



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**ESTUDIO CRONOLÓGICO DEL DESARROLLO DE
ANGIOGÉNESIS E HIPERTROFIA EN LOS
CORAZONES DE RATAS CON HIPERTIROIDISMO
DE INCIPIENTE EVOLUCIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA

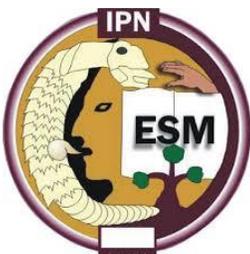
PRESENTA:

CINTIA DANIELA SÁNCHEZ RIVAS

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. RUTH MERY LÓPEZ MAYORGA

DR. ENRIQUE FERNANDO CASTILLO HENKEL



Ciudad de México

Junio 2020

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular perteneciente a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, se contó con el apoyo de la Secretaría de Investigación y Posgrado, proyecto clave 20190063 y con beca BEIFI.

INDICE DE CONTENIDO

Relación de Figuras	07
Abreviaturas	08
Resumen	10
Abstrac	11
I. INTRODUCCIÓN	14
1. Glándula tiroides	14
2. Síntesis de hormonas tiroideas	14
2.1 Transporte	17
2.2 Metabolismo	18
3. Mecanismos de acción de acción de las Hormonas Tiroideas	19
3.1 Mecanismo genómico	19
3.1.1 Isoformas de los receptores nucleares de Hormonas tiroideas	20
3.1.2 Estructura de los receptores nucleares de hormonas tiroideas	20
3.1.3 El receptor retinoide X	21
3.1.4 Comoduladores	21
3.2 Mecanismo No genómico	21
3.2.1 Regulación del citoesqueleto por HT	22
3.2.2 Acciones no genómicas de las isoformas de los RT en citoplasma	22
3.2.3 Acciones no genómicas de las HT iniciadas en la membrana	23
3.2.4 Integrina $\alpha V\beta 3$ como receptor a Hormonas tiroideas	24
4. Hormonas tiroideas en el sistema cardiovascular	26
5. Hormonas tiroideas e hipertrofia cardiaca	28
6. Hormonas tiroideas y angiogénesis	29

plasmática

II.	JUSTIFICACIÓN	30
III.	HIPÓTESIS	31
IV.	OBJETIVO GENERAL	31
1.	Objetivos particulares	32
V.	MATERIALES Y METODOS	32
1.	Inducción del estado hipertiroideo	33
2.	Valoración del estado hipertiroideo	33
3.	Preparación de Langendorff a flujo constante	33
4.	Medición de la masa ventricular	35
5.	Determinación de factores angiogénicos VEGF, bFGF, y HIF-1 α en el ventrículo izquierdo de rata a través de western blot	35
6.	Análisis Histológico en ventrículo izquierdo	37
VI.	RESULTADOS	40
	Validación del modelo de hipertiroidismo	41
	Función cardiaca de las ratas hipertiroideas	44
	Determinación de la expresión de factores angiogénicos a través de la técnica de western blot	47
	Análisis histológico en el ventrículo izquierdo	51
VII.	DISCUSIÓN	54
VIII.	CONCLUSIONES	59
IX.	BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química y numeración de átomos de la molécula de Tiroxina, y estructura química de la triyodotironina.	16
Figura 2. Esquema del mecanismo de acción genómico de las hormonas tiroideas.	18
Figura 3. Representación esquemática del mecanismo no genómico de las hormonas tiroideas.	24
Figura 4. Comparación de los valores de las hormonas 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) y 3, 5, 3', 5' tetrayodo-L-tironina (T4)	40
Figura 5. Valores de masa corporal de ratas tratadas con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) o con vehículo.	41
Figura 6. Comparación de los valores de la razón masa seca ventricular izquierda (MSVI)/longitud de la tibia (LT) como índice de hipertrofia cardíaca.	42
Figura 7. Valores de la función cardíaca evaluadas en el modelo de corazón aislado Langerdorff.	44
Figura 8. La frecuencia cardíaca (FC) en corazones aislados de ratas con hipertiroidismo agudo.	45
Figura 9. Evaluación densitométrica en unidades arbitrarias (U.A.) del HIF-1 α en los ventrículos izquierdos cardíacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo.	47
Figura 10. Evaluación densitométrica en unidades arbitrarias (U.A.) del FGF en los ventrículos izquierdos cardíacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo.	48
Figura 11. Evaluación densitométrica en unidades arbitrarias (U.A.) del VEGF en los ventrículos izquierdos cardíacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo.	49
Figura 12. Densidad capilar (% de vasos/área total) evaluada en los ventrículos izquierdos cardíacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo.	51
Figura 13. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de corazones de ratas tratadas con T3 y Vh	52

ABREVIATURAS

DBD	Dominio de unión al ADN conservado
DIT	Diyodotirosina
dP/dt	Derivada de Presión Respecto al Tiempo
Ds	Desyodasas de yodotironinas
ERT	Elementos de respuesta a hormonas tiroideas
FGF	Factor de crecimiento a fibroblastos
GLUT 1	transportador de glucosa
GT	Glándula tiroides
H₂O₂	Peróxido
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HSA	Albúmina
HTs	Hormonas Tiroideas
I⁻	Yoduro
LBD	Dominio de unión al ligando
MAP3K	Cinasa de la Cinasa de las Proteincinasa Activadas por Mitógenos
MAP3K	Cinasa de la Cinasa de las Proteincinasa Activadas por Mitógenos
MAPK	Proteincinasas Activadas por Mitógenos
MAPK	Proteincinasas Activadas por Mitógenos
MCT	Transportador tipo Monocarboxilato
MCT	Transportador tipo Monocarboxilato
MEK/MAP2K	Cinasa de las Proteincinasa Activadas por Mitógenos
MEK/MAP2K	Cinasa de las Proteincinasa Activadas por Mitógenos

MHC	Cadenas Pesadas de Miosina
MIT	Monoyodotirosina
Mtor	Objetivo de la Rapamicina en mamíferos
mTORC	Complejo de mTOR
NcoR	Co-represor de receptores nucleares
p70^{S6K}	Cinasa de la p70 S6 Ribosomal
PDK	Cinasa Dependiente de Fosfoinositidos
PDVI	Presión Desarrollada por el Ventriculo Izquierdo
PFKP	Fosfofructocinasa tipo plaquetas
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidil-Inositol-3-Cinasa
rT3	T3 reversa
RXR	Receptor Retinoide X
SERCA	Bomba de Calcio ATPasa del Retículo Sarcoplásmico
SMRT	Mediador de silenciamiento para el ácido retinoico y receptores de hormonas tiroideas
SIN	Simportador de sodio/yoduro
SRC-1	Coactivador del receptor de hormona esteroideas
T3	3, 5 ,3'-triyodotironina
T4	Tiroxina o 3, 5, 3', 5'-tetrayodotironina
Tg	Tiroglobulina
TPO	Peroxidasa tiroidea
TGB	Globulina unida a tiroxina
TTR	Transtiretina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIs	Ventrículos izquierdos

RESUMEN

Objetivo: Evaluar las modificaciones en la expresión de los factores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF; factor de crecimiento de fibroblastos, FGF; factor inducible por hipoxia 1α , HIF 1α) y la densidad capilar coronaria durante el desarrollo de hipertrofia miocárdica en los corazones de ratas Wistar con hipertiroidismo a corto plazo.

Materiales y Métodos: El hipertiroidismo se indujo mediante la administración subcutánea diaria de 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3; 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por 1 (T3 $_{1\text{d}}$), 3 (T3 $_{3\text{d}}$) y 10 (T3 $_{10\text{d}}$) días. Los animales control fueron inyectados con el vehículo (1ml/kg) durante 1 (V $_{1\text{d}}$), 3 (V $_{3\text{d}}$) y 10 (V $_{10\text{d}}$) días. Se evaluaron: (i) los valores séricos de las hormonas tiroideas y la masa ventricular izquierda cardiaca, (ii) la densidad capilar y el área de sección transversal de los cardiomiocitos en los ventrículos izquierdos (VIs) mediante análisis histológico morfométrico, (iii) la función cardiaca con la preparación de Langendorff con flujo constante, (iv) los cambios en los niveles de las proteínas HIF 1α , VEGF y FGF en los VIs, mediante análisis de transferencia Western.

Resultados: En comparación con sus respectivos controles temporales, los corazones aislados de las ratas T3 $_{3\text{d}}$ y T3 $_{10\text{d}}$, pero no así de las T3 $_{1\text{d}}$, desarrollaron incremento de la masa ventricular izquierda, acrecentamiento del área de sección transversal de los cardiomiocitos, y valores absolutos aumentados de $+dP/dt_{\text{max}}$ y $-dP/dt_{\text{min}}$ (esto es, inotropismo y lusitropismo positivos). La presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, la presión de perfusión coronaria, y la frecuencia cardiaca espontánea de los corazones aislados de las ratas T3 $_{1\text{d}}$, T3 $_{3\text{d}}$ y T3 $_{10\text{d}}$ no fueron

modificadas. Interesantemente, los estudios histológicos mostraron una tendencia (no significativa) de la densidad capilar a aumentar en los VIs de las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d}, en comparación correspondiente con los controles temporales; así, el crecimiento capilar fue paralelo al crecimiento de los cardiomiocitos (i.e., no se observó rarefacción capilar). En los VIs de las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d}, el HIF-1 α permaneció inalterado al compararse con los correspondientes valores de los controles. En los VIs de las ratas T3_{3d}, la expresión del FGF fue mayor que la del control V_{3d}, pero sus niveles fueron similares en los grupos T3_{1d} y T3_{10d} comparados con los valores obtenidos en los corazones de los grupos V_{1d} y V_{10d}, respectivamente. Notablemente, los niveles de expresión de VEGF aumentaron en los VIs de los grupos T3_{1d} y T3_{3d}, pero no en los del grupo T3_{10d}, en relación con los controles temporales.

Conclusión: Durante la fase temprana de desarrollo del hipertiroidismo experimental en la rata, de forma aproximadamente coincidente en el tiempo, se manifiestan: hipertrofia ventricular izquierda, inotropismo y lusitropismo positivos, y aumento de la densidad capilar. Este último, hipotéticamente, permite mantener la perfusión miocárdica fisiológica. Consideramos, asimismo, que el mecanismo para la angiogénesis comprende el aumento transitorio de la expresión de los factores VEGF y FGF, que acompaña parcialmente la manifestación del incremento de la densidad capilar en los VIs de las ratas tratadas con T3. La ausencia de cambios significativos en la expresión del HIF1 α , excluye a este factor como participante causal de la angiogénesis de temprano desarrollo en los VIs de las ratas tratadas con T3 a corto plazo.

ABSTRACT

Objective: To assess the modifications of angiogenic factors expression (vascular endothelial growth factor, VEGF; fibroblast growth factor, FGF; hypoxia-inducible factor 1 α , HIF1 α) and coronary capillary density during the development of myocardial hypertrophy in hearts of Wistar rat with short-term hyperthyroidism.

Materials and Methods: Hyperthyroidism was induced by daily subcutaneous administration of 3,5,3' triiodo-L-thyronine (T3; 500 μ g/kg) for 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}), and 10 (T3_{10d}) days. Control animals were injected with the vehicle (1ml/kg) for 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}), and 10 (V_{10d}) days. They were evaluated: (i) serum values of thyroid hormones and cardiac left ventricular mass, (ii) capillary density and cross-sectional area of cardiomyocytes in the left ventricles (LVs) through morphometric histological analysis, (iii) cardiac function with constant flow Langendorff preparation, (iv) changes in the levels of HIF1 α , VEGF, and FGF proteins in LVs by Western blot analysis.

Results: Compared to their respective time controls, hearts isolated from T3_{3d} and T3_{10d} rats, but not from T3_{1d}, developed enlarged left ventricular mass, augmented cross-sectional area of cardiomyocytes, and increased absolute values of +dP/dt_{max} and -dP/dt_{min} (that is, positive inotropism and lusitropism). Left ventricular pressure development, coronary perfusion pressure, and spontaneous heart rate of the isolated hearts of T3_{1d}, T3_{3d}, and T3_{10d}, rats were not altered. Interestingly, histological studies showed a tendency (non-significant) for capillary density to increase in the left ventricles of T3_{1d}, T3_{3d}, and T3_{10d} rats, in corresponding

comparison with temporal controls; thus, capillary growth was parallel to cardiomyocytes growth (i.e., capillary rarefaction was not observed). In the LVs of T3_{1d}, T3_{3d}, and T3_{10d} rats, HIF-1 α remained unchanged when compared with the corresponding control values. In the LVs of T3_{3d} rats, FGF expression was higher than that of V_{3d} control, but their levels were similar in the T3_{1d} and T3_{10d} groups compared to the values obtained in hearts of V_{1d} and V_{10d} groups, respectively. Notably, the levels of VEGF expression increased in the LVs of T3_{1d} and T3_{3d} groups, but not in those of the T3_{10d} group, when compared with the temporal controls.

Conclusion: During the early phase of development of experimental hyperthyroidism in the rat, roughly coinciding in time, were manifested: left ventricular hypertrophy, positive inotropism and lusitropism, and increased capillary density. The latter, hypothetically, allows the physiological myocardial perfusion to be maintained. We consider, also, that the mechanism for angiogenesis includes the transient rise in the expression of VEGF and FGF, which partially accompanies the manifestation of the increase in capillary density in the LVs of rats treated with T3. The absence of significant changes in HIF1 α expression excludes this factor as a causal participant of early development angiogenesis in the LVs of short-term T3 treated rats.

I. INTRODUCCIÓN

1. Glándula tiroides

La glándula tiroides (GT) es una glándula endocrina constituida por dos lóbulos, derecho e izquierdo, unidos por una estructura intermedia, llamada istmo; la glándula asemeja una mariposa. Anatómicamente, los lóbulos de la tiroides se localizan anterolaterales a la tráquea e inferiores a la laringe [Koeppen, 2009]. Sus dimensiones varían con la edad y de un sujeto a otro. Como referencia, en la edad adulta, se consideran las siguientes dimensiones: 4-6 cm x 2 cm x 2 cm en sentido craneocaudal, sagital y transversal respectivamente [Arancibia *et al*, 2002]. La glándula pesa en promedio 25 gramos, siendo mayor en las mujeres, especialmente durante la menstruación y el embarazo [Sañudo *et al* 2020].

Esta glándula está altamente irrigada por cuatro arterias (tiroidea superior e inferior, dos y dos, respectivamente) y es drenada por tres venas por cada lado, vena tiroidea superior, inferior y media [Esen *et al.*, 2018]. Se encuentra inervada por el sistema nervioso simpático, con la capacidad de regular su acción vasomotora [Koeppen, 2009].

Cada lóbulo está hecho de agregación de folículos, los cuales son las unidades estructurales y funcionales de la GT. Los folículos están revestidos por células foliculares simples que descansan sobre la membrana basal, y tienen una cavidad llena de un material gelatinoso homogéneo llamado coloide. El cual está compuesto por tiroglobulina, una glicoproteína yodada, que es una forma de almacenamiento inactivo de la hormona tiroidea [Lee, 2016]. Entre los folículos se encuentran las células parafoliculares, también conocidas como células C, que son productoras de calcitonina [Shah *et al.*, 2015].

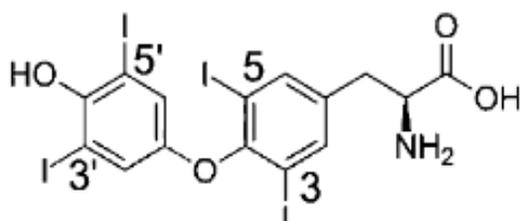
2. Síntesis de hormonas tiroideas

La tiroides sintetiza 2 hormonas principalmente, tiroxina o 3, 5, 3', 5'-tetrayodotironina (T4) y 3, 5 ,3'-triyodotironina (T3) (Fig.1). El yodo es un elemento indispensable de las hormonas tiroideas, que comprende el 65% del peso de T₄ y el 58% de T₃. Las hormonas tiroideas son los únicos compuestos que contienen

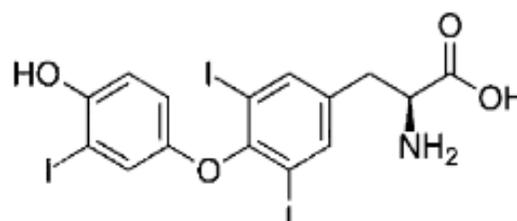
yodo con importancia fisiológica establecida en los vertebrados [Rousset *et al.*, 2015]. El yodo ingerido a través de la dieta se absorbe en el intestino delgado y es transportado a través del torrente sanguíneo que abastece la membrana basolateral de los tirocitos, en donde es absorbido a través del simportador sodio/yoduro (SNI) para posteriormente ser oxidado e incorporado a la tiroglobulina (Tg), cuyos tirosilos son sustratos para la reacción de yodación y así formar las hormonas monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT) [Carvalho *et al.*, 2017]. Estas reacciones ocurren en las membranas apicales de los tirocitos, en la luz del folículo, y los componentes involucrados son la Tg glucosilada, yoduro (I^-), peróxido de hidrógeno y la enzima peroxidasa tiroidea (TPO) [Rousset *et al.*, 2015].

La yodación de los tirosilos es una reacción compleja que aún no se encuentra completamente dilucidada, sin embargo, la literatura propone que puede llevarse a cabo por formación de radicales libres [Taurog *et al.*, 2000] y a través de la formación de un intermediario de yodación $TPO-I^+$ [Ohtaki *et al.*, 1981]. Cualquiera que sea el mecanismo de reacción de la yodación, es claro que el yoduro se oxida por H_2O_2 y TPO, para obtener las moléculas anteriormente mencionadas MIT y DIT. Los tirosilos de dos DIT unidos por enlace difenil éter forman la hormona T4; mientras que la unión de un tirosilo de DIT y uno de MIT forman la hormona T3 [Schweizer *et al.*, 2015].

Cuando se requiere de hormonas tiroideas en el organismo, la Tg se internaliza en el polo apical de los tirocitos, transportándose a endosomas y posteriormente es digerida por proteasas, como son endopeptidasas, catepsinas y exopeptidasas. Después de la digestión de Tg las hormonas T4 y T3 son liberadas al torrente sanguíneo para su aprovechamiento. La biosíntesis de las hormonas tiroideas (THs) está regulada por la hormona tirotrópica (TSH) [Carvalho *et al.*, 2017].



3, 5, 3', 5'-tetrayodotironina (T4)



3, 5, 3'-triyodotironina (T3)

Figura 1. Estructura química y numeración de átomos de la molécula de Tiroxina, y estructura química de la triyodotironina.

2.1 Transporte

Las hormonas tiroideas generalmente se encuentran unidas a proteínas plasmáticas para transportarse hasta las células blanco, dichas proteínas son:

- Globulina unida a tiroxina (TBG), el 70% de las HTs se unen a esta proteína. Tiene mayor afinidad por la tiroxina que por la triyodotironina.
- Albúmina (HSA), el 15-20% de las hormonas se unen a esta proteína.
- Transtirretina (TTR), llamada también prealbúmina transportadora de tiroxina es una proteína a la que se une solamente la tiroxina en un 10-15%.

Anteriormente se creía que las hormonas tiroideas debido a su baja polaridad podrían atravesar la membrana lipídica, pero fue hasta 1970 que se demostró que las HTs requieren de un transportador para ingresar a las células [Schweizer et al., 2014]. A través de estudios de biología molecular se describió el transportador monocarboxilato 8 (MCT8, SLC16A2) como transportador de HTs específico y muy activo [Hennemann *et al*, 2001]. La proteína tiene 12 dominios transmembranales y sus extremos amino y carboxilo-terminal están orientados hacia el citoplasma. Además, en la región amino-terminal, la proteína contiene un dominio llamado PEST por su abundante contenido en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T). Aunque el mecanismo mediante el cual MCT8 lleva a cabo el ingreso de las hormonas aún es desconocido, se sabe que es independiente de la concentración extracelular de Na⁺ [Friesema *et al*, 2010].

2.2 Metabolismo

Una vez en el interior de la célula blanco, la concentración de las HTs es regulada por enzimas conocidas como desyodasas de yodotironinas (Ds). Dichas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en diversos tejidos del organismo [Larsen *et al.*, 2012]. Las Ds incluyen dos enzimas activadoras, D1 y D2, y una enzima inhibidora, D3. Embriológicamente hablando, la enzima D3 se expresa primero durante el desarrollo, seguidas de D2 y D1 respectivamente. Schneider y colaboradores, en 2006, demostraron que la enzima D1 no es esencial para la acción de las HTs en el ratón eutiroideo, como se estudió en el modelo de ratón nocaout del gen D1. Se ha denotado más su participación en el hipertiroidismo, disminuyendo el impacto de la alta concentración de HTs.

La D3 se expresa en la placenta y su función es proteger al feto de la producción excesiva de HTs maternas, además estimula la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1) [Simonides *et al.*, 2008]. Cabe mencionar que el selenio es un elemento fundamental para el buen funcionamiento catalítico de esta enzima, por lo que una deficiencia nutricional de selenio conduce a una reducción de la actividad de la desyodasa y posiblemente un metabolismo anormal de las HTs [Gereben *et al.*, 2008].

La enzima D2 es la responsable principal de los cambios en las concentraciones de T3 en humanos [Maia *et al.*, 2005]. Se expresa en tejidos clave que responden a la tiroides, como el cerebro, el músculo esquelético y cardiaco, y la grasa parda. La T3 se genera intracelularmente por la actividad de D2 sobre T4, T3 se transfiere al núcleo y regula la transcripción. Por esta razón, la actividad de D2 es crítica para la actividad de las HTs y su señalización [Silva *et al.*, 2008].

3. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

3.1 Mecanismo genómico

Gran parte de las acciones de las HTs están mediadas por la unión de la hormona a los receptores tiroideos nucleares (RT). Los RT pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares [Aranda *et al.*, 2013]. Se denominan como TR α Y TR β y están codificados por dos genes (α y β) que se encuentran en dos cromosomas diferentes que se expresan en diversas vías de desarrollo y tejidos [Senese *et al.*, 2014].

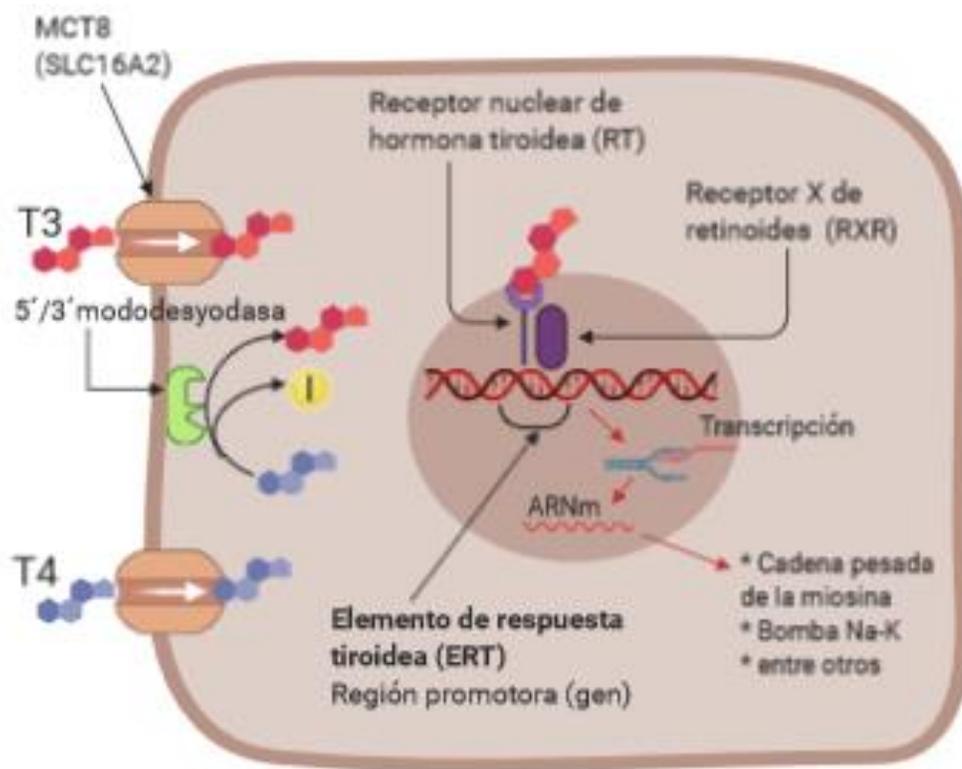


Figura 2. Esquema del mecanismo de acción genómico de las hormonas tiroideas. Se representa la entrada de las HTs a través del transportador de mono carboxilatos (MCT8). La T4 es sustrato de la enzima desiodasa, siendo transformada en T3. El receptor de hormonas tiroideas (RT) y el receptor X de ácido retinoico (RXR) forman heterodímeros que se unen específicamente a elementos de respuesta de hormonas tiroideas (ERT) en las regiones promotoras de los genes blanco, modificando la expresión génica [Kasper *et al.*, 2016].

Los RT regulan la transcripción uniéndose a secuencias de ADN denominados elementos de respuesta a hormonas tiroideas (ERT), ubicados en regiones reguladoras de genes diana (Figura 2). Dichos efectos de los receptores en la transcripción están mediados por el reclutamiento de corre reguladores. Los TR pueden unirse a corre presores que inactivan la expresión génica, o a coactivadores que favorecen la activación transcripcional [Cheng *et al.*, 2010].

3.1.1 Isoformas de los receptores nucleares de hormonas tiroideas

Las isoformas TR α 1 y TR α 2 se producen por medio de un empalme alternativo del gen TR α y únicamente cambian en el carboxilo terminal; por otra parte, del receptor TR β existen dos isoformas principales β 1 y β 2 con variación en el amino terminal, pero conservando la capacidad de unión al ADN y a las hormonas [Carreón-Rodríguez y Pérez-Martínez, 2013]. Existe otra isoforma menos estudiada, el TR β 3, así como las formas truncadas: Δ TR β 3, Δ TR β 1 y Δ TR α 2, las cuales carecen de la capacidad de unión al ADN [Pascual y Aranda, 2013].

Los niveles de expresión de las diferentes isoformas de los TR varían entre el tipo de tejido y periodo de desarrollo, sugiriendo que cumplen funciones específicas para cada órgano. TR α 1 presenta una alta expresión en corazón, hueso, cerebro y musculo esquelético, mientras que TR β 1 se expresa mayormente en riñón e hígado. Los niveles de TR β 2 son más altos en la hipófisis anterior y en las células neuronales [Pascual y Aranda, 2013].

3.1.2 Estructura de los receptores nucleares de hormonas tiroideas

El receptor consiste en una región N-terminal variable (A/B), un dominio de unión al ADN conservado (DBD), una región de enlace D y una región E conservada que contiene el dominio de unión al ligando (LBD). La región A/B es la región con más variaciones tanto en tamaño, como en secuencia y contienen una función de activación transcripcional independiente del ligando. Por el contrario, DBD es el dominio más conservado y permite la unión a una secuencia de ADN específica [Skah *et al.*, 2017]. Esta región está conformada por los conocidos “dedos de zinc”

y un carboxilo terminal. Cada dedo de zinc contiene 4 cisteínas coordinadas tetraédricamente por un ion de zinc [Aranda *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2016].

3.1.3 El receptor retinoide X

El receptor retinoide X (RXR) se caracteriza por su capacidad de unión con otros receptores nucleares a elementos de respuesta de ADN. Aunque también puede ser estimulado directamente por el ligando y regular la expresión génica. Este receptor puede ser estimulado por el ácido retinoico, así como una gama de otros ligandos sintéticos, los cuales han servido como tratamiento contra el cáncer [Mullur *et al.*, 2014]. TR forma un heterodímero con RXR que se une a un ERT, estimulando o inhibiendo la transcripción génica. El ERT está compuesto por dos secuencias de seis pares de bases (medios sitios) separadas por un número discreto de bases a las que se une el heterodímero RXR-RT [5'-PuG (G/T)TCA-(X)_n-PuG(G/T)TCA-3'] [Dawson y Xia 2012]. El componente del heterodímero RXR se une a la repetición 5' del ERT, mientras que la proteína TR se une a la repetición 3' [Shulman y Mangelsdorf, 2005].

3.1.4 Comoduladores

El RT en su forma libre de ligando (aporreceptor) usualmente reprime la transcripción al asociarse a correpresores como SMRT y NcoR, los cuales reclutan desacetilasas de las histonas, manteniendo la cromatina en su estado compacto. Después de la unión de la hormona, los correpresores son liberados y los coactivadores son reclutados, como es el caso de SRC-1, el cual activa a la enzima histona acetiltransferasa, para dejar disponible el material genético y sea más accesible para la transcripción [Shimizu *et al.*, 2015; Pascual y Aranda, 2013; Astapova, 2016].

3.2 Mecanismo no genómico

Desde hace unos años se han estudiado diferentes sitios de unión para las HTs ubicados en la membrana plasmática y citoplasma. La unión ha demostrado tener

acciones importantes para la proliferación celular, transporte de iones, mantenimiento del citoesqueleto, entre otras [Davis *et al.*, 2004, 2011, 2014].

Por convención se ha definido como acciones no genómicas a todas aquellas que no se inician por la asociación de la T3 con TR localizados en el núcleo celular, además pueden ser iniciadas por T4 y rT3 (T3 reversa) [Davis *et al.*, 2011, 2016]. Así, con respecto a las acciones no genómicas, las proteínas que se desempeñan como receptores de las HTs son componentes estructurales de la membrana plasmática, por ejemplo, la integrina $\alpha\beta3$. También pueden ser isoformas truncadas de TR nucleares, por ejemplo, de TR α , que puede actuar en la membrana plasmática o en el citoesqueleto [Davis *et al.*, 2016]. Se ha propuesto que una isoforma TR α truncada (TR $\Delta\alpha1$) se desempeña en el citoplasma como el receptor en el que T4 y rT3 inician pasos reguladores en la bioquímica de la proteína actina. Esta isoforma no se une a T3, y tampoco cuenta con localización en el núcleo, es abundante en el cerebro y tiene ciertas características estructurales que se encuentran en proteínas que se unen a la subunidad reguladora p85 α del fosfatidilinositol (PI3K) relevante para la actina3-quinasa [Davis *et al.*, 2016]

3.2.1 Regulación del citoesqueleto por HT

Estudios *in vitro* han demostrado que células del sistema nervioso en un estado hipotiroideo presentan un desarrollo anormal del citoesqueleto de actina; este cultivo celular fue expuesto a T3, T4 y rT3 demostrando a los pocos minutos de su aplicación una reparación de la escasez de actina polimerizada (Actina-F) (Figura 3), causada por T4 y rT3, pero no por T3 [Farwell *et al.*, 2006]. Se ha propuesto TR $\Delta\alpha1$ en el citoplasma funciona como receptor de T4 y rT3 iniciando las modificaciones estructurales de la actina [Davis *et al.*, 2017].

3.2.2 Acciones no genómicas de las isoformas de los RT en el citoplasma

En recientes estudios se ha demostrado que las isoformas citoplasmáticas de TR α se encuentran involucradas en la regulación del estado del citoesqueleto de actina y en la proliferación celular del hueso [Kalyanaraman et al., 2014]. La isoforma truncada p30 TR α 1 de las células óseas, se encuentra asociada a una balsa lipídica. Al unirse a T3 en la superficie celular puede activar las vías de la proteína cinasa activada por mitógeno [MAPK/ERK] y fosfatidil-Inositol-3-cinasa [PI3K] culminando en proliferación celular (Figura 3) [Davis et al., 2013]. La activación de ERK y PI3K a través de TR α 1 también se puede lograr a partir del receptor hormonal integrina α v β 3 [Davis et al., 2011] y la modulación del tráfico de receptores nucleares intactos (TR β 1, TR α 1) desde el citoplasma hasta el núcleo (Figura 3) [Davis, et al., 2009, 2011]. Hiroi y colaboradores demostraron que TR α 1 puede unirse a la subunidad p85 de la PI3K y por consiguiente activar la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) para la recuperación de células del sistema nervioso en estado isquémico [Hiroi et al., 2006].

El receptor TR β 1 reside en el citoplasma y puede dirigirse al compartimento intranuclear por acción de T4 sobre la integrina α v β 3 [Moeller et al., 2006], dicha activación culmina en transcripción de genes para el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), el transportador de glucosa (GLUT 1), y la fosfofructocinasa tipo plaqueta (PFKP) [Moeller et al., 2005, 2006]. GLUT 1 y PFKP son proteínas que contribuyen al metabolismo celular: absorción celular de glucosa y participación en glucólisis, respectivamente. HIF-1 α participa principalmente en angiogénesis y metabolismo energético [Martin et al., 2014].

3.2.3 Acciones no genómicas de las HT iniciadas en la membrana plasmática

Las hormonas tiroideas regulan la expresión génica de Na⁺/K⁺-ATPasa en el desarrollo de varios sistemas. Los aumentos posnatales en la Na⁺/K⁺-ATPasa en riñón, cerebro y pulmón dependen de las concentraciones normales de la HT [Horowitz et al., 1990]. La expresión de la isoforma Na⁺/K⁺-ATPasa α 3 en el

miocardio de hurón es sensible a T3 en los recién nacidos menores de 3 semanas de edad, pero no en los hurones maduros mayores de 6 semanas [Book, *et al.*, 1997]. La naturaleza del receptor en la membrana plasmática que podría estar vinculado a estas bombas de iones no fue esclarecida durante varios años, pero se propuso que ciertas cinasas tenían que activarse de manera inmediata para que la hormona tiroidea ejerza sus efectos en las bombas [Lin *et al.*, 2012].

3.2.4 Integrina de membrana $\alpha\beta 3$ como receptor de HT

Diversas líneas de investigación han demostrado que la Integrina $\alpha\beta 3$ da lugar a la activación de varias vías de transducción como: STAT-1 α [Lin *et al.*, 1999a], STAT3 [Lin *et al.*, 1999b], p53 [Shih *et al.*, 2001], receptor de estrógenos- α [Tang *et al.*, 2004]. La fosforilación de MAPK dirigida por las HTs favorece las capacidades transcripcionales en el núcleo, también es capaz de actuar en la membrana plasmática favoreciendo la inserción de transportadores en la membrana, así como la activación de los ya presentes, a través de la fosforilación (Figura 3) [Davis *et al.*, 2000, 2017].

Las integrinas son una familia de glucoproteínas transmembranales que forman heterodímeros no covalentes. Los dominios extracelulares de las integrinas interactúan con varios ligandos, incluidas las glucoproteínas de la matriz extracelular y factores de crecimiento, y al unirse al ligando puede activar la cascada de señalización de MAPK. La integrina tiene un sitio de reconocimiento de RGD que es importante para la unión con los ligandos que contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp [Plow *et al.*, 2003].

A través de la técnica de cristalografía se estudió el complejo HT-Integrina $\alpha\beta 3$ revelando la ubicación del receptor en la cabeza de la integrina, cerca del sitio de reconocimiento de RGD, los monómeros α y $\beta 3$ contribuyen a la estructura y soporte del receptor. El modelado también demostró que este sitio distinguía entre T3, T4 y tetrac [Lin *et al.*, 2011]. El modelo matemático realizado con una cinética química con la integrina $\alpha\beta 3$ y las hormonas T3 y T4 exhibió dos dominios de unión, S1 vinculado con T3 exclusivamente y S2 en el que se pueden unir T3 y T4

[Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011]. La unión de T3 al dominio S1 activa la vía de señalización PI3K, generando la transferencia de TR α citoplasmático al núcleo y la transcripción del gen HIF-1 α , mientras que T3 al unirse a S2 puede causar la proliferación de células U-87 MG dependiente de ERK1/2 [Lin *et al.*, 2009].

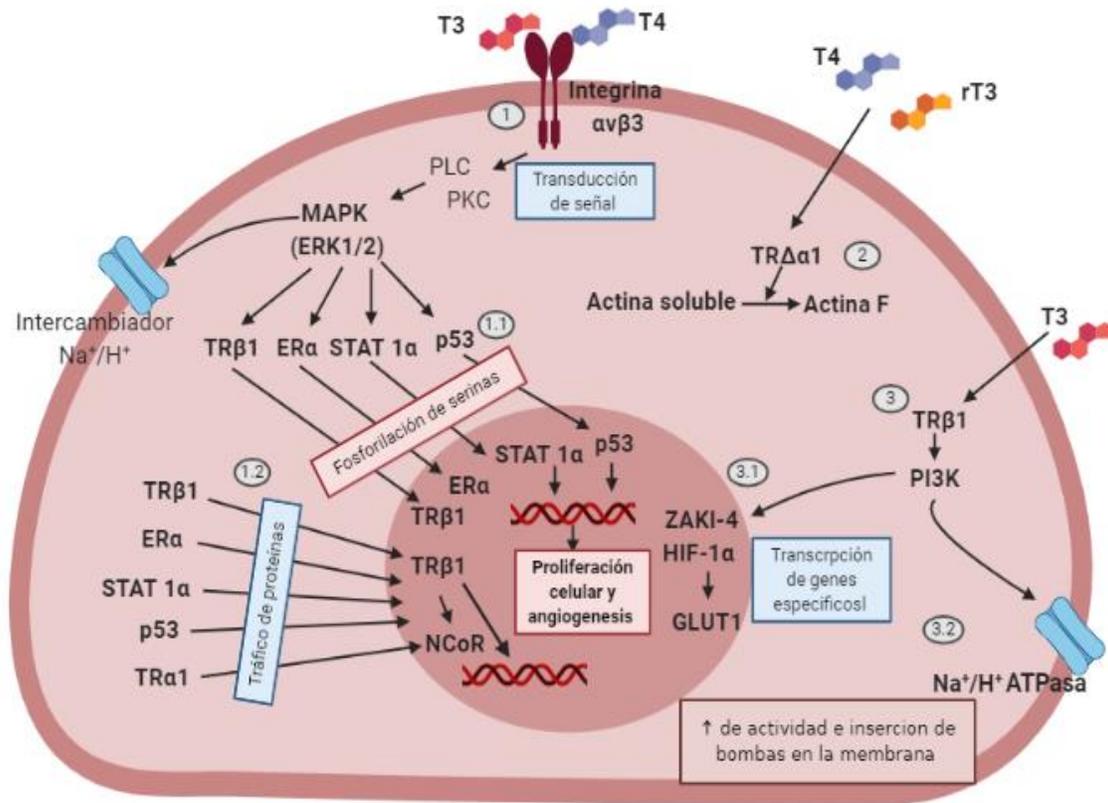


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo no genómico de las hormonas tiroideas. (1) Acciones no genómicas de las HTs que comienzan en la membrana plasmática con la unión de la hormona a la integrina $\alpha v \beta 3$ activando la vía de señalización PLC y PKC, la cual activa a MAPK/ERK1/2. La activación de MAPK da lugar a la fosforilación de serinas de ciertos receptores (1.1). También, pueden regular el tráfico intracelular de proteínas (1.2) desde el citoplasma hacia el núcleo. Estas proteínas se encuentran involucradas en la modulación de genes específicos que dan lugar a la proliferación celular y angiogénesis. (2) Regulación no genómica del estado del citoesqueleto por T4 y rT3. (3) T3 puede interactuar con el RT citoplasmático TR β 1 para activar la vía de transducción PI3K/AKT. Los resultados finales de este proceso incluyen: (3.1) transcripción genética tal como ZAKI-4 y HIF-1 α . Un gran número de genes son

objetivos de HIF-1 α , incluido el transportador de glucosa GLUT1, y (3.2) cambios en el número de bombas insertadas en la membrana y aumento en la actividad de la bomba Na-K-ATPasa.

4. Hormonas tiroideas y el sistema cardiovascular

La importancia de las hormonas tiroideas en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular se ha demostrado a través de estudios clínicos y experimentales. Los cuales muestran que cambios sutiles en las concentraciones de las HTs, como en el hipotiroidismo e hipertiroidismo subclínicos influyen evidentemente en el sistema cardiovascular [Rutigliano y Zucchi, 2017].

Las HTs influyen en el estado cardiaco en tres formas: por acciones genómicas directas en los cardiomiocitos a través de la unión a receptores nucleares, dando lugar a la regulación de transcripción de genes específicos; por acciones no genómicas en los canales iónicos de la membrana celular de las células cardíacas; y finalmente a través de los efectos de T3 y T4 en la circulación periférica que modifica la hemodinámica cardiovascular, como el llenado cardiaco [Klein y Ojamma, 2001; Cooper y Biondi, 2012].

En el cardiomiocito, T3 se une al TR nuclear, que al unirse a los elementos de respuesta regula la actividad transcripcional de genes diana, dando como resultado modificaciones en la contractilidad miocárdica y la función sistólica. La hormona tiroidea, T3, activa la expresión de genes que codifican para la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa, la cadena pesada de la miosina α (codificada por MYH6) y la bomba ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA2; codificada por ATP2A2), y regula negativamente la transcripción de la cadena pesada de la miosina β (codificada por MYH7) y el fosfolamban (PLN) [Cheng *et al.*, 2010; Pingitore *et al.*, 2012; Holt *et al.* 1999; Fazio *et al.*, 2004].

Las dos cadenas pesadas de miosina son componentes importantes del aparato contráctil del cardiomiocito. SERCA y su inhibidor PLN regulan la recaptación y liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, controlando la disponibilidad de calcio para la contracción sistólica. Al incrementar los niveles de SERCA2 y

reducirse los niveles de PLN en el retículo sarcoplásmico se favorece la recaptación de Ca^{2+} durante la diástole, que genera una relajación miocárdica más rápida [Kranias y Hajjar, 2012]. A continuación, se detallan los eventos moleculares que explican las acciones de las hormonas tiroideas sobre el cardiomiocito, anteriormente mencionadas. Las principales proteínas que regulan la captación, almacenaje y liberación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (RS) del músculo cardíaco son la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA), una proteína de alta capacidad de unión a Ca^{2+} llamada calsequestrina (CSQ) y el canal de liberación de Ca^{2+} también conocido como receptor de rianodina (RyR) [Hall, 2011]. En la célula cardíaca, el acoplamiento excitación-contracción comienza cuando un estímulo despolarizante en el túbulo T activa al canal de calcio sensible a voltaje del sarcolema, receptor de dihidropiridina (DHPR), el cual permite la entrada de pequeñas cantidades de Ca^{2+} extracelular al citoplasma induciendo al canal RyR para que libere Ca^{2+} del interior del RS para elevar la concentración de Ca^{2+} intracelular de ~20 nM hasta ~1 μM . La fuerza de contracción muscular está regulada por la unión de Ca^{2+} a la troponina C, que causa el entrecruzamiento de actina y miosina [Reyes-Juárez y Zarain-Herzberg 2009]. Durante la relajación muscular, el Ca^{2+} es transportado del citoplasma al RS principalmente por la SERCA (60-70%) y transportado al exterior por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (30-40%). Por tanto, la contracción y la relajación en miocitos cardíacos es regulada por las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [Kranias y Hajjar, 2012].

Las hormonas tiroideas poseen efecto inotrópico sobre el corazón, a través de la regulación positiva de la expresión génica del receptor adrenérgico β_1 [Klein y Danzi, 2007]. Las HTs al activar la vía de señalización PI3K/Akt induce la producción de óxido nítrico endotelial, que genera una reducción en la resistencia vascular [Kuzman *et al.*, 2005]. El decremento en la resistencia vascular provocada por las hormonas tiroideas, aunado al efecto inotrópico positivo, conducen a un aumento del gasto cardíaco; así se ha demostrado en pacientes con hipertiroidismo [Vadiveloo *et al.*, 2011]. Las TH regulan de manera negativa la expresión del receptor vascular de angiotensina II tipo 1 disminuyendo la respuesta contráctil a Ang II [Fukuyama *et al.*, 2003], y aumentan la producción de

óxido nítrico (NO) [Carrillo - Sepulveda, *et al.*, 2010]. Esta vasodilatación periférica activa los reflejos vasopresores, induciendo taquicardia y activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona, favoreciendo la reabsorción renal de sodio, dando como consecuencia aumento en el volumen plasmático, y por consiguiente un aumento en la precarga [Grais y Sowers, 2014; Klein y Ojamaa, 2001].

5. Hormonas tiroideas e hipertrofia miocárdica

Las alteraciones descritas anteriormente contribuyen a un proceso de crecimiento cardíaco (hipertrofia cardíaca) inicialmente considerado fisiológico o adaptativo, el cual tiene una relevante participación en el mantenimiento de la homeostasis del sistema cardiovascular, como resultado al aumento en la demanda cardíaca [Dillman, 2010; Ojamaa, 2010].

En el hipertiroidismo la hipertrofia cardíaca observada se caracteriza por:

- Engrosamiento de la pared ventricular (hipertrofia concéntrica), debido a la adición de sarcómeros en dirección paralela en los cardiomiocitos.
- Un aumento en la fuerza de contracción generado por incremento en la recaptación de calcio al retículo sarcoplásmico.
- Velocidad de relajación incrementada, causada por el aumento de la absorción de calcio por el retículo sarcoplásmico durante la diástole [Marcisz *et al.*, 2006].

Diversas vías de señalización intracelular se activan rápidamente a través de T3 y median el crecimiento de los cardiomiocitos, por ejemplo, la vía de PI3K/Akt/mTOR (mTOR: blanco mamífero de rapamicina) en células de mamífero [Diniz *et al.*, 2009; Kenessey y Ojamaa, 2006]. mTORC1 regula el inicio de la transcripción a través de la activación de la cinasa de la proteína p70 S6 ribosomal (p70^{S6K}) y de la inhibición de la proteína de unión del factor eucariótico de iniciación 4E (4E-BP1) [Iadevai *et al.*, 2014]. Estas acciones también pueden ser iniciadas por la integrina de membrana $\alpha\beta3$, que como se mencionó

anteriormente puede activar la vía de PI3K cuando T3 se une a S1, o cuando la unión de las HTs a S2 activa la vía de las MAPK [Bergh *et al.*, 2005; Cody *et al.*, 2007].

6. Hormonas tiroideas y angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, contribuyendo al mantenimiento de los tejidos y proliferación celular [Rocha *et al.*, 2018]. La capacidad de las HTs para generar angiogénesis se debe a su unión con el receptor de membrana integrina $\alpha v \beta 3$; así fue estudiado en modelos angiogénicos, como la membrana corioalantoidea de embriones de pollo [Bergh *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2004]. Dicho modelo permitió demostrar que al añadir concentraciones supra fisiológicas de T3 se incrementaron los factores de crecimiento vascular convencionales, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [Mousa *et al.*, 2014], el factor de crecimiento a fibroblastos (bFGF) [Davis *et al.*, 2004] y el factor de crecimiento de derivado de plaquetas (PDGF) [Mousa *et al.*, 2014]. Para que la transcripción de estos factores se llevara a cabo se requirió la transcripción génica, iniciada por la vía de señalización ERK1/2 [Bergh *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2004]. Las yodotironinas también estimulan la angiogénesis al aumentar la expresión del factor 1α inducible por hipoxia (HIF- 1α); el mecanismo implica la interacción de la hormona con el RT β 1 en el compartimento citosólico y la activación de la PI3K (Moeller *et al.*, 2011; Hiroi *et al.*, 2006).

Asimismo, se ha propuesto un papel potencial para los RTs intranucleares en la regulación de la angiogénesis coronaria. Estudiando modelos de ratones transgénicos, Makino y colaboradores (2009) informaron que la densidad capilar cardíaca se redujo significativamente en los ratones deficientes en RT β , pero no en los ratones nocaout RT α o en los ratones nocaout RT β específicos para cardiomiocitos, lo que sugiere que la expresión del RT β intranuclear en células

endoteliales desempeña un papel en la angiogénesis. Estos autores mostraron que las células endoteliales coronarias aisladas de ratones nocaout RT β tenían capacidad reducida para formar redes capilares comparadas con las células endoteliales de ratones de tipo salvaje o nocaout RT α .

II. JUSTIFICACIÓN

La evidencia experimental reciente, ha conducido a definir el crecimiento cardiaco en respuesta a las HTs como hipertrofia fisiológica; esto en oposición a la hipertrófica patológica ocasionada, principalmente, por sobrecarga de presión (Ojamaa, 2010; Dilmann, 2010). La hipertrofia cardíaca fisiológica se asocia con capilares miocárdicos normales o aumentados, mientras que la hipertrofia patológica se correlaciona con una reducción en la densidad capilar (Luidens et al., 2010; Ojama, 2010). Así, en la hipertrofia cardíaca fisiológica, las señales que promueven el crecimiento deben inducir paralelamente la expresión de factores angiogénicos e hipertrofia, para mantener el equilibrio entre el crecimiento de los cardiomiocitos y el de los capilares coronarios (Luidens et al., 2010).

Los primeros estudios histomorfométricos en ratas, reportaron una respuesta angiogénica coordinada al crecimiento miocárdico inducido por T4, lo que sugiere que la formación de nuevos capilares y arteriolas sirvió para normalizar la perfusión miocárdica durante la hipertrofia (Chilian et al., 1985; Tomanek y Busch, 1998). Las HTs tienen efectos bien documentados en la angiogénesis (Davis et al., 2009; Moeller y Broecker-Preuss, 2001; Savinova et al., 2011; Nicolini et al., 2013). La brotación de las células endoteliales inducida por las HTs ha sido establecida en diferentes modelos, como la membrana corioalantoica de pollo y el tejido del ventrículo izquierdo cardiaco cultivado de ratón hipotiroideo (Davis et al., 2004; Chen et al., 2012). El mecanismo molecular de la acción pro angiogénica de las HTs puede iniciarse de forma no genómica en la membrana plasmática de las células endoteliales (EC) a través de la interacción con la integrina $\alpha v \beta 3$. La transducción de la señal hormonal está mediada por la proteína cinasa activada

por mitógenos, ERK1/2, y da como resultado la transcripción de varios genes relevantes para la angiogénesis, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Bergh et al., 2005; Luidens et al., 2010). Este efecto pro angiogénico puede ser potenciado por una comunicación cruzada entre el receptor integrina de las HTs y los receptores VEGF y bFGF (Luidens et al., 2010). Las yodotironinas también parecen estimular la angiogénesis al aumentar la expresión del factor 1α inducible por hipoxia (HIF- 1α) (Moeller et al., 2005, 2011), un factor de transcripción importante para el desarrollo de colaterales de las arterias coronarias en el escenario de hipoxia (Chen et al., 2008). El mecanismo propuesto implica la interacción de la T3 con el RT β en el compartimento citosólico y la activación de la fosfatidilinositol3-cinasa (PI3K) (Moeller et al., 2005, 2011).

Es palmario, por lo expuesto anteriormente, que distintas vías de transducción han sido implicadas en los efectos angiogénicos de las HTs. En principio, estas vías pueden, aisladamente o en combinación, en función del tiempo de su activación por diferentes estímulos, participar en el desarrollo de la angiogénesis. En este trabajo, analizaremos los niveles de factores de crecimiento angiogénicos en los corazones aislados de ratas con hipertiroidismo agudo, centrándonos en la evolución del crecimiento cardíaco y de la densidad capilar coronaria.

III. HIPÓTESIS

La hormona tiroidea, T3, incrementa los niveles de los factores angiogénicos (HIF1 α , VEGF y FGF) en el corazón, favoreciendo el desarrollo de capilares coronarios previa o paralelamente a la manifestación de la hipertrofia de los cardiomiocitos, durante los primeros días de evolución del hipertiroidismo experimental en la rata.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las modificaciones de los factores angiogénicos (HIF1 α , VEGF y FGF) y la densidad capilar coronaria durante el desarrollo de hipertrofia miocárdica en los corazones de ratas Wistar con hipertiroidismo inducido por la administración subcutánea de T3 por 1, 3 y 10 días.

1. Objetivos particulares:

Estudiar en los corazones aislados de ratas con hipertiroidismo experimental de 1, 3 y 10 días de evolución:

- 1) el aumento de la masa ventricular izquierda y los valores de hormonas tiroideas en el suero.
- 2) el desarrollo de angiogénesis ventricular izquierda, mediante análisis histológico morfométrico para determinar la densidad capilar.
- 3) el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda, mediante análisis histológico morfométrico para determinar el área de sección transversal de los cardiomiocitos.
- 4) la presión de perfusión coronaria, la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, las primeras derivadas máxima positiva (+dP/dtmáx) y mínima negativa (-dP/dtmin) de la presión ventricular, y la frecuencia cardiaca espontánea.
- 5) los cambios en los niveles de las proteínas HIF1 α , VEGF y FGF mediante análisis de transferencia Western.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron ratas macho Wistar con pesos de 250 a 300 g, y de 12 a 14 semanas de edad. Los animales se mantuvieron con un ciclo de luz y oscuridad de 12 por 12 horas, en un cuarto especial con temperatura constante (22 ± 2 °C), con libre

acceso a agua y comida en sus cajas. Los procedimientos realizados en animales cumplen con los requerimientos que en la materia determinan 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.

1. Inducción del hipertiroidismo

El hipertiroidismo agudo se indujo mediante la administración subcutánea de T_3 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, diluida en solución salina alcalina: 0.2 mM de NaOH en 0.9% de NaCl) diariamente por 1 (T_{1d}), 3 (T_{3d}) y 10 días (T_{10d}). Los animales controles fueron inyectados con el vehículo (solución salina alcalina, 1ml/kg) durante 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 días (V_{10d}). Los experimentos se realizaron 24 h después de la última dosis de T_3 o vehículo.

2. Valoración del estado hipertiroideo

Se obtuvo sangre de la aorta abdominal, la cual fue centrifugada a 1000 g durante 10 min y el suero se almacenó a -20°C , hasta el ensayo de las HTs. Los niveles de T_3 y T_4 en el suero, fueron determinados en ratas de los grupos T_{31d} , T_{33d} y T_{310d} , así como en sus respectivos controles temporales V_{1d} , V_{3d} y V_{10d} , utilizando Total T_3 y Total T_4 ELISA kits (Alpha Diagnostics, San Antonio, TX, USA).

Se utilizaron ratas de todos los grupos experimentales para realizar los experimentos que se definen a continuación:

3. Preparación de Langendorff flujo constante

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.), corroborada la profundidad del plano anestésico mediante el “pellizcamiento del dedo de la pata”, los animales fueron heparinizados por vía intraperitoneal (heparina sódica 500 UI). En cada animal, se realizó una incisión de la piel

siguiendo la línea media, desde el apéndice xifoides hasta la base del cuello; posteriormente, se practicó toracotomía por los cartílagos costales y el esternón; levantado para visualizar el pericardio, se disecó el pericardio y la aorta ascendente y se extrajo el corazón rápidamente, colocándolo en una solución salina amortiguadora fría. El corazón aislado fue perfundido retrógradamente con flujo constante (10 ml/min) a 37 ± 1 °C, a través de una cánula insertada en la aorta ascendente (asegurada con hilos de sutura). La perfusión se realizó utilizando buffer Tyrode modificado, gaseado con 95% O₂ y 5% CO₂, conteniendo en mM: NaCl (128), KCl (4.7), CaCl₂ (1.36), MgCl₂ (1), NaHCO₃ (20), NaH₂PO₄ (0.36), dextrosa (10) y agua bidestilada, pH 7.4. El pH se mantuvo mediante la gasificación continua con la mezcla de oxígeno y dióxido de carbono mencionada.

La función ventricular izquierda fue evaluada por medio de un globo intraventricular. Este globo de látex, lleno de agua, se insertó en el ventrículo, a través de la aurícula izquierda, en los primeros 10 minutos del período de estabilización. El globo fue elaborado en el laboratorio a partir del látex de un condón, midiendo de 3 a 5 mm de diámetro, y fue conectado a un transductor de presión (TSD104A, Biopac Systems Inc.; Santa Bárbara, California, USA) para el registro de la presión intraventricular izquierda en una computadora con el programa Acqknowledge (MP 100WSW, Biopac Systems Inc.). La presión de perfusión del corazón se cuantificó mediante un transductor de presión conectado a la cánula de infusión; de esta forma se obtuvieron los valores basales de presión de perfusión coronaria (PPC).

Después de un período de estabilización de al menos 45 minutos se obtuvieron las siguientes mediciones:

Para evaluar la función sistólica ventricular izquierda se midió la presión desarrollada ventricular izquierda (PDVI); a partir de ella se calcularon los valores máximos de las primeras derivadas de la presión ventricular positiva ($+dP/dt_{max}$) y negativa ($-dP/dt_{min}$). La frecuencia cardiaca (FC) espontánea y la PPC también fueron determinadas.

4. Medición de la masa ventricular

Una vez extraídos los corazones, el tejido auricular y los grandes vasos fueron disecados para aislar el tejido ventricular. El peso seco del ventrículo izquierdo se obtuvo mediante el secado del tejido ventricular en un horno a temperatura de 105-110°C hasta obtener un peso constante. Utilizando una báscula analítica (Ohaus, Adventure Pro) se midió la masa ventricular izquierda (mg). Los valores obtenidos de masa de los ventrículos fueron normalizados con la longitud de la tibia (mm), la cual fue medida con un calibrador Vernier. Esta medición se realizó mediante disección post mortem del miembro pélvico derecho de los animales de los diferentes grupos.

5. Determinación de la expresión de los factores angiogénicos VEGF, bFGF, HIF-1 α en el ventrículo izquierdo del corazón de rata mediante el método de Western Blot

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60 μ g/kg, i.p.), la corroboración de la profundidad del plano anestésico y la extracción del corazón se realizaron como fue descrito previamente. Una vez extraído el corazón, se tomó una muestra del ventrículo izquierdo de aproximadamente 100 mg y colocó en un tubo de micro centrifuga con 1 ml de solución homogeneizadora (TRIS 0.1 M a pH 7.4), adicionada con inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Complete Mini y PhosSTOP EasyPack). Los tejidos fueron homogeneizados con un Polytron entre 8000 - 12000 rpm durante 1 minuto aproximadamente. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante en alícuotas de 100 μ L, las cuales fueron preservadas a - 80°C para los experimentos posteriores. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry.

Para el proceso de separación por electroforesis, las alícuotas de las muestras (100 μ L) se mezclaron con 11 μ L de buffer de carga mezclado con β -

Mercaptoetanol y se colocaron a una temperatura de 100°C durante 10 min para desnaturalizar las proteínas. Se cargaron 50 µg de proteína total para ser separados mediante electroforesis en geles poliacrilamida-SDS (10 y 12%), La electroforesis se realizó en un equipo MiniProtean tetra cell de Bio-Rad:

- Para VEGF y bFGF: 88 V durante 2 horas
- Para HIF-1α: 100 V durante 3 horas

Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Inmobilon-P) empleando un sistema semiseco trans-blot SD Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad. Las condiciones de transferencia fueron:

- Para VEGF y bFGF: 19 V durante 55 minutos
- Para HIF-1α: 21 V durante 65 minutos

Las membranas fueron bloqueadas con TBST-Leche al 5% o TBST-albumina sérica bovina al 3% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante, después del bloqueo, las membranas fueron incubadas durante la noche en agitación constante a 4°C, de manera separada con los siguientes anticuerpos:

- VEGF (27-30kDa)- Anti VEGF ratón monoclonal IgG, dilución 1:1000
- bFGF (25kDa)- Anti bFGF ratón monoclonal IgG a una dilución 1:2000
- HIF-1α(130kDa)-Anti HIF-1α Conejo monoclonal a una dilución 1:800 Santa Cruz Biotechnology.
- β-Actina (44kDa)-Anti β-Actina cabra monoclonal IgG a una dilución 1:5000 abcam

Después de que las membranas fueron lavadas, los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano fueron diluidos en TBST, se añadieron y se mantuvieron en agitación durante 2 h a temperatura ambiente.

- VEGF - Anti ratón dilución 1:20000
- bFGF - Anti ratón dilución 1:20000

- HIF-1 α – Anti Conejo dilución 1:20000
- β -Actina - Anti cabra dilución 1:10000

Las membranas fueron lavadas, con TBST, e incubadas con sustrato de quimioluminiscencia (luminol), lo cual produjo una señal detectable por exposición a una película fotográfica. Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 3200C. La intensidad 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, posteriormente se normalizó con la intensidad de la β -Actina (Control de carga) por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Indice} = \frac{\text{Densidad de la proteína de estudio}}{\text{Densidad de } \beta - \text{Actina}}$$

La disposición de cadáveres se realizó de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo; en el almacén temporal de residuos de la ESM.

6. Análisis histológico en ventrículo izquierdo

Se anestesió la rata con pentobarbital a una dosis de 50 mg.kg⁻¹. Se extrajo el corazón a través de una resección quirúrgica, evitando cualquier lesión en el tejido con el material de extracción. A continuación, se detalla paso a paso cada etapa de la técnica histológica, debido a que es de vital importancia cada uno de ellos para la obtención de resultados fidedignos.

Fijación

La fijación es el proceso de preservación estructural y química de las células y material extracelular. Se utilizó un fijador no coagulante, el formaldehído, el cual puede interactuar con las macromoléculas tisulares para formar una malla que las entrelaza. A diferencia de los fijadores coagulantes, este tiene la capacidad de

eliminar menos moléculas de agua en el tejido, favoreciendo la preservación ultraestructural de los órganos.

Deshidratación

Para realizar la inclusión en parafina (medio hidrofóbico) el corazón se deshidrató en alcohol etílico a una concentración creciente para evitar la rápida salida de agua del tejido y por consecuencia la deformación de este. La siguiente tabla muestra las concentraciones y tiempo utilizados durante la deshidratación:

Concentración de alcohol etílico	Duración
30°	1 hora
35°	1 hora
40°	1 hora
50°	1 hora
60°	1 hora
70°	1 hora
70°	12 horas
80°	1 hora
80°	1 hora
90°	1 hora
90°	1 hora
96°	1 hora
96°	1 hora
<i>Absoluto</i>	1 hora
<i>Absoluto</i>	1 hora

Aclaramiento e inclusión en parafina

La finalidad de este proceso es sustituir al agente deshidratante por una sustancia miscible con el medio de inclusión, que además da como resultado el transparentado del tejido cardiaco. Se utilizó xilol como agente aclarante. Se

colocaron los corazones en una mezcla Xilol y etanol absoluto (1:1), y posteriormente se incluyeron en parafina.

Tinción

Se obtuvieron con un microtomo secciones histológicas de 5 μm de espesor, preparadas a partir del embebido en parafina. A dichos cortes se les realizó una tinción hematoxilina-eosina y se observaron bajo microscopia de luz. Se observaron 2 campos a 40x por laminilla y se contaron los capilares de manera cegada a través del programa Angio tool. Se analizaron 2 laminillas por animal de cada grupo de tratamiento.

Análisis cuantitativo en Angio tool

Las imágenes de red vascular generadas a partir de simulaciones múltiples para cada fotografía obtenida de las observaciones al microscopio se analizaron utilizando el software de procesamiento automatizado Angio Tool (Zudaire *et al.*, 2011).

Análisis de datos

Se utilizó el análisis de variancia (ANOVA) de una vía, o el ANOVA de dos vías, apropiadamente seguidos por una prueba post hoc de Tukey o Bonferroni (Prism versión 6.0; Graph Pad Software; San Diego, CA, USA). En todas las comparaciones un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

El tratamiento a corto plazo con T3 ocasionó incremento de la T3 sérica, disminución de la masa corporal y aumento de la masa ventricular izquierda en las ratas

Los niveles séricos de T3 total aumentaron, y los de T4 total 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} (Fig.4). En los animales tratados con T3, se observa una tendencia de los valores de T3 sérica a aumentar en los días 3 y 10 en comparación con el primer día, aunque no fue significativa (Fig. 4). 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 del control temporal (Fig. 5). El tratamiento con T3 ocasionó hipertrofia ventricular evidenciada por el aumento de la razón masa seca ventricular izquierda/longitud (MSVI/LT) de la tibia en las ratas T3_{3d} y T3_{10d}, pero no en las ratas T3_{1d}, en comparación con los respectivos controles temporales (Fig. 6). Esto datos en conjunto, pueden considerarse indicativos del estado hipertiroideo de las ratas tratadas con T3 (Fazio et al., 2004; Mullur et al., 2014).

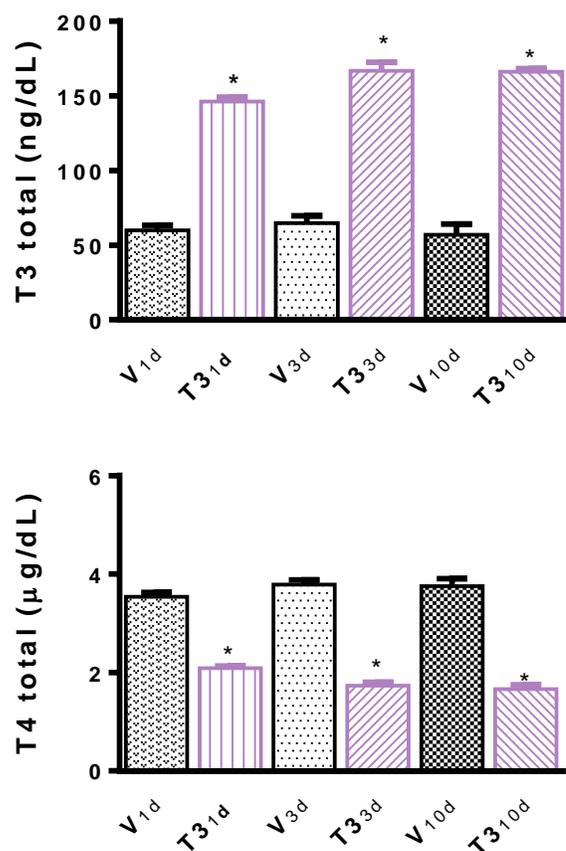


Figura 4. Comparación de los valores de las hormonas 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) y 3, 5, 3', 5' tetrayodo-L-tironina (T4) de ratas tratadas mediante inyección subcutánea diaria con T3 (500 µg/kg) por 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días, o vehículo (V; 0.1 ml/100g) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los datos son las medias ± EEM (n = 4). *P<0.05 vs. V respectivo en el tiempo (ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Tukey).

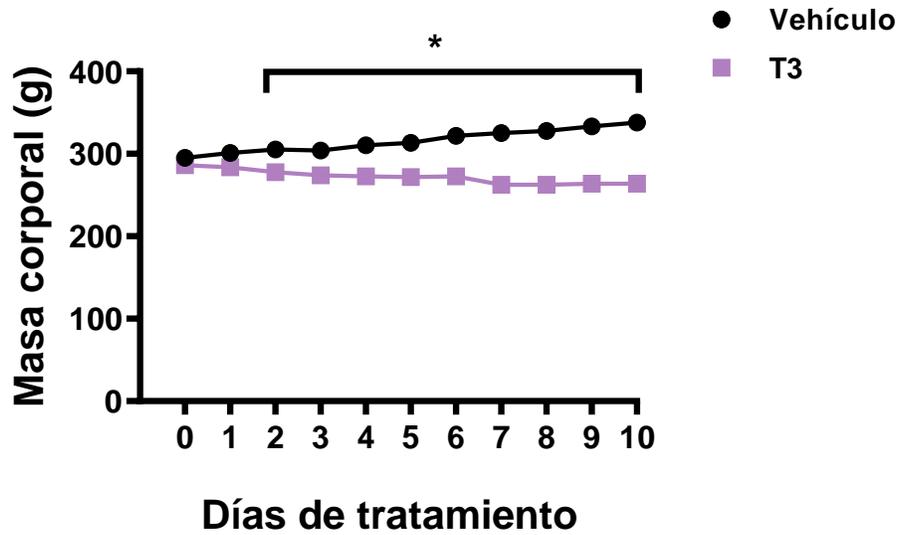


Figura 5. Valores de masa corporal de ratas tratadas con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) o con vehículo. El hipertiroidismo agudo fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de T3 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por 10 días. Los animales del grupo control fueron inyectados diariamente con el vehículo (0.1 ml/100g) durante 10 días. Los datos representan las medias \pm EEM (n = 10-22). *P < 0.05 T3 vs. Vehículo (ANOVA de dos vías con la prueba *post hoc* de Bonferroni).

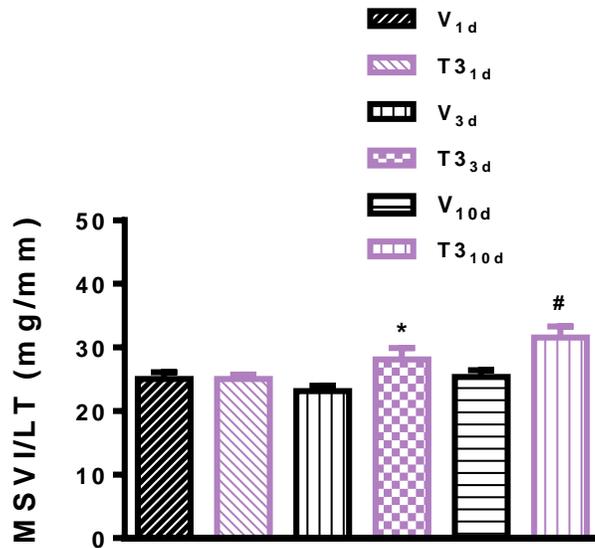


Figura 6. Comparación de los valores de la razón masa seca ventricular izquierda (MSVI)/longitud de la tibia (LT) como índice de hipertrofia cardiaca en ratas con hipertiroidismo agudo. El hipertiroidismo agudo fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3; 500 μ g/kg) por 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días, o vehículo (V; 0.1 ml/100g) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los datos representan las medias \pm EEM (n = 6). *P < 0.05 vs. V_{3d}; #P < 0.05 vs. V_{10d} (ANOVA de una vía con la prueba post hoc de Tukey).

El tratamiento con T3 in vivo a corto plazo incrementó la función cardíaca en el corazón aislado

Los corazones aislados de las ratas T3_{1d} y V_{1d} mostraron valores de PDVI, $+dP/dt_{\text{máx}}$, $-dP/dt_{\text{min}}$, FC y PPC equiparables (Figs. 7 y 8). Los corazones de las ratas T3_{3d} y T3_{10d} manifestaron incrementos significativos en la tasa máxima de aumento de presión ($+dP/dt_{\text{máx}}$) y la tasa máxima de disminución de presión ($-dP/dt_{\text{min}}$) en comparación con los corazones de las ratas V_{3d} y V_{10d}, respectivamente (Fig. 7). La FC, la PPC y la PDVI de los grupos T3_{3d} y T3_{10d} no difirieron estadísticamente de los valores correspondientes observados en los animales V_{3d} y V_{10d} (Figs. 7 y 8).

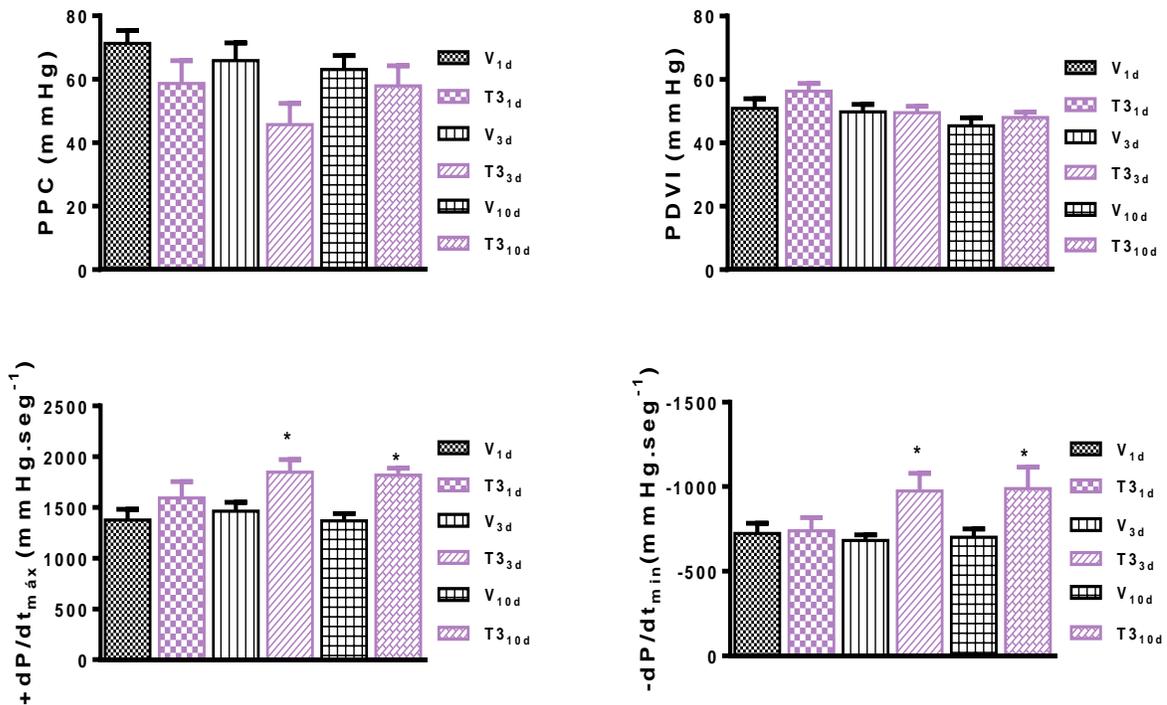


Figura 7. Aumento de la función cardíaca en corazones aislados de ratas tratadas con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) a corto plazo. Comparación de los valores de la presión desarrollada ventricular izquierda (LVDP), primera derivada de la presión ventricular máxima positiva (+dP/dt_{max}), primera derivada de presión ventricular mínima negativa (-dP/dt_{min}), y presión de perfusión coronaria (PPC) de corazones aislados de ratas tratadas con T3 a corto plazo y tratadas con vehículo. El hipertiroidismo a corto plazo fue inducido por la inyección subcutánea diaria de T3 (500 µg/kg) durante 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días. Los animales control fueron inyectados diariamente con el vehículo (V) durante 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los valores son las medias ± SEM. * P < 0.05 vs. V respectivo en el tiempo; n = 6 corazones por grupo (ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey).

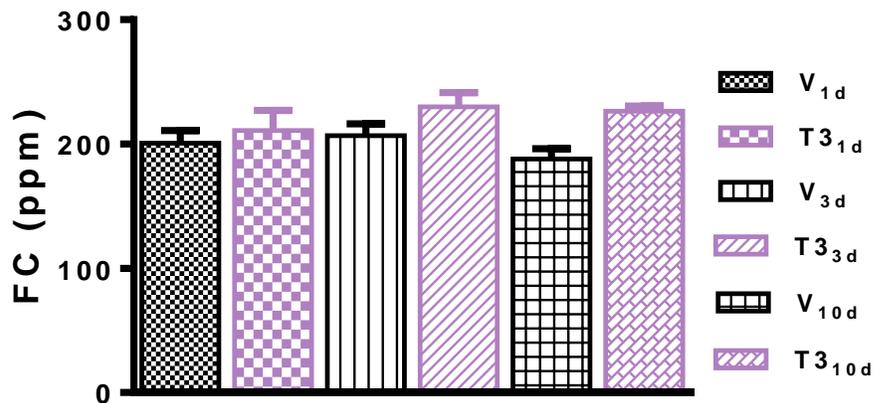


Figura 8. La frecuencia cardiaca (FC) en corazones aislados de ratas con hipertiroidismo agudo. El hipertiroidismo agudo fue inducido mediante la inyección subcutánea diaria de 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días, o vehículo (V; 0.1 ml/100g) por 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los datos representan las medias \pm ESM (n = 6). P no significativa (ANOVA de una vía). Pulsos por minuto: ppm.

El hipertiroidismo agudo y los niveles cardiacos de HIF-1 α , VEGF y FGF

Las expresiones de HIF-1 α , FGF y VEGF en los ventrículos izquierdos cardiacos (VIs) de las ratas tratadas *in vivo* con T3 o con vehículo, se muestran en las figuras 6-8. En los VIs de las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d}, la expresión del HIF-1 α no mostró cambios significativos al compararse con los valores correspondientes obtenidos con los VIs de las ratas V_{1d}, V_{3d} y V_{10d} (Fig.6). En los VIs de las ratas T3_{3d}, la expresión de FGF fue mayor que la del control V_{3d}, pero los niveles de FGF fueron similares en los grupos T3_{1d} y T3_{10d} comparados con los valores obtenidos en los corazones de los grupos V_{1d} y V_{10d}, respectivamente (Fig. 7). Notablemente, los niveles de expresión de VEGF aumentaron en los VIs de los grupos T3_{1d} y T3_{3d}, pero no en los del grupo T3_{10d}, al compararse con los referidos controles temporales V_{1d}, V_{3d} y V_{10d} (Fig. 8).

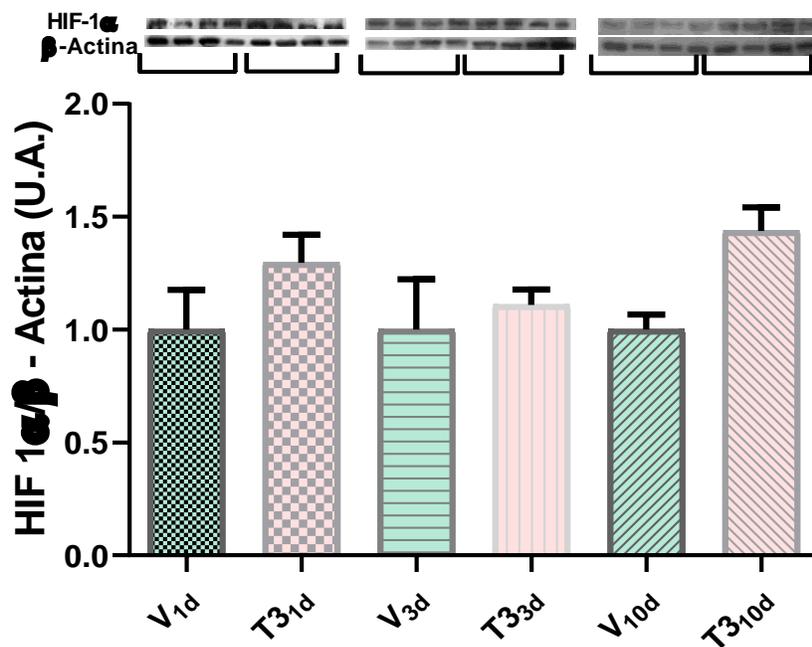


Figura 9. El tratamiento *in vivo* a corto plazo con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) no modificó la expresión del factor inducible por hipoxia 1α (HIF-1α). (Arriba) Western blots representativos. (Abajo) Evaluación densitométrica en unidades arbitrarias (U.A.) del HIF-1α en los ventrículos izquierdos cardiacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo. El hipertiroidismo a corto plazo fue inducido por la inyección subcutánea diaria de T3 (500 µg/kg) durante 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días. Los animales control fueron inyectados diariamente con el vehículo (V) durante 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los valores son las medias ± SEM; n = 4 corazones por grupo. P no significativa (ANOVA de una vía).

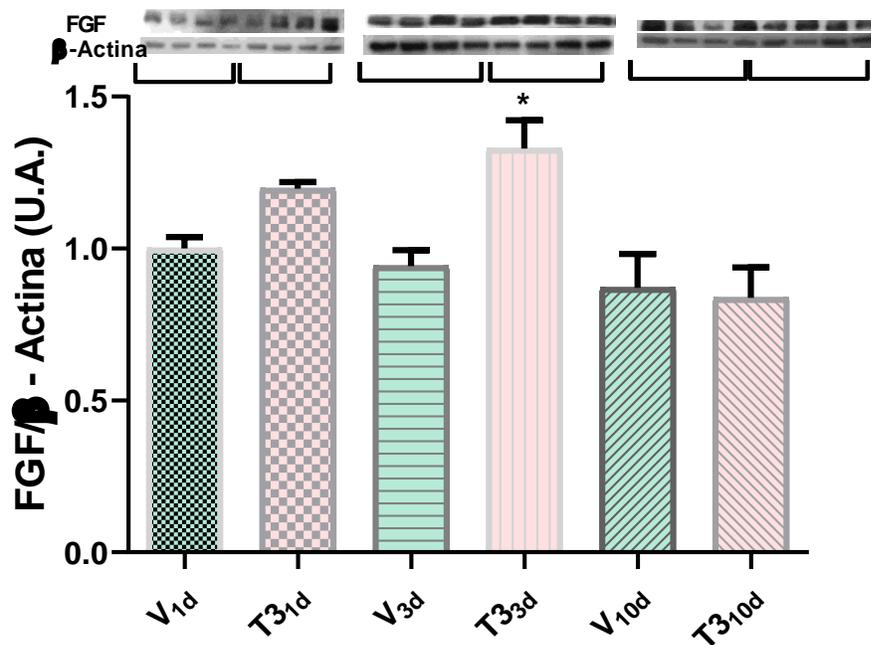


Figura 10. El tratamiento *in vivo* a corto plazo con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) aumenta la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). (Arriba) Western blots representativos. (Abajo) Evaluación densitométrica en unidades arbitrarias (U.A.) del FGF en los ventrículos izquierdos cardiacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo. El hipertiroidismo a corto plazo fue inducido por la inyección subcutánea diaria de T3 (500 µg/kg) durante 1 (T_{31d}), 3 (T_{33d}) y 10 (T_{310d}) días. Los animales control fueron inyectados diariamente con el vehículo (V) durante 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los valores son las medias ± SEM. *P <0.05 vs. V respectivo en el tiempo; n = 4 corazones por grupo (ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey).

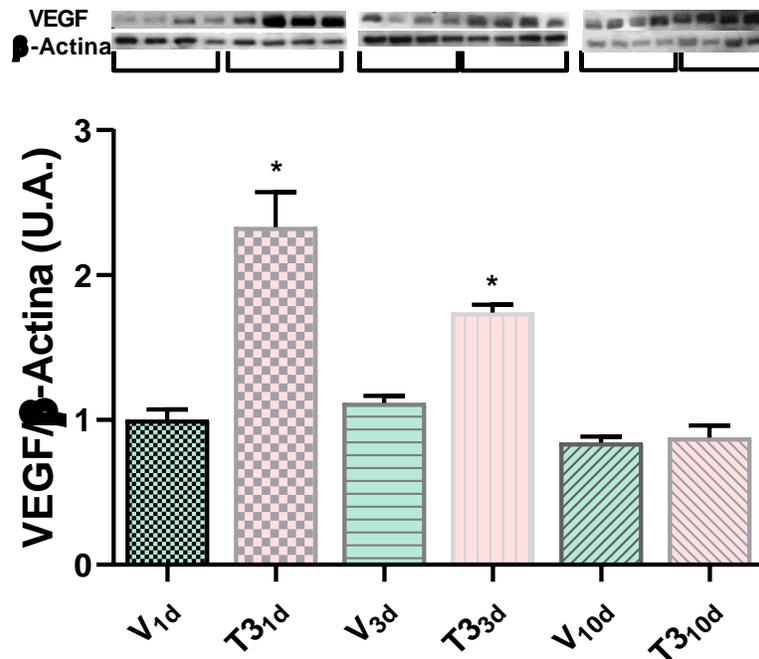


Figura 11. El tratamiento *in vivo* a corto plazo con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). (Arriba) Western blots representativos. (Abajo) Evaluación densitométrica en unidades arbitrarias (U.A.) del VEGF en los ventrículos izquierdos cardiacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo. El hipertiroidismo a corto plazo fue inducido con la inyección subcutánea diaria de T3 (500 µg/kg) durante 1 (T_{31d}), 3 (T_{33d}) y 10 (T_{310d}) días. Los animales control fueron inyectados diariamente con el vehículo (V) durante 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los valores son las medias ± SEM. * P <0.05 vs. V respectivo en el tiempo; n = 4 corazones por grupo (ANOVA de una vía con la prueba *post hoc* de Tukey).

El hipertiroidismo agudo y la densidad capilar

Los valores de la densidad capilar, representados por el porcentaje de vasos por área, se proporcionan en la Figura 12. En los VIs se observó una tendencia de los valores de densidad capilar a aumentar los días 1, 3 y 10 de tratamiento con T3, aunque no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos, en comparación respectiva con los datos obtenidos con los controles temporales (Fig.12 y Fig.13). Estos hallazgos indican que la angiogénesis en el miocardio coincidió aproximadamente en el tiempo con el desarrollo de la hipertrofia miocárdica; es decir, la angiogénesis se desarrolló en el miocardio ventricular izquierdo de forma paralela al crecimiento miocárdico.

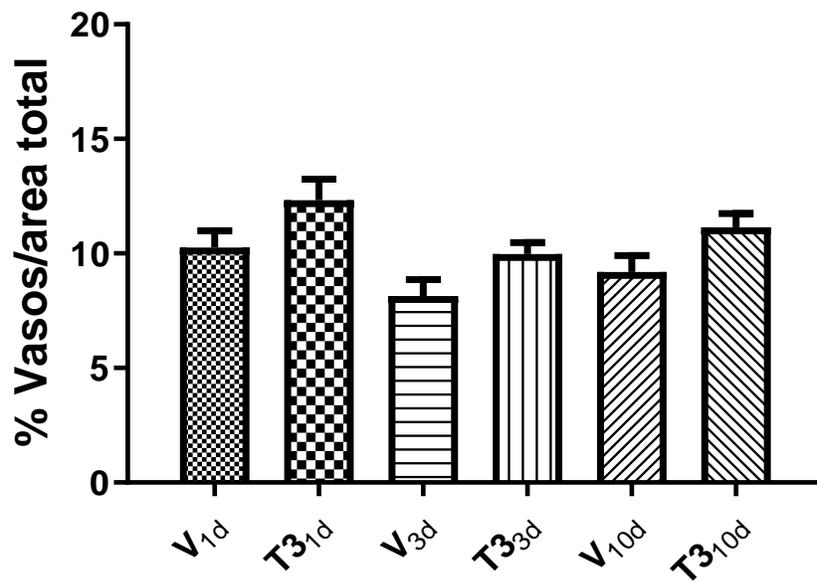


Figura 12. Durante el tratamiento *in vivo* a corto plazo con 3, 5, 3' triyodo-L-tironina (T3) la densidad capilar permaneció similar a la de los controles. La densidad capilar (% de vasos/área total) fue evaluada en los ventrículos izquierdos cardiacos de ratas tratadas con T3 o vehículo a corto plazo. El hipertiroidismo a corto plazo fue inducido por la inyección subcutánea diaria de T3 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) durante 1 (T3_{1d}), 3 (T3_{3d}) y 10 (T3_{10d}) días. Los animales control fueron inyectados diariamente con el vehículo (V) durante 1 (V_{1d}), 3 (V_{3d}) y 10 (V_{10d}) días. Los valores son las medias \pm SEM; n = 4 corazones por grupo. P no significativa (ANOVA de una vía).

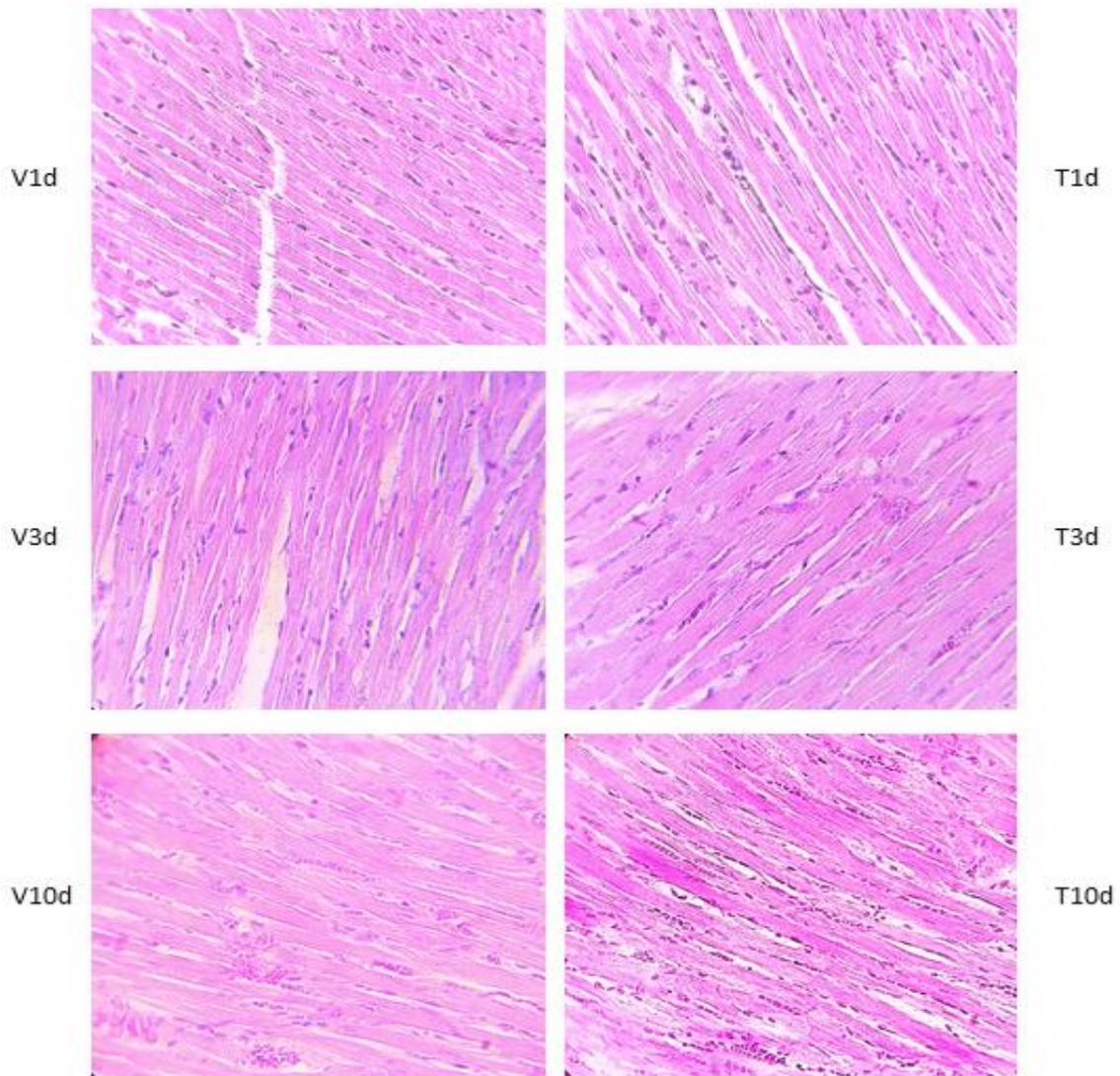


Figura 13. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de corazones de ratas tratadas con T3 a corto plazo y tratadas con vehículo. Se indujo hipertiroidismo a corto plazo por la inyección subcutánea diaria de T3 (500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) por 1 (T1d), 3 (T3d) y 10 (T10d) días. Los animales de control se inyectaron diariamente con el vehículo durante 1 (V1d), 3 (V3d) y 10 (V10d) días. Los valores son medias \pm SEM. * $P < 0,05$ frente a V respectivo en el tiempo; $n = 300\text{-}360$ cardiomiocitos de 6 corazones por grupo (ANOVA unidireccional con la prueba post hoc de Tukey). T3: 3, 5, 3 'triyodo-L-tironina; V: vehículo

VII. DISCUSIÓN

En las ratas Wistar, hemos contribuido a caracterizar los efectos del tratamiento *in vivo* a corto plazo con altas dosis de T3 (hipertiroidismo experimental) en la angiogénesis, hipertrofia y función cardiacas. En comparación con sus respectivos controles temporales, los corazones aislados de las ratas T3_{3d} y T3_{10d}, pero no así de las T3_{1d}, desarrollaron incremento de la masa ventricular izquierda, aumento del área de sección transversal de los cardiomiocitos, y valores absolutos aumentados de $+dP/dt_{max}$ y $-dP/dt_{min}$ (esto es, inotropismo y lusitropismo positivos). La PDVI, la PPC, y la FC espontánea de los corazones aislados de las ratas T3_{1d}, T3_{3d} y T3_{10d} no fueron alteradas. Lo cual puede explicarse considerando que estos parámetros requieren para su manifestación positiva en estado hipertiroido (i.e., aumento de la PPC y FC) ser evaluados, *in vivo*, en el animal íntegro. Interesantemente, los datos mostraron una tendencia (no significativa) de la densidad capilar a aumentar en los ventrículos izquierdos de ratas T3_{1d}, T3_{3d}, y T3_{10d}, en comparación con los controles temporales correspondientes. Es decir, la respuesta angiogénica se observó coordinada con el crecimiento miocárdico inducido por T3, lo que sugiere que la formación de nuevos capilares sirvió para normalizar la perfusión miocárdica durante la hipertrofia (Chilian et al., 1985; Tomanek y Busch, 1998). Consideramos que se produjo un crecimiento rápido del lecho capilar paralelamente al desarrollo de la hipertrofia cardíaca dado que: si el crecimiento capilar precediese o siguiese a la hipertrofia cardíaca, la densidad capilar aumentaría o disminuiría (rarefacción capilar) de manera significativa, respetivamente.

En apoyo a nuestros resultados y su interpretación, en la vasculatura coronaria de las ratas ha sido caracterizada una respuesta angiogénica, durante el desarrollo de hipertiroidismo experimental por las HTs, que es paralela y proporcional a la magnitud de la hipertrofia cardíaca (Wachtlova et al., 1985; Mall et al., 1990; Tomanek et al., 1995). Notablemente, Wachtlova y sus colegas (1985) reportaron que administrando dosis diarias de T4 de 1 mg/kg a las ratas durante un período de 5 días, el peso de los VIs aumenta en un 36% en animales adultos, y en un 79% en ratas de 10 días, sin cambios en la densidad numérica capilar. Otros estudios han proporcionado evidencia de crecimiento vascular compensado con tratamientos a corto y largo plazo con hormona tiroidea. Al respecto, encontramos que el tratamiento de ratas con HTs durante 9 días a 2 meses ocasionó aumentos en la masa cardíaca o la masa del VI (ajustados con la masa corporal) del 30 al 48% (Craft-Cormney and Hansen, 1980; Mall et al., 1990; Tomanek et al., 1995; Heron et al., 1997) y hasta del 79% (Heron y Rakusan, 1994). A pesar de las diferencias en la masa ventricular y duración del tratamiento, los índices de capilaridad fueron normales, un hallazgo que indica claramente que el crecimiento capilar es paralelo al crecimiento de los cardiomiocitos. No obstante, también ha sido reportado que la angiogénesis puede manifestarse en los primeros 5 días de tratamiento con T4 antes del desarrollo de hipertrofia cardíaca en las ratas (Tomanek y Busch, 1998). Por lo tanto, estos autores dedujeron que, en este modelo de hipertiroidismo temprano en las ratas, la angiogénesis no es una respuesta al agrandamiento cardíaco, sino que precede y luego es paralela a la hipertrofia de los cardiomiocitos (Tomanek y Busch, 1998). Además, Chilian y colaboradores (1985) reportaron que la densidad numérica capilar fue

significativamente mayor en las ratas de 3 y 7 meses que fueron tratadas con T4 durante 2 meses comparadas con sus controles en el tiempo; de forma que el crecimiento capilar excedió en magnitud a la hipertrofia cardíaca. Sumariamente, cabe hacer énfasis, nuestros resultados concuerdan con la mayoría de los trabajos citados, que reportan que el crecimiento capilar fue paralelo al crecimiento de los cardiomiocitos; lo cual permite concluir que la hipertrofia cardíaca fisiológica requiere aumentos proporcionales en la densidad capilar del miocardio.

Los estudios moleculares mostraron que el VEGF se encuentra incrementado en los corazones de las ratas hipertiroideas de 1 y 3 días de evolución, pero no en los de las ratas T3_{10d}, en comparación con los valores obtenidos en los corazones de los controles temporales concernientes. La expresión del FGF en los VIs se apreció incrementada en el grupo T3_{3d} comparado con V_{3d}; en cambio, en los corazones de las ratas T3_{1d} y T3_{10d}, la expresión de este factor de crecimiento fue similar, en ese orden, a la de los controles V_{1d} y V_{10d}. Un hallazgo importante en este estudio fue que, en los lapsos definidos de 1, 3 y 10 días de tratamiento con T3 en las ratas, los valores densitométricos del HIF-1 α en los corazones aislados, no difirieron significativamente de sus controles temporales pertinentes. Estos resultados conducen a proponer que el incremento transitorio de la expresión de las proteínas FGF y VEGF en los VIs de los grupos T3_{3d}, y T3_{1d} y T3_{3d}, respectivamente, representa el aumento de la actividad de vías de señalización angiogénicas, mediado por los mencionados factores de crecimiento, como parte de los mecanismos de transducción activados por la T3 en el corazón. El hecho de que estos factores de crecimiento angiogénicos se manifiesten aumentados

transitoriamente no conduce a considerar su posible expresión cíclica, es decir, que el proceso angiogénico a largo plazo se establezca con la repetición periódica de los incrementos en los niveles de FGF y VEGF. La ausencia de cambios significativos en la expresión del HIF1 α , por otra parte, excluye a este factor como participante causal de la angiogénesis de temprano desarrollo en los ventrículos de las ratas tratadas con T3 a corto plazo. Aun cuando el incremento del HIF1 α se vincula principalmente con hipoxia tisular, y en nuestras condiciones experimentales esta puede excluirse por la condición hiperdinámica del sistema cardiovascular propia del hipertiroidismo (Fazio et al., 2004; Kahaly y Dillmann, 2005), hay evidencia de que su expresión puede ser aumentada por estímulos varios independientes de la hipoxia tisular (Fraisl et al., 2009). Obviamente, hay que considerar la posibilidad de que T3 incremente al mediador HIF-1 α en puntos temporales precoces o relativamente tardíos (antes de 1 día o después de 10 días) no comprendidos en el diseño de este estudio.

Por lo anteriormente expuesto, consideramos que es necesario realizar experimentos adicionales para establecer, si es el caso, la participación cíclica de los factores de crecimiento, VEGF y FGF, en el desarrollo paralelo de la angiogénesis a la hipertrofia cardíaca, y la falta de participación del HIF1 α , o lo contrario, en el desarrollo de angiogénesis en los animales con hipertiroidismo de variados tiempos de desarrollo.

Las bases moleculares de la acción pro angiogénica de las HTs aún no se comprenden íntegramente; no obstante, varios informes han proporcionado ideas mecanicistas. Inicialmente, en un modelo de hipertrofia cardíaca inducida por T4 en la rata, el crecimiento capilar se reportó acompañado de una regulación positiva del ARNm y la proteína del bFGF (Tomanek et al., 1998). Los niveles de la proteína bFGF aumentaron durante los primeros 2 días de administración de T4 cuando la síntesis de ADN de células endoteliales capilares incrementó notablemente (Tomanek et al., 1998). Adicionalmente, ha sido demostrado que el bFGF (Zheng et al., 2004), o el VEGF y el bFGF (Wang et al., 2003), pueden mediar en la angiogénesis inducida por análogos de las HTs en el corazón de rata. Utilizando un modelo corioalantoideo de pollo, Davis et al. (2004) identificaron a la integrina $\alpha\beta3$ como receptor de las HTs en las membranas celulares. Actualmente se acepta que la Integrina $\alpha\beta3$ inicia de forma no genómica la acción pro angiogénica de las HTs mediante la activación de la ERK1/2 y la PI3K, aumentando la transcripción del bFGF y el VEGF, y participando en la comunicación cruzada con los receptores VEGF y bFGF (Luidens et al., 2010; Moeller y Broecker-Preuss, 2011).

VIII. CONCLUSIONES

Nuestros datos en conjunto indican que, durante la fase temprana de desarrollo del hipertiroidismo experimental en las ratas, de forma aproximadamente coincidente en el tiempo, se manifiestan: hipertrofia ventricular izquierda, inotropismo y lusitropismo positivos, y aumento de la densidad capilar. Este último, hipotéticamente, permite mantener la perfusión miocárdica fisiológica (si se acompaña del apropiado crecimiento de los vasos de resistencia). Consideramos, asimismo, que el mecanismo para la angiogénesis comprende el aumento de la expresión de los factores VEGF y FGF, que antecede o coincide parcialmente con la manifestación del incremento de la densidad capilar en los Vis de las ratas tratadas con T3. Por otra parte, la ausencia de cambios significativos en la expresión HIF1 α excluye a este factor como participante causal de la angiogénesis de precoz desarrollo en los ventrículos de las ratas tratadas con T3 a corto plazo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Arancibia Z, Germán, Niedmann E, Juan Pablo, & Ortega T., Dulia. (2002). Ultrasonografía de tiroides. *Revista chilena de radiología*, 8(3), 101-106
- Aranda A. Alonso-Merino E. & Zambrano A. (2013). Receptors of thyroid hormones. *Pediatric Endocrinology Reviews: PER*, 11, 2–13
- Astapova, I. (2016). Role of co-regulators in metabolic and transcriptional actions of thyroid hormone, *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(3), R73-R97
- Bergh, J. J., Lin, H. Y., Lansing, L., Mohamed, S. N., Davis, F. B., Mousa, S., & Davis, P. J. (2005). Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146(7), 2864-2871
- Biondi B, Palmieri EA, Klain M, Schlumberger M, Filetti S, Lombarda G. (2005) Subclinical hyperthyroidism: clinical features and treatment options. *European Journal of Endocrinology*. 152(1):1-9
- Book, C, Sun, X, Ng, Y. (1997). Developmental changes in regulation of the Na⁺, K⁺-ATPase $\alpha 3$ isoform by thyroid hormone in ferret heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1358(2), 172-180
- Carreón-Rodríguez A., & Pérez-Martínez L. (2013). El papel de los receptores de hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso. *Neurobiología Revista electrónica*, 4(7), 240-513.
- Carrillo-Sepúlveda, M, Ceravolo, G, Fortes, Z, Carvalho, M, Tostes, R. C., Laurindo, F, & Barreto-Chaves, M, (2010). Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovascular research*, 85(3), 560-570.
- Carvalho D, & Dupuy C, (2017) Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 6-15
- Chaudhary P, Singh Z, Khullar M, Arora K. (2013) Levator glandulae thyroideae, a fibromusculoglandular band with absence of pyramidal lobe and its innervation: a case report. *J Clin Diagn Res*. 7(7): 1421-1424

- Chen J, Ortmeier S, Savinova O, Nareddy V, Beyer A, Wang D, Gerdes A. (2012) Thyroid Hormone Induces Sprouting Angiogenesis in Adult Heart of Hypothyroid Mice Through the PDGF-Akt Pathway. *J Cell Mol Med.*; 16(11): 2726-35
- Cheng S, Leonard J, Davis P. (2010) Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews* 31: 139-170
- Chilian WM, Wangler RD, Peters K, Tomanek R, & Marcus M. Thyroxine-induced left ventricular hypertrophy in the rat. Anatomical and physiological evidence for angiogenesis. *Circ. Res.* 1985; 57: 591–598.
- Craft-Cormney C, Hansen J. Early ultrastructural changes in the myocardium following thyroxine-induced hypertrophy. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* 1980; 33: 267–273.
- Cooper, D. S., & Biondi, B. (2012). Subclinical thyroid disease. *The Lancet*, 379(9821), 1142-1154
- Davis P, Davis F, Mousa S, Luidens M, Lin H. (2011) Membrane receptor for thyroid hormone: Physiologic and pharmacologic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, 99-115
- Davis P, Glinsky G, Lin H, Mousa S. (2014). Cancer cell gene expression modulated from plasma membrane integrin $\alpha v \beta 3$ by thyroid hormone and nonaparticulate tetrac. *Frontiers in Endocrinology*, 5 240
- Davis P. Shih, A. Lin, H. Martino, L. Davis F. (2000). Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 38032-38039
- Davis, P. J., Goglia, F., & Leonard, J. L. (2016). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(2), 111–121
- Davis P, Davis F, Mousa S. (2009) Thyroid hormone-induced angiogenesis. *Curr Cardiol Rev.* 5(1): 12-6
- Davis P, Leonard J, Davis F. (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*; 29: 211-218

- Davis, F, Mousa S, O'Connor L, *et al.* (2004). Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circulation Research*, 94(11) 1500-1506
- Davis P, Leonard J, Lin H, Leinung M, Mousa S. (2018). Molecular Basis of Nongenomic Actions of Thyroid Hormone. *Vitam Horm.* 106:67-96
- Davis, P. Lin, H. Tang, H. Davis, F. Mousa, S. (2013). Adjunctive input to the nuclear thyroid hormone receptor from the cell surface receptor for the hormone. *Thyroid*, 23(12), 1503-1509
- Davis, P, Davis F, Lin H, Mousa S, Zhou M., & Luidens, M. K. (2009). Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(6), 1238-1246.
- Dawson, M, & Xia, Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(1), 21-56.
- Dillmann, W. (2002). Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*, 12(6), 447-452.
- Diniz, G, Carneiro-Ramos, M, & Barreto-Chaves, M. (2009). Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3 β /mTOR signaling pathway. *Basic research in cardiology*, 104(6), 653.
- Eckle T, Köhler, D, Lehmann R, El Kasmi K, & Eltzschig, H. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection. *Circulation*, 118, 166-175
- Esen K, Ozgur A, Balci Y, Tok S, Kara E. (2018) Variations in the origins of the thyroid arteries on CT angiography. *Jpn J Radiol.* 36(2):96-102
- Farwell, A. P., Dubord-Tomasetti, S. Pietrzykowski, A. Leonard, J. (2006) Dynamic nongenomic actions of thyroid hormone in the developing rat brain. *Endocrinology* 147(5) 2567–2574

- Fazio, S., Palmieri, E. A., Lombardi, G., & Biondi, B. (2004). Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent progress in hormone research*, 59(1), 31-50
- Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. (2009) Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism. *Dev Cell*; 16(2): 167-79
- Friesema E, Visser W, Visser T. (2010) Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Mol Cell Endocrinol*; 322: 107-113
- Fukuyama, K., Ichiki, T., Takeda, K., Tokunou, T., Iino, N. Masuda, S. y Kanaide, H. (2003). Downregulation of vascular angiotensin II type 1 receptor by thyroid hormone. *Hypertension*, 41(3), 598-603.
- Furuya F, Lu C, Guigon C, & Cheng S. (2009). Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors. *Steroids*, 74(7), 628–634.
- Grais I, & Sowers J. (2014). Thyroid and the heart. *The American journal of medicine*, 127(8), 691-698.
- Gereben B, Zavacki A, Ribich S, Kim B, Huang S, Simonides W, Zeold A, & Bianco A. (2008) Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29: 898–938
- Hall, J. E. (2011). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- Hennemann G, Docter R, Friesema E, de Jong M, Krenning E, Visser T. (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 22: 451-476
- Heron M, & Rakusan K. (1994) Geometry of coronary capillaries in hyperthyroid and hypothyroid rat heart. *Am J Physiol*. 1994; 267: 1024–1031
- Hiroi Y, Kim H, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini, T, & Moskowitz, M. (2006). Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38), 14104-14109.
- Holt E, Sjaastad I, Lunde, P, Christensen G, & Sejersted, O. (1999). Thyroid hormone control of contraction and the Ca²⁺-ATPase/phospholamban

complex in adult rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 31(3), 645-656.

- Horowitz B, Hensley C, Quintero M, Azuma K, Putnam D, McDonough A. (1990). Differential regulation of Na, K-ATPase alpha 1, alpha 2, and beta subunit mRNA and protein levels by thyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 265(24), 14308-14314.
- Iadevaia V, Liu R., & Proud C. (2014). mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* 36, 113-120
- Kahaly G, Dillmann W. (2005) Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*; 26: 704-728.
- Kalyanaraman H, Schwappacher R, Joshua J, Zhuang S, Scott B, Klos, M, Pilz R. (2014). Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Sci. Signal.*, 7(326), ra48-ra48.
- Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Lazcano J. (2016) Harrison. Principios de medicina interna. 19ª edición. Mc Graw-Hill España
- Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Yodoi J, Adachi T, Semenza GL, Hirota K. (2004) Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling *J Biol Chem.*; 279, 2550-8
- Kenessey A., & Ojamaa K. (2006). Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20666-20672.
- Klein I, & Danzi S. (2007). Thyroid disease and the heart. *Circulation*, 116(15), 1725-1735.
- Klein I, & Ojamaa K. (2001). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*, 344(7), 501-509
- Koeppen B, Stanton B. (2009) *Fisiología*. 6ª ed. Barcelona: Elsevier p.c: 727-737

- Kranias E, & Hajjar R. (2012). Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circulation research*, 110(12), 1646-1660.
- Kuzman, J. A., Gerdes, A. M., Kobayashi, S., & Liang, Q. (2005). Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 39(5), 841-844
- Larsen P, Zavacki A. (2012) The role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur Thyroid J* 1: 232–242
- Lee J, Yi S, Kang Y, Kim H, Joung K, Sul H, Kim K, Shong M. (2016) Morphological and Functional Changes in the Thyroid Follicles of the Aged Murine and Humans. *J Pathol Transl Med*. 50(6):426-435
- Lin, H. Cody, V. Davis, F. Hercbergs, A. Luidens, M. Mousa, S. Davis, P. (2011). Identification and functions of the plasma membrane receptor for thyroid hormone analogues. *Discovery medicine*, 11(59), 337-347
- Lin, H, Davis, F, Gordinier, J, Martino, L, & Davis, P. (1999a). Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(5), C1014-C1024.
- Lin, H, Shih, A., Davis, F. B., & Davis, P. J. (1999b). Thyroid hormone promotes the phosphorylation of STAT3 and potentiates the action of epidermal growth factor in cultured cells. *Biochemical Journal*, 338(2), 427-432.
- Lin, H. Y., Tang, H. Y., Davis, F, Mousa, S, Incerpi, S, Luidens, M, & Davis, P. J. (2012). Nongenomic regulation by thyroid hormone of plasma membrane ion and small molecule pumps. *Discovery medicine*, 14(76), 199-206
- Lin H, Tang H, Lin C, Luidens M. Mousa S. Davis P. (2009). L-Thyroxine vs. 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-

activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(5), C980-C991

- Luidens M, Mousa S, Davis F, Lin H, & Davis P. (2010) Thyroid hormone and angiogenesis. *Vascular Pharmacology*; 52: 142–145
- Maia A, Kim B, Huang S, Harney J, Larsen P. (2005) Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T₃ in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115: 2524–2533
- Makino, A., Suarez, J., Wang, H., Belke, D, Scott, & Dillmann, W. H. (2009) Thyroid hormone receptor- β is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy. *Endocrinology*, 150(4), 2008-2015
- Mall G, Zimmer G, Baden S, and Mattfeldt T. (1990) Capillary neoformation in the rat heart-stereological studies on papillary muscles in hypertrophy and physiologic growth. *Basic Res. Cardiol*; 85: 531–540.
- Marcisz, C., Jonderko, G., Wróblewski, T., Kurzawska, G., & Mazur, F. (2006). Left ventricular mass in patients with hyperthyroidism. *Medical science monitor*, 12(11), CR481-CR486
- Martin, N. Marron Fernandez de Velasco, E. Mizuno, F. Scappini, E. Gloss, B. Erxleben, C. Armstrong, D. (2014). A rapid cytoplasmic mechanism for PI3 kinase regulation by the nuclear thyroid hormone receptor, TR β , and genetic evidence for its role in the maturation of mouse hippocampal synapses in vivo. *Endocrinology*, 155(9), 3713-3724.
- Moeller, L, & Broecker-Preuss, M. (2011). Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid research*, 4(S1), S6.
- Moeller, L, Dumitrescu, A, & Refetoff, S. (2005). Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes. *Molecular Endocrinology*, 19(12), 2955-2963.
- Moeller, L. Cao, X. Dumitrescu, A. Seo, H., y Refetoff, S. (2006). Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nuclear receptor signaling*, 4(1), nrs-04020.

- Mondal S, Raja K, Schweizer U, Mugesh G. Chemistry and biology in the biosynthesis and action of thyroid hormones. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016; 55: 7606–7630
- Mourouzis, I., Forini, F., Pantos, C., & Iervasi, G. (2011). Thyroid hormone and cardiac disease: from basic concepts to clinical application. *Journal of thyroid research, 2011*
- Mousa, S. A., Lin, H. Y., Tang, H. Y., Hercbergs, A., Luidens, M. K., & Davis, P. J. (2014). Modulation of angiogenesis by thyroid hormone and hormone analogues: implications for cancer management. *Angiogenesis, 17*(3), 463-469
- Mullur, R., Liu, Y. Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological reviews, 94*(2), 355–382
- Nicolini G, Pitto L, Kusmic C, Balzan S, Sabatino L, Iervasi G, Forini F. (2013) New insights into mechanisms of cardioprotection mediated by thyroid hormones. *J Thyroid Res.*; 2013:264387
- Ohtaki S, Nakagawa H, Kimura S, Yamazaki I. (1981) Analyses of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during its iodinating reaction. *J Biol Chem* 256(2): 728-740
- Ojamaa, K. (2010). Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Vascular Pharmacology, 52*(3-4), 113–119.
- Ojamaa, K., Kenessey, A., & Klein, I. (2000). Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. *Endocrinology, 141*(6), 2139-2144
- Pantos, C. & Mourouzis, I. (2014). The emerging role of TR α 1 in cardiac repair: potential therapeutic implications. *Oxid Med Cell Longev, 2014*: 481482
- Pascual A., & Aranda A. (2013). Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1830*(7), 3908–3916

- Pingitore, A, Chen Y, Gerdes, A, & Iervasi, G. (2012). Acute myocardial infarction and thyroid function: new pathophysiological and therapeutic perspectives. *Annals of medicine*, 44(8), 745-757.
- Plow, E. Haas, T. Zhang, L., Loftus, J. Smith, J. (2000). Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21785-21788.
- Resnick, L, & Laragh, J. (1982). Plasma renin activity in syndromes of thyroid hormone excess and deficiency. *Life sciences*, 30(7-8), 585.
- Reyes-Juárez J, & Zarain-Herzberg Á. (2009). Terapia génica en la insuficiencia cardiaca. *Archivos de cardiología de México*, 79(2), 147-156.
- Rocha L, Learmonth, D, Sousa, R., & Salgado A. (2018). $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrin-specific ligands: From tumor angiogenesis inhibitors to vascularization promoters in regenerative medicine. *Biotechnology advances*, 36(1), 208-227
- Rousset B, Dupuy C, Miot F, & Dumont J. (2000) Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Sañudo E. de las Heras Flórez P. Calvo D, Cascón, S, & Valdezate, L. (2020). Anatomía quirúrgica de las glándulas tiroideas y paratiroides. *Revista ORL*, 11(2), 161-178
- Savinova O, Liu Y, Aasen G, Mao K, Weltman N, Nedich B, Liang Q, & Gerdes A. (2011) Thyroid Hormone Promotes Remodeling of Coronary Resistance Vessels. *PLoS One.*; 6(9): e25054
- Schneider M, Fiering S, Thai B, Wu S, St Germain E, Parlow A, St Germain D, & Galton V. (2006) Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147: 580–589

- Schweizer, U., Johannes, J., Bayer, D., & Braun, D. (2014) Structure and function of thyroid hormone plasma membrane transporters. *Eur Thyroid J.* 3(3):143-153
- Skah S, Uchuya-Castillo J, Sirakov M, & Plateroti M. (2017) The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/ β -catenin pathway: An intriguing liaison. *Developmental Biology* 422 71–82
- Senese, R., Cioffi, F., de Lange, P., Goglia, F., & Lanni, A. (2014). Thyroid: biological actions of ‘nonclassical’ thyroid hormones, *Journal of Endocrinology*, 221(2), R1-R12
- Shah JP. (2015) Thyroid carcinoma: epidemiology, histology, and diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol.* 13(4):3-6.
- Shih, A., Lin, H. Davis, F. & Davis, P. (2001). Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry*, 40(9), 2870-2878.
- Shimizu, H, Astapova, I, Ye, F, Bilban, M, Cohen, R. & Hollenberg A. (2015). NCoR1 and SMRT play unique roles in thyroid hormone action in vivo. *Molecular and cellular biology*, 35(3), 555–565
- Shiojima I, & Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev.* 2006; 20(24): 3347-3365
- Shulman A, Mangelsdorf D. (2005) Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 353: 604–615
- Silva J, Bianco S. (2008) Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid* 18: 157–165
- Simonides WS, Mulcahey MA, Redout EM, Muller A, Zuidwijk M, Visser T, Wassen F, Crescenzi A, da-Silva W, Harney J, Engel F, Obregon M, Larsen P, Bianco A, Huang SA. (2008) Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *J Clin Invest* 118: 975–983
- Tang, H. Y., Lin, H. Y., Zhang, S., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2004). Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent

phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology*, 145(7), 3265-3272.

- Taurog A. (2000) Hormone synthesis In: Braverman L, Utiger R, The Thyroid. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins 61-85
- Tomanek R, & Busch T. (1998) Coordinated Capillary and Myocardial Growth in Response to Thyroxine Treatment. *Anat Rec.* 251(1): 44-9.
- Tomanek R, Connell P, Butters C, & Torry R. (1995) Compensated coronary microvascular growth in senescent rats with thyroxine-induced cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1995;268:H419–H425.
- Tomanek R, Doty M, & Sandra A. (1998) Early Coronary Angiogenesis in Response to Thyroxine: Growth Characteristics and Upregulation of Basic Fibroblast Growth Factor. *Circ Res.* 82(5): 587-93.
- Vadiveloo T, Donnan P, Cochrane L., & Leese G. (2011). Morbidity in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism. In *Society for Endocrinology BES 2011* (Vol. 25). BioScientifica.
- Wachtlova M, Ostadal B, & Mares V. (1985). Thyroxine-induced cardiomegaly in rats of different age. *Physiol. Bohemoslov.* 34: 385–395.
- Wang X, Zheng W, Christensen L, & Tomanek R. (2003). DITPA Stimulates bFGF, VEGF, Angiopoietin, and Tie-2 and Facilitates Coronary Arteriolar Growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(2): H613-8.
- Zheng, W., Weiss, R.M., Wang, X., Zhou, R., Arlen, A.M., Lei, L., Lazartigues, E., Tomanek, R.J. (2004). DITPA Stimulates Arteriolar Growth and Modifies Myocardial Postinfarction Remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(5): H1994-2000.
- Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., & Vermeren, S. (2011). A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS one*, 6(11), e27385