

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

**“VALIDACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS TIROIDEAS
DE BOVINO”**

Prestadora de Servicio Social: Jarendy Cortes Franco
Matrícula: 2173063853

Asesores



Interno: Dr. Adrián Guzmán Sánchez
Número económico: 34155



Interno: Dra. Cyndi Gabriela Hernández Coronado
Número económico: 41207

Lugar de realización: Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de la
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Fecha de inicio y termino: 06 de marzo del 2023 al 06 de septiembre del
2023

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEORÍCO.....	4
Producción de hormonas tiroideas y mecanismos de regulación del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo.....	4
Función de hormonas tiroideas en el organismo	6
Cultivos celulares.....	8
OBJETIVOS	9
Objetivo general.....	9
Objetivos particulares.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Colección de glándulas tiroides y obtención de células tiroideas.....	9
Conteo del número de células tiroideas por azul de tripán (4%).....	11
Cultivo de células tiroideas	11
Determinación del número de células tiroideas viables mediante el ensayo de MTT.....	11
ANÁLISIS DE DATOS.....	12
ACTIVIDADES REALIZADAS	12
METAS ALCANZADAS	13
RESULTADOS Y CONCLUSIÓN.....	13
Cuadro 1. Parámetros implementados para la realización de cultivos primarios de células tiroideas de bovino realizadas en diferentes fechas en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de UAM Xochimilco.	14
Gráfica 1. Efecto de TSH sobre la viabilidad de células tiroideas de bovino en cultivo. Las literales a y b indican diferencias significativas.	14
DISCUSIÓN	15
RECOMENDACIONES	17
REFERENCIAS.....	17
ANEXOS	19

INTRODUCCIÓN

La glándula tiroides se conforma por distintos grupos de células; paratiroides que se encargan de la producción de la paratohormona; parafoliculares localizadas en los espacios interfoliculares que producen calcitonina y la unidad funcional de la glándula, los folículos tiroideos con un diámetro de 130 a 150 μm , se encuentran revestidos por una capa de células epiteliales cúbicas glandulares llamadas células foliculares tiroideas o tirocitos que miden entre 7 a 11 μm de altura, las cuales encierran al coloide, sustancia necesaria para la síntesis y almacenamiento de las hormonas tiroideas (HT) como L-tiroxina (tetrayodotironina o T4) y L-triyodotironina (T3) (Osorio *et al.*, 2011; Hernández-Stegmann *et al.*, 2016; Hernández-Coronado *et al.*, 2023). Esta glándula endocrina se localiza caudal al cartílago tiroides adyacente tanto a la superficie lateral de la tráquea como del cartílago cricoides, se compone por dos lóbulos conectados por un istmo delgado y alargado, extendidos desde los arcos del cartílago cricoides hasta el primer o segundo anillo traqueal, por debajo del músculo cricofaríngeo, paralelo al músculo esofágico, con un peso de 20 a 35 g en bovinos adultos y entre 12 a 34 g en terneros y bovinos jóvenes (Peksa *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2014; Hernández-Coronado *et al.*, 2023).

El eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT) es el encargado de regular la síntesis y secreción de HT por medio de un circuito neuroendocrino, que consiste en un mecanismo de retroalimentación negativa entre los niveles circulantes de HT, el hipotálamo y la glándula hipófisis (Gavrila *et al.*, 2019). Este eje está diseñado para activarse cuando los niveles circulantes de HT disminuyen y suprimirse cuando se elevan (Goel *et al.*, 2011). En el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPVH) se secreta la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) hacia la eminencia media a través de la circulación porta hipofisiaria para unirse a receptores de membrana acoplado a proteína G α q, ubicados en los tirotropos de la adenohipófisis y así promover la transcripción de las subunidades α y β de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) para que pueda ser secretada a circulación sistémica hasta encontrarse con su receptor acoplado a proteína G α s, localizado en la membrana del tirocito para participar en la síntesis y secreción de T3 y T4 (Goel *et al.*, 2011; Ortega-Carvalho *et al.*, 2011; Guzmán *et al.*, 2017).

Las HT están involucradas en la regulación de la función reproductiva al actuar directamente sobre células ováricas, uterinas y placentarias a través de receptores nucleares específicos que modulan el desarrollo y metabolismo de estos órganos (Silva *et al.*, 2018). En machos, son importantes para la diferenciación de las poblaciones de células de Leydig y la regulación del desarrollo de las células de Sertoli en los testículos (Duarte-Guterman *et al.*, 2014). Por ello, la disfunción de la glándula tiroidea se asocia con alteraciones morfológicas, fisiológicas y conductuales, incluidos trastornos reproductivos (Silva *et al.*, 2018).

Aun cuando se tiene información sobre la función y regulación *in vivo* de las células tiroideas, como por ejemplo la producción de T3 y T4, no existe información suficiente sobre los mecanismos intracelulares ni los factores que modulan su funcionamiento *in vitro* en el bovino. Por lo anterior, considerando que el aislamiento de células tiroideas y su cultivo es una herramienta que permitirá conocer los procesos celulares fundamentales como proliferación, sobrevivencia y síntesis de hormonas, el objetivo de este servicio social es: “Validar el cultivo primario de células tiroideas de bovino mediante el estímulo con la hormona estimulante de la tiroidea (TSH)”.

MARCO TEORÍCO

Producción de hormonas tiroideas y mecanismos de regulación del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo

T3 y T4 son compuestos de yoduro y, por lo tanto, requieren de la ingestión de yodo a través de la dieta para poder sintetizarse (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2011). En el bovino este elemento se absorbe en forma de yoduro (I⁻) que ingresa a circulación sanguínea unido a albúmina y en primera instancia es captado por la glándula tiroidea para destinarlo a la síntesis hormonal, pero también entra a riñón, glándulas salivales y glándula mamaria lactante, donde es excretado en heces, orina y leche (Osorio *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2014).

El I⁻ es transportado al interior del tirocito por medio del simportador NIS; su mecanismo de acción consiste en ingresar 2 moléculas Na⁺ al interior de la célula a favor del gradiente electroquímico y simultáneamente transportar una molécula de

I⁻ en contra del gradiente de concentración hacia el citoplasma (Riedel *et al.*, 2001). El gradiente de Na⁺ que permite la captación de I⁻, se mantiene en equilibrio gracias a la enzima Na⁺/K⁺ ATPasa, que transporta 3 moléculas de Na⁺ hacia el exterior de la célula y 2 moléculas de K⁺ hacia el citoplasma; dentro de los tirocitos, el transporte de I⁻ desde el citosol hacia el coloide está mediado por un transportador I⁻/Cl⁻ llamado pendrina (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2011).

A continuación, se sintetiza tiroglobulina (Tg) en los tirocitos, que es la matriz para la síntesis y almacenamiento de HT en la glándula. Seguidamente se da el proceso de oxidación del I⁻ a yodo molecular (I₂) por acción de la enzima peroxidasa en conjunto con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), para que este pueda unirse a las moléculas del aminoácido tirosina de la Tg (Osorio *et al.*, 2011). Los productos yodados iniciales son monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT); el acoplamiento de dos moléculas de DIT generan a la molécula de tiroxina, la unión de una molécula de MIT con una de DIT forman triyodotironina y finalmente, se forma una molécula de Tg madura en el coloide que contiene MIT, DIT, T₃ y T₄ (Osorio *et al.*, 2014).

Por estimulación aguda de TSH, la Tg ingresa al tirocito y únicamente T₃ y T₄ son liberadas a circulación, mientras que MIT y DIT sufren un proceso de desyodación por acción de la enzima yodotironina desyodasa. El yodo liberado es almacenado y una parte de este es reutilizado en la síntesis de HT, mientras que el resto es liberado a circulación para ser excretado. Las HT son de carácter lipofílico, por lo tanto, se unen a proteínas de transporte como a la globulina fijadora de tiroxina (TBG) que posee alta afinidad por T₄, en forma secundaria y en menor grado a albúmina, que presenta poca afinidad para HT, pero se encuentra en mayor concentración y a la transtiretina (TTR), que presenta una especificidad intermedia entre TBG y albumina (Osorio *et al.*, 2011).

Aunque es en la glándula tiroides donde se producen las HT, la mayor parte de T₃ se origina en el metabolismo extratiroideo de T₄ a T₃ y es controlado por tres isoenzimas: yodotironina desyodasa tipo I o IDI, yodotironina desyodasa tipo II o IDII, y yodotironina desyodasa tipo III o IDIII, que están presentes en cerebro, piel y

placentas (Hernández-Stegmann *et al.*, 2016). La conversión activa de T4 a T3 se genera por una reacción llamada 5'- monodesyodinasas, que es catalizada por IDI e IDII, en la cual, se retira el yodo del anillo fenólico externo de la tiroxina para formar T3. En cambio, si la pérdida de yodo es en la posición 5 se forma rT3 (triyodotironina inversa) catalizada por IDIII, que no posee actividad biológica debido a su casi completa incapacidad para unirse a los receptores (Osorio *et al.*, 2011). La importancia de la generación de T3 es que la afinidad de los receptores a HT en la célula blanco por T4 es menor que los de T3, por ello, T4 se considera un precursor de T3 o una prohormona (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2018).

No obstante, cuando los niveles circulantes de T3 son elevados, esta puede ingresar directamente al hipotálamo y unirse a sus receptores en las neuronas hipofisiotróficas de TRH en el NPVH e inhibir la expresión del ARNm de TRH y de manera similar en la adenohipófisis, T3 sintetizada localmente por efecto de IDII producida en células gliales especializadas llamadas tanicitos, inhibe la expresión de las subunidades α y β de TSH y es por estos mecanismos de retroalimentación negativa entre los niveles circulantes de HT, el hipotálamo y la glándula hipófisis que se lleva a cabo la regulación del eje HPT (Bernal-Carrasco, 2010; Ortiga-Carvalho *et al.*, 2011; Gavrilina *et al.*, 2019).

Función de hormonas tiroideas en el organismo

La principal función de la glándula tiroidea es la producción de hormonas como T3 y T4, las cuales tienen un papel clave en la regulación de la mayoría de los órganos y tejidos del organismo. Estas hormonas son esenciales para el crecimiento y desarrollo del bovino, al estimular los procesos de osteogénesis, osteólisis y al actuar sinérgicamente con la hormona del crecimiento, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), y otros factores de crecimiento que promueven este proceso (Osorio *et al.*, 2011). Así como para el mantenimiento de la termorregulación y homeostasis del metabolismo durante la vida adulta. Es por ello, por lo que T3 y T4 son llamadas “calorigénicas”, ya que inducen la producción de calor en la célula de diferentes maneras; estimulan tanto a la termogénesis basal (obligatoria), como la adaptativa (facultativa), la cual es activada por el sistema

nervioso simpático (Ortiga-Carvalho *et al.*, 2011; Osorio *et al.*, 2011). Sin embargo, las HT actúan como moduladores, es así, que la exposición prolongada al frío ocasiona un aumento en la producción de TSH por parte de la adenohipófisis y, por ende, un incremento de los niveles de T3 y T4 en sangre y tejidos periféricos, por ello, los cambios en la temperatura ambiental influyen en la actividad hormonal; se ha reportado que existe un incremento en las concentraciones hormonales en plasma sanguíneo durante el invierno en comparación con el verano (Farooq *et al.*, 2010; Aleena *et al.*, 2016).

La disfunción en la glándula tiroides se asocia con efectos adversos en la función reproductiva (Duarte-Guterman *et al.*, 2014). En hembras cuando las concentraciones de HT disminuyen, se reduce el número de folículos en crecimiento y aumenta la atresia folicular, estos efectos son causados no solo por cambios en el eje GnRH/LH, sino también por cambios en la secreción de kisspeptina, esteroides sexuales y niveles elevados de prolactina (Silva *et al.*, 2018). También, se ha reportado que la producción de la globulina transportadora de hormonas sexuales disminuye cuando las concentraciones de HT son bajas y, en consecuencia, hay una reducción en los niveles de esteroides circulantes (Gavrila *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha observado que las HT estimulan el crecimiento de los folículos preantrales y la tasa ovulatoria, además, T3 en combinación con la hormona folículo estimulando (FSH), es capaz de mejorar la proliferación y reducir la apoptosis en las células de la granulosa (CG). Así mismo, la interacción de T3 con FSH y hormona luteinizante (LH) inhibe la producción excesiva de andrógenos por parte de las células de la teca (CT) y estimula la aromatización, con la producción de estrógenos por parte de las CG (Zhang *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018). Del mismo modo, T4 actúa a nivel de las CG, ejerciendo un impacto positivo sobre la producción de progesterona inducida por FSH y en las CT, T3 y T4 pueden ejercer mayor impacto sobre la producción de androstenediona. En machos, T3 actúa sobre las células de Sertoli, estimulando la secreción de proteína fijadora de andrógeno; lo cual, puede indicar una relación entre el control del inicio de la pubertad y la función de la glándula tiroides sobre el desarrollo de la espermatogénesis (Osorio *et al.*, 2014).

Además, la disfunción de la glándula tiroides induce alteraciones en el rendimiento productivo de los animales domésticos, debido a que las HT son responsables de la regulación de la función de la glándula mamaria porque el crecimiento y la diferenciación del epitelio mamario se ven reducidos cuando hay ausencia de estas hormonas (Aleena *et al.*, 2016).

Cultivos celulares

Se le conoce como cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento, supervivencia y/o multiplicación *in vitro* de células provenientes de tejidos, órganos o fluidos corporales con la finalidad de conservar al máximo sus propiedades bioquímicas, genéticas y fisiológicas (Tavira *et al.*, 2009).

Se divide en tres tipos denominados: cultivos primarios, cultivos secundarios y líneas celulares. Los cultivos primarios son aquellos donde las células han sido obtenidas a partir de un órgano o tejido animal, las células de estos cultivos poseen un periodo de vida limitado (Lozano *et al.*, 2019). Cuando las células recuperadas de un cultivo primario son resembradas en un medio fresco de manera exitosa, se les denomina cultivo secundario o subcultivo (Tavira *et al.*, 2009). Y por último, una línea celular es aquella que tiene una elevada capacidad para multiplicarse *in vitro*, se establece a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y en principio tiene las mismas características que el tejido de origen pero al finalizar el cultivo celular, las células difieren genética y morfológicamente de las células de origen, expandiendo así su vida útil convirtiéndose en líneas celulares, que se caracterizan por ser células con capacidad de sobrevivir, proliferar y crecer indefinidamente (Kwasnik *et al.*, 2016).

De acuerdo con la fuente de la cual se extraen las células (tejido o fluido corporal), los cultivos pueden crecer como una monocapa adherente o en suspensión. Las células adherentes se unen a la superficie de una placa de cultivo para su crecimiento y proliferación, siendo estas células de cultivo primario y líneas celulares ya que la mayoría de las células que provienen de tejido depende de dicha adherencia. Las células que se cultivan en suspensión se encuentran inmersas en un medio líquido; este tipo de cultivo es utilizado para células hematopoyéticas o

aquellas que han perdido o disminuido la síntesis de proteínas de anclaje (Santacruz *et al.*, 2017; Arteaga-García *et al.*, 2021). En esta clasificación también podemos englobar a los cultivos tridimensionales, en los cuales, se busca mantener la arquitectura *in vivo* del tejido de origen; en este tipo de cultivo es posible mantener los tipos celulares diferenciados, sin embargo, la propagación celular es dependiente de las características de la biomatriz o soporte (Tavira *et al.*, 2009).

Los cultivos de tejido permiten la visualización *in vitro* del tejido original y para su elaboración es necesario utilizar medios suplementados con nutrientes para la supervivencia celular, incubadoras con módulos de temperatura, humedad y CO₂. Una vez finalizado el cultivo celular, se puede congelar a -80°C y almacenar durante periodos prolongados, lo cual, facilita su uso en investigaciones (Arteaga-García *et al.*, 2021).

OBJETIVOS

Objetivo general

Validar el cultivo primario de células tiroideas de bovino mediante el estímulo con la hormona estimulante de la tiroides (TSH).

Objetivos particulares

1. Establecer las condiciones ideales del cultivo primario de células tiroideas de bovino.
2. Identificar la dosis ideal de TSH que tenga mayor efecto sobre la viabilidad de células tiroideas de bovino.
3. Identificar la dosis ideal de TSH que tenga mejor respuesta sobre la producción de hormonas tiroideas (T3, T4) en cultivo primario de células tiroideas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de glándulas tiroides y obtención de células tiroideas

Se obtuvieron glándulas tiroides de bovinos sacrificados en un rastro particular ubicado en el Municipio de Temamatla, Estado de México, México (Anexo 1). Posteriormente, se lavaron y transportaron al laboratorio de Bioquímica de la

Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a temperaturas de 37 a 38°C, en un lapso no mayor a 2 hrs. Una vez en el laboratorio, se realizaron varios lavados con SSF al 0.9% a 37°C, después un lavado con etanol al 75% y finalmente se colocaron en SSF al 0.9% y medio de cultivo McCoy's 5A modificado con bicarbonato de sodio (in vitro-ME-043) previamente gaseado en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C con 90% de humedad y suplementado con 20 mM HEPES (SIGMA H6147), 100 IU/mL de penicilina (P4333-sigma), 0.1 mg/mL de estreptomycin, 3 mM L-glutamina (G8540-sigma), 0.1% de BSA (A7030-sigma), 10 ng/mL de insulina (I3769-sigma), 2.5 µg/mL transferrina (T8158-sigma) y 4 ng/mL de selenito (S5261-sigma) hasta que se diseccionaron las glándulas (Anexo 2).

A continuación, se retiró la cápsula del lóbulo y posteriormente se diseccionaron pequeños segmentos de sitios aleatorios de la glándula hasta obtener 600 mg de tejido por glándula (Anexo 3), a los cuales, se les añadió 6 mL de digestión enzimática (relación 100 mg de tejido por 1 mL de digestión), que contenía, 6.78 mg/10 mL de Colagenasa (Sigma C2674), 0.6 mg/10 mL de DNasa (Sigma DN25), 0.6 mL/10 mL de DPBS 10x (Fosfato Dubuleco con buffer salino; In Vitro-SS-05) y agua estéril (1:10) logrando una solución de DPBS 1X por 15 a 20 min a 37°C en agitación constante (Anexo 4), una vez transcurrido el tiempo, se procedió a resuspender el tejido con una pipeta serológica (Anexo 5) y se dejó de 5 a 10 min a 37°C en agitación constante, posteriormente, se procedió a detener la reacción añadiendo 600 µL de suero fisiológico bovino (SFB) al 10% (100 µL de SFB al 10%/1 mL de digestión enzimática) y se dejó por 10 min a 37°C en agitación constante, después, se filtró la muestra de tejido con un filtro de 100 µm (Cell strainer FALCON A Corning Brand, 352360) y se llevó a centrifugar por 5 min a 200 xg, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de buffer de lisis de eritrocitos que contenía 0.16 M de cloruro de amonio (604265-Merck), 0.17 M de TRIS – Base (161-0716-Biorad) y 7.65 de pH, hasta cubrir por completo el pellet por 2 min a T° ambiente, se lavó con 1 mL de medio gaseado y se centrifugó a 200 xg por 5 min, en seguida se retiró el sobrenadante y se le añadió 250 µL de tripsina al 0.05% para disgregar las células tiroideas e inmediatamente se colocaron las muestras a 37°C por 3 min, la reacción

se detuvo con 1 mL de medio de cultivo con SFB al 10%, después, se centrifugó por 5 min a 200 xg y se retiró el sobrenadante. Por último, se resuspendió en 500 a 1,000 μ L de medio gaseado.

Conteo del número de células tiroideas por azul de tripán (4%)

Para realizar el conteo de células tiroideas se tomaron 90 μ L de la suspensión celular y 10 μ L de solución azul Tripán (4%). La mezcla se colocó sobre una cámara doble de Neubauer y posteriormente se contó el número de células no teñidas sobre 5 cuadrantes en cada una de las cámaras (Anexo 6). La siguiente fórmula indicó el número de células totales:

Número de células viables = (Promedio del número de células totales contadas en las 2 cámaras) (10,000) (5 cuadrantes) (dilución en mL)

Cultivo de células tiroideas

Las células tiroideas se cultivaron en placas de 96 pozos con tapa (Thermoscientific, NUNC estéril, 16008), en medio de cultivo McCoy's 5A modificado. Previamente las placas se incubaron por 3 hrs en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C con 90% de humedad. Posteriormente, se sembraron 50,000 células viables y se dejaron estableciendo por 24 hrs para realizar un recambio de medio de cultivo con los respectivos tratamientos: Control; 0.1; 1 y 10 mU de TSH estableciéndose por 48 hrs (Anexo 7).

Determinación del número de células tiroideas viables mediante el ensayo de MTT

La viabilidad celular se determinó por el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio o MTT, este ensayo se basa en la reducción metabólica de sales de tetrazolio por el succinato deshidrogenasa (enzima mitocondrial) que a través de coenzimas como NADH y NADPH convierten el tetrazolio a formazán, lo que permite evaluar la funcionalidad de la mitocondria de las células expuestas determinando la cantidad de células vivas a través de la cantidad de formazán producido en la actividad metabólica (González Aretia, 2021).

Después de haber transcurrido las 48 hrs de cultivo, se retiraron 180 μ L de medio y se adicionaron 20 μ L de la solución MTT (5 mg/mL de Tetrazolio-Sigma M5655) a cada pozo, la placa se dejó incubando en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 90% de humedad por 24 hrs. Una vez transcurrido este tiempo, se le adicionó a cada pozo 100 μ L de buffer de lisis, el cual contenía 5 mL de H₂O destilada, 5 mL de N-Dimetilformamida (D4551-sigma), 2 g de SDS (161-0301-Biorad), 500 μ L de ácido acético 1 N (9507-02- J. T. Baker) y 500 μ L de ácido clorhídrico 1 N; posteriormente, se dejó la placa por 4 hrs a temperatura ambiente en total oscuridad. A continuación, se procedió a medir la densidad óptica del medio a 595 nm en un espectrofotómetro Smartec Plus-BIORAD y a través de una ecuación de regresión se determinó la relación entre absorbancia y el número de células con el programa Assay Zap 3.0.

ANÁLISIS DE DATOS

El efecto del tratamiento sobre la viabilidad de células tiroideas se evaluó mediante la prueba de ANOVA, mientras que la diferencia entre los tratamientos (control, 0.1, 1 y 10 mU de TSH) se analizó por la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Así mismo, se realizó un análisis de regresión lineal simple para evaluar si el aumento sobre el número de células, depende del incremento en las concentraciones de TSH. El análisis de los datos se llevó a cabo en el programa JMP.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante mi estancia en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción, realice diversas actividades que contribuyeron a mi desarrollo académico, como visitas al rastro "Temamatla" para coleccionar glándulas tiroideas de bovino, análisis macroscópico y microscópico de estas glándulas, realización de cultivos primarios de células tiroideas, preparación de solución salina fisiológica al 0.9% para coleccionar glándulas tiroideas en el rastro y de medio de cultivo adicionando suplementos. Desarrollé prácticas de pipeteo y disección de glándulas tiroideas y folículos ováricos, participé en la realización de ensayos de MTT, extracción de proteínas a partir de cultivos primarios de células de la granulosa y teca, así como ensayos de ELISA. Colaboraré en actividades relacionadas con el funcionamiento del laboratorio, entre

ellas, esterilización del material, manejo de equipos, control de inventario, limpieza, entre otros.

METAS ALCANZADAS

En el transcurso de mi servicio social, cumplí con la mayoría de mis metas establecidas. Recolecté 10 glándulas tiroides de bovinos sacrificados en el rastro "Temamatla", apoyé en la realización de 10 cultivos primarios de células tiroideas sembradas en medio McCoy's 5A modificado estimuladas con diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10 mU) de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), participé en 10 ensayos de MTT para la determinación de la viabilidad celular, desarrollé un análisis estadístico con los resultados obtenidos de los tratamientos y consulté bibliografía para conocer el funcionamiento de la glándula tiroides y la realización de cultivos de células tiroideas en diferentes especies.

Debido a que el establecimiento de los cultivos implica diversos factores como, adecuada suspensión de células tiroideas, adherencia de las células a la placa, evitar contaminación del cultivo, entre otros. No logramos alcanzar el tercer objetivo "Identificar la dosis ideal de TSH que tenga mejor respuesta sobre la producción de hormonas tiroideas (T3, T4) en cultivo primario de células tiroideas". Sin embargo, se logró estandarizar y será el paso siguiente de esta investigación.

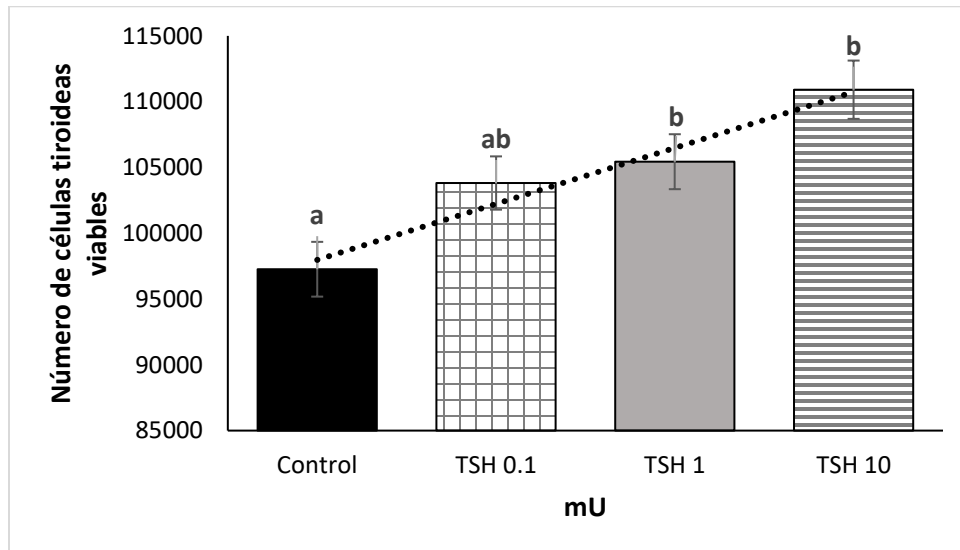
RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Uno de los objetivos de este servicio social fue establecer las condiciones ideales del cultivo primario de células tiroideas de bovino, los cuales se especifican en el cuadro 1, donde se observan los parámetros empleados tales como condiciones de sembrado y adición de tratamientos.

Cuadro 1. Parámetros implementados para la realización de cultivos primarios de células tiroideas de bovino realizadas en diferentes fechas en el Laboratorio de Bioquímica de la Reproducción de UAM Xochimilco.

Cultivo de células tiroideas													
Fecha	Cultivo	Peso del tejido (g)	Digestión enzimática	Resuspensión mL	Conteo celular	Sembrado			Tratamientos (µL)				
						Pozos/cultivo	Suspensión celular (µL)	Medio (µL)	Control	TSH 0.1 mU	TSH 1 mU	TSH 10 mU	Medio
25/07/2023	1	666	Relación: 100	0.5	2,800,000	24	214	1,086	350	350	350	350	1,050
	2	604	mg de tejido	0.5	3,225,000	24	186	1,114	350	350	350	350	1,050
15/08/2023	3	667	por 1 mL de	0.5	2,125,000	24	282	1,017	350	350	350	350	1,050
	4	555	digestión enzimática (ver en materiales y métodos)	1	2,050,000	24	586	714	350	350	350	350	1,050

Los resultados mostraron que, el uso de 1 y 10 mU de TSH en el medio de cultivo de células tiroideas de bovino, incrementaron ($p > 0.05$) la viabilidad celular (105,437.78 y 110,908.79 células respectivamente) en comparación con el control (97,264.67 células). Mientras que, la adición de 0.1 mU de TSH (103,817.29 células) al medio de cultivo, no mostró efecto ($p < 0.05$). Adicionalmente, el análisis de regresión lineal simple indicó que, el efecto de TSH sobre la viabilidad celular es dosis dependiente (0.1, 1 y 10 mU; $p > 0.001$) como se observa en la gráfica 1.



Gráfica 1. Efecto de diferentes dosis de TSH sobre la viabilidad de células tiroideas de bovino en cultivo. Las literales a y b indican diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente informe de servicio social indicaron que, bajo las condiciones de cultivo empleadas, se logró establecer el cultivo primario de células tiroideas de bovino. Esto se corroboró al estimular las células a diferentes concentraciones de TSH. Los resultados indicaron que la TSH incrementa la viabilidad de células tiroideas de bovino.

Las condiciones empleadas en este proyecto para el tiempo de establecimiento del cultivo primario de células tiroideas de bovino fue el siguiente: El transporte de las muestras biológicas del rastro "Temamatla" al laboratorio de Bioquímica de la Reproducción en UAM Xochimilco fue en SSF estéril al 0.9% a 37°C, se emplearon 600 mg de tejido tiroideo y la digestión enzimática contenía 6.78 mg/10 mL de colagenasa 0.6 mg/10 mL de DNasa, 0.6 mL/10 mL de DPBS 10x y agua estéril (1:10) logrando una solución de DPBS 1X. El establecimiento de cultivo fue durante 24 hrs, el tiempo de cultivo con los tratamientos (Control, 0.1, 1 y 10 mU de TSH) de 48 hrs y se adicionó la solución MTT por 24 hrs, todos los pasos mencionados en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 90% de humedad, por último, el buffer de lisis celular se dejó por 4 hrs a T° ambiente en total oscuridad.

Eggo *et al.*, (1990), realizaron un estudio en el que evaluaron la interacción de TSH (1 mU/mL), insulina (100 ng/mL) e IGF-1 (100 ng/mL) en la regulación del crecimiento y la función de la glándula tiroides en ovinos, para ello, transportaron las muestras biológicas en solución salina estéril (HBSS) fría. Los resultados indicaron que TSH por sí sola no induce la proliferación celular, sin embargo, la combinación con otro factor trófico como insulina o IGF-1 promueve el incremento en el número de células. Respecto a las condiciones de disgregación de tejido, Gerad *et al.*, (1989), usaron de 5 a 10 g de tejido tiroideo de bovino para evaluar la expresión del gen de la Tg. Utilizaron colagenasa (1 mg/mL), DNasa (400 µg/mL) y dipasa (5 mg/mL) para elaborar la digestión enzimática, sin embargo, en nuestras

manos, se empleó una mayor cantidad de tejido. Por lo anterior, si bien la colecta y transporte de las muestras biológicas empleada, así como de los componentes de la digestión enzimática difieren con algunos otros autores, se logró el establecimiento de los cultivos primarios de células tiroideas de bovino.

En cuanto al efecto de TSH sobre la viabilidad de células tiroideas, los resultados de este informe demostraron que, el uso de 1 y 10 mU de TSH incrementó el número de células tiroideas de bovino. En un estudio realizado por Nitsch & Wollman en 1980, reportaron que, el número de células tiroideas de rata sembradas se duplicó en el transcurso de 3 días tras la exposición a 10 mU de TSH. Así mismo, Deleu *et al.*, (1999), observaron que los tirocitos de perro en cultivo primario proliferaron en respuesta a una combinación de TSH (1 mU), insulina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o IGF-1 (100 ng/mL) y suero al 1%. De igual manera, Huber *et al.*, (1990), en cultivos de células tiroideas fetales de humano, mostraron que el tiempo de duplicación celular en medio sin suero en condiciones basales, es decir, sin insulina y TSH fue de 112 ± 7 hrs y al adicionar insulina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en combinación con TSH (1 y 10 mU), el tiempo medio de duplicación dosis dependiente fue de 27 ± 0.5 hrs ($p < 0.001$). De esta manera, se demuestra que, bajo nuestras condiciones de cultivo, el uso de insulina como factor trófico en el medio de cultivo y la estimulación con TSH incrementa el número de células tiroideas de bovino.

A pesar de la información respecto al uso de cultivos primarios de células tiroideas en diferentes especies, los modelos más estudiados son en líneas celulares de tiroides de rata FRTL-5, WRT y células PC Cl3 (Medina & Santisteban, 2000). Evidencias indican que, Golstein *et al.*, (1999), reportaron que el aumento de número de pases (entre 40 y 50) de líneas celulares FRTL-5 reduce progresivamente la sensibilidad de respuesta proliferativa de las células a TSH. Similarmente, Kimura *et al.*, (2001), observaron que al aumentar el número de pases en líneas celulares WRT se pierde la capacidad de respuesta proliferativa a TSH. Estos hallazgos sugieren que en cultivos de líneas celulares existen cambios genotípicos que distan del tejido de origen, por lo que, este informe de servicio social aporta herramientas para estudiar la glándula tiroides de bovino.

RECOMENDACIONES

Realizar más cultivos primarios de células tiroideas de bovino con los parámetros establecidos en este servicio social para hacer más evidente el efecto de TSH respecto al incremento en el número de células viables. Así mismo, se recomienda cumplir con el objetivo 3, “Identificar la dosis ideal de TSH que tenga mejor respuesta sobre la producción de hormonas tiroideas (T3, T4) en cultivo primario de células tiroideas” para dar continuidad y profundizar en la investigación.

REFERENCIAS

Aleena, J., Pragna, P., Archana, P., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E., Varma, G., & Bhatta, R. (2016). Significance of Metabolic Response in Livestock for Adapting to Heat Stress Challenges. *Asian Journal of Animal Sciences*, 10, 224-234.

Arteaga-García, Y., Hernández-Coronado, C. G., Guzmán, A., & Rosales-Torres, A. M. (2021). Manual de extracción, cuantificación e identificación de proteínas.

Bernal-Carrasco, J. R. (2010). Las hormonas tiroideas en el desarrollo del cerebro. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Deleu, S., Pirson, I., Coulonval, K., Drouin, A., Taton, M., Clermont, F., ... & Maenhaut, C. (1999). IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis and complement each other in inducing mitogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 149(1-2), 41-51.

Duarte-Guterman, P., Navarro-Martín, L., & Trudeau, V. L. (2014). Mechanisms of crosstalk between endocrine systems: regulation of sex steroid hormone synthesis and action by thyroid hormones. *General and comparative endocrinology*. 203, 69–85.

Eggo, M. C., Bachrach, L. K., & Burrow, G. N. (1990). Interaction of TSH, insulin and insulin-like growth factors in regulating thyroid growth and function. *Growth Factors*, 2(2), 99-109.

Farooq, U., Samad, H. A., Shehzad, F., & Qayyum, A. (2010). Respuestas fisiológicas del ganado al estrés por calor. *Ciencia aplicada mundial*, 8, 38-43.

Gavrila, A., & Hollenberg, A. N. (2019). The hypothalamic-pituitary-thyroid axis: physiological regulation and clinical implications. *The Thyroid and Its Diseases: A Comprehensive Guide for the Clinician*, 13-23.

- Gerard, C. M., Roger, P. P., & Dumont, J. E. (1989). Thyroglobulin gene expression as a differentiation marker in primary cultures of calf thyroid cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 61(1), 23-35.
- Goel, R., Raju, R., Maharudraiah, J., Kumar, G. S. S., Ghosh, K., Kumar, A., & et al. (2011). A signaling network of thyroid-stimulating hormone. *Journal of proteomics & bioinformatics*, 4.
- Golstein, J., Kimura, T., Miot, F., & Dumont, J. E. (1999). Loss of several cell functions including okadaic acid-induced apoptosis after multiple passages in FRTL-5 cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 150(1-2), 141-149.
- González Aretia, D. (2021). La esfingosina 1-fosfato (s1p) como mediador de los efectos biológicos de la hormona foliculoestimulante (fsh) en las células de la granulosa de bovino. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Guzmán, A., Rosales-Torres, A. M., & Hernández-Coronado C. G. (2017). Hormonas que regulan la reproducción.
- Hernández-Coronado, C. G., Armndariz, D., Guzman, A., Medina, Z., Gonzalez, D., Lopez, L., & Rosales-Torres, A. M. (2023). Morfofisiología de la Glándula Adrenal y Tiroides del Bovino. *Entorno ganadero*, 19 (117), 30-36.
- Hernández-Stegmann, M. F., Rendón-Villa, M., & Mesa-Marrero, M. (2016). Fisiología De Las Glándulas Tiroides Y Paratiroides. *Libro virtual de formación en ORL*, 1-2.
- Huber, G. K., & Davies, T. F. (1990). Human fetal thyroid cell growth in vitro: system characterization and cytokine inhibition. *Endocrinology*, 126(2), 869-875.
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J. E., & Roger, P. P. (2001). Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocrine reviews*, 22(5), 631-656.
- Kwasnik, A., Tonry, C., Ardle, A. M., Butt, A. Q., Inzitari, R., & Pennington, S. R. (2016). Proteomes, their compositions and their sources. *Modern proteomics—Sample preparation, analysis and practical applications*, 3-21.
- Lozano, Y., Ochoa, D., & Zapata, A. (2019). Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas. *Ámbito Investigativo*, 4 (1), 82-90.
- Medina, D. L., & Santisteban, P. (2000). Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *European journal of endocrinology*, 143(2), 161-178.
- Nitsch, L., & Wollman, S. H. (1980). Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(5), 2743-2747.

Ortiga-Carvalho, T. M., Chiamolera, M. I., Pazos-Moura, C. C., & Wondisford, F. E. (2011). Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Comprehensive Physiology*, 6 (3), 1387-1428.

Ortiga-Carvalho, T. M., Sidhaye, A. R., & Wondisford, F. E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature Reviews Endocrinology*, 10 (10), 582-591.

Osorio, J. H., & López-Salazar, C. (2011). Actualización en el funcionamiento de la glándula tiroides en caninos. Primera parte: Funcionamiento normal. *Biosalud*, 10 (1), 99-112.

Osorio, J.H., Vinasco, J., & Suárez, Y.J. (2014). Hormonas tiroideas en bovinos: artículo de revisión. *Revista Biosalud*, 13 (1), 76-84.

Peksa, Z., Trávníček, J., Dusová, H., Konečný, R., & Hasonová, L. (2011). Morphological and histometric parameters of the thyroid gland in slaughter cattle. *Journal of Agrobiology*, 28 (1), 79.

Riedel, C., Levy, O., & Carrasco, N. (2001). Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (24), 21458-21463.

Santacruz, L., Melo, A., Rodríguez, C., & Moscoso, J. (2017). Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Biociencias*, 12 (2), 127-140.

Silva, J., Ocarino, N., & Serakides, R. (2018). Thyroid hormones and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 99 (5), 907–921.

Tavira, C. A., Ortega, A., Dávila, I., Estrada, S., & Meneses, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista mexicana de Ciencias farmacéuticas*, 40 (4), 35-46.

Zhang, C., Guo, L., Zhu, B., Feng, Y., Yu, S., An, N., & Wang, X. (2013). Effects of 3, 5, 3'-triiodothyronine (t3) and follicle stimulating hormone on apoptosis and proliferation of rat ovarian granulosa cells. *Chinese Journal of Physiology*, 56(5), 298-305.

ANEXOS

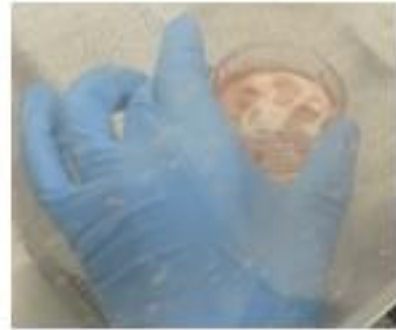
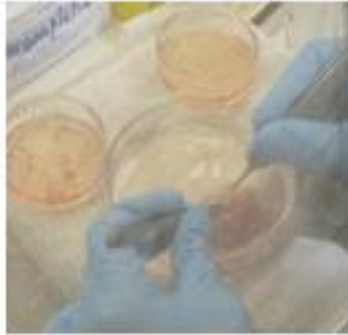
Anexo 1. Lóbulo izquierdo de glándula tiroides de bovino obtenido en rastro "Temamatla".



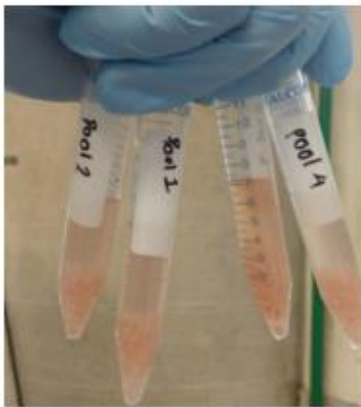
Anexo 2. Glándulas tiroides de bovino en SSF al 0.9% y medio McCoy's 5A modificado.



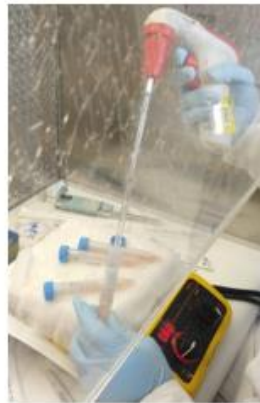
Anexo 3. A: Retiro de cápsula del lóbulo izquierdo de glándula tiroides de bovino. **B:** Disección de segmentos aleatorios de glándula tiroides de bovino.



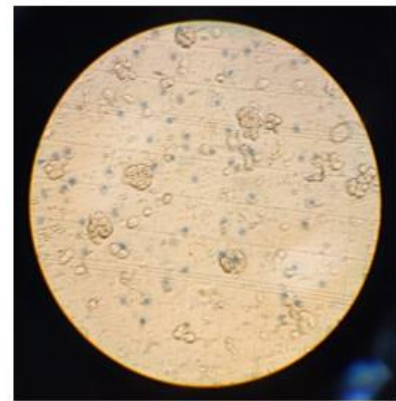
Anexo 4. Muestras de tejido tiroideo en digestión enzimática.



Anexo 5. Resuspensión de tejido con pipeta serológica.



Anexo 6. Cámara de Neubauer para el conteo de células tiroideas en objetivo 40x.



Anexo 7. Esquematización de la distribución de tratamientos en una placa de 96 pozos.

