

CULTIVO TRIDIMENSIONAL SIN MATRIZ EXTRACELULAR DE GLÁNDULA TIROIDES

EXTRACELLULAR MATRIX WITHOUT THREE-DIMENSIONAL CULTURE OF THYROID GLAND

Herrera M^{1,2}, Rivera J^{1,3}, Curtidor H⁵, Ondo A^{1,3}, Spinel C^{1,4}

¹Centro Internacional de Física, ²Centro de Telemedicina, ³Departamento de Química, ⁴Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, ⁵Fundación de Inmunología de Colombia.

RESUMEN

La unidad morfológica funcional de la glándula tiroides es el folículo, estructura ovoide rodeada por células cúbicas con el coloide que secreta dentro del lumen folicular. Excepto el cultivo de 12 días de folículos cerrados de rata que conservan morfología y función como *in vivo*, en la mayoría de los cultivos de tiroides se pierde la estructura del folículo a partir de 24 horas, en pocos conservan la reconstrucción del folículo hasta 6 días sin especificar la función. El objetivo fue lograr un cultivo de folículos porcinos cerrados.

Se realizó una digestión enzimática y mecánica de la tiroides de cerdo para obtener los folículos cerrados, confirmados por análisis morfológico y funcional. Se realizó el cultivo a largo plazo sobre agarosa con 1 mU/ml y sin hormona tireotrópica (TSH) y su análisis morfológico.

El tejido *in vivo* muestra una morfología de glándula hipotiroidea, células planas, poco retículo endoplásmico rugoso (RER) y complejo de Golgi, microvellosidades escasas y cortas. Los folículos aislados realizan las funciones de la glándula, presentando una relación de organificación de I¹²⁵/captación de I¹²⁵ de 70%, demostrándose que la mayoría son cerrados. Los folículos cultivados sin TSH conservan la forma ovoide y el coloide en su interior y la misma ultraestructura del tejido de donde se obtuvieron, con RER y complejo de Golgi muy escasos, pero aumentan la microvellosidades y el espesor del epitelio. En presencia de TSH el espesor del epitelio, el RER y el complejo de Golgi aumentan desde el primer día y se reducen considerablemente las cavidades foliculares.

Los folículos aislados y cerrados conservan su arquitectura y función. En cultivo a largo plazo (8 días) con y sin TSH se mantiene un cultivo tridimensional de la unidad funcional de tiroides; además, responden al estímulo de la TSH como una glándula *in vivo*.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de: Colciencias (110140521161), Unidad de Investigación UN sede Bogotá (8003029) y al programa ECOS-

Nord/Colciencias/ICFES/ICETEX, y la Fundación de Inmunología de Colombia (FIDIC).

Palabras claves: Folículo tiroideo, disociación de la tiroides, cultivo tridimensional primario.

ABSTRACT

The functional morphological unit of the thyroid gland is the follicle, ovoid structure surrounded by cuboidal cells that secretes the colloid within the follicular lumen. Except the 12-day culture of rat follicles remain closed morphology and function in vivo, in most cultures of thyroid follicle structure lost after 24 hours, few retain the reconstruction of the follicle up to 6 days unspecified function. The aim was to achieve a culture of porcine follicles closed. We performed an enzymatic digestion and mechanical pig thyroid follicles for closed, confirmed by morphological and functional analysis. We performed long-term cultivation in agarose with 1 mU / ml and no thyrotrophic hormone (TSH) and morphologic analysis. The tissue in vivo shows a hypothyroid gland morphology, flat cells, little rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex, few and short microvilli. The isolated follicles perform the functions of the gland, presenting a list of organification of I-125 / I-125 uptake 70%, showing that most are closed. Follicles cultured without TSH retain the ovoid shape and inside the colloid and the same ultra-structure of the tissue from which they were obtained, with RER and Golgi complex of very low, but increase the microvilli and the thickness of the epithelium. TSH is the thickness of the epithelium, the RER and Golgi complex increase from the first day and considerably reduced the follicular cavities. The follicles remain isolated and closed architecture and function. In long-term culture (8 days) with and without TSH remains three-dimensional culture of thyroid functional unit, also respond to stimulation of TSH as a gland in vivo. This work was made possible thanks to support from: Colciencias (110140521161), A Research Unit in Bogotá (8003029) and the program ECOS-Nord/Colciencias/ICFES/ICETEX and Immunology Foundation of Colombia (FIDIC).

Keywords: Thyroid follicle, dissociation of the thyroid, primary three-dimensional culture.

Recibido: agosto 30 de 2009

Aceptado: julio 28 de 2009

Correspondencia: Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Email: cmspinelg@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

La tiroides es una de las glándulas endocrinas más importantes del organismo, tiene múltiples efectos en el desarrollo y el metabolismo de los vertebrados. Regula la tasa metabólica basal y es esencial para mantener alta y constante la temperatura corporal en los animales homeotérmicos (37°C). El efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de las proteínas y de los lípidos es de naturaleza bifásica: a bajas concentraciones fisiológicas son anabólicas y a altas concentraciones catabólicas (1,2). Las alteraciones de la función de la tiroides ocasionan patologías importantes, entre las que se cuentan numerosos casos de bocio endémico, hipertiroidismo, hipotiroidismo y cáncer de tiroides en el mundo y en Colombia.

La unidad morfológica y funcional de la tiroides es el folículo: estructura ovoide, constituido por una capa de células epiteliales cúbicas (tirocitos) alrededor de una solución viscosa de proteínas que secretan: el coloide (1-3). El tamaño de los folículos varía según la especie (50 a 150 µm en rata y ratón; 150 y 500 µm cerdo y humanos), edad y su localización: los más grandes al exterior de los lóbulos (2).

La tiroides sintetiza y secreta las hormonas tiroideas 3,5,3'-triyodotironina (T3) y 3,5,3',5'-tetrayodotironina (T4), que se realizan en tres procesos ligados a su morfología folicular y a la ultraestructura de los tirocitos (4, 5). La **Síntesis de la Tg** e inicio de su

glicosilación N-osídica se realiza en el abundante retículo endoplásmico rugoso (RER) ubicado alrededor del núcleo; la maduración y finalización de la glicosilación de la Tg se hace en el complejo de Golgi (CG) de la región supranuclear, y en vesículas de exocitosis es secretada al coloide. La **captación del yoduro** se efectúa en la membrana basal (5-7), y pasa al coloide folicular a través de la membrana apical del tirocito (8-9). La tiroperoxidasa de la membrana apical y dentro del coloide une el yoduro a la Tg y luego forma las yodotironinas T3 y T4 (10,11,12) sobre la Tg. Por último, la Tg yodada es endocitada (13) y degradada en prelisosomas y lisosomas (14), liberando las hormonas a la circulación (15) donde son transportadas a los tejidos del organismo (16). La glándula tiroides esta bajo el control de la hormona tireotrópica (TSH) y de la concentración del yoduro (1-3).

Uno de los mayores problemas del cultivo del tejido tiroideo es mantener la arquitectura folicular y la polaridad de los tirocitos, por lo tanto la función se pierde (17) debido a la desaparición del lumen coloidal y de la polaridad del tirocito (18-21). Algunos cultivos con elementos de la matriz extracelular como colágeno u artificiales como matrigel y en presencia de TSH se logra la formación denominadas pseudofolículos y algunos autores los llaman folículos (21-28) o a partir de transfección de células madre embrionarias (29). Pero son estructuras

de corta duración y no reproducen *in vitro* la función de organificación de la Tg ni formación de hormonas T3 y T4. La polaridad del tirocito en cultivo es fundamental para conservar los dominios de membrana y por lo tanto la expresión de moléculas específicas de estos dominios (28).

Han sido reportados métodos para cultivar folículos cerrados y abiertos (19,30-34), o recubriéndolos de colágeno (35-38) pero se conoce muy poco de las relaciones entre estructura y función. La incubación de folículos abiertos de rata sobre agarosa durante 12 horas conservan la ultra-estructura del tirocitos, (3,10,39,40) y se mantienen hasta 3 días (30) y responden a la TSH (3, 31,40).

La TSH estimula la función de los tirocitos de folículos abiertos de cerdo y humanos durante el cultivo en los dos primeros días (31,37-39), este hallazgo y otros de disociación de tiroides de rata (3,10,39) y de cerdo (34,39) modificados para la tiroides de rata, se logró el cultivo de folículos cerrados hasta 12 días. En este cultivo se demostró que conservar desde el inicio del cultivo a los folículos cerrados mantienen la forma folicular y la polaridad del tirocito, y al mismo tiempo, expresan una función como la glándula *in vivo*, es decir, la función de organificación del yoduro, la síntesis de la Tg normalmente yodada y la formación de hormonas T3 y T4 con y sin TSH durante 12 días (41), adicionalmente, estos folículos de rata en cultivo reproducen el efecto Wolff-Chaikoff en presencia de

concentraciones creciente de yoduro (42), demostrándose que responden a la TSH y al yoduro de una manera muy similar a la glándula *in vivo*. Se hicieron modificaciones de esta disociación de tiroides de rata y se logró folículos cerrados de tiroides de cerdo, ratón y humana (43). En este artículo nos basamos en estos resultados y describimos un análisis morfológico y funcional de los folículos aislados de tiroides de cerdo; y su cultivo conservando la estructura tridimensional de estos folículos cerrados por 8 días con y sin TSH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracción y disección de tiroides de cerdo

Los lóbulos de tiroides de cerdo se obtienen en Frigoríficos Guadalupe, se lavan durante un minuto en alcohol al 70% y luego se colocan en medio de cultivo COON (44) (Sigma) con 100 mg/ml-100 mU/ml penicilina-estreptomicina (Gibco) (medio que denominamos de ahora en adelante COON), y se lleva directamente al laboratorio. Se retira la cápsula del lóbulo y se seccionan segmentos del parénquima que es cortado en fragmentos pequeños de aproximadamente 1mm³.

Disociación y obtención de folículos

Los fragmentos obtenidos se reúnen en un frasco de base plana con medio COON + 400 U/ml de colagenasa tipo II (Sigma) en COON, se incuban a 37°C con agitación continua de 160 oscilaciones por minuto. Cada 10 minutos (min) se renueva la colágenasa

y se realiza cuatro veces sin pasar una hora (h) de acción enzimática. Antes de tomar el precipitado con los folículos, se realiza una disociación mecánica con la ayuda de pipetas de 10 y 5 ml cada una 10 veces evitando la formación de burbujas y turbulencia en el flujo. Para retirar la solución de colagenasa los folículos son lavados tres veces con COON + 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) cada uno centrifugando 5 min a 50 gravedades (g). Los sobrenadantes se eliminan y con ellos los desechos celulares y células aisladas.

De las cuatro disociaciones de 10 min se reúne todos los precipitados y se filtra a través de una malla con poros de 300m de diámetro con el fin de homogeneizar el material disociado y eliminar el tejido no disociado. Antes de iniciar la pre-incubación se realiza una prueba de viabilidad con azul Tripan 0,5%. Se pre-incuban durante 12 horas en COON + 0,5% de SFB en cajas de Petri de 75mm recubiertas con agarosa tipo I al 1% para impedir la adhesión celular, se mantienen en la incubadora a 37°C, con una atmósfera de 95% de aire -5% de CO₂ y saturada en humedad. (p/v). Para el análisis funcional se pre-incuba 10 seguido de 2 horas en presencia de yoduro radiactivo (5 mCi/mL de NaI¹²⁵).

Captación de I¹²⁵

Finalizado el tiempo de pre-incubación, se lavan 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) que contiene NaI 10⁻⁷M, centrifugando a 50g por 5min cada vez. Finalmente, se determina el *background* del contador

gamma de pozos (Auto Gamma Counter Cobra II Packard) y se realiza la medida de la radioactividad de las muestras en tubos Beckman, así como de controles positivos de medio con radioactividad. La captación (C). se evalúa calculando la proporción de I¹²⁵ en los folículos con respecto al I¹²⁵ total en el medio de solución.

Organificación de I¹²⁵

Una vez determinada la captación de I¹²⁵, se adiciona 1mL de ácido tricloroacético (TCA) al 21%(p/v) + 100μL de albúmina sérica bovina al 5%(p/v) y 1mL de PBS que contiene NaI 10⁻⁷M, se agita vigorosamente por un minuto y después se deja a 4°C durante 16 horas. Se realizan 3 lavados con TCA al 10%(p/v) que contiene NaI 10⁻⁷M con centrifugación a 3.400g por 10min y se mide la radioactividad del precipitado previa determinación del *background* de la máquina y de los tubos vacíos, esto permite evaluar la cantidad de yoduro unido a las proteínas (PBI) u organificación del yoduro.

Cuantificación del ADN (Schenider 1957)

Una vez medida el PBI, el precipitado se resuspende en 600μL de etanol al 95% a 4°C y se centrifuga a 3.400g por 10min. Se resuspende en 600μL de etanol al 95% y se calienta por 21min a 70°C seguido de centrifugación a 3.400g por 10min. El precipitado se resuspende en éter etílico y se eleva la temperatura a 30°C por 10min. Finalmente, se centrifuga desechando el sobrenadante y secando el precipitado a 50°C. Se añade 400 ml de

HClO₄ 0,5 N 21 min a 70°C, se añade NaOH 5 mM y se calienta 15 min a 70°C, y por último se añade el reactivo de difenilamina, al mismo tiempo se realizan los blancos de la curva de mg ADN. Las muestras y los blancos se dejan en obscuridad mínimo 18 h, y se lee el sobrenadante en un espectrofotómetro a 600 nm l. Primero la curva de ADN y luego las muestras La cuantificación del ADN se realiza para tener un factor de normalización tanto para la C como para el PBI. Los resultados funcionales de captación y organificación se correlacionan con lo observado en el microscopio invertido (MI) del análisis con el azul Trypan.

Cultivo de folículos

El análisis del cultivo se realizó morfológicamente en microscopios invertido (MI), óptico (MO) y electrónico (ME). Los folículos se cultivan en cajas de Petri de 75mm de diámetro recubiertas con agarosa tipo II (*agar-bearing marine algae type II*, Sigma) en COON + 0.5% de SFB a 37°C y una atmósfera 95% aire-5% CO₂ y saturada en humedad. El medio se cambia a las 24 horas y después cada 3 días tanto para renovar el medio como para eliminar los desechos remanentes. Se hicieron cultivos con y sin 1 mU/ml de TSH desde el inicio del cultivo.

Procesamiento para el análisis morfológico El estudio morfológico se realizó en base al procesamiento de folículos abiertos (3) modificado para folículos cerrados de rata (41).

La fijación del tejido completo 2 h y de los folículos 1 h en glutaraldehído

2,5% en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7.4. Tres lavado de 10 min con tampón cacodilato 0,1 M pH 7.4. Se continúa inmediatamente con la posfijación en 1% de tetróxido de osmio (OsO₄) en tampón cacodilato 0,1 M. Tres lavado de 10 min con tampón cacodilato 0,1 M, pH 7.4. Como los folículos se encuentran en suspensión son centrifugando a 210 g por 5 min para cada paso hasta su impregnación en resina. Se continúa con la deshidratación en concentraciones ascendentes de etanol, cada una de 5 min 75%, 85%, 90% y 5 veces alcohol absoluto. La infiltración a la resina se realiza 4 veces 15 min en oxido de propileno, 2 veces en una mezcla oxido de 1 propileno/1 resina Epon 812 (Ladd), la primera de 15 min y la segunda de 2 h. Se culmina con la inclusión en la resina una noche y cambio al día siguiente. La polimerización se realiza 6 h a 30°C, 12 h a 40°C y 2 días a 60°C, una vez formada la pirámide de resina se realizan cortes semi-finos de 0,5 μm de espesor, coloreados con azul de toluidina 1% y examinados al MO. Los cortes ultra-finos se montan en rejillas de cobre y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados al ME (45).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tejido tiroideo de cerdo

La morfología de las muestras de tiroides empleadas al observarlas en MO muestra unos folículos de diámetro variable, pero en todos una capa de células muy planas (Fig. 1A).

Los tirocitos en ME presentan exiguo RER y complejo de Golgi, cortas y muy pocas microvellosidades y escasos lisosomas (Fig. 1B). Esta es la morfología a la descrita *in vivo* para una glándula hipotiroidea (46). Concluyendo que el tejido original es característico de una glándula hipotiroidea.

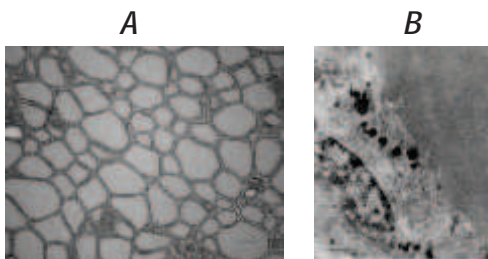


Figura 1. Aspecto morfológico de la glándula de tiroides.

A. En microscopio óptico del tejido de la tiroides de cerdo presenta folículos con células muy planas limitando el coloide y de diferentes diámetros. H y E, MO, Barra 130 mm.

B. Imagen en microscopio electrónico de un tirocito de la imagen A. El polo apical presenta escasas microvellosidades muy cortas en relación directa con el coloide. El polo basal en contacto con la membrana o lámina basal. Note la escasa presencia de retículo endoplásmico rugoso y las vesículas en la región apical de la célula. ME, Barra 1,5 mm.

Folículos recién disociados

Después de 12 horas de pre-incubación los folículos que presentan un contenido homogéneo son cerrados comparándolos con los abiertos que presentan un contenido heterogéneo (3,41), aproximadamente 95% (n=6

experimentos diferentes) de las células son viables, similar a lo reportado para rata (41). Los folículos abiertos pueden resellarse, es decir, recuperan su morfología folicular cerrada después de 12 horas; si no se cierran se desorganizan y las células mueren y son eliminadas con el cambio de cultivo (41). Para comprobar si eran cerrados se realizó la captación (C) y la organificación (PBI) del I^{125} , cuya relación PBI/C es directamente proporcional al número de folículos cerrados (41), se logró obtener una proporción de 72% sin TSH y 80% con TSH (Fig. 2). Demostrándose que los cultivos se inician con una proporción elevada de folículos cerrados.

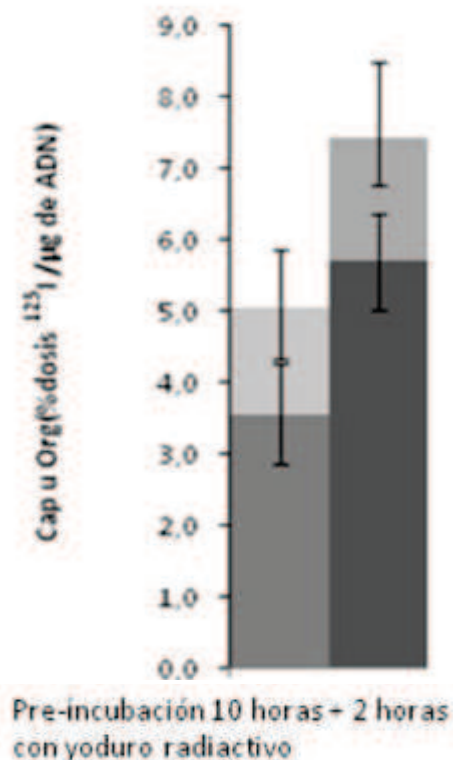


Figura 2. Porcentajes de captación y organificación de I^{-125} de la dosis por μg de ADN en folículos de tiroides de cerdo pre-incubados durante 10 horas + 2 horas con I^{-125} (5 mCi/mL). Los colores claros muestran los valores de captación en ausencia (verde) y en presencia de 1mU/mL de TSH (azul), mientras que los colores oscuros muestran la organificación por μg de ADN para ambos tratamientos. N=3, \pm SEM.

Cultivo de folículos

En los folículos cultivados sin TSH persiste la luz de los folículos con coloide desde el primer día (Fig. 3A) hasta el octavo (Fig. 3C). Al iniciar el cultivo se evidencia que el epitelio es plano similar al tejido de origen

siendo de 8 μm , pero con el tiempo de cultivo se incrementa a 25 μm en el día 8. La ultra-estructura del primer día (Fig. 3B) es similar a los folículos del tejido de origen (Fig. 1B), las células conservan su polarización con escasas microvellosidades y organelos como el RER y complejo de Golgi, pero se distinguen bien los complejos de unión en la región apical entre los tirocitos separando los dominios de membrana basolateral de la apical como *in vivo*. Aunque son folículos de pared epitelial muy delgada se logran conservar con el coloide. A los 8 días de cultivo en ME es evidente el aumento del espesor del epitelio y de las microvellosidades (Fig. 3D), pero con exiguo RER y complejo de Golgi.

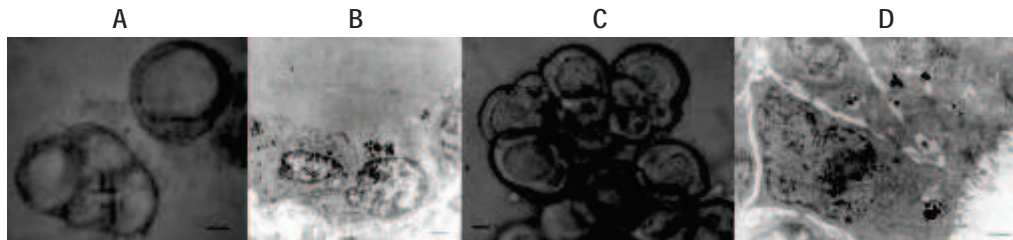


Figura 3. Cultivo de folículos de tiroides de cerdo sobre agarosa sin hormona tireotrópica. A y B. Un día de cultivo. C y D. 8 días de cultivo.

A. Los folículos cerrados conservan la estructura y su coloide de aspecto hialino y la capa de células parecen planas aunque, algunos presentan un epitelio folicular cúbico (derecha arriba). MI, Barra 40 μm .

B. Imagen en microscopio electrónico de un fragmento de folículo de tiroides de A, se distingue el coloide del folículo y las células presentan núcleos redondos. En la región apical del núcleo se encuentran estructuras vesiculares densas a los electrones, similares a lisosomas. ME, Barra 1,5 μm .

C. Los folículos cerrados conservan su estructura y coloide en cultivo. Se evidencia que el espesor del epitelio es cúbico, aunque se presentan escasos folículos con epitelio plano. Los folículos tienden a agruparse. MI, Barra 40 μm .

D. Imagen en microscopio electrónico de un fragmento de folículo de la imagen C. Las células presentan un epitelio cúbico alto. El polo apical se encuentra erizado con abundantes microvellosidades y en contacto con el coloide, persisten vesículas similares a lisosomas con contenido denso a los electrones distribuidas en el citoplasma. Adicionalmente, en la región apical de la membrana lateral se aprecian los complejos de unión. ME, Barra 2,5 μm .

Los folículos cultivados con TSH (1 mU/ml) a partir del primer día el epitelio presenta una morfología típica de epitelio cúbico y la luz folicular se conserva con su aspecto hialino (Fig. 4A). A partir del cuarto día y hasta el octavo (Fig. 4C) el epitelio presenta el doble de altura que el primer día de cultivo, y las cavidades de los folículos disminuyen siendo muy difícil distinguir la cavidad folicular (Fig. 4C).

El epitelio de los folículos cultivados 1 día con TSH (1 mU/ml) presentan un epitelio menos plano (Fig. 4A), pero el espesor de las células es mayor comparado con los folículos sin TSH (Fig. 3A), aunque se agregan más que sin TSH. En ME el aspecto de los tirocitos (Fig. 4B) es similar al del

tejido de origen. En el día 8, aunque en MI no se distinguen las cavidades (Fig. 4C), en ME se observan (Fig. 4D) y los folículos presenta un epitelio de 30 mm. Es evidente que el incremento en la altura del epitelio de los folículos de cerdo en presencia de TSH es respuesta de las células a la hormona y va acompañado del abundante RER alrededor del núcleo (Fig. 4D1), el complejo de Golgi en la región perinuclear, además de largas y abundantes microvellosidades y cavidades folicular muy estrechas (Fig. 4D2). Igual que sin TSH se distinguen bien los complejos de unión en la región apical entre los tirocitos *separando los dominios de membrana basolaterale de la apical* (Fig. 4D2) *como in vivo*.

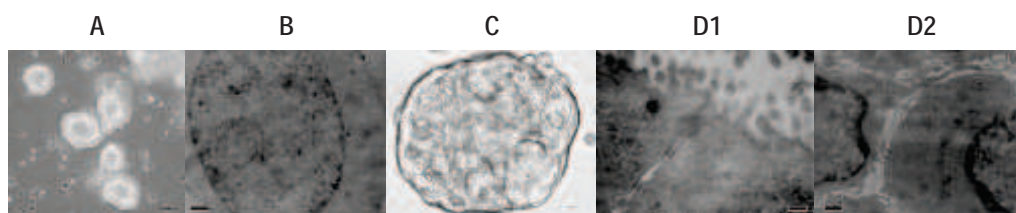


Figura 4. Cultivo de folículos de tiroides de cerdo sobre agarosa con 0,1 mU/mL de hormona tireotrópica. A y B. Un día de cultivo. C y D. 8 días de cultivo.

A. Los folículos conservan la estructura, los que son cerrados desde el inicio presentan un límite neto entre la membrana apical y el coloide (los dos folículos centrales), mientras que los que se resellaron presentan un límite irregular y la cavidad tiene aspecto heterogéneo (izquierda arriba). Los folículos tienden a agruparse desde el primer día. MI, Barra 50 mm.

B. Tirocito de un folículo de la imagen A en microscopio electrónico se distingue el coloide del folículo y las células presentan núcleos redondos. No se observan en la región apical del núcleo estructuras vesiculares densas a los electrones. Presenta la misma ultraestructura que un tirocito del tejido (Fig. 1B) y no se evidencia retículo endoplásmico rugoso. ME, Barra 1,9 mm.

C. Los folículos pierden su estructura ovoide y es muy difícil de distinguir las cavidades, pero persisten algunas con contenido de aspecto hialino. MI, Barra 22 mm.

D. Tirocitos de un folículo de la imagen C, en D1 corte a través del polo basal de las células, se evidencia el abundante retículo endoplásmico rugoso alrededor del núcleo. ME, Barra 32 mm; en D2 se observa un detalle de la unión entre dos células poniendo en evidencia un típico el complejo de unión; del coloide hacia el polo basal se distingue la unión cerrada, el desmosoma de banda y el desmosoma normal (spot desmosome). El polo apical presenta abundantes y largas microvellosidades. ME, Barra 100 mm.

La metodología desarrollada permitió la obtención de folículos cerrados de epitelio plano y algunos abiertos como lo reportados para la tiroides de rata (41,42) o de ratón (43) y humana (40), además de agrupaciones celulares y células aisladas (30,31,32). La arquitectura folicular se mantiene durante el tiempo de cultivo en presencia o ausencia de TSH (3,41,42), confirmándose que la clave está en colocar al inicio del cultivo los folículos cerrados y estos conservan su estructura en cultivo con o sin soporte de elementos de la matriz extracelular (44). Los folículos aislados y cerrados no requieren la TSH para mantener la cavidad ni la estructura folicular como lo descrito en la mayoría de los cultivos de pseudofolículos (22,23,24,25,26,37) y tampoco necesitan matriz extracelular (21,21,36,37) demostrándose que si desde el inicio del cultivo se tienen folículos cerrados no importa el soporte empleado ni hormonas, ellos conservan su arquitectura folicular en cultivo. Una característica descrita por diferentes autores como rasgo importante de polaridad son los complejos de unión tanto *in vivo* (46) como *in vitro* en folículos abiertos (3) o su reconstrucción con colágeno (43,35), los folículos de cerdo también presentan estas características, demostrando su cierre completo y la separación de la membrana apical de la basolateral. El incremento del espesor del epitelio observado sin TSH es posible que deba a los nutrientes favorables para el mantenimiento de estos en cultivo, pues el medio COON se ha descrito como el mejor para los

cultivos de tejido tiroideo (44). En el cultivo de folículos de rata se reporta la presencia de numerosas vacuolas autofágicas en ausencia y con 0,1 mU/ml de TSH (41), probablemente las vesículas que se observan al 4 día (dato no mostrado) de cultivo sin TSH sean vacuolas autofágicas o lisosomas secundarios.

Los folículos responden a la TSH como una glándula *in vivo* (1) aumentando la proporción de captación del I^{125} en la pre-incubación y durante el cultivo el espesor del epitelio y disminuyen notablemente las cavidades foliculares como fue descrito para el cultivo de 9 y 12 días de folículos de rata (46) o en glándulas hipertiroideas (46), es evidente que el incremento en la altura del epitelio de estos folículos es respuesta de las células a la TSH. Los receptores de la TSH se encuentran en la membrana basal y en folículos humanos y en condiciones de cultivo similares de 24 horas, péptidos sintéticos derivados de la TSH se unen a las membranas basales de los tirocitos de estos folículos (40). Un método ha sido descrito para aislar folículos de cerdo (34) que responden a iodolactonas (47), pero no describen si estos folículos se mantienen más de 24 h en cultivo.

El tejido inicial empleado en este trabajo es de una glándula hipotiroidea con folículos de epitelio cúbico muy bajo o plano, demostrándose que es una metodología que puede ser aplicada para obtener folículos de patologías de tejido humano para su estudio *in vitro* en condiciones controladas.

La principal particularidad del modelo descrito es su sencillez respecto a lo planteado en 34 y 47, además, puede realizarse con folículos de glándula hipotiroidea.

En conclusión, la clave para conservar la arquitectura del folículo de tiroides y la ultra-estructura del tirocito en cultivo de manera similar a la tiroides *in vivo* es extraer desde el inicio los folículos aislados y cerrados. Además, estos folículos responden a la TSH de manera similar a una glándula *in vivo* y no requieren de esta hormona para conservar su arquitectura.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Marcela Camacho, a Thierry Pourcher y a Manuel Elkin Patarroyo con sus aportes científicos y personales. A Frigoríficos Guadalupe. A la financiación de: Colciencias Programa Ciencias Básicas y Ecos-Nord; Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología y Centro Internacional de Física.

BIBLIOGRAFÍA

1. Werner CS, Ingbar HS. The thyroid. 3th ed. New York: Harper & Row: 1971. p. 5-40.
2. Wollman, SH. Structure of the thyroid gland. En: Vissler M. editor. The thyroid gland. New York: Raven Press; 1980.
3. Deneff J-F, Björkman U, Ekhölm R. Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles. J Ultrastruct Res 1980;71: 185-202.
4. Giraud A., Sandrine S, Lanet J, Franc JL. Binding and internalization of thyroglobulin: Selectivity, pH dependence and lack of tissue specificity. Endocrinology 1997;138(6): 2325-2332.
5. Spinel C. (2002) Biología molecular de la célula eucariótica animal. 1era ed. Medellín: Biogénesis Fondo Editorial; 2002. p. 201-214.
6. Spitzweg, C, Heufelder A, Morris J. Thyroid iodide transport. Thyroid 2000;10(4):321-330.
7. de la Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. Physiol Rev 2000;80(3):1083-105.
8. Kopp P. Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. Thyroid 1999;9(1): 65-69
9. Rodríguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T. Identification and characterization of a putative iodine transporter located at the apical membrane of the thyrocytes. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(7):3500-3503.
10. Björkman U, Ekhölm R. Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles. Endocrinology 1984; 115:392-398.
11. Medeiros-Neto G, Targovnik H, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. Endocr Rev. 1993;14(2):165-183
12. Vono-Toniolo J, Kopp P. Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated

- with congenital hypothyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004;48(1):70-82.
13. Marino M, McCluskey RT. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1295-C1306.
 14. Dubois B, Couvreur M, Spinel C, Deneff J-F, van den Hove M-F. Thyroglobulin (Tg) hydrolysis starts in prelisosomes. *Proceeding of the 10th International Thyroid Conferences, Amsterdam, The Netherlands: 1999.* p. 111.
 15. van den Hove-Vandenbroucke M-F. Secretion of thyroid hormones. In: De Visscher M, editors. *The thyroid gland.* New York: Raven Press; 1980. p. 61-79.
 16. Richardson SJ. Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones. *Int Rev Cyt* 2007;258:137-193.
 17. Fayet G, Hovsepian S, Dickson JG, Lissitzky S. Reorganization of porcine thyroid cells into functional follicles in a chemically defined, serum- and thyrotropin-free medium. *J Cell Biol* 1982;93(2):479-488.
 18. Ambesi-Impombato FS, Parks LAM, Coon HG. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci* 1980;77(6):3455-3459.
 19. Chambard M, Gabrion J, Mauchamp J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers. *J Cell Biol* 1982;91:157-166.
 20. Kimura T, Keymeulen AV, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: A critical evaluation of in vitro models. *Endocrine Reviews* 2001;22(5):631-656.
 21. Eggo MC, Quiney M, Campbell VS. Local factors regulating growth and function of human thyroid cells in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 2003;213:47-58
 22. Fayet G, Michel-Bechet M, Lissitzky S. 1971. Thyrotrophin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine-thyroid cells. 1. Ultrastructural studies. *Eur. J Biochem* 1971;24:100-111.
 23. Curcio F, Ambesi-Impombato FS, Perrela G, Coon HG. Long term culture and functional characterization of follicular cells from adult normal human thyroids. *PNAS* 1994;91(19):9004-9008.
 24. Toda S, Yonemitsu N, Minami Y, Sugihara H. Pluripolar cells organize thyroid follicles through aggregation and linkage in collagen gel culture of porcine follicle cells. *Endocrinology* 1993;133(2): 914-920.
 25. Mauchamp J, Mirrione A, Alquier C, André F. Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture. *Biol Cell* 1998;90:369-380.
 26. Pellerin S, Croizet K, Rabilloud R, Feige J, Rousset B. Regulation of

- the three-dimensional organization of thyroid epithelial cells into follicle structures by the matricellular protein, thrombospondin-1. *Endocrinology* 1999;140(3):1094-1103.
27. Toda S, Watanabe K, Yokoi F, Matsumura S, Suzuki K, Ootani A, Aoki S, Koike N, Sugihara H. A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294: 906–911
 28. Kuliawat R, Lisanti MP, Arvan P. Polarized distribution and delivery of plasma membrane proteins in the thyroidal follicular epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270(6);2478-2482.
 29. Lin R-Y, Kubo A, Keller GM, Davies TF. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro. *Endocrinology* 2003;144(6):2644-2649.
 30. Nitsch L, Wollman SH. 1980. Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *PNAS* 1980;77(1): 472-476.
 31. Nitsch L, Wollman SH. 1980. Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture. *PNAS* 1980; 77(5):2743-2747.
 32. Karlsson F, Westermark K, Westermark B. Functional properties of porcine-thyroid follicles in suspension. *Mol Cell Endocrinol* 1982;28: 99-112.
 33. Herzog V, Miller F. Structural and functional polarity of inside-out follicles prepared from pig thyroid gland. *Eur J Cell Biol* 1981;24(1):74-84.
 34. Gärtner R, Greil W, Stübner D, Permanetter W, Horm K, Pickardt CR. Preparation of porcine thyroid follicles with preserved polarity: functional and morphological properties in comparison to inside-out-follicles. *Mol Cell Endocrinol* 1985;40:9–16.
 35. Kusakabe T, Kawaguchi A, Hoshi N, Kawaguchi R, Hoshi S, Kimura S. Thyroid-specific enhancer-binding protein/NKX2.1 is required for the maintenance of ordered architecture and function of the differentiated thyroid. *Mol Endocrinol* 2006;20:1796–1809.
 36. Massart C, Gibassier J, Raoul ML, Le Gall F, Lancien G, Genetet N, Denais A, Darcel F, Lucas C. Action of peripheral or intrathyroidal lymphocytes on autologous thyrocytes cultured in follicles in collagen gel. *J Mol Endocrinol* 1997;18:137-145.
 37. Takasu N, Ohno S, Komiya I, Yamada T. Requirements of follicle structure for thyroid Hormone síntesis; cytoskeletons and Iodine Metabolism in polarized monolayer cells on collagen gel an in double layered, follicle-forming cells. *Endocrinology* 1992;131(3):1143-1148.
 38. Kraiem Z, Sadeh O, Heinrich R. Preparation and culture of a serum-free human thyroid follicle system and its application for measuring

- thyroid hormone secretion, iodide uptake and organification, cyclic adenosine monophosphate formation, gene expression, and cell growth. *Thyroid* 2000;10(1):53-57.
39. Westermark K, Karlsson FE, Westermark B. Thyrotropin modulates EGF receptor function in porcine thyroid follicles cells. *Mol Cell Endocrinol* 1985;40:17-23.
 40. Orozco J, Guzmán F, Orozco O, Spinel C. Detección en tirocitos humanos de péptidos sintéticos derivados de la hormona tireotrópica. *Rev Boliva Endocrinol* 1997;6(1),14-20.
 41. Spinel C, Colin I, van den Hove M-F, Deneff J-F. Correlated morphological and functional study of isolated rat thyroid follicles in suspension culture. *Mol Cell Endocrinol* 1990;71:141-153.
 42. Spinel C, Yildiz I. High doses of iodide are not toxic for rat thyroid follicles in culture. *Proceeding of the 10th International Thyroid Conferences, Netherlands, 1991;259.*
 43. Cabezas R, Ondo A, Arias J, Spinel C. Isolation and culture of closed thyroid follicles in mouse, pig and man. *Thyroid* 2005;15 Suppl. 15: Suppl:84-85.
 44. Ambesi-Impimbato FS, Parks LAM, Coon HG. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *PNAS* 1980;77(6):3455-3459.
 45. Hayat MA. *Positive staining for electron microscopy*. 1st ed. Cincinnati, Toronto, London: Wan Nostrand Reinhold Company; 1975. p.57-125
 46. Many M-C. L'involution de la hyperplasie thyroïdienne chez la souris C3H. [dissertation]. Bruselas: Univ. Católica de Lovaina:1982.
 47. Langer R, Burzler C, Bechtner G, Gärtner R. Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111:325-329.
 48. Rodríguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart Pourcher T. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3500-3503.