

## ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL CULTIVO A LARGO PLAZO DE FOLÍCULOS AISLADOS Y CERRADOS DE TIROIDES DE CERDO

### Morphological Study of Long-term culture of closed isolated pig follicles

HERRERA M<sup>1</sup>, ONDO-MENDEZ A<sup>1,2</sup>, Est- Ph. D.; BERNAL E<sup>1,3</sup>, Est-MSc.; SPINEL C<sup>1,4</sup>, Ph. D.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física,

<sup>2</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia (FC-UN) y Unité CEA UNSA TIRO, Francia.

<sup>3</sup>Unidad Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina-UN.

<sup>4</sup>Departamento de Biología, FC-UN. Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia. cmspinelg@unal.edu.co

Presentado 22 de agosto de 2007, aceptado 18 de octubre de 2007, correcciones 24 de junio de 2008.

#### RESUMEN

La unidad morfológica y funcional de la glándula tiroides es el folículo, estructura ovoide cerrada, constituida por una capa de células cúbicas (tirocitos) que encierran un lumen lleno del coloide secretado por ellas. En cultivo, tanto la estructura como la función del folículo se pierden rápidamente en las primeras 24 horas. Sin embargo, si se cultivan folículos cerrados de tiroides de rata conservan la arquitectura folicular, la morfología del tirocito y la función hasta la síntesis de hormonas tiroides de manera similar a la glándula *in vivo*. En este trabajo describimos el aislamiento y cultivo de folículos porcinos cerrados y su análisis morfológico. Los folículos se aíslan por digestión enzimática y disociación mecánica del parénquima tiroideo, luego se cultivan sobre agarosa con y sin hormona tirotrópica o tirotropina (1 mU/ml, TSH).

El tejido de tiroides porcino obtenido tiene las mismas características de una glándula hipotiroidea *in vivo*, un epitelio casi plano, retículo endoplásmico rugoso (RER) exiguo, complejo de Golgi (CG), y microvellosidades escasas y cortas. Los folículos cultivados sin TSH conservan la forma ovoide y el coloide en su interior, y la misma ultra-estructura del tejido *in vivo*, RER y CG muy escasos, pero con el tiempo de cultivo aumenta la longitud de la microvellosidades y el espesor del epitelio. En presencia de TSH el epitelio se hipertrofia desde el primer día y las cavidades foliculares se reducen considerablemente. Se demuestra que folículos cerrados de tiroides durante ocho días (d) de cultivo conservan su morfología con y sin TSH. Además, estos responden al estímulo de TSH disminuyendo su cavidad folicular y aumentando el espesor del epitelio folicular.

**Palabras clave:** folículo tiroideo cerrado, cultivo tridimensional, hormona tirotrópica o tirotropina.

## ABSTRACT

The morphological and functional unit of the thyroid gland is the follicle - an ovoid closed-structure, constituted by a layer of cubical cells (thyrocytes) that lock up a full lumen of the colloid secreted by themselves. In culture, the structures as well as the function of the follicles are lost rapidly in the first 24 hours. However, if the rat thyroid follicles closed are seeded since the beginning of the culture, these conserve the follicular structure, the thyrocyte morphology and the function even as the thyroid hormone synthesis in a similar way to the gland *in vivo*. This work describes the isolation and the culture of closed swine thyroid follicles and its morphological analysis. The follicles are isolated by enzymatic and mechanic digestion of the thyroid, then they are cultured in agarose with and without thyrotropin (1 mU/ml, TSH).

The swine thyroid tissue obtained has the same characteristics of an *in vivo* hypothyroid gland, an almost flat epithelium, low quantity of Rough Endoplasmic Reticulum (RER) and Golgi complex (GC), short and very scarce microvillus. The isolated and closed follicles cultivated without TSH preserve the ovoid form and the colloid in the lumen, and the same ultrastructure of the thyroid tissue *in vivo*, RER and GC, but the length of the microvillus as well as the thickness of the epithelium were increased with the culture time. In the presence of TSH the thickness of the epithelium increases from the first day and the follicular cavities reduce considerably. The isolated and closed follicles preserve their morphology in the long term (8 days) of culture with and without the TSH. Besides, they responded to the stimulus of the TSH reducing the follicular cavity.

**Key words:** Closed thyroid follicle, three-dimensional culture, thyrotrophic hormone.

## 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. 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 son catabólicas (Werner e Ingbar, 1971; Wollman 1980). 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 (Gaitán, 1991). La unidad estructural y funcional de la tiroides es el folículo, constituido por una capa de células epiteliales cúbicas (tirocitos) alrededor de una solución viscosa, el coloide, secretado por los tirocitos (Werner e Ingbar, 1971; Nadler, 1974; Deneff *et al.*, 1980; Wollman, 1980). El tamaño de los folículos varía según la especie (50 a 150  $\mu\text{m}$  en rata y ratón; 150 a 500  $\mu\text{m}$  cerdo y humanos), edad y su localización: los más grandes al exterior de los lóbulos (Wollman, 1980).

La tiroides sintetiza y secreta las hormonas tiroideas: 3,5,3'-triyodotironina (T<sub>3</sub>) y 3,5,3',5'- tetrayodotironina (T<sub>4</sub>) que se realiza en tres procesos ligados a la morfo-

logía folicular y a la ultraestructura de los tirocitos (Giraud *et al.*, 1997; Spinel, 2002). La síntesis de la tiroglobulina (Tg, proteína precursora de las hormonas tiroideas) e inicio de su glicosilación N-osídica se realiza en el abundante RER que se encuentra alrededor del núcleo; la maduración y finalización de la glicosilación en el CG, y en vesículas de exocitosis, luego de lo cual es secretada al coloide. La captación de yoduro se efectúa en la membrana basal (de la Vieja *et al.*, 2000; Spitzweg *et al.*, 2000; Spinel, 2002), y pasa al coloide folicular a través de la membrana apical del tirocito (Kopp *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002). En la membrana apical la tiroperoxidasa une yoduro a la Tg (proceso conocido como organificación o PBI (*protein binding iodide*)) y luego la misma enzima forma yodotironinas en la Tg (Björkman y Ekhölm, 1984; Medeiros-Neto *et al.*, 1993; Vono-Toniolo *et al.*, 2004). Por último, la Tg es endocitada (Marino y McCluskey, 2000) y degradada en prelisosomas y lisosomas (Dubois *et al.*, 1991), liberando las hormonas a la circulación (van den Hove-Vandenbroucke *et al.*, 1980). La glándula tiroidea está bajo el control de la TSH y de la concentración de yoduro (Werner e Ingbar, 1971; Denef *et al.*, 1980; Wollman, 1980).

Uno de los mayores problemas del cultivo del tejido tiroideo es mantener la arquitectura folicular y la polaridad de los tirocitos, sin lo cual las propiedades funcionales se pierden (Fayet *et al.*, 1982) debido a la desaparición del lumen coloidal y de la polaridad del tirocito (Ambesi-Impimbato *et al.*, 1980; Chambard *et al.*, 1982; Kimura *et al.*, 2001; Eggo *et al.*, 2003). En cultivos primarios, la introducción de elementos de la matriz extracelular (colágeno) u artificiales (matrigel), y en presencia de TSH se logran formaciones denominadas pseudofolículos que algunos autores llaman folículos (Fayet *et al.*, 1971; Toda *et al.*, 1993; Curcio *et al.*, 1994; Kuliawat *et al.*, 1995; Mauchamp *et al.*, 1998; Pellerin *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2001; Toda *et al.*, 2002; Eggo *et al.*, 2003). Estas mismas estructuras pueden obtenerse a partir de la transfección de células madre embrionarias (Lin *et al.*, 2003), pero son de corta duración y no reproducen la organificación de la Tg ni la formación de hormonas T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>. 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 (Kuliawat *et al.*, 1995; Bernier-Valentin *et al.*, 2006). Han sido reportados métodos para cultivar folículos cerrados y abiertos (Chambard *et al.*, 1982; Nitsch y Wollman, 1980a; Nitsch y Wollman, 1980b; Herzog y Miller, 1981; Karlsson *et al.*, 1982; Gärtner *et al.*, 1985; Westermarck *et al.*, 1985), o de folículos recubiertos de colágeno (Takasu *et al.*, 1992; Massart *et al.*, 1997; Kraiem *et al.*, 2000; Cabezas *et al.*, 2005; Kusakabe *et al.*, 2006), pero no se describe la estructura, ni la función, como tampoco la relación entre estas dos.

Folículos de rata cerrados desde el inicio del cultivo con y sin tirotrópina (TSH) mantienen la polaridad del tirocito, la función normal de síntesis de tiroglobulina y de hormonas tiroideas (Spinel *et al.*, 1990), y reproducen el efecto Wolff-Chaikoff (Spinel y Yildiz, 1991) de manera homóloga a los folículos de una glándula *in vivo* (Wolff y Chaikoff, 1948; Denef, 1980; Many, 1982). Sin embargo, este modelo no es adecuado para extrapolar al humano, porque el metabolismo es 10 veces mayor y el diámetro promedio de los folículos es tres veces más pequeño. Por lo tanto, desarrollamos este estudio con una glándula tiroidea homóloga a la humana, como lo es la de cerdo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DE TIROIDES DE CERDO

Los lóbulos de tiroides de cerdo se obtienen en Frigoríficos Guadalupe, Bogotá-Colombia. Inmediatamente disecados del animal se lavan durante un minuto en alcohol al 70% y luego se colocan en medio de cultivo COON (Sigma F-6636; Ambesi-Impiomato *et al.* 1980) con 100  $\mu$ U/ml- $\mu$ g/ml penicilina-estreptomocina (Gibco 15140-122; 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 libre de tejido conectivo que son cortados en fragmentos pequeños de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>.

### DISOCIACIÓN Y CULTIVO

Los fragmentos obtenidos se reúnen en un frasco de base plana con medio COON + 400 U/ml de colagenasa tipo II (Sigma C-6885), se incuban a 37 °C con agitación continua de 160 osc/min. Cada 10 min se renueva el medio COON + colágenasa y se realiza cuatro veces sin pasar 1 h de acción enzimática. Al final de cada etapa de 10 min se realiza la disociación mecánica de los fragmentos con ayuda de pipetas de 10 y 5 ml cada una 10 veces evitando la formación de burbujas y turbulencia en el flujo; el material disociado se lava tres veces con COON + 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco 10437-028) 5 min a 50 g. Los sobrenadantes de cada lavado se eliminan y con ellos los desechos celulares y las células aisladas. Se reúne todo el material disociado de las cuatro digestiones de 10 min y se filtra a través de una malla con poros de 300  $\mu$ m de diámetro eliminando el tejido no disociado. Se realiza un control de viabilidad con azul Trypan 5% (Sigma T-8154) antes de iniciar el cultivo.

### CULTIVO DE FOLÍCULOS

Los folículos se cultivan en cajas de Petri de 35 y 75 mm en suspensión sobre agarosa tipo II al 1% (*agar-bearing marine algae type II*, Sigma A9918) en medio COON + 0,5% de SFB a 37 °C y una atmósfera 95% aire - 5% CO<sub>2</sub> y saturada en humedad. Se cambia el medio de cultivo a las 12 h de preincubación, a las 24 h y cada 3 días de cultivo por aspiración del medio con los folículos y lavado de la superficie de agarosa, se centrifuga a 50 g por 5 min y se resuspenden con nuevo medio COON. Se hicieron cultivos con y sin 1 mU/ml de TSH (donada por el Dr. Thierry Pourcher) desde el inicio del cultivo, y se realiza su seguimiento en microscopio invertido (MI).

### PROCESAMIENTO PARA EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO

El tejido completo se fija 2 h y los folículos 1 h con glutaraldehído 2,5% (Sigma G-5882) en tampón cacodilato 0,1 M (Sigma C-0125) a pH 7,4. Tres lavados de 10 min con tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4. Se continúa inmediatamente con la post-fijación 1 h con tetróxido de osmio 1% (OsO<sub>4</sub> Sigma O-0631) en tampón cacodilato 0,1 M. Tres lavados de 10 min con tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Como los folículos se encuentran en suspensión son centrifugados a 200 g por 5 min en cada etapa desde su fijación y deshidratación hasta su impregnación en resina. La deshidratación se realiza con concentraciones ascendentes de etanol (Carlo Erba 414577/002)

75%, 85%, 90% cada una de 5 min y alcohol absoluto cinco veces 5 min. La infiltración de la resina se realiza cuatro veces 15 min en óxido de propileno (Polysciences 00236), dos veces en una mezcla óxido de propileno/resina Epon 812 (Polysciences 08791) 1/1, la primera de 15 min y la segunda de 2 h. Se culmina con la inclusión de 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 semifinos de 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor, coloreados con azul de Toluidina 1% (Merck 15930) y se examinan en microscopio óptico (MO; Deneff *et al.*, 1980; Spinel *et al.*, 1990). Los cortes ultrafinos se montan en rejillas de cobre y se contrastan con acetato de uranilo (Merck 8473) y citrato de plomo (Polysciences 003787) y se examinan en microscopio electrónico (ME; Hayat, 1975).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### AISLAMIENTO DE FOLÍCULOS

El tejido de tiroides que se obtiene para el cultivo presenta folículos con epitelio plano de 8  $\mu\text{m}$  de espesor (Fig. 1A). Además, los tirocitos tienen exiguo RER, CG, escasos lisosomas y microvellosidades (Fig. 1B), aspecto similar al epitelio de los folículos de una glándula hipotiroidea (Many, 1982), al contrario al epitelio de 20  $\mu\text{m}$  de espesor en promedio, con abundante RER, CG y largas microvellosidades en los tirocitos de una glándula normal o eutiroidea (Deneff *et al.*, 1980; Nitsch y Wollman, 1980a; Nitsch y Wollman, 1980b; Karlsson *et al.*, 1982).

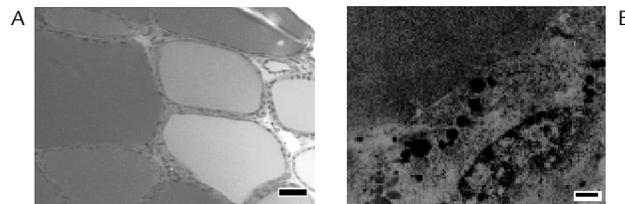


Figura 1. Tiroides de cerdo antes de iniciar la disociación del tejido. A. En microscopio óptico (MO) el parénquima de la tiroides presenta los folículos con células planas limitando el coloide y diferentes diámetros (Semi-fino, MO, barra 100  $\mu\text{m}$ ). B. Tirocito de un folículo de la imagen A en microscopio electrónico presenta en el polo apical escasas microvellosidades muy cortas en contacto con el coloide. El polo basal (barra) en contacto con la membrana basal o lámina basal. No se evidencia presencia de retículo endoplásmico rugoso, pero sí vesículas apicales densas a los electrones en la región apical de la células (Ultra-fino, ME, barra 1,5  $\mu\text{m}$ ).

Se realizaron ocho aislamientos y cultivos de los folículos de las glándulas tiroides de cerdo, obteniendo los mismos resultados que se describen a continuación. La digestión enzimática y mecánica realizadas para la obtención de folículos cerrados son muy controladas, evitando turbulencia al aspirar y expirar, de lo contrario se obtienen folículos abiertos. Se conoce que con una fuerte disociación mecánica de tiroides de rata se obtiene 20% de folículos cerrados, mientras que con una disociación controlada, esta proporción aumenta a un 70% (Spinel, 1987). Esto permite obtener folículos cerrados de epitelio plano y algunos abiertos como lo reportado para la tiroides de rata (Spinel *et al.*, 1990) o de ratón (Cabezas *et al.*, 2005) y humana (Orozco *et al.*, 1997), además de agrupaciones celulares y células aisladas (Deneff *et al.*, 1980; Nitsch

y Wollman 1980a; Nitsch y Wollman, 1980b; Karlsson *et al.*, 1982). Inmediatamente después de la disociación, los folículos cerrados con su coloide presentan una cavidad hialina y si pierden el coloide muestran un contenido heterogéneo al observarlos en microscopio invertido (MI). La viabilidad de las células en los folículos es 100%, solo se observan células no viables en la periferia de los folículos que corresponden a células endoteliales de los capilares.

Se realizó una pre-incubación de 12 h, tiempo necesario para que los folículos abiertos se desorganicen y sean eliminados con el cambio del medio, además permite que se resellen los folículos ligeramente abiertos (Denef *et al.*, 1980; Spinel *et al.*, 1990). El período de pre-incubación permite que un 20% de folículos abiertos se cierren. Para que los folículos de rata se conserven en el cultivo de 12 d se debe iniciar con 80% o más de folículos cerrados después de la pre-incubación (Spinel, 1987; Spinel *et al.*, 1990). Efectivamente, si se inicia con 60% o menos de folículos abiertos, no se conservan más allá de 48 h en cultivo.

#### CULTIVO DE FOLÍCULOS

Los folículos cultivados en ausencia de TSH conservan su arquitectura, en los primeros días de cultivo presentan el mismo aspecto del epitelio plano del tejido de origen. A partir del tercer día el epitelio deja de ser plano y aumenta observándose al día 8 un epitelio cúbico típico de una tiroide normal, ya sea que presenten coloide hialino o no (Fig. 2A). La estructura folicular se mantiene durante el cultivo (3 días) si se inicia con folículos cerrados (Cabezas *et al.*, 2005) y no requieren soporte de elementos de la matriz extracelular (Fayet *et al.*, 1971; Ambesi-Impiomato *et al.*, 1980; Takasu *et al.*, 1992; Massart *et al.*, 1997; Eggo *et al.*, 2003) ni TSH para mantener la cavidad folicular, como lo descrito en la mayoría de los cultivos de pseudofolículos, o de folículos reconstruidos a partir de monocapas, o de estructuras similares llamadas folículos (Fayet *et al.*, 1971; Takasu *et al.*, 1992; Toda *et al.*, 1993; Curcio *et al.*, 1994; Mauchamp *et al.*, 1998; Pellerin *et al.*, 1999; Bernier-Valentin *et al.*, 2006) demostrándose que si desde el inicio del cultivo se tienen folículos cerrados estos conservan su morfología con la correcta polaridad en cultivo de 8 días. Cuando los folículos no son cerrados la polaridad del tirocito se reinvierte en el 2 día con el aumento de suero en el medio (Herzog y Miller, 1981), esto no ocurre con los folículos cerrados de cerdo o ratón aún con 10% de suero (Cabezas *et al.*, 2005). En MI es muy difícil distinguir la cavidad de los folículos en presencia de TSH (Fig. 2B). Los folículos responden morfológicamente a la TSH como una glándula *in vivo* (Werner y Ingbar, 1971; Gaitán, 1991) aumentando el espesor del epitelio y disminuyendo notablemente las cavidades foliculares como fue descrito a partir del sexto día en el cultivo de rata (Spinel *et al.*, 1990).

El incremento del espesor del epitelio de 8  $\mu\text{m}$  en el 0 día (Fig. 3A) a 18  $\mu\text{m}$  en promedio a los 8 días (Fig. 3C) sin TSH va acompañado de modificaciones de la ultra-estructura de los tirocitos, se forman vesículas de aspecto heterogéneo similar a lisosomas en la región apical de los tirocitos desde el primer día (Fig. 3B), similar a lo reportados en el cultivo de folículos de rata (Spinel *et al.*, 1990), aumentan las microvellosidades y su longitud, y se logra evidenciar RER (Fig. 3D) comparado con los folículos del tejido inicial (Fig. 1B). Todos estos cambios se deben posiblemente a la eliminación de lo que induce *in vivo* a mantener una glándula hipotiroidea, además, puede verse favorecida

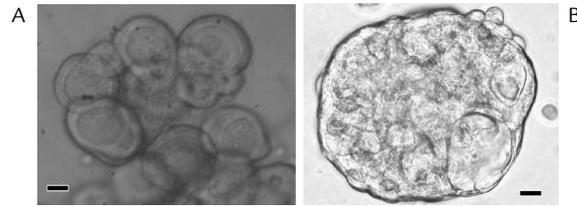


Figura 2. Aspecto de los folículos de tiroides de cerdo 8 días de cultivo sobre agarosa al observarlos al microscopio invertido (MI). A. Los folículos en ausencia de TSH conservan la cavidad folicular con el coloide de aspecto hialino. En estos folículos también se evidencia un epitelio cúbico y una arquitectura típica de folículos de la tiroides (MI, barra 40  $\mu$ m). B. Los folículos en presencia de 1 mU/ml pierden su estructura ovoide y es muy difícil distinguir las cavidades, pero persisten algunas con contenido de aspecto hialino (MI, barra 60  $\mu$ m).

por los nutrientes del medio COON descrito como el mejor para los cultivos de tejido tiroideo (Ambesi-Impimbato *et al.*, 1980), y al suero que tiene hormonas y factores en concentraciones desconocidas. Los folículos a partir del 4 día de cultivo son muy similares a los folículos de glándulas eutiroides (Denef *et al.*, 1980).

En ausencia de TSH, la polaridad celular persiste y las uniones celulares se conservan a nivel apical separando los dominios de membrana basolateral de la apical (Fig. 3D) como *in vivo*, siendo una característica descrita por diferentes autores como rasgo importante de polaridad (Alberts *et al.*, 2002; Eggo *et al.*, 2003), los folículos de cerdo a lo largo del cultivo (8 días) presentan estas características demostrando su cierre completo y la separación de la membrana apical de la basolateral como lo descrito tanto *in vivo* (Many, 1982) como *in vitro* para folículos reconstruidos con colágeno (Kusakabe *et al.*, 2006) o de folículos cerrados de rata donde además se demuestra que es indispensable que sean cerrados para conservar la función de captación y organización del yoduro hasta 12 días en ausencia de TSH (Spinel, 1987) y las proteínas que caracterizan los diferentes dominios de membrana (Bernier-Valentin *et al.*, 2006). El epitelio de los folículos cultivados con TSH (1 mU/ml) al inicio del cultivo (0 y 1 día)

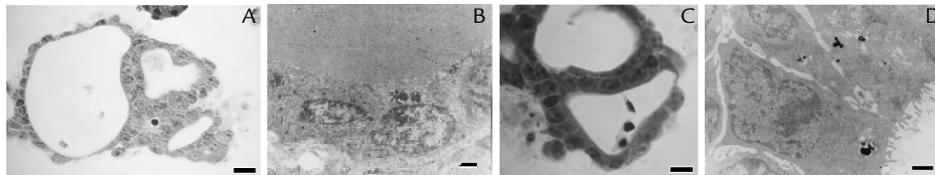


Figura 3. Aspecto de los folículos de tiroides de cerdo cultivados en ausencia de TSH. A. Aspecto de los folículos 0 d de cultivo (12 h de preincubación) al microscopio óptico presentan un epitelio plano y algunos casi cúbico, se conserva la arquitectura folicular (Semi-fino, MO, barra 20  $\mu$ m). B. Tirocito de un folículo de la imagen A en microscopio electrónico 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. Presenta la misma ultraestructura que un tirocito del tejido (Fig. 1B) y no se evidencia retículo endoplásmico rugoso (Ultra-fino, ME, barra 4  $\mu$ m). C. Aspecto de los folículos 8 d de cultivo al microscopio óptico presentan un epitelio cúbico y se conserva la arquitectura folicular (Semi-fino, MO, barra 20  $\mu$ m). D. Los tirocitos de un folículo de la imagen C en microscopio electrónico se observan que son un epitelio cúbico alto. El polo apical se encuentra con abundantes microvellosidades y en contacto con el coloide, persisten vesículas similares a lisosomas con contenido denso a los electrones en la región apical de los tirocitos (Ultra-fino, ME, barra 4  $\mu$ m).

presentan un epitelio menos plano (Fig. 4A), pero el espesor de las células es mayor comparado con los folículos sin TSH y se evidencia una mayor agregación de folículos. En el día 8, aunque en MI no se distinguen las cavidades, en MO se observan y los folículos presenta un epitelio de 30  $\mu\text{m}$  (Fig. 4C). Esto también ha sido descrito en cultivo de folículos de rata a partir del 9 día de cultivo con 0,1 mU/ml de TSH y del 6 día con 1 mU/ml, únicamente por autorradiografía del yoduro radiactivo se pone en evidencia las cavidades de estos folículos (Spinel *et al.*, 1990).

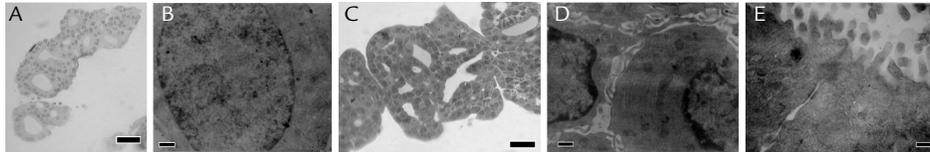


Figura 4. Aspecto de los folículos de tiroides de cerdo cultivados en presencia de 1 mU/ml de TSH. A. Aspecto de los folículos 0 días de cultivo (12 h de pre-incubación) al microscopio óptico presentan un epitelio cúbico, se preserva la arquitectura folicular y se evidencia la reagrupación de los folículos (Semi-fino, MO, barra 40  $\mu\text{m}$ ). 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 (Ultra-fino, ME, barra 1,9  $\mu\text{m}$ ). C. Aspecto de los folículos 8 d de cultivo al microscopio óptico presentan un epitelio cúbico muy alto, aunque conservan la arquitectura folicular se evidencia que ya no presentan una cavidad circular sino alargada típica de folículos estimulados con TSH (Semi-fino, MO, barra 60  $\mu\text{m}$ ). D. Los tirocitos de un folículo de la imagen C en microscopio electrónico, en D1 corte a través del polo basal de las células, se evidencia el abundante retículo endoplásmico rugoso alrededor del núcleo (Ultra-fino, ME, barra 32  $\mu\text{m}$ ). En D2 se observa un detalle de la unión entre dos células poniendo en evidencia un complejo de unión típico; 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 (Ultra-fino, ME, barra 100  $\mu\text{m}$ ).

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 desde el primer día de cultivo (Fig. 4B) y día 8 presentan una ultraestructura similar a una glándula hipertiroidea que responde al estímulo de la TSH con un RER muy abundante alrededor del núcleo (Fig. 4D1), el CG en la región perinuclear, largas y abundantes microvellosidades y cavidades folicular muy estrechas (Fig. 4D2). En folículos humanos cultivados con péptidos sintéticos derivados de la TSH se evidencia su unión en la membrana basal de los tirocitos (Orozco *et al.*, 1997), demostrando que el procedimiento de aislamiento no modifica los receptores de la TSH en la membrana basal de los tirocitos de los folículos. Ha sido descrito el aislamiento de folículos de cerdo (Gärtner *et al.*, 1985) que responden a iodolactonas (Langer *et al.*, 2003), pero no describen si estos folículos se mantienen más de 24 h y si en cultivo son cerrados o abiertos. La principal particularidad del cultivo descrito es su sencillez. Puede ser aplicada para obtener folículos de patologías de tejido humano cuyo epitelio sea plano para su estudio *in vitro* en condiciones controladas y homologable a la patología *in vivo*. En conclusión, los folículos deben aislarse cerrados, y así en cultivo conservan la arquitectura folicular, la ultraestructura del tirocito y responden a la TSH en cultivo a largo plazo de manera similar a una glándula tiroides *in vivo*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de: Colciencias (1101405 20161), Unidad de Investigación Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (8003029) y al programa ECOS-Nord/Colciencias/ICFES/ICETEX. Agradecemos al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, al Laboratorio de Biofísica del Centro Internacional de Física. Muy especiales agradecimientos a Frigoríficos Guadalupe; y a la *Unité Transporteurs en Imagerie et Radiothérapie Oncologique, Université de Nice Sophia-Antipolis*. A Thierry Pourcher y Marcela Camacho muchas gracias por la asesoría científica.

## BIBLIOGRAFÍA

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup> ed. New York and London: Garland Publishing Inc.; 2002.

AMBESI-IMPIOMBATO FS, PARKS LAM, COON HG. Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. Proc Nat Acad Sci USA. 1980;77(6):3455-3459.

BERNIER-VALENTIN F, TROUTTET-MASSON S, RABILLOUD R, SELMI-RUBY S, ROUSSET B. Three-Dimensional Organization of Thyroid Cells into Follicle Structures Is a Pivotal Factor in the Control of Sodium/Iodide Symporter Expression. Endocrinology. 2006;147(4):2035-2042.

BJÖRKMAN U, EKHÖLM R. Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in isolated porcine thyroid follicles. Endocrinology. 1984;115:392-398.

CABEZAS R, ONDO A, ARIAS J, SPINEL C. Isolation and culture of closed thyroid follicles in mouse, pig and man. Thyroid. 2005;15(S1):84-85.

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 monolayer. J Cell Biol. 1982;91:157-166.

CURCIO F, AMBESI-IMPIOMBATO FS, PERRELA G, COON HG. Long term culture and functional characterization of follicular cells from adult normal human thyroids. Proc Nat Acad Sci USA. 1994;91(19):9004-9008.

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.

DENEF J-F, BJÖRKMAN U, EKHÖLM R. Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles. J Ultrastruct Res. 1980;71:185-202.

DUBOIS B, COUVREUR M, SPINEL C, van den HOVE M-F, DENEF J-F. *Thyroglobulin (Tg) hydrolysis starts in prelisosomes*. En: Progress in Thyroid Research. Rotterdam: Gordon A., Gross J. y Hennemann G; 1991. p. 111.

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.

FAYET G, HOVSÉPIAN S, DICKSON JG, LISSITZK 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.

FAYET G, MICHEL-BECHET M, LISSITZKY S. Thyrotrophin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine-thyroid cells. 1. Ultrastructural studies. *Eur J Biochem.* 1971;24:100-111.

GAITÁN E, NELSON NC, POOLE GV. Endemic goiter and endemic thyroid disorders. *World J Surg.* 1991;15(2):205-215.

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.

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.

HAYAT MA. Positive staining for electron microscopy. 1st ed. Cincinnati, Toronto, London: Wan Nostrand Reinhold Co.; 1975. p. 57-125.

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.

KARLSSON F, WESTERMARK K, WESTERMARK B. Functional properties of porcine-thyroid follicles in suspension. *Mol Cell Endocrinol.* 1982;28:99-112.

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.

KOPP P. Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid.* 1999;9(1):65-69.

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.

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.

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.

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.

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.

MANY M-C. L'involution de la hyperplasie thyroïdienne chez la souris C3H. [Tesis de Doctorado]. Bruselas: Univ. Católica de Lovaina: 1982.

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.

MASSART C, GIBASSIER J, RAOUL ML, LE GALL F, LANCIEN G, GENETET N, *et al.* Action of peripheral or intrathyroidal lymphocytes on autologous thyrocytes cultured in follicles in collagen gel. *J Mol Endocrinol.* 1997;18:137-145.

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.

MEDEIROS-NETO G, TARGOVNIK H, VASSART G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr Rev.* 1993;14(2):165-183.

NADLER N.J. Anatomical features. En: *Handbook of physiology.* Edi. Greep R.O. and Aswood E.B. Washington, D.C. Amer Physiol Soc. 1974;3:39-54.

NITSCH L, WOLLMAN SH. Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1980a;77(1):472-476.

NITSCH L, WOLLMAN SH. Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1980b;77(5):2743-2747.

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.

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.

RODRÍGUEZ AM, PERRON B, LACROIX L, CAILLOU B, LEBLANC G, *et al.* Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3500-3503.

SPINEL C. Aspects morphologiques et fonctionnels des follicules thyroïdiens en culture. [Tesis de Doctorado]. Bruselas: Univ. Católica de Lovaina: 1987.

SPINEL C, COLIN I, van den HOVE M-F, DENEJF J-F. Correlated morphological and functional study of isolated rat thyroid follicles in suspension culture. *Mol Cell Endocrinol.* 1990;71:141-153.

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.

SPINEL C. *Biología molecular de la célula eucariótica animal.* 1era ed. Medellín: Biogénesis Fondo Editorial; 2002. p.201-214.

SPITZWEG C, HEUFEIDER A, MORRIS J. Thyroid iodide transport. *Thyroid.* 2000;10(4):321-330.

TAKASU N, OHNO S, KOMIYA I, YAMADA T. Requeriments 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.

TODA S, WATANABE K, YOKOI F, MATSUMURA S, SUZUKI K, *et al.* A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term. *Biochem Biophys Res Comun.* 2002;294:906-911.

60 Artículo - *Estudio morfológico del cultivo a largo plazo de folículos aislados y cerrados de tiroides de cerdo.*  
Herrera, et al.

---

TODA S, YONEMITSU N, MINAMI Y, SUGIHARA H. Plural cells organize thyroid follicles through aggregation and linkage in collagen gel culture of porcine follicle cells. *Endocrinology*. 1993;133(2):914-920.

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.

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.

WERNER CS, INGBAR HS. *The thyroid*. 3th ed. New York: Harper & Row; 1971. p.5-40.

WESTERMARK K, KARLSSON FE, WESTERMARK B. Thyrotropin modulates EGF receptor function in porcine thyroid follicles cells. *Mol Cell Endocrinol* 1985;40:17-23.

WOLFF J, CHAIKOFF IL. Plasma inorganic iodide, a chemical regulator of normal thyroid function. *Endocrinology*. 1948;42:468-471.

WOLLMAN SH. Structure of the thyroid gland. En: Visscher M. editor. *The thyroid gland*. New York: Raven Press; 1980; p. 9-40.