y la remodelación vascular no ha sido establecida. No encontramos una explicación para la falta de consistencia entre nuestros datos y los reportados por los autores mencionados (Hiroi et al., 2006; Carrillo-Sepúlveda et al., 2010; Wang y Sun, 2010).

10. Conclusión.

Los resultados obtenidos con las aortas torácicas *ex vivo* permiten establecer que el tratamiento con T3 a corto plazo ocasionó remodelación de la pared aórtica y depresión de la respuesta contráctil inducida por la activación de RA- α_1 , independientemente del endotelio, sin la participación de las vías de señalización que comprenden a las proteínas Akt y ERK1/2. No obstante, el tratamiento con T3 de forma bifásica modificó a la cinasa Akt en el tiempo: primero inhibió fugazmente su forma activa, p-Akt, sin modificar su expresión total, y con mayor latencia aumentó esta última. La relevancia funcional de estos cambios en la expresión y activación de Akt inducidos por T3, requiere adicional investigación para su esclarecimiento.

11. Bibliografía.

1. Aranda A, Alonso-Merino E, Zambrano A. Receptors of Thyroid Hormones. *Ped Endocrinol. Rev.* 2013;11(1): 2-13.
2. Axelband F, Dias J, Ferrão FM, Einicker-Lamas M. Nongenomic signaling pathways triggered by thyroid hormones and their metabolite 3-iodothyronamine on the cardiovascular system. *J. Cell. Physiol.* 226: 21–28, 2010.
3. Akcay M, Akcay E, Yeter E, Durmaz T, Keles T, Bayram NA, Yuksel I, Yuksel Kalkan G, Ayhan H, Simavli H, Simsek S, Bozkurt E. Aortic elastic properties are impaired in patients with Graves' ophthalmopathy. *Vasa* 2011; 40: 41-48.
4. Barreto-Chaves MLM, Carrillo-Sepúlveda MA, Carneiro-Ramos MS, Gomes DA, Diniz GP. The crosstalk between thyroid hormones and the Renin–Angiotensin System. *Vascular Pharmacology* 52 (2010) 166–170.
5. Bassett JHD, Williams GR. The skeletal phenotypes of TRa and TRb mutant mice. *Journal of Molecular Endocrinology* (2009) 42, 269–282 Introduction.
6. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 1994; 75: 539-545.
7. Bhargav PR, Amar V, Kumar CH, Gayathri KB. Pipestem carotids as a marker of vascular insult in Graves' disease. *Indian J Surg.* 2011; 73(2):168-169.
8. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3035– 3043.
9. Brix K, Führer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid Research* 2011, 4(Suppl 1):S9.
10. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/ protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Molecular Endocrinology* 19: 102–112, 2005.
11. Capo LA, Sillau AH. The effect of hyperthyroidism on capillarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. *J Physiol* 1983; 342:1-14.

12. Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, Webb RC, Barreto-Chaves ML. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovasc Res*. 2010; 85(3): 560-570.
13. Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Furstenau CR, Monteiro PS, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, Laurindo FR, Tostes RC, Webb RC, Barreto-Chaves MLM. Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/ Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism. *PLoS ONE* 8(4): e61982. doi:10.1371/journal.pone.0061982.
14. Celsing F, Blomstrand E, Melichna J, Terrados N, Clausen N, Lins PE, Jansson E. Effect of hyperthyroidism on fibre-type composition, fibre area, glycogen content and enzyme activity in human skeletal muscle. *Clin Physiol* 1986; 6:171-181.
15. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews* 2010; 31: 139-170.
16. Cheng JK, Wagenseil JE. Extracellular matrix and the mechanics of large artery development. *Biomech ModelMechanobiol* (2012) 11:1169–1186
17. Cigarroa JE, Isselbacher EM, DeSanctis RW, Eagle KA. Diagnostic imaging in the evaluation of suspected aortic dissection. Old standards and new directions. *N Engl J Med* 1993; 328: 35-43.
18. Cini G, Carpi A, Mechanick J, Cini L, Camici M, Galetta F, Giardino R, Russo MA, Iervasi G. Thyroid hormones and the cardiovascular system: Pathophysiology and interventions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63 (2009) 742 – 753.
19. Czarkowski M, Hilgertner L, Powalowski T, et al: The stiffness of the common carotid artery in patients with Graves' disease. *Int Angiol* 2002; 21:152-157.
20. Das B, Matsuda H, Fujimoto K, Sun G, Matsuura K, Shi Y. Molecular and genetics studies suggest that thyroid hormone receptor is both necessary and sufficient to mediate the developmental effects of thyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2010 September 1; 168(2): 174–180.
21. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29: 211-218.
22. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Contemporary Endocrinology: Diseases of the Thyroid*, 2nd Edition Edited by: L. E. Braverman Humana Press Inc., Totowa, NJ.
23. Delitala AP, Orrù M, Filigheddu F, Pilia MG, Delitala G, Ganau A, Saba PS, Decandia F, Scuteri A, Marongiu M, Lakatta EG, Strait J, Cucca F. Serum

free thyroxine levels are positively associated with arterial stiffness in the SardiNIA study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015; 82(4): 592-597.

24. Dillmann WH. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Failure Reviews* 2010; 15: 125–132.
25. Ding L, Chapman A, Boyd R, Wang HD. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(6): H2997-3005.
26. Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res*. 2004; 59:31-50.
27. Harrington J, Peña AS, Gent R, Hirte C, Couper J. Aortic intima media thickness is an early marker of atherosclerosis in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* 2010; 156: 237-241.
28. Hartman JD, Eftychiadis AS. Medial smooth-muscle cell lesions and dissection of the aorta and muscular arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 50-61.
29. Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(38): 14104-14109.
30. Honda H, Takeshi Iwata T, Takuya Mochizuki T, Hiroshi Kogo H. Changes in vascular reactivity induced by acute hyperthyroidism in isolated rat aortae. *Gen. Pharmacol*. 2000; 34: 429-434.
31. Ichiki T. Thyroid Hormone and Vascular Remodeling. *J Atheroscler Thromb*, 2016; 23: 266-275.
32. Iervasi G, Nicolini G. Thyroid hormone and cardiovascular system: From basic concepts to clinical application. *Int Emerg Med* 2013; 8: 71-74.
33. Inaba M, Henmi Y, Kumeda Y, et al: Increased stiffness in common carotid artery in hyperthyroid Graves' disease patients. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 241-246.
34. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev* 2005; 26:704-728.
35. Kaneko K, Sunano S. Involvement of alpha-adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenaline-induced contraction in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1993; 240: 195-200.

36. Kenessey A, Ojamaa K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J Biol Chem* 2006; 281: 20666-20672.
37. Kinne A, Kleinau G, Hoefig CS, Grüters A, Köhrle J, Krause G, Schweizer U. Essential Molecular Determinants for Thyroid Hormone Transport and First Structural Implications for Monocarboxylate Transporter 8. 28054 *Journal of Biological Chemistry* volume 285, number 36, September 3, 2010.
38. Klein, I., Ojamaa, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 2001; 344(7): 5011-5019.
39. Kuzman JA, O'Connell TD, Gerdes AM. Rapamycin prevents thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 2007; 148: 3477-3484.
40. Kuzman JA, Vogelsang KA, Thomas TA, Gerdes AM. L-thyroxine activates Akt signaling in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 251-258.
41. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular Research* (2012) 95, 194–204.
42. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, Ducimetiere P, Benetos A (2001) Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001; 37: 1236-1241.
43. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C980–C991, 2009. First published January 21, 2009.
44. Luidens MK, Mousa SA, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vasc Pharmacol* 2010; 52: 142-145.
45. Malayeri AA, Natori S, Bahrami H, Bertoni AG, Kronmal R, Lima JA, Bluemke DA. Relation of aortic wall thickness and distensibility to cardiovascular risk factors (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). *Am J Cardiol* 2008; 102: 491-496.
46. Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237: 529-538.

47. Matsuda K, Sekiguchi F, Tojo M, Shimamura K, Sunano S. Effects of N^G-nitro-L- arginine on alpha-agonists-induced contraction of aortae from Wistar Kyoto rats and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Smooth Muscle Res* 1995; 31: 51- 60.
48. Mansourian AR. Metabolic Pathways of Tetraiodothyronine and Triiodothyronine Production by thyroid gland: A Review Articles. *Pakistan Journal of Biological sciences*, 14 (1), 1-12, 2011.
49. McAllister RM, Albarracin I, Price EM, Smith TK, Turk JR, Wyatt KD. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. *J Endocrinol* 2005; 185:111-119.
50. McAllister RM, Grossenburg VD, Delp MD, Laughlin MH. Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. *Am J Physiol* 1998; 274:E946- E953.
51. Moulakakis KG, Poulakou MV, Paraskevas KI, Dontas I, Vlachos IS, Sokolis DP, Dosios T, Karayannacos PE, Perrea D. Hyperthyroidism is associated with increased aortic oxidative DNA damage in a rat model. *In Vivo* 2007; 21: 1021-1026.
52. Moulakakis KG, Sokolis DP, Perrea DN, Dontas I, Dosios T, Poulakou MV, Mylonas SN, Dimitriou CA, Karayannacos PE. The effects of hypothyroidism on the mechanical properties and histomorphological structure of the thoracic aorta. *Angiology* 2010; 61: 259-268.
53. Moulakakis KG, Sokolis DP, Perrea DN, Dosios T, Dontas I, Poulakou MV, Dimitriou CA, Sandris G, Karayannacos PE. The mechanical performance and histomorphological structure of the descending aorta in hyperthyroidism. *Angiology*. 2007; 58(3): 343-352.
54. Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this?. *Cardiovascular Research* . . 41 (1999) 9 – 13.
55. Napoli R, Biondi B, Guardasole V, Matarazzo M, Pardo F, Angelini V, et al. Impact of hyperthyroidism and its correction on vascular reactivity in humans. *Circulation* 2001; 104: 3076-3080.
56. Obuobie K, Smith J, Evans LM, et al: Increased central arterial stiffness in hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4662-4666.
57. Obuobie K, Smith J, John R, et al: The effects of thyrotoxicosis and its treatment on central arterial stiffness. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 35-40.
58. Ojamaa K, Klemperer JD, Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid* 1996; 6: 505-512.

59. Ojamaa K, Kenessey A, Klein I. Thyroid Hormone Regulation of Phospholamban Phosphorylation in the Rat Heart. *Endocrinology* 141: 2139–2144, 2000.
60. Ojamaa K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Vasc Pharmacol* 2010; 52(3-4): 113-119.
61. Pantos C, Xinaris C, Mourouzis I, Malliopoulou V, Kardami E, Cokkinos DV. Thyroid hormone changes cardiomyocyte shape and geometry via ERK signaling pathway: potential therapeutic implications in reversing cardiac remodeling? *Mol Cell Biochem.* 2007; 297(1-2): 65-72.
62. Paquette MA, Atlas E, Wade Mg, Yauk CL. Thyroid Hormone Response Element Half-Site Organization and Its Effect on Thyroid Hormone Mediated Transcription. *PLoS ONE* 9(6): 1 June 2014, Volume 9, Issue 6.
63. Park KW, Dai HB, Ojamaa K, Lowenstein E, Klein I, Sellke FW. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries. *Anesth Analg* 1997; 85: 734-738.
64. Rasmussen LM, Wolf YG, Ruoslahti E. Vascular smooth muscle cells from injured rat aortas display elevated matrix production associated with transforming growth factor-beta activity. *Am J Pathol* 1995; 147: 1041–1048.
65. Safar M.E., Laurent P. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: comparison with humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2003) 285 H1363–H1369.
66. Schiffrin EL. The vascular phenotypes in hypertension: Relation with the natural history of hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension* 1(1) (2007) 56–67.
67. Sreekanth, Salma TM, Annapurna M, Yaseen S. A thyroid gland showing pyramidal lobe with levator glandulae thyroidea. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences/ Volume 2/ Issue 5/ February 4.*
68. Shigeta O, Makuuchi H, Kaneko Y, Takuma S, Konishi T, Omura M. A case of acute aortic dissection associated with myxedema. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi* 1994; 42: 1096-1100.
69. Sokolis DP, Kefaloyannis EM, Kouloukoussa M, Marinos E, Boudoulas H, Karayannacos PE. A structural basis for the aortic stress-strain relation in uniaxial tension. *J Biomech* 2006; 39: 1651-1662
70. Suarez J, Scott BT, Suarez-Ramirez J, Chavira CV, Dillmann WH. Thyroid hormone inhibits ERK phosphorylation in pressure overload-induced hypertrophied mouse hearts through a receptor-mediated mechanism. *Am*

- J Physiol Cell Physiol 2010; 299(17): C1524-C1529.
71. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase MOX1. *Nature*. 1999; 401: 79-82.
 72. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signaling by angiotensin II and vascular remodeling hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30: 860-866.
 73. Van Bortel LM, Struijker-Boudier HA, Safar ME. Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension* 2001; 38: 914-921.
 74. Vinet R, Brieva C, Pinardi G, Penna M. Modulation of alpha-adrenergic-induced contractions by endothelium-derived relaxing factor in rat aorta. *Gen Pharmacol* 1991; 22: 137-142.
 75. Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(11): 609–617.
 76. Wang X, Sun Z. Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: discovery of a new TRalpha1-Nox1 pathway. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 368-380.
 77. Wirth EK, Schweizer U, Köhrle J. Transport of thyroid hormone in brain. *Frontiers in Endocrinology*, June 2014, Volume 5, Article 98.
 78. Yen, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001; 81(3): 1097-1142.
 79. Yurtdaş M, Gen R, Ozcan T, Aydın MK. Assessment of the elasticity properties of the ascending aorta in patients with subclinical hypothyroidism by tissue Doppler imaging. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2013; 57: 132–138.
 80. Zaki SM1, Youssef MF. Thyroid hormone dysfunctions affect the structure of rat thoracic aorta: a histological and morphometric study. *Folia Morphol (Warsz)*. 2013; 72(4):333-339.