



TESE DE DOUTORAMENTO

**CÉLULAS MADRE EN LA
TIROIDES POSTNATAL:
IDENTIFICACIÓN Y FUNCIÓN**

Fernando Oroz Gonjar

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

ANO 2020



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE
CÉLULAS MADRE EN LA TIROIDES POSTNATAL:
IDENTIFICACIÓN Y FUNCIÓN

D. Fernando Oroz Gonjar

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela., 21 de junio de 2020

Asdo...





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

CÉLULAS MADRE EN LA TIROIDES POSTNATAL: IDENTIFICACIÓN Y FUNCIÓN

D./Dna. Clara Álvarez Villamarín

INFORMA/N:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna. **Fernando Oroz Gonjar**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 21 de junio de 2020

Asdo.....



DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

El doctorando declara que no tiene ningún conflicto de interés.

Este estudio ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación y Fondo Social Europeo, Proyectos BFU2013-46109-R y BFU2016-76973-R FEDER Titulado: Implicaciones fisiopatológicas de los mecanismos de recambio y proliferación, benigna y maligna, de las células foliculares tiroideas humanas y de glándulas endocrinas, siendo investigador principal la Prof. Clara V Álvarez.

El doctorando Fernando Oroz Gonjar ha sido financiado por una beca F.P.I. adscrita al proyecto BFU2013-46109-R FEDER, con el código BES-2014-071031





AGRADECIMIENTOS





CÉLULAS MADRE EN LA TIROIDES POSTNATAL: IDENTIFICACIÓN Y FUNCIÓN

La glándula tiroides se organiza en folículos, con un polo basal hacia los capilares y un polo apical hacia el coloide lleno de tiroglobulina de donde se sintetizan las hormonas tiroideas. En los últimos años, se ha demostrado la presencia de células madre postnatales en casi todos los órganos endocrinos. Una excepción ha sido la tiroides, donde se han propuesto, pero donde hasta ahora no se habían localizado ni estudiado en cuanto a sus marcadores ni su funcionalidad. El factor de transcripción Sox2 se expresa en todas las células madre postnatales descubiertas. El objetivo de esta tesis ha sido caracterizar la población de células Sox2+ de la tiroides de ratones macho y hembra, identificando marcadores co-expresados, y demostrar su funcionalidad en modelos que exijan hiperplasia celular. Descubrimos que la población Sox2+ es una población epitelial de célula única o en pequeños grupos en la periferia de los folículos, y que se distribuye desigualmente a lo largo de la glándula. Las células Sox2+ co-expresan factores de transcripción de epitelio folicular pero no expresan tiroglobulina. Experimentos *in vitro* en condiciones para células madre demostraron esferas con expresión de Sox2 y a las que se indujo diferenciación expresando tiroglobulina. Para demostrar inequívocamente que las Sox2+ son células madre de la tiroides, utilizamos un modelo animal de rastreo celular a lo largo del tiempo, cruzando el modelo Sox2-CRE-ERT2 con el loxP-EGFP, e inducción de recombinación por Tamoxifen. Observamos la renovación celular de la tiroides adulta a partir de población Sox2+EGFP+ neonatal, y que en modelos de hipotiroidismo hay reclutamiento y diferenciación de las Sox2+-EGFP+ tanto *in vivo* como en experimentos *in vitro*.

En conjunto, los datos identifican la población Sox2+ como células madre de tiroides con implicaciones fisiopatológicas importantes para el futuro.

Palabras clave: células madre, epitelio folicular, rastreo celular

CÉLULAS NAI NA TIROIDE POSTNATAL: IDENTIFICACIÓN E FUNCIÓN

A glándula tiroide organízase en folículos, con un polo basal orientado cara os capilares e un polo apical cara o coloide cheo de tiroglobulina de onde se sintetizan as hormonas tiroideas. Nos últimos anos, demostrouse a presenza de células nai postnatales en case todos os órganos endócrinos. Unha excepción foi a tiroide, onde se propuxeron, pero na que ata agora no se localizaran ni estudaran en canto aos seus marcadores nin a súa funcionalidade. O factor de transcrición Sox2 exprésase en tódalas células nai postnatales descubertas. O obxectivo desta tese foi o de caracterizar a poboación de células Sox2+ da tiroide de ratos macho e femia, identificando marcadores co-expresados, e demostrar a súa funcionalidade en modelos que esixan hiperplasia celular. Descubrimos que a poboación Sox2+ é unha poboación epitelial de célula única ou en pequenos grupos na periferia dos folículos, e que está distribuído desigualmente por toda a glándula. As células Sox2+ co-expresan factores de transcrición de epitelio folicular pero non expresan tiroglobulina. Experimentos *in vitro* en condicións para células nai demostraron esferas con expresión de Sox2 e ás que se lles induciu diferenciación expresando tiroglobulina. Para demostrar inequivocamente que as Sox2+ son células nai da tiroides, empregamos un modelo animal de rastrexo celular ao longo do tempo, cruzando o modelo Sox2-CRE-ERT2 co LoxP-EGFP, e indución de recombinación por Tamoxifen. Observamos a renovación celular da tiroide adulta a partir da poboación Sox2+EGFP+ neonatal, e que en modelos de hipotiroidismo hai recrutamento e diferenciación das Sox2+-EGFP+ tanto *in vivo* como en experimentos *in vitro*.

En conxunto, os datos identifican a poboación Sox2+ como células nai de tiroide con implicacións fisiopatolóxicas importantes para o futuro.

Palabras chave: células nai, epitelio folicular, rastreo celular

STEM CELLS IN THE POSTNATAL THYROID: IDENTIFICATION AND FUNCTION

The thyroid gland is made of hollow thyroid follicles with epithelial cells showing cellular polarity: a basal pole leaning on the basal membrane surrounded by vascularized stroma and an apical pole facing the colloid where the thyroid hormones are synthesized. During the last years, existence of postnatal stem cells was demonstrated in almost all endocrine tissues. However, within the thyroid, although they have been proposed, they have not yet been demonstrated nor their markers or their function. The transcription factor Sox2 is expressed in all described postnatal stem cells. Therefore, the main objective of this project was to characterize Sox2 positive cell population in the thyroid of male and female mice through the identification of co-expressed markers. Furthermore, we wanted to demonstrate its ability to differentiate tracing its function in models of induction of thyroid follicular hyperplasia. We were able to demonstrate that the Sox2⁺ population was located among follicular epithelium or at the periphery of the follicles near this same follicular epithelium, with a global distribution around the thyroid. We also found that Sox2⁺ cells co-expressed transcription factors which are specific of follicular epithelium but do not express thyroglobulin. Moreover, *in vitro* cultures of mouse thyroid single cells led to the formation of Sox2 expressing spheres able to differentiate into thyroglobulin. To demonstrate that Sox2 were thyroid stem cells, we have generated a specific tamoxifen inducible mice model, crossing Sox2-CRE-ERT2 mice with loxP-EGFP ones, to be able to trace Sox2⁺ proliferation and its possible conversion into follicular epithelium over time. We have observed that Sox2⁺EGFP⁺ neonatal cells were able to form new functional thyroid cells, and that both *in vivo* models of hypothyroidism or *in vitro*, Sox2⁺-EGFP⁺ cells were recruited and functionally differentiated into follicular epithelium.

In conclusion of this work, we were able to identify thyroid Sox2⁺ cells as a specific stem cell population. Our results, although in rodent models, could have future pathophysiological relevance.

Key Words: stem cells, follicular epithelium, tracing.



ÍNDICE





ÍNDICE.....	15
ABREVIATURAS	22
INTRODUCCIÓN.....	28
1 LA GLÁNDULA TIROIDES	30
1.1 ANATOMÍA	30
1.2 EL FENOTIPO TIROIDEO.....	32
1.3 ACCIONES Y METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	32
1.4 SÍNTESIS DE HORMONAS TIROIDEAS	34
1.5 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES.....	36
2 PATOLOGÍAS TIROIDIAS POR HIPERPLASIA BENIGNA: EL BOCIO.....	39
2.1 BREVE RESUMEN DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA TIROIDES	39
2.2 BOCIO MULTINODULAR (MNG).....	41
2.3 EL HIPOTIROIDISMO. MODELOS ANIMALES DE HIPOTIROIDISMO PRIMARIO	42
3 CÉLULAS MADRE ADULTAS (ASC)	44
3.1 NICHOS DE CÉLULAS MADRE	44
3.2 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS ASCs.....	46
3.3 MARCADORES COMUNES EN ASCs	48
3.4 ASCs EN ÓRGANOS ENDOCRINOS	49
3.5 ASCs EN TIROIDES.....	51
3.6 <i>CANCER STEM CELLS</i> (CSCs) EN TIROIDES	52
4 SOX2.....	53
4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	53
4.2 FUNCIONES DE SOX2 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE DIFERENTES TEJIDOS....	54
4.3 SOX2 ES ESENCIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD “STEM” DE LAS CÉLULAS.....	54
4.4 REGULACIÓN DE SOX2.....	56
4.5 MOLÉCULAS REGULADAS MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE SOX2	56
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	65
1.1 ASPECTOS ÉTICOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	65
1.2 MODELO DE RATÓN B6;129S-SOX2 ^{TM1(CRE/ERT2)HOCH/J} Y B6-129Gt(ROSA)26Sor ^{TM2SHO/J}	65
1.3 GENOTIPADO DE RATONES	67
1.3.1 Genotipado para B6;129S-Sox2 ^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}	67
1.3.2 Genotipado para Ratón B6-129Gt(ROSA)26Sor ^{tm2Sho/J}	68
1.4 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFENO.....	69
1.5 ADMINISTRACIÓN DE EDU (5-ETINIL-2'-DEOXIURIDINA)	70
1.6 EXTRACCIÓN DE SUERO Y MEDICIÓN DE PESOS	70
1.7 HIPOTIROIDISMO MEDIADO POR PTU (<i>PROPYLTHIOURACIL</i>).....	70
1.8 PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS Y TEJIDOS	71

1.8.1 Preparación de las muestras para inmunofluorescencia.....	72
1.8.2 Preparación de muestras para el análisis del ARN.	72
1.9 MODELO DE DESARROLLO DE LA TIROIDES	73
1.10 MODELO DE HEMITIROIDECTOMÍA PARCIAL	73
2 CULTIVO CELULAR	74
2.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS FOLICULARES TIROIDEAS HUMANAS.....	74
2.1.1 Aspectos éticos.....	74
2.1.2 Cultivos celulares humanos	74
2.1.3 Cultivos celulares de tejido de tiroides de ratón. Formación de tiroferas e inmunofluorescencia aplicada a las mismas.	75
3 ESTUDIO DE PROTEÍNAS.....	77
3.1 WESTERN BLOT	77
3.1.1 Extracción de proteína	77
3.1.1.1 Método de extracción de proteína con SDS y tampón de Shlessinger	77
3.1.1.2 Método de extracción de proteína de tejido de ratón.....	78
3.1.2 Cuantificación de la concentración de proteína	78
3.1.3 Electroforesis y transferencia de proteínas	79
3.1.4 Inmunodetección.....	80
3.2 INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	82
3.2.1 Inmunofluorescencia en tejidos de tiroides de ratón.....	82
3.2.2 Inmunofluorescencia en cultivo.....	83
3.2.3 Inmunohistoquímica en tejido de tiroides de ratón.....	84
3.2.4 Inmunofluorescencia con el uso de TSAs (<i>Tyramide Signal Amplification</i>)... ..	85
3.2.5 ELISA	85
3.3 MICROSCOPIA	86
3.3.1 Microscopía óptica.....	86
3.3.2 Microscopía confocal.....	86
3.3.3 Microscopía Light-Sheet.....	86
4 ESTUDIOS DE ADN	88
4.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO/TEJIDO.....	88
4.2 GENOTIPADO DE RATONES	88
4.2.1 Extracción de ADN.....	88
5 ESTUDIOS DE ARN	88
5.1 EXTRACCIÓN ARN.....	88
5.2 SÍNTESIS DE ADNc A PARTIR DE ARN MEDIANTE RETROTRANSCRIPCIÓN.	89
5.3 PCR CUANTITATIVA.....	89
6 ANALISIS ESTADÍSTICO	90
6.1 TEST PARAMÉTRICOS	91
6.2 TEST NO PARAMÉTRICOS	91
RESULTADOS	93
1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN SOX2 EN RATONES NORMALES	95
1.1 EXPRESIÓN DE SOX2 A NIVEL DE ARN.	95

1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE SOX2	96
1.2.1 Expresión de Sox2 mediante Western-Blot en ratones	97
1.2.2 Estandarización de la tinción de secciones de tejido de ratón hembra de 90 días por IHQ con diferentes anticuerpos de Sox2.....	97
1.2.3 Colocalización de diferentes marcadores en las células Sox2 positivas en ratones hembras de 90 días.	99
1.3 DISTRIBUCIÓN POSICIONAL DE LA POBLACIÓN SOX2 EN LA GLÁNDULA TIROIDES COMPLETA	110
1.4 DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN SOX2 A TRAVÉS DE MICROSCOPIA <i>LIGHT-SHEET</i>	111
2 MODELOS DE RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE EN LA TIROIDES: TRACEADO DE LA POBLACIÓN SOX2 EN EL MODELO SOX2-CRE-ERT2/LOXP-EGFP.....	113
2.1 CARACTERIZACIÓN EN LA TIROIDES DEL MODELO <i>SOX2-CRE-ERT2/LOXP-EGFP</i> TRAS TAMOXIFEN (TAM) A TIEMPO CORTO O LARGO.	113
2.1.1 Inmunohistoquímica de SOX2 con tamoxifen a lo largo del tiempo frente a controles en la tráquea	113
2.1.2 Inmunofluorescencia para GFP en la tráquea y en la tiroides tras tamoxifen en ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP.....	117
2.2 MODELO DE RECLUTAMIENTO INDUCIDO POR HIPOTIROIDISMO FARMACOLÓGICO..	117
2.2.1 El hipotiroidismo inducido en ratones hembra mediante PTU disminuye la cantidad de T4 libre en sangre alcanzando niveles de hipotiroidismo moderado.	118
2.2.2 Aumento en la expresión del ARN de SOX2 en ratones hipotiroideos de 3, 6 y 12 días.....	119
2.2.3 El hipotiroidismo de 12 días en ratones hembra C57BL/6 aumenta la expresión de la proteína SOX2	121
2.2.4 Expansión de la población de células SOX2 en ratones hipotiroideos de 12 días.	122
2.3 TRAZAMIENTO DE CÉLULAS SOX2 EN RATONES HIPOTIROIDEOS FRENTE A CONTROLES EN EL MODELO <i>B6;129S-SOX2^{TM1(CRE/ERT2)HOCH/J} ↔ RATÓN B6-129GT(ROSA)26SOR^{TM2SHO/J} (SOX2-CRE-ERT2/LOXP-EGFP)</i>	124
3 HEMITIROIDECTOMÍA PARCIAL.....	128
4 MODELOS DE DESARROLLO DE LA GLÁNDULA TIROIDES.....	138
5 GENERACIÓN DE TIROSFERAS	146
5.1 GENERACIÓN DE TIROSFERAS PRIMARIAS	146
5.2 GENERACIÓN DE TIROSFERAS SECUNDARIAS Y TERCARIAS.....	148
5.3 INMUNOFUORESCENCIA EN TIROSFERAS	149
5.4 DIFERENCIACIÓN TIROSFERAS	149
6 EXPRESIÓN DE SOX2 EN TEJIDO Y CULTIVO CELULAR DE TIROIDES HUMANO.....	152
6.1 EXPRESIÓN DE SOX2 TANTO EN CULTIVOS CELULARES DE TIROIDES NORMAL (T-NT) Y BOCIOS MULTINODULARES (T-MNG) COMO EN SUS PROPIOS TEJIDOS A NIVEL DE ARN MENSAJERO, PERO NO HAY DIFERENCIAS ENTRE ELLOS.....	152

6.2 AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SOX2 EN CULTIVOS HUMANOS DE BOCIO MULTINODULAR (T-MNG), COMPARADO CON TIROIDES NORMAL (T-NT).....	154
6.2.1 Estudio de la expresión de proteína Sox2 en cultivos primarios humanos....	154
6.2.1 Estudio de la expresión de proteína Sox2 en cultivos primarios de tiroides humano.....	155
DISCUSIÓN	161
CONCLUSIONES.....	173
LISTA DE FIGURAS.....	177
BIBLIOGRAFÍA.....	182





ABREVIATURAS





- ABCG2:** transportador de membrana *ATP-binding cassette transporter G2*.
- ASCs:** *Adult Stem Cells*. Células madre adultas.
- ATC:** *Undifferentiated or Anaplastic Thyroid Carcinoma*. Carcinoma Indiferenciado de Tiroides
- BMP** *Bone Morphogenetic Protein*.
- BrdU** Bromo-deoxiuridina.
- BSA:** *Bovine Seric Albumin*. Albúmina de suero bovino.
- D1/D2/D3:** Desyodasa 1, 2 y 3, respectivamente.
- DPPA4:** *Developmental pluripotency Associated 4*.
- DTC:** *Differentiated Thyroid Carcinoma*. Carcinoma diferenciado de tiroides.
- DUOX:** Dual Oxydase.
- Edu:** 5-etinil-2'-deoxiuridina.
- EGFP:** *Enhanced Green Fluorescent Protein*.
- EGFR:** *Epidermal grow factor receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- ESCs:** *Embryonic Stem Cells*. Células madre embrionarias.
- FGSC:** *Female germline stem cell*. Célula madre germinal femenina.
- GFAP:** *Glial Fibrillary Acidic Protein*. Proteína Ácida Fibrilar Glial.
- GFR α 2:** *GDNF Family Receptor α -2*.
- Gli1:** Zinc finger protein Gli1.
- GMO:** *Genetically Modified Organism*. Organismo Genéticamente modificado.
- HMG:** *High-movility group*. Grupo de alta movilidad. Dominio del ADN capaz de moverse rápidamente para regular el genoma.
- HFSCs:** *Hair follicle stem cells*. Células madre del folículo piloso.
- HNF4 α :** *Hepatocyte nuclear factor α 4*. Factor nuclear hepático α 4.
- HSCs:** Hematopoietic Stem Cells. Células Madre Hematopoyéticas.
- IAP:** *Inhibitor of apoptosis*.
- iPSs:** *Induced Pluripotent Stem Cells*. Células Madre Pluripotentes Inducidas.
- ISCs:** Intestinal Stem Cells. Células Madre Intestinales.
- Klf4:** *Kruppel-like factor 4*.
- LHX2:** *LIM homebox 2*. Regulador transcripcional.
- MCT8/MCT10:** *Monocarboxylate Transporter*. Transportadores de hormonas tiroideas.

- MIT/DIT:** Mono-yodotironina / Di-yodotironina.
- MNG:** *Multinodular Goiter*. Bocio Multinodular.
- NIS:** *Na⁺/I Symporter*. Simportador basal de yodo.
- NPY:** *Neuropeptide Y*.
- NSCs:** Neural Stem Cells.
- OATP1C1:** Organic Anion Transporter Polypeptide. Polipéptido Transportador de Aniones Orgánicos.
- Oct4/POU5F1:** *Octamer-binding Transcription Factor 4*.
- OSCs:** *Oogonial Stem Cells*.
- PAX8:** *Paired Box Gene-8 Protein*. Factor de transcripción determinante de la tiroides.
- PCR:** Polymerase Chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa.
- PDTC:** *Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma*. Carcinoma de Tiroides Pobremente Diferenciado.
- Prop1:** *Prophet of Pit1*. Factor de transcripción determinante de la hipófisis.
- PTH:** Parathyroid Hormone. Hormona Paratiroidea.
- PTU:** Propiltiouracilo
- SCs:** *Satellite Cells*. Células satélite musculares.
- SDS:** *Sodium Dodecyl Sulfate*. Dodecilsulfato sódico.
- Sf1:** *Steroidogenic factor 1*.
- SHH:** *Sonic Hedgehog*.
- Sox2:** *SRY-box 2*.
- Sry:** *Sex-determining región Y*. Región determinante del sexo Y.
- SVZ/SGZ:** *Subventricular/Subgranular Zone*. Zona subventricular y Zona Subgranular. Regiones cerebrales donde se localizan células madre adultas neuronales.
- TAM:** Tamoxifeno.
- T3/T4:** Triyodotironina / Tetrayodotironina (Tiroxina).
- TBG:** Thyroxine-binding Globulin, proteína transportadora de hormonas tiroideas.
- TCF4:** factor de transcripción *T-cell factor 4*.
- Tg:** Tiroglobulina.
- TPO:** Tiroperoxidasa
- TRH:** *Thyrotropin-Release Hormone*. Hormona liberadora de Tirotropina.
- TSH:** *Thyroid-Stimulating Hormone*. Hormona estimuladora de Tiroides.

TSHR: Receptor de TSH.

TTF1/NKX2.1: Thyroid Transcription Factor-1, proteína del gen *NKX2.1*

TTF2/FOXE2: Thyroid Transcription Factor-2, proteína del gen *FOXE2*

TTR: Transtirretina.

El resto de las abreviaturas son de uso común o bien se detallan en el texto





INTRODUCCIÓN





1 LA GLÁNDULA TIROIDES

1.1 ANATOMÍA

La glándula tiroides, encargada de secretar las hormonas tiroideas, es un órgano endocrino procedente del endodermo embrionario situado superficialmente en el cuello delante de la laringe y por encima de la tráquea. Su forma característica es similar a unas “alas de mariposa” o a un escudo, de donde deriva su nombre desde el griego antiguo¹. Los dos lóbulos laterales que la conforman a ambos lados del comienzo de la tráquea llegan lateralmente hasta el cartílago tiroides. Estos lóbulos se unen entre sí en la parte anterior, por delante del cartílago cricoides, en una estructura llamada istmo. Del istmo parte hacia el cartílago tiroides un tercer lóbulo central fino y alargado llamado lóbulo piramidal que es un residuo del conducto tirogloso embrionario, origen de la glándula tiroides¹.

En su parte posterior se localizan cuatro glándulas esféricas y pequeñas ajenas al origen embrionario y función de la glándula tiroides, dos por cada lóbulo, las glándulas paratiroides, cuya función es la secreción de la hormona paratiroidea (PTH), esencial para la regulación de la calcemia.

Toda la glándula se encuentra recubierta de una capa de tejido conjuntivo denso que forma una cápsula a su alrededor que ayuda a mantener su estructura. Desde dicha cápsula emergen proyecciones irregulares de colágeno hacia el interior de la tiroides formando ciertos septos y dividiendo irregularmente la glándula en unidades más pequeñas, en cierto modo como lobulillos parcialmente¹. Cada una de estas estructuras está compuesta, a su vez, por una gran cantidad de folículos tiroideos, la unidad funcional principal de la glándula. Al ser un órgano endocrino y, por tanto, dependiente del aporte vascular para la liberación de sus hormonas, se encuentra muy irrigado tanto por vasos sanguíneos como por vasos linfáticos y también está muy innervado por fibras del sistema nervioso. Entre los folículos y como células basales únicas dentro de ellos o en grupos entre folículos podemos encontrar otro tipo celular, las llamadas células C o medulares que producen y secretan calcitonina, que conforman aproximadamente el 1% de la población tiroidea total¹.

El folículo tiroideo, unidad funcional de la tiroides^{1,2}, es una estructura esférica hueca compuesta por una sola capa de células epiteliales íntimamente unidas llamadas células foliculares¹. Todas estas células se encuentran polarizadas, lo que quiere decir que la distribución de las proteínas en su membrana plasmática se orientan en dos grupos: el polo basal que contacta con la membrana basal que descansa sobre el estroma y contiene los capilares; y el polo apical que se orienta hacia el interior del folículo que contiene un material llamado coloide (imagen 1). Esta polarización es imprescindible para que dichas células puedan cumplir su principal función: la síntesis y almacenamiento de hormonas tiroideas (T3/Triyodotironina y T4/Tetrayodotironina/Tiroxina)^{1,3} (imagen 1). La principal función de estas hormonas es el control del metabolismo celular, tanto de lípidos como de proteínas e hidratos de carbono, y por tanto del metabolismo basal corporal además de la sensibilidad al sistema nervioso autónomo simpático. Además, en el desarrollo embrionario, son responsables de la proliferación y maduración del SNC (sistema nervioso central).

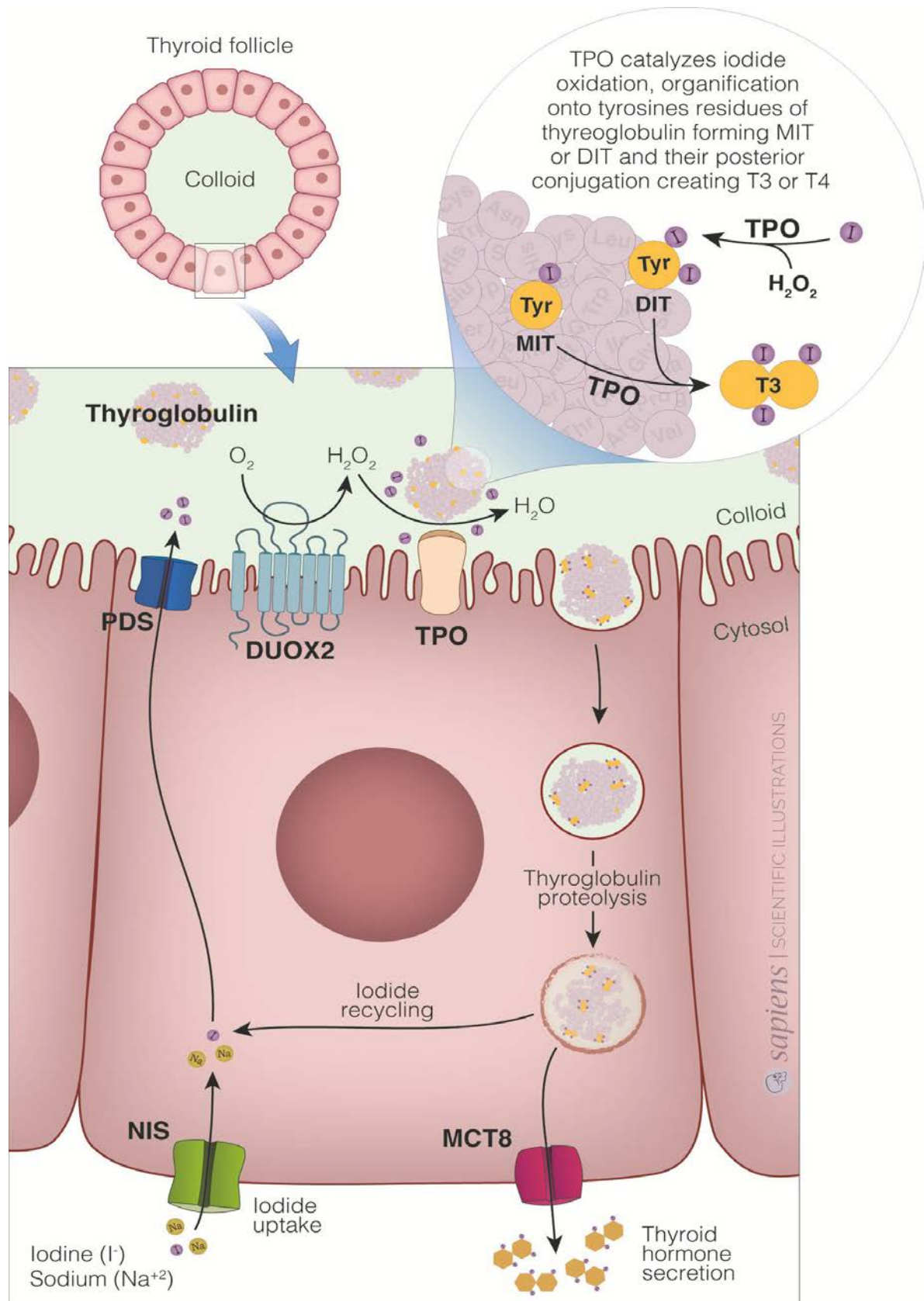


Imagen 1. Esquema de la formación de hormonas tiroideas dentro del coloide y su posterior liberación al torrente sanguíneo. Reproducido de Ortega-Carvalho *et al.*, 2016⁴. Copyright © 2016 American Physiological Society.

1.2 EL FENOTIPO TIROIDEO

Para la formación de las hormonas tiroideas, T4 o tiroxina y T3 o triyodotironina, son necesarios dos componentes principales: la tiroglobulina (Tg), proteína sintetizada por las células foliculares y secretada por el polo apical hacia la luz del folículo, y el yodo (I), procedente del torrente sanguíneo en forma de ion yoduro (I⁻) y captado por estas células para concentrarlo también en la luz folicular (imagen 1). Además de dichas moléculas, existen factores de transcripción igualmente necesarios para el correcto desarrollo y funcionamiento de la glándula.

NKX2.1 (cuya proteína es clásicamente llamada factor de transcripción de tiroides 1 o TTF1) es un factor homeobox que se ha descrito como esencial para que la estructura de la glándula se desarrolle correctamente después de la especificación inicial en el endodermo, así como para su maduración^{5,6,7}. El ratón *knockout* para TTF1 no desarrolla ni el epitelio folicular ni presenta células C, siendo imprescindible para ambas.

PAX8 (*Paired box gene-8 protein*) es otro factor de transcripción esencial para la diferenciación de las células tiroideas perteneciente a la familia *paired-box* que se expresa en el epitelio folicular⁸. Se ha demostrado que la falta de dicho gen impide el desarrollo de las células que forman el epitelio de los folículos tiroideos pero no afecta a las células de calcitonina⁹.

FOXE1 (*Forhead box protein E1*)/TTF2, es un factor de la familia *forkhead* que se expresa desde el inicio del desarrollo de la glándula¹⁰. Parece esencial en la especificación inicial de la glándula tiroidea en el endodermo, ya que el ratón *knockout* presenta agenesia de tiroides y paladar hendido¹¹.

Estos tres factores de transcripción no son específicos de tejido tiroideo, pero su co-expresión simultánea en dicho tejido hace que la célula pueda diferenciarse en célula folicular de tiroides y pueda ejercer su función como productora y liberadora de hormonas tiroideas.

Otras proteínas y enzimas también juegan un papel esencial para que el tirocito funcione correctamente. Los dos co-transportadores de yoduro, el simportador de Na⁺/I⁻ llamado NIS o el antiportador de Cl⁻/I⁻ Pendrina se requieren para el paso del yoduro al interior de la célula y después al coloide desde el torrente sanguíneo. (imagen 1). El complejo enzimático de la Tiroperoxidasa (TPO) junto a DUOX2 organifican el yoduro y hacen que dicho yodo se incorpore a la molécula de tiroglobulina en la luz del coloide. Por último, cabe destacar también el receptor de la hormona estimuladora de la tiroides (TSHR), principal regulador tanto de la síntesis, activando la expresión de todas estas proteínas del fenotipo, como de la secreción de las hormonas, además de ser responsable del trofismo del epitelio en cuanto a número de células.

1.3 ACCIONES Y METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas regulan procesos metabólicos esenciales en el crecimiento y desarrollo; en la vida adulta, son las principales reguladoras del metabolismo basal¹² (imagen 2)¹⁵. Está muy bien establecido que los niveles de hormonas tiroideas se encuentran directamente relacionadas con la masa corporal y el gasto energético¹³. Las hormonas tiroideas regulan procesos como el metabolismo del colesterol y los hidratos de carbono, activan el proceso de β-oxidación de ácidos grasos y promueven la termogénesis. Son esenciales en el desarrollo del SNC durante la embriogénesis, ya que la falta de estas hormonas produce trastornos severos en el cerebro de individuos neonatos¹⁴.

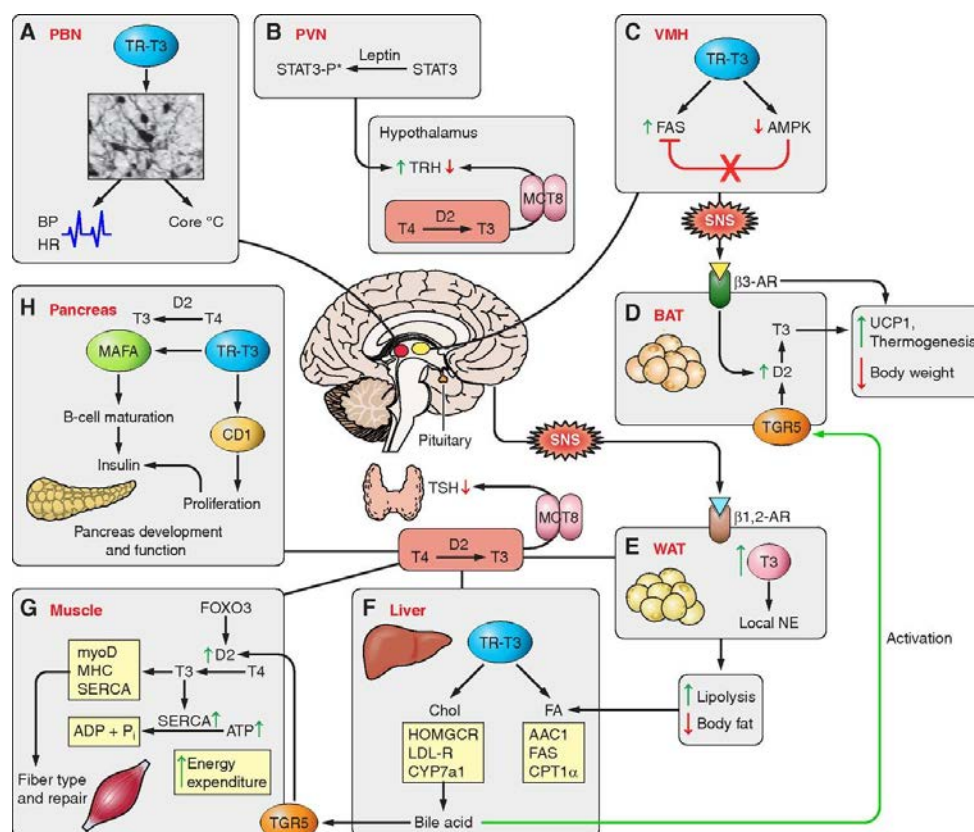


Imagen 2. Vista general de los diferentes tejidos donde las hormonas tiroideas ejercen su acción. Reproducido con el permiso de Mullur *et al.*, 2014¹⁵. Copyright © 2014 American Physiological Society.

La mayoría de las acciones de las hormonas tiroideas sobre los tejidos se realizan mediante receptores nucleares que reconocen estas hormonas llamados THR (*Thyroid Hormone Receptor*), miembros de una superfamilia de factores de transcripción nucleares que responden a hormonas¹² (imagen 2)¹⁵. Todos ellos comparten una estructura similar con un motivo de dedo de Zinc como dominio de unión al ADN, así como un dominio c-terminal que une coactivadores y correpresores¹². Existen dos tipos de THR, la isoforma α y la β ; estos a su vez pueden sufrir modificaciones postraduccionales (como la sumoilación) que, dependiendo del tejido, harán que las hormonas ejerzan una acción u otra (algunas de ellas, dependiendo de la isoforma del THR, con efectos totalmente opuestos)¹⁶.

Como se mencionó anteriormente, las hormonas tiroideas son el principal regulador del metabolismo energético, activando la fosforilación oxidativa mitocondrial mediante la activación de genes OXPHOS. Cuando la hormona se une a su receptor y forma un complejo, son capaces de unirse a secuencias específicas del ADN nuclear que también están presentes en el ADN de las mitocondrias, activando así en ambos genomas muchos de estos genes OXPHOS esenciales para que se produzca la fosforilación oxidativa¹⁷.

La regulación específica de tejido para estas hormonas, además de realizarse mediante la expresión de diferentes isoformas de sus receptores, también se produce gracias a la interacción entre los niveles de hormonas circulantes y la conversión en el propio tejido de T₄ a T₃ y su transporte dentro de la célula diana. Por ejemplo, la respuesta al frío modulada por el tejido adiposo pardo implica la activación de receptores β -adrenérgicos. Estos promueven en el tejido un estado de “hipertiroidismo celular” producido por la activación de enzimas desyodasas tipo 2, implicadas en la conversión de T₄ a su forma más activa T₃. Todo esto produce la

activación de la transcripción de proteínas como UCP-1 que, en última instancia, desacoplan el proceso de generación de ATP en la fosforilación oxidativa en favor de la producción de calor¹⁸.

Las acciones de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo energético están bastante claras desde hace ya varias décadas; sin embargo, hasta hace solo diez años no se sabía que el SNC estaba muy implicado en estos eventos. Estudios en ratas demostraron que el hipotálamo es el principal regulador del balance energético de todo el organismo a través de la acción de las hormonas tiroideas en la ruta de AMPK. Para demostrarlo, utilizaron ratas hipotiroideas y ratas eutiroides a las que se les administraba T₃ directamente al cerebro; en ambos casos disminuía la actividad de AMPK, lo que incrementaba a su vez la actividad del Sistema Nervioso Simpático (SNS) activando marcadores termogénicos en el tejido adiposo marrón (BAT, *Brown Adipose Tissue*). Si se inhibía la ruta termogénica del núcleo ventromedial (VHM, *Ventromedial Nucleus*) del hipotálamo, la activación del BAT mediante hormonas tiroideas no se producía, revirtiéndose la pérdida de peso asociada al hipertiroidismo. El mecanismo regulatorio depende totalmente de AMPK, ya que la inhibición genética de esta proteína en el VHM de ratas eutiroides induce pérdida de peso independiente de la alimentación, aumentando también la expresión de marcadores termogénicos en BAT^{19,20}.

1.4 SÍNTESIS DE HORMONAS TIROIDAS

El yodo que viaja por el torrente sanguíneo es captado por las células foliculares tiroideas a través de un mecanismo de transporte activo mediado por NIS (SLC5A5). Esta glicoproteína se encuentra presente en la membrana basal de los tirocitos, es decir, la parte celular en contacto con los capilares sanguíneos²¹. Además de expresarse en tiroides, NIS se expresa en otros tejidos como en las glándulas salivales, mucosa gástrica o en la glándula mamaria en periodo de lactancia; dependiendo del tejido donde se exprese, NIS puede sufrir diferentes modificaciones postraduccionales^{22,23}.

Aunque NIS tenga una alta afinidad por el yoduro, también se ha demostrado que es capaz de mediar el transporte de otros aniones, entre ellos perclorato^{24,25}. Las Na⁺/K⁺ ATPasas son las responsables de que haya una diferencia de gradiente de Na⁺, el cual se encuentra mucho más concentrado en el exterior de la célula. Así, dos átomos de Na⁺ pasarán a través de NIS al interior celular a favor de gradiente junto con uno de yoduro en contra²¹. Para la correcta función de NIS es imprescindible su localización en el polo basal. Recientemente se ha identificado en el extremo citoplasmático C-terminal de NIS el motivo de aminoácidos responsable de esta localización, basado en Leucinas y aminoácidos ácidos (DD y EE), y conservada en todos los mamíferos²⁶.

Pendrina es el transportador encargado de que el yodo atraviese el polo apical de la célula folicular y llegue al coloide²⁷. Esta proteína de membrana actúa como antiportador Cl⁻/I⁻, ya que expulsa iones yodo desde la célula a la luz del coloide a cambio de introducir un átomo de Cl⁻ al citoplasma de la misma²⁸. Pendrina se expresa exclusivamente en el oído interno, tiroides y riñón. Mutaciones en el gen de esta proteína transportadora originan el síndrome de Pendred, enfermedad caracterizada por sordera con malformaciones en el oído interno y aparición de bocios en etapas cercanas a la pubertad^{29,30}. Normalmente los pacientes adultos son normotiroideos y no presentan niveles elevados en sangre de TSH. Hace algunos años, este laboratorio logró demostrar que tirocitos de pacientes con síndrome de Pendred eran capaces de almacenar hasta cinco veces más yodo en su interior que células de tiroides normal. La ausencia de alteraciones hormonales relacionadas con este evento se explicaría debido a que estas células son capaces de transportar el exceso de yodo hacia el coloide a través de la pendrina mutada o de otros transportadores, aunque de manera mucho más lenta³¹.

El yodo, una vez llega al interior del folículo, se une a residuos de tirosina situados en cadenas laterales de la molécula de tiroglobulina mediante reacción enzimática. Para que este proceso pueda llevarse a cabo, el yodo se oxida nada más entrar al coloide mediante una reacción catalizada por la enzima tiroperoxidasa o TPO, utilizando H_2O_2 como sustrato. La actividad enzimática de TPO es dependiente de su asociación con un grupo hemo^{32,33}, ya que la inactivación química de su grupo prostético inactiva la enzima y su recombinación con otra proteína con grupo hemo restaura de nuevo su función³⁴. TPO funciona como un dímero y se proponen varias posibles orientaciones de sus dos centros activos –*dominios mieloperoxidasa*– en Cis o en Trans, pero aún no resueltas³⁵. Existen varios modelos animales en los que TPO deja de ser funcional, causando hipotiroidismos severos; los describiremos más adelante, en un apartado dedicado a dichos modelos.

La producción de H_2O_2 necesaria para el proceso la realizan dos enzimas NADPH-dependientes llamadas DUOX 1 y 2 (*Dual Oxidase 1 y 2* o THOX), descubiertas casi simultáneamente en dos laboratorios independientes^{36,37}. *DUOX1* y *DUOX2* son dos genes contiguos en el cromosoma 15 junto con otros dos genes, *DUOXA1* y *DUOXA2*, que son factores de maduración para que las oxidasas lleguen al polo apical³⁸. El hecho de que *DUOX2* está muy expresada en tiroides, que sólo las mutaciones de *DUOX2* y *DUOXA2* causan hipotiroidismo congénito en humanos, y que en modelos de ratón sólo la pérdida de *Duox2* pero no *Duox1* causa hipotiroidismo indica que la enzima clave en tiroides es *DUOX2*³⁸. De hecho, algunas mutaciones de *DUOX2* incluso están asociadas a disgénesis de la glándula tiroidea³⁹. Sin embargo, recientemente se ha descrito un caso con mutación bialélica de *DUOX2* y *DUOX1* originando un fenotipo de hipotiroidismo muy marcado, sugiriendo que la actividad de *DUOX1* compense la falta de *DUOX2*, y es por ello que las mutaciones de *DUOX1* den un fenotipo más benigno que mutaciones en otros genes⁴⁰. Tanto TPO como *DUOX* son glicoproteínas que se localizan en la membrana apical de las células foliculares de la tiroides.

La Tiroglobulina (Tg) (330 kDa) es la proteína más abundante en la glándula tiroides, y especialmente en el coloide. La concentración en la luz del folículo puede llegar a alcanzar los 300 g/L y su principal función es la de proveer a la glándula de reservorio para la síntesis y acumulación de hormonas tiroideas⁴¹. Su producción está regulada por los mismos factores de transcripción específicos de tiroides que regulan la expresión de TPO: TTF1/NKx2.1, TTF2/FOXE2 y PAX8⁴². La Tiroglobulina es una proteína glucosilada en 17 residuos distintos, contiene 60 puentes disulfuro intracatenarios y forma un dímero en el coloide adquiriendo un alto peso molecular y mucha estabilidad⁴³. La Tg tiene 66 tirosinas en su secuencia pero sólo 30 de ellas se acoplan a yodo, y de estas últimas muy pocas van a ser donantes de su anillo yodado para la conjugación, y sólo cuatro van a serceptoras para formar tironinas^{44,45}. Para la síntesis de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) es necesaria la formación previa de dos tirosinas yodadas dentro de la Tg que, dependiendo si se unen uno o dos átomos de yodo previamente oxidado, se llamarán MIT (monoyodotirosina) o DIT (diyodotirosina), respectivamente. Muchos estudios han intentado demostrar el proceso exacto mediante el cual TPO cataliza la oxidación del yodo y su posterior unión al anillo de tirosina, pero el mecanismo todavía no está claro^{46,47,48}. El paso final es el acoplamiento entre dos moléculas de DIT para formar la T_4 o una molécula de MIT y una DIT para formar la T_3 . La reacción, como ya se dijo anteriormente, es catalizada por TPO y dependiente de H_2O_2 , además de ser estrictamente dependiente de la estructura de la Tg⁴⁹.

Muy recientemente, se ha obtenido la estructura tridimensional por crio-microscopía electrónica del dímero de Tiroglobulina, y se ha confirmado ayudándose de un estudio mutacional y de síntesis *in vitro*⁵⁰. Cada monómero tendrá un NTD-Core-Flap-Ar y CTD que se pliegan como formando un eslabón de una cadena. La estructura se basa en la dimerización

de los dominios C-terminales (CTD) de ambos monómeros, de forma que un NTD contacta con todos los dominios del monómero contrario. Se confirman 4 tirosinas aceptoras (A-Y24, B-Y2573, C-Y2766, y D-Y1310) y 5 tirosinas donantes (Y234 y Y149 donantes para A, Y2540 para B, Y2766 para C and Y108 para D). El sitio A está dentro del NTD, el sitio B y C quedan dentro del CTD, y el sitio D acerca el Flap del monómero contrario al NTD del primero. De cada dímero se obtienen 7 moléculas de T₄, ya que el sitio C sólo es activo como aceptor en uno de los dos monómeros, mientras que los donantes parecen venir de ambos. Este trabajo seminal tiene sin embargo algunas cosas sin explicar, como por ejemplo que no hayan conseguido sintetizar T₃ en su modelo.

El mecanismo por el cual los folículos tiroideos generan las hormonas tiroideas funcionales a partir de las reservas de Tg madura están muy bien estudiados. Los tirocitos captan las moléculas de Tg mediante fagocitosis, aunque también se han propuesto otros mecanismos parecidos como la micro y la macropinocitosis^{51,52}. Una vez dentro del tirocito, las Tg se fusionan con lisosomas que cortan los residuos de tironinas (principalmente T₄ pero también T₃) mediante escisión proteolítica. Se ha demostrado que las principales enzimas responsables de este proceso son las catepsinas, siendo las D, H y L las isoformas capaces de cortar moléculas de Tg^{53,54,55}. La internalización de la Tg mediante endocitosis está regulada por la TSH⁵².

La tiroxina tiene una vida media larga y una alta concentración en plasma sanguíneo. Esto es debido a su unión (junto con la T₃ y otras yodotironinas) con las 3 principales proteínas transportadoras de hormonas tiroideas: TBG (*thyroxine-binding globulin*), TTR (*transthyretin*) y HSA (*Human Serum Albumin*); estas hormonas también pueden unirse a otras proteínas de la sangre tales como las lipoproteínas de alta densidad, pero sin apenas relevancia biológica⁵⁶.

Durante muchas décadas se pensaba que las hormonas tiroideas eran capaces de entrar a las células diana mediante difusión pasiva dada su naturaleza lipofílica. Sin embargo, evidencias publicadas a partir de los años 70 sirvieron para esclarecer que debía haber algún tipo de transportador específico y que la difusión pasiva hacia las células de la hormona, si la hubiera, sería limitado^{57,58}. Hasta finales de los 90 no se empezaron a estudiar a nivel molecular el proceso mediante el cual las hormonas tiroideas atraviesan la membrana plasmática, momento en el que se descubrieron los principales transportadores: MCT8 y MCT10 (*monocarboxylate transporter*), OATP1C1 (*Organic Anion Transporter Polypeptide*) y, más recientemente, SLC17A4^{59,60,61,62}.

Las desyodasas (DIO), enzimas transmembrana con su dominio catalítico orientado hacia el citosol⁶³, son proteínas muy implicadas en las etapas finales del metabolismo de las hormonas tiroideas, así como de su inactivación en algunos casos. DIO₁ y DIO₂ son las encargadas de catalizar la conversión de T₄ en T₃, mucho más activa, pero con una vida media más corta que la primera. DIO₃, por el contrario, se encarga de inactivar ambas hormonas⁶⁴.

1.5 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides es el principal circuito regulador de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas (imagen 3). Este sistema tiene como punto inicial el hipotálamo y sus neuronas productoras de TRH (Hormona Estimuladora de Tirotropina), que además de ser el principal estimulador de la liberación de TSH por parte de la adenohipófisis, interviene en otros procesos como el comportamiento frente a la comida o la termogénesis⁶⁵. Existen varias zonas en el cerebro con neuronas productoras de TRH, pero solo aquellas localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo son las responsables del control del eje. Las hormonas tiroideas ejercen una retroalimentación negativa sobre las neuronas TRH, ya que altos niveles de estas hormonas en sangre inhiben la secreción de más TRH, como se demostró en modelos

animales⁶⁶. Además del control regulatorio negativo de las hormonas tiroideas, otros elementos relacionados con la nutrición, el metabolismo o el control de la temperatura también intervienen en la producción de TRH; entre ellos, entre ellos el neuropéptido Y (NPY), la leptina o la hormona estimuladora de melanocortina (α -MSH)^{67,68,69}.

La hipófisis, más concretamente la adenohipófisis o hipófisis anterior, es el segundo componente de este sistema y principal regulador de todo el sistema endocrino. Las células tirotropas son las encargadas de producir TSH cuando llegan estímulos de TRH por parte del hipotálamo. La TSH activa todos los pasos de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas: aumenta la captación de yodo por los tirocitos, incorporación de este yodo a la Tg y producción de H_2O_2 por los mismos, cofactor esencial para la biosíntesis de hormonas. La endocitosis del coloide y la posterior hidrólisis de la Tg también se encuentran muy estimuladas por la TSH⁷⁰. Además, la TSH tiene un papel esencial en la estimulación del crecimiento y maduración de los tirocitos^{70,71}.

El último componente del sistema, la propia glándula tiroides, ejerce una potente inhibición sobre en el hipotálamo en la liberación de TRH y sobre la hipófisis en la liberación de TSH. En este último caso, concretamente, las hormonas tiroideas regulan negativamente ambas unidades que conforman la TSH: la subunidad alfa y TSH β ⁷².



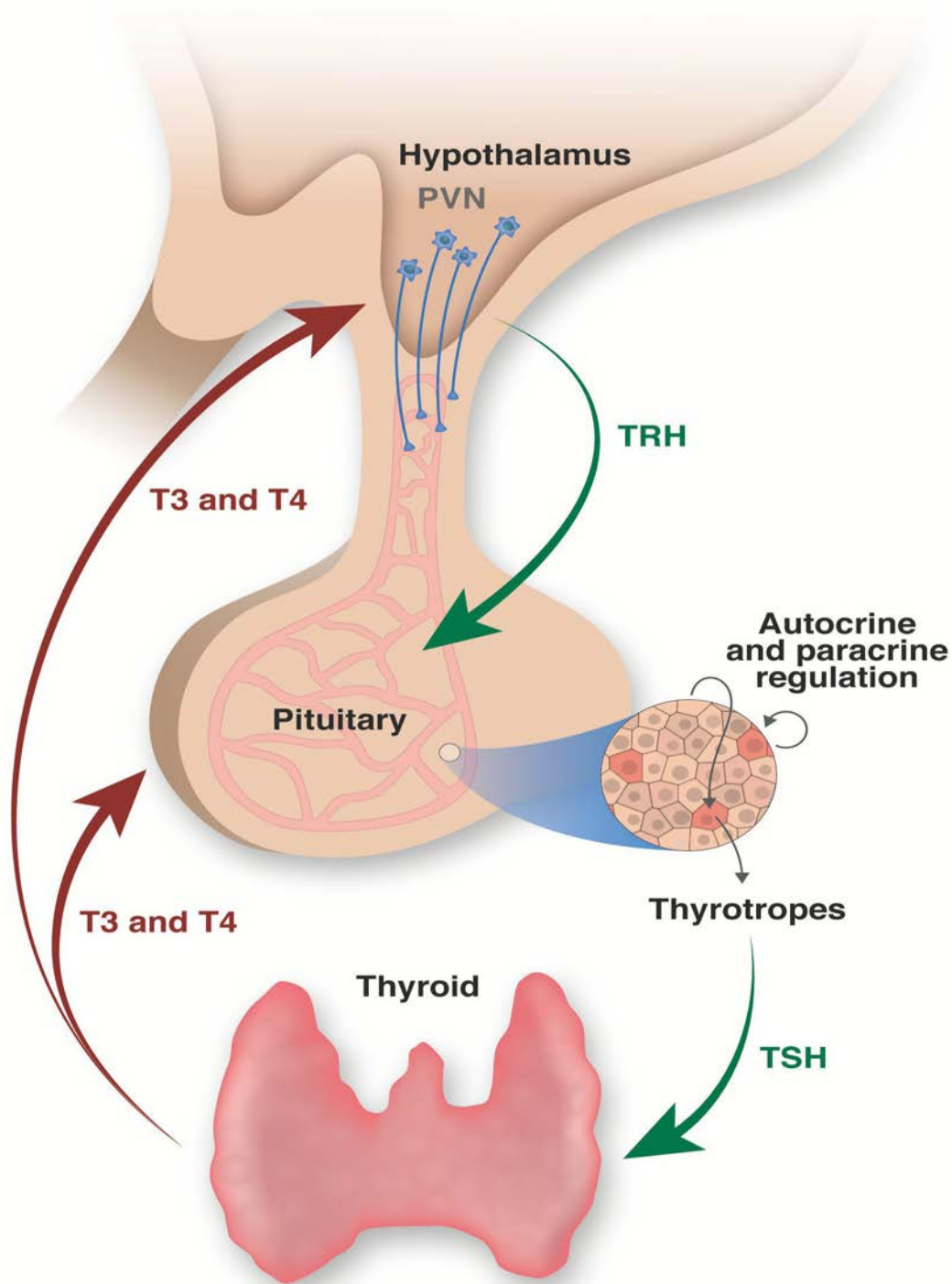


Imagen 3. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Las flechas en rojo indican regulación negativa y en verde regulación positiva. Reproducido de Ortega-Carvalho *et al.*, 2016⁴. Copyright © 2016 American Physiological Society.

En cuanto a los receptores, ya se habló de las acciones mediadas por la familia de receptores nucleares THR (receptor de hormonas tiroideas) en apartados anteriores, fundamentalmente de sus acciones sobre el genoma actuando como factor que regula muchos procesos transcripcionales. Estos receptores se localizan en el núcleo, donde se unirán al ADN mediante secuencias llamadas THEs (*Thyroid Hormone Responsive elements*) previa unión de ellos mismos con sus ligandos con una alta afinidad y especificidad^{12,73}. El receptor de TSH (TSHR)

pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y se localiza en la membrana basolateral de los tirocitos⁷⁴. Dependiendo de la concentración de TSH en el microambiente, su mecanismo de acción puede encaminarse a la síntesis y secreción de hormonas tiroideas o a la activación de proliferación celular. En el primer caso, la TSH se unirá a su receptor produciendo la activación de la subunidad Gs de la proteína G, la cuál a su vez activa la adenilciclase que aumentará los niveles de cAMP con la consecuente activación de PKA. Esta ruta de señalización es la responsable de la mayoría de los efectos que ejerce la TSH en el organismo⁴. Cuando la concentración de TSH llega a niveles más elevados, la vía de señalización cambia y en este caso se activan subunidades Gq que activarán a su vez la ruta del IP₃ (Inositol trifosfato)-DAG (Diacilglicerol), aumentando el Ca²⁺ intracelular y la activación de PKC. Esta vía es responsable de la regulación del flujo de I⁻, la incorporación del mismo a la Tg y la generación de H₂O₂⁷⁰.

2 PATOLOGÍAS TIROIDEAS POR HIPERPLASIA: EL BOCIO

2.1 BREVE RESUMEN DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA TIROIDES

Los tumores primarios pueden ser benignos o malignos, exceptuando si la neoplasia se origina en células C en cuyo caso el tumor solo puede ser maligno (aunque solo el 3% aproximadamente correspondería a este tipo de tumor)⁷⁵. Los benignos, también llamados adenomas foliculares (más del 95% del total), representan la mayor parte de los tipos de tumores tiroideos en la población⁷⁶.

Los tumores malignos más comunes dentro de los órganos endocrinos corresponden a tumores tiroideos⁷⁷; además, su incidencia ha aumentado un 4% en los últimos 20 años^{78,79}. En términos generales en cuanto a su incidencia, es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres y el séptimo en hombres en población de entre 20 y 49 años; en la población general, sería el quinto en incidencia en mujeres y el decimosexto en hombres⁸⁰.

Según la clasificación internacional de la OMS y dependiendo de dónde se origine, los tumores tiroideos pueden ser primarios, si se generan en la propia glándula tiroides o secundarios, si se originan en otros tejidos y mediante metástasis invaden el tejido tiroideo⁷⁵(imagen 4).

<p>Adenoma folicular</p> <p>Tumor trabecular hialinizante</p> <p>Otros tumores tiroideos encapsulados de patrón folicular - Tumor folicular de potencial maligno incierto</p> <p>- Tumor bien diferenciado de potencial maligno incierto</p> <p>- Neoplasia tiroidea folicular no invasiva con rasgos nucleares de tipo papilar</p> <p>Carcinoma papilar (CP)</p> <p>Carcinoma folicular (CF) - CF mínimamente invasivo - CF encapsulado angioinvasivo - CF ampliamente invasivo</p> <p>Tumores de células de Hürthle (oncocíticos) - Adenoma de células de Hürthle</p> <p>- Carcinoma de células de Hürthle</p> <p>Carcinoma pobremente diferenciado</p> <p>Carcinoma anaplásico (indiferenciado)</p> <p>Carcinoma escamoso</p> <p>Carcinoma medular</p> <p>Carcinoma mixto medular y folicular</p> <p>Carcinoma mucoepidermoide</p> <p>Carcinoma mucoepidermoide esclerosante con eosinofilia</p> <p>Carcinoma mucinoso</p>	<p>Timoma ectópico</p> <p>Tumor epitelial fusiforme con diferenciación de tipo tímica</p> <p>Carcinoma tímico intratiroideo</p> <p>Paraganglioma y tumores mesenquimales /estromales - Paraganglioma - Tumor de vaina nerviosa periférica (shwannoma, tumor maligno de vaina nerviosa periférica) - Tumores vasculares benignos (hemangioma, hemangioma cavernoso, linfangioma) - Angiosarcoma - Tumores de músculo liso (leiomioma, leiomiosarcoma) - Tumor fibroso solitario</p> <p>Tumores hematolinfoides - Histiocitosis de células de Langerhans, Enfermedad de Rosai-Dorfman, sarcoma de células foliculares dendríticas, linfoma primario)</p> <p>Tumores de células germinales - Teratoma benigno (grado 0 o 1) - Teratoma inmaduro (grado 2) - Teratoma maligno (grado 3)</p> <p>Tumores secundarios</p>
--	---

Imagen 4. Modificado a partir del libro de la clasificación de tumores tiroideos de la OMS (Lloyd *et al.*, 2017⁷⁶). Permitido por IARC.

Los carcinomas de epitelio folicular se dividen en 3 grupos atendiendo a sus características histológicas y clínicas:

- Carcinoma diferenciado (DTC “*Differentiated Thyroid Carcinoma*”), con un crecimiento lento y buena respuesta a la cirugía y al tratamiento con yodo radioactivo. Según el tipo de crecimiento, pueden dividirse, a su vez, en dos tipos.
 - Carcinoma papilar, que representa el 80% de todos los cánceres de tiroides y los principales responsables del aumento de incidencia de esta patología. Sus núcleos son muy característicos, suelen crecer en papilas e invaden por vía linfática.
 - Carcinoma papilar, que crece en folículos e invade por vía sanguínea.

- Carcinoma pobremente diferenciado (PDTC, “*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma*”) y
- Carcinoma indiferenciado o anaplásico (ATC, “*Undifferentiated or Anaplastic Thyroid Carcinoma*”). Tiene una baja incidencia (2-5%), pero es el más agresivo de todos (la mitad de los pacientes diagnosticados ya tienen metástasis). La media de supervivencia son 6 meses y tiene un 100% de mortalidad.

2.2 BOCIO MULTINODULAR (MNG)

El crecimiento excesivo de varias áreas de la glándula tiroides y su transformación estructural y/o funcional se conoce en clínica como bocio multinodular (MNG, *multinodular goiter*). Se ha descrito que hasta el 50% de la población general podría tener nódulos tiroideos aunque la mayoría no serían detectables por palpación y sería necesario el uso de otras técnicas como los ultrasonidos^{81,82}.

La etiología de la enfermedad tiene una parte genética y una esporádica. En cuanto a la aparición de la enfermedad por causas genéticas, aunque se ha demostrado en varias ocasiones la agregación familiar^{83,84}, los estudios en dichas familias no han podido demostrar si la enfermedad es debida al componente genético que comparten estas familias o al componente ambiental. El MNG es la patología más común de la glándula tiroides; incluso en regiones no endémicas de bocio difuso por deficiencia de yodo, puede presentarse hasta en el 4% de la población general mayor de 30 años⁸⁵.

El factor ambiental más importante que contribuye a la aparición de bocio en casos esporádicos es la deficiencia de yodo^{85,86}; de hecho, el tamaño de la glándula es inversamente proporcional a la excreción de yodo en la orina⁸⁷. Otros factores como el género también están claramente implicados, ya que el ratio mujeres-hombres de bocio multinodular puede sobrepasar el 5:1 e incluso el 10:1, lo que deja muy claro que es mucho más frecuente en mujeres que en hombres. Existen más agentes de riesgo como podrían ser el tabaco⁸⁸, el estrés emocional⁸⁹ o ciertas drogas⁹⁰.

En endocrinología y según su fisiopatología, los bocios pueden dividirse en *nontoxic goiter* y TNG (*Toxic Nodular Goiter*). El primero corresponde a una expansión nodular o difusa sin procesos de inflamación o neoplasia y que no altera la función tiroidea normal. La evolución del *nontoxic goiter* varía a lo largo del tiempo: en fases iniciales, se produce una hiperplasia epitelial folicular de manera uniforme (bocio difuso) que aumenta la masa de la glándula; si el desorden persiste, la arquitectura tiroidea pierde uniformidad y se desarrollan áreas fibrosas intercaladas con áreas de hiperplasia focal (a lo que se le conoce como MNG o bocio multinodular). El TNG es el otro tipo de bocio en el que sí se produce una hiperfuncionalidad de la glándula. Esta enfermedad abarca desde la aparición de un único nódulo hiperfuncionante dentro de una tiroides multinodular a una glándula con múltiples áreas con hiperfunción (de ahí que pueda haber variantes genéticas entre nódulos). Por tanto, el crecimiento natural de los MNGs trae como consecuencia la aparición de varios nódulos. Si alguno de ellos adquiere características hiperfuncionantes (normalmente por mutaciones somáticas en la tirotrópina o en la TSH) estaríamos hablando de un TNG; si no fuese el caso, correspondería con un *nontoxic goiter*^{91,92}.

La presencia de MNG en humanos siempre se ha asociado a un riesgo mucho más bajo de desarrollar cualquier tipo de neoplasia maligna en la tiroides que en casos donde se presenta un único nódulo. En los últimos años se ha demostrado que el riesgo de cáncer de tiroides es muy parecido tanto en individuos con un solo nódulo tiroideo como en aquellos que presentan algún tipo de MNG. De ahí que se deban monitorizar de la misma manera ambos casos ya que el riesgo de neoplasias es muy parecido⁹³. Las causas que generan dicha hiperplasia todavía no

están claras. Se han reportado casos de pacientes con varios nódulos tiroideos en los que las mutaciones en DICER1 provocan la aparición de varios nódulos de tipo MNG a edades tempranas⁹⁴.

Otros estudios no demasiado contundentes apoyan la teoría de que la aparición de bocios multinodulares podría estar relacionada con la presencia de moléculas que indican estrés oxidativo, observando correlación entre ambos en algunos grupos de pacientes⁹⁵. La teoría de que células madre adultas jueguen un papel clave en la formación de MNG también se ha propuesto. En un estudio se cultivaron, en condiciones de cultivo para células madre, células procedentes de bocios de pacientes humanos que dieron lugar a “tiroferas” capaces de responder a TSH y comenzar así a expresar factores de diferenciación de tiroides, tales como Pax8, Tg o NIS⁹⁶.

2.3 EL HIPOTIROIDISMO. MODELOS ANIMALES DE HIPOTIROIDISMO PRIMARIO

El hipotiroidismo se define como una condición patológica en la que se produce una deficiencia de hormonas tiroideas. Debido a su gran variabilidad en los casos clínicos y en la ausencia general de sintomatología específica, su definición es predominantemente bioquímica. Por tanto, el diagnóstico se da cuando los valores de la concentración de TSH están por encima de un rango específico y cuando los valores de tiroxina libre están por debajo de un rango específico. El reemplazamiento de hormonas tiroideas con levotiroxina es el tratamiento estándar para pacientes con esta patología.

La deficiencia de hormonas tiroideas tiene un amplio rango de efectos. Los efectos sistémicos son el resultado tanto de los trastornos que afectan a los procesos metabólicos como de la infiltración mixedematosa (debido a la acumulación de glucosaminoglicanos, entre otros). En el corazón se produce un descenso en el pulso, la contractilidad y el gasto cardíaco. En el tracto gastrointestinal se produce acloridia (ausencia total o parcial de ácido clorhídrico) y un tiempo de tránsito intestinal prolongado con estasis gástrica. El hipotiroidismo causar aumento en el colesterol total y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low-density Protein*), lo que se traduce en hipercolesterolemia. Por último, puede dar lugar también a resistencia a la insulina⁹⁷. Si el hipotiroidismo se presenta en niños, hablaremos de hipotiroidismo congénito cuando es causado por alguna mutación somática, normalmente espontánea, aunque también puede ser familiar. La tiroiditis linfocítica crónica (CLT, *Chronyc Lymphocytic Thyroiditis*) es la causa más común del segundo tipo de hipotiroidismo pediátrico, el hipotiroidismo adquirido. El síntoma más común en el hipotiroidismo congénito no tratado es el cretinismo; hay otros síntomas que se presentan tanto en el hipotiroidismo pediátrico congénito como en el esporádico, como son el retraso en el crecimiento (enanismo), depresión pediátrica, intolerancia al frío o debilidad muscular⁹⁸.

La prevalencia de la enfermedad varía entre EEUU y Europa, siendo un 5% la media aproximada en la población general⁹⁹. El hipotiroidismo es más frecuente en mujeres y en individuos adultos mayores de 65 años^{100,101}. En España, el hipotiroidismo (medido como incremento de TSH) afecta alrededor del 8% en la población total, siendo el porcentaje mucho mayor en mujeres (más del 13%) que en hombres (4% aproximadamente)¹⁰².

El hipotiroidismo puede clasificarse en primario, si hay una deficiencia en hormonas tiroideas; secundario, si la deficiencia es de TSH; terciario, con deficiencia en TRH y periférico cuando las causas son ajenas al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides¹⁰³.

Los modelos de hipotiroidismo pueden ser genéticos, siendo un buen modelo para el Hipotiroidismo Congénito Neonatal en humanos, pero no para el estudio de la fisiología celular ante una situación de hipotiroidismo en un paciente adulto. Además, los modelos de

hipotiroidismo congénito provocan muchas veces alteraciones anatómicas/histológicas de la glándula tiroidea (agenesia, displasia, ectopia) por lo que la fisiología celular y los mecanismos de reclutamiento de poblaciones celulares podrían estar completamente alterados. Modelos de hipotiroidismo congénito genéticos en ratones son el *knockout* de NKX2.1-TTF1, las mutaciones puntuales de TPO o la delección del extremo C-terminal del TSHR.

Un modelo más adecuado para estudiar la fisiología de poblaciones celulares en la glándula tiroidea postnatal es el hipotiroidismo causado por drogas antitiroideas como los imidazoles (MMI, Metimazol) o los tiouracilos (PTU, Propiltiouracilo). Estos dos compuestos son ampliamente usados en el tratamiento del hipertiroidismo (también en enfermedad de Graves), ya que reducen los niveles de hormona tiroidea impidiendo su síntesis. Cabe destacar que el PTU se administra solo, mientras que el MMI se administra junto con otro imidazol, el CMZ (Carbimazol); de ahí que se utilicen los términos PTU para referirse al tratamiento con este tiouracilo, y MMI/CBZ para referirse al tratamiento con imidazoles¹⁰⁴. El uso de uno u otro siempre ha permanecido como objeto de debate, tanto es así que se ha instado a usar MMI en guías médicas de Europa o Japón y el uso de PTU en EEUU, por ejemplo¹⁰⁵. En 2019 se realizó el último estudio comparando estas dos drogas antitiroideas, concluyendo que el PTU producía un ligero aumento en los niveles de transaminasas respecto al MMI, aunque no se veían alterados otros indicadores de daño hepático como la bilirrubina o una mayor agranulocitosis¹⁰⁴.

El mecanismo de acción de ambas drogas antitiroideas es similar, ya que se unen a la enzima TPO y la inactivan, impidiendo que esta pueda catalizar la oxidación del yoduro para que pueda incorporarse a los residuos tirosil de la molécula de Tg y así formar T₃ y T₄. Además, el PTU (pero no el MMI) es capaz de unirse al grupo Selenio de la enzima DIO1 y así bloquear también la conversión de T₄ en T₃, la forma más activa de la hormona¹⁰⁶. Es importante destacar que DIO1, expresada en su mayoría en hígado y riñón, también se encarga de degradar T₄ a rT₃ y T₃/rT₃ a T₂ y T₁. Aunque la afinidad de DIO1 por la T₄ es mucho menor que DIO2 (rango nM frente a μM, respectivamente), su expresión es tan abundante que contribuye marcadamente a los niveles de T₃ circulantes. Sin embargo, la T₃ importante para la acción hormonal en los receptores es la que se produce dentro de las células por la DIO2^{107,108}.

El uso de ambas drogas para inducir modelos de hipotiroidismo tanto en ratas como en ratones está muy bien estudiado, siendo el PTU el más comúnmente usado para ratones^{109,110} y el MMI para ratas¹¹¹. Para la administración de las drogas antitiroideas se utiliza normalmente el agua de bebida, monitorizando siempre el consumo de la misma ya que dichas drogas alteran su sabor; de hecho, es recomendable añadir algún tipo de edulcorante para estimular que los animales beban y que el modelo sea efectivo¹¹⁰. Respecto a las diferencias en cuanto al sexo en la inducción de modelos de hipotiroidismo en ratas y ratones, se ha visto que en machos aumenta la variabilidad en cuanto al consumo de agua y un aumento en los niveles de colesterol¹¹².

Existen otros modelos con ratones GMO que producen un hipotiroidismo más severo ya que la falta de funcionalidad de TPO se presenta desde el inicio del desarrollo y no en fases adultas como en el modelo que hemos visto de ratones con antitiroideos en el agua de bebida. En el modelo de ratón *Tpo^{tee}* una sustitución de una base en el gen de *Tpo* hace que el codón correspondiente que codificaba para el aminoácido tirosina (Y) ahora transcriba una asparagina (N). Este aminoácido se encuentra altamente conservado por lo que dicho cambio es suficiente para la total inactividad de la proteína. Junto a este se generó otro modelo de ratón GMO muy similar al anterior llamado *Tpo^{tee-2J}* en el que se delecionan 64pb con el consecuente fallo en el *splicing* del RNA y la formación de transcritos aberrantes. En ambos modelos, la falta total de TPO se traduce en niveles indetectables de hormonas tiroideas y en una estructura de la glándula

tiroides totalmente anormal, con un desarrollo muy pobre de los folículos tiroideos y una hiperproliferación de las células epiteliales que forman dichos folículos¹¹³

3 CÉLULAS MADRE ADULTAS (ASC)

Las células madre adultas (*adult stem cells*, ASCs) son aquellas capaces de generar células diferenciadas del tejido al que pertenecen en respuesta a un daño producido en el mismo, asegurando al mismo tiempo su autorrenovación¹¹⁴. Además, deben cumplir tres características fundamentales para ser consideradas como tal:

- **Autorrenovación:** deben ser capaces de realizar divisiones simétricas para mantener el *pool* a la vez que regeneran el tejido.
- **Diferenciación:** además de dividirse simétricamente, las ASCs deben hacerlo de manera asimétrica y de esta manera generar células diferenciadas del tejido al que pertenecen.
- **Quiescencia:** las ASCs se caracterizan por tener una actividad basal muy baja. Gracias a esto, evitan un mayor desgaste del ADN y con ello una mayor probabilidad de mutaciones en sus genes.

3.1 NICHOS DE CÉLULAS MADRE

El concepto de ASC siempre se ha relacionado con el concepto de nicho, que se definiría como un microambiente de varias poblaciones celulares *in vivo* donde residen las ASCs y donde reciben estímulos que determinarán su destino final¹¹⁵. Es un error considerar el nicho como un simple espacio donde residen las ASC; el nicho es una zona donde señales extrínsecas convergen e interactúan para influir en el comportamiento de las células madre. Dichas señales incluyen interacciones célula-célula y célula-matriz, además de otras moléculas encargadas de activar o reprimir genes y programas de transcripción¹¹⁵.

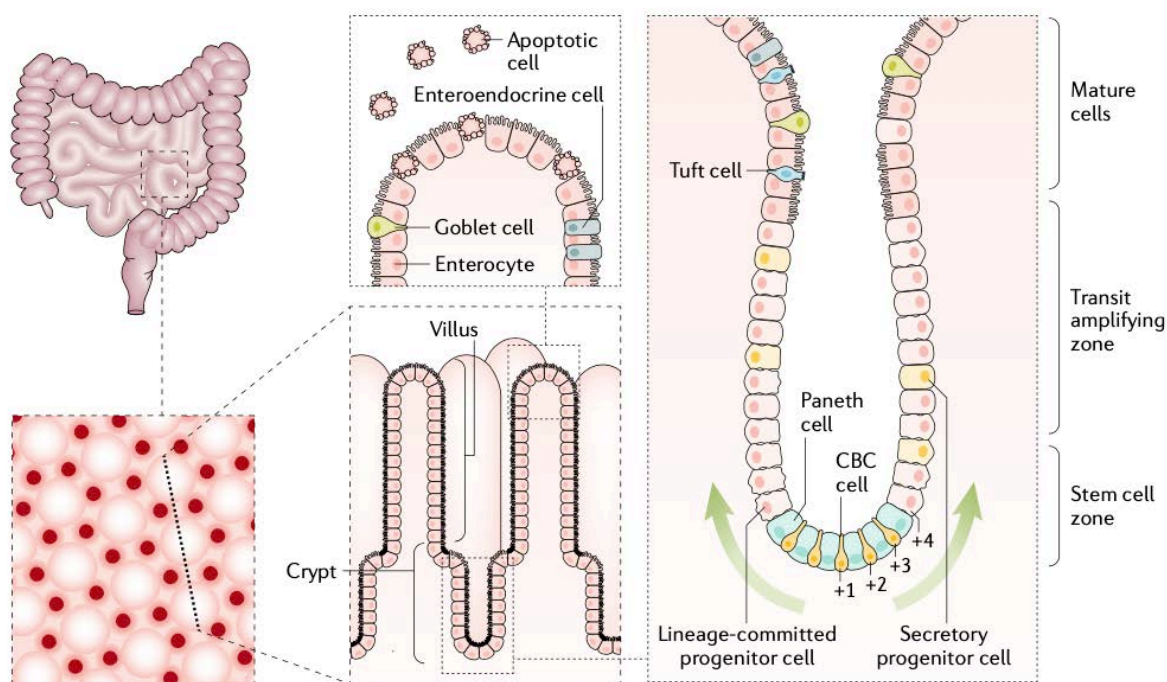


Imagen 5. Representación del nicho que forman las ISC en el sistema intestinal. Reproducido de Gehart and Clevers, 2019¹¹⁶. Copyright © 2018, Springer Nature.

A lo largo de los últimos 20 años se han descrito varios tipos de nichos de ASC dependiendo del órgano al que pertenecen (imagen 5). Los componentes que lo forman, las rutas de señalización implicadas y su localización varía enormemente dependiendo del tejido, ya que cada uno posee una estructura única y tienen unas necesidades de autorrenovación específicas.

- ⇒ En la **médula ósea**, las células madre hematopoyéticas y sus progenitores (**HSCs**, *hematopoietic stem cells*) residen a lo largo de la superficie endosteal cerca de los osteoblastos^{117,118} y muy cerca de los vasos sanguíneos^{119,120}.
- ⇒ En la **piel**, las células madre epiteliales se localizan en las zonas abultadas de los folículos pilosos. Son esenciales para la regeneración del folículo piloso, mientras que otras células madre más dispersas ancladas a la membrana basal (que separa la dermis de la epidermis (llamados keratinocitos basales) se encargan de regenerar la epidermis interfolicular¹²¹.
- ⇒ En el **cerebro**, los nichos de células madre neuronales (**NSCs**, *Neural Stem Cells*) están bien identificados y localizados: uno de estos nichos se encuentra en la zona lateral subventricular del tercer ventrículo (SVZ, *subventricular zone*) y el otro en la zona subgranular (SGZ, *subgranular zone*) del giro dentado del hipocampo^{122,123,124}.
- ⇒ En **intestino**, las células madre (**ISCs**, *intestinal stem cells*) se alojan en la parte inferior de la cripta intestinal intercaladas con las células de Paneth (imagen 5).
- ⇒ Las **células satélite musculares (SCs)**, conocidas desde hace mucho sin saber exactamente cuál era su función, también se han descrito como células madre. Se ha demostrado que son capaces de regenerar el músculo en respuesta a daño del tejido y se localizan en la lámina basal del músculo, alrededor de las fibras musculares¹²⁶. Además, se han realizado grandes avances en la comprensión de estas ASCs y por qué pierden su funcionalidad con la edad. Se ha observado que en ratones geriátricos (ratones muy mayores) se produce una acumulación de autofagosomas en estas SCs debido al fallo

que se produce en la autofagia cuando estas células envejecen. Como consecuencia, se incrementa la basura intracelular (proteínas dañadas y mitocondrias fundamentalmente) que a su vez aumentan los niveles de ROS y daño al ADN, lo que provocan la activación de genes como p16^{INK4a} que producen senescencia en estas células¹²⁷.

- ⇒ En la hipófisis, el nicho de células madre fue descrito por nuestro grupo en hipófisis humana, de rata y ratón^{128,129}. La población de células madre son denominadas **GPS** por coexpresar receptores de la familia Gfra/RET, Prop1 y proteínas Stem como Sox2, Sox9, Klf4 y Oct4, y comprende las dos capas de células en contacto en la frontera entre el lóbulo intermedio y la adenohipófisis^{128,130,131}. En íntimo contacto con las GPS, hay una capa de células Vimentina+ con apariencia de estromal^{128,129}. También hay células alargadas aisladas Nestin+ en íntimo contacto con las GPS^{128,129}. Esta estructura acompaña a los pliegues de GPS hacia el interior de la adenohipófisis que originan las estructuras conocidas como “folículos”. Datos estructurales de histología funcional (no publicados) sugiere que a lo largo del nicho existen capilares dedicados e inervación específica.

3.2 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LAS ASCs

Las vías moleculares que se han catalogado como importantes moduladores del mantenimiento y la función de las ASCs suelen ser redundantes para cada nicho de los diferentes tejidos en los que se han descrito. Es muy importante destacar que estas vías, aún siendo comunes para los diferentes nichos, tienen papeles muy distintos según el órgano donde se activen (imagen 6).

- ⇒ La vía de señalización *Wnt/Beta-catenin* es una de las más conservadas dentro de los diferentes tejidos pero sus efectos varían dependiendo de en cuál se active. Por ejemplo, en el sistema hematopoyético¹³² y en intestino¹³³, esta vía es un importante mediador de la autorrenovación y proliferación de las ASCs, mientras que en la piel actúa promoviendo la diferenciación de los precursores para formar folículos pilosos^{134,135}. En intestino, esta vía está muy bien estudiada; Wnt se une a receptores Friezzled (FZD) que activarán a su vez cascadas de señalización que provocarán en última instancia la acumulación y translocación al núcleo de β-catenina, donde interactúa con factores de transcripción¹³⁶. En el cerebro de mamíferos, la sobreexpresión de beta-catenina a través de la señalización de *Wnt* conduce a la expansión de las poblaciones de NSCs¹²².
- ⇒ La vía de NOTCH es un importante regulador de ASC tanto en músculo como en intestino 5. Contacto directo entre células que expresan Notch y otras que expresan algunos de sus receptores (JAG o DELTA) resultan en la escisión del dominio intracelular de Notch (NICD, *Notch Intracellular Domain*), el cual actúa directamente como factor de transcripción en el núcleo¹¹⁶.
- ⇒ La señalización mediante la proteína morfogenética ósea (BMP, *Bone morphogenetic protein*) es clave en el control de la expansión de las células madre germinales de *D. melanogaster* mediante la represión de *bam*¹³⁶. En el proceso de hematopoyesis, BMP tiene un papel muy importante en el control del número de HSCs¹¹⁸; en la piel, en cambio, BMP actúa de manera contraria a la vía *Wnt* inhibiendo la activación de las células madre foliculares y favoreciendo la formación de células epidérmicas^{137,138} (imagen 6). En el sistema nervioso central, la señalización por BMP favorece la diferenciación de las NSCs a astrocito mientras que su inhibidor, *Noggin*, favorece la formación de neuroblastos¹³⁹.

⇒ La vía de YAP o de HIPPO, como también se la conoce, ha cobrado interés en los años más recientes. Cuando están activadas, YAP/TAZ se unen y activan a factores de transcripción tipo CTGF o CYR61 en los genes diana induciendo *stemness*. cuando están inactivadas tras fosforilación por kinasas LATS, son citoplasmáticas. En intestino, su papel en la homeostasis tisular parece ser redundante, pero sin embargo es esencial en la inducción de reparación tisular donde células ya diferenciadas son capaces de desdiferenciarse y volver a adquirir características de células madre¹⁴⁰. También es una vía clave en la formación de organoides mediante divisiones asimétricas¹⁴¹. En la hipófisis, YAP/TAZ son exclusivos de la población Sox2⁺¹⁴². La sobreactivación de ambas origina una expansión de las células Sox2 acompañada de desdiferenciación y tumorigénesis, mientras que la sobreexpresión de YAP sola acumula Sox2 que se diferencian normalmente¹⁴³.

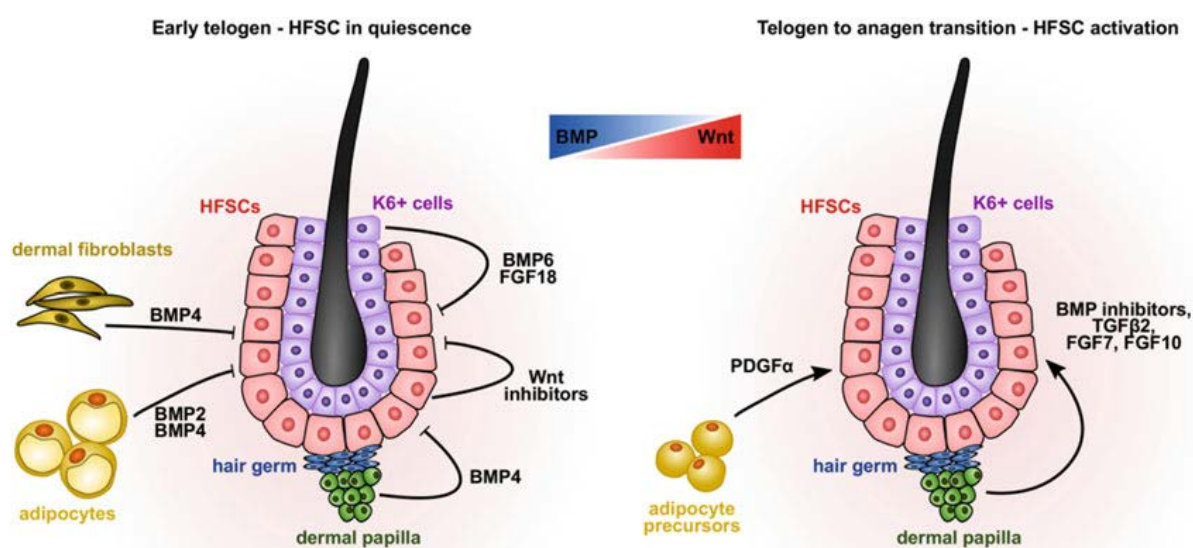


Imagen 6. Representación del nicho que forman las HFSCs en el folículo piloso; su regulación atiende al balance entre Wnt y BMP. Reproducido de So et al., 2017¹⁴⁴. Copyright © 2018, Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology.

Además de las proteínas, otras moléculas como iones, el oxígeno o las ROS (*Reactive Oxygen Species*) pueden influir en el comportamiento de las ASCs. En la médula ósea, se han encontrado altas concentraciones de Ca^{2+} en la superficie endosteal, lugar donde se produce la remodelación ósea entre osteoblastos y osteoclastos. En condiciones normales, las HSCs expresan el receptor de Ca^{2+} (CaSR) y su delección se traduce en un comportamiento anormal de dichas HSC ya que no son capaces de quedar retenidas en zona endosteal (se produce un fallo en la adhesión de estas HSC a la matriz extracelular)¹⁴⁵.

Uno de los fenómenos más usuales en otros procesos se ha demostrado recientemente ser también un mecanismo muy importante en el control de las células satélite o células madre musculares (SCs): la **autofagia**. En concreto, este mecanismo es esencial para mantener la quiescencia de las SCs de ratones¹⁴⁶. Fallos en la autofagia de dichas células (cuando son jóvenes) conducen a una rápida senescencia de las mismas; si se reestablece, las SCs revierten este proceso y restauran su función regenerativa. Esta autofagia basal también se ha demostrado que decae en SCs de pacientes en edades avanzadas, por lo que este proceso es decisivo en el mantenimiento de la población. El estudio abre un campo enorme para terapias regenerativas

musculares para muchas enfermedades y en otros procesos inherentes al envejecimiento, como la sarcopenia¹⁴⁶.

3.3 MARCADORES COMUNES EN ASCs

Una de las estrategias más utilizadas en la identificación de nuevas ASCs es mediante la utilización de marcadores proteicos que las diferencien del resto de células diferenciadas presentes en el tejido. Parece ser que algunos factores de transcripción muy presentes en el desarrollo embrionario también lo estarían en las ASCs de algunos tejidos.

Sox2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de genes SOX que se identificó junto con el descubrimiento del factor determinante del sexo en mamíferos, Sry (*Sex-determining region Y*)^{147,148}. Se hablará más en detalle en el apartado específico para esta proteína.

Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*), también conocido como POU5F1 (*POU domain, class 5, transcription factor 5*), es un factor de transcripción implicado en el mantenimiento de la pluripotencia de células madre embrionarias (ESC)¹⁴⁹ y el desarrollo embrionario. Oct4 controla importantes puntos de no retorno para formar el epiblasto y los diferentes precursores del endodermo^{150,151}. Oct4 también es uno de los reprogramadores centrales para la formación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, *induced pluripotent stem cells*) y también conocido como uno de los 4 factores de Yamanaka¹⁵². En tejidos adultos se han encontrado poblaciones de células Oct4 positivas en los folículos pilosos¹⁵³ o en el endometrio humano¹⁵⁴.

Klf4 (*Krüppel transcription factor 4*) es un factor de transcripción caracterizado por tener en su estructura 3 motivos de dedos de Zinc en la secuencia carboxiloterminales¹⁵⁵ y es una proteína muy implicada en diversos procesos celulares como el crecimiento celular, proliferación y diferenciación. Su regulación se produce tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional. Varios estudios muestran que la hipermetilación de Klf4 en su promotor y la metilación de algunas histonas modulan su actividad en varios tipos de cáncer^{156,157,158}. *Micro-RNAs* también son importantes moduladores de Klf4 en células madre y progenitoras, en la reorganización del sistema cardíaco y en procesos de tumorigénesis^{159,160,161}.

No podemos hablar de estos 3 factores de transcripción sin tener en cuenta **Nanog**; junto con Sox2, Oct4 y Klf4 forman lo que se conoce como “factores de Yamanaka”, las cuatro proteínas esenciales para que células diferenciadas se conviertan en células pluripotentes capaces de generar cualquier tipo de tejido, las llamadas iPSCs (*induced Pluripotent Stem cells*)¹⁵².

Existen muchos marcadores asociados a ASCs, aunque pocos son comunes a más de un tejido adulto. Además, dependiendo del estado de diferenciación en el que se encuentren, las ASCs pueden ir perdiendo marcadores y ganando otros progresivamente a la vez que se produce dicha diferenciación¹⁶². Se ha demostrado que distintos niveles en la expresión de CD150 y cKit determinan diferentes poblaciones de HSCs¹⁶³. Las células madre epiteliales del folículo piloso (HFSCs, *Hair follicle stem cells*) se caracterizan por presentar altos niveles de integrinas ($\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 3\beta 1$), keratinas (K5, K14 y K15) y otros marcadores de superficie celular como CD34, Lgr5 o TCF4 (*T-cell factor 4*)^{164,165,166}. Estas células también expresan factores de transcripción tales como SOX9 o LHX2 (*LIM homebox 2*); estudios de pérdida de función muestran que estos factores son esenciales para mantener las características de célula madre en estas poblaciones^{167,168,169}. En intestino de ratón, una proteína antes mencionada, Lgr5, es el principal

marcador de las ISCs (localizadas en la parte inferior de la cripta)¹²⁵. A pesar de las grandes diferencias entre las IPSs y las HFSCs, comparten marcadores como el ya mencionado *Lgr5* y otros como *SOX9* y *TCF4*. También comparten rutas de señalización como la que implica a *BMP* (que promueve la quiescencia de estas células) o *Wnt* (crucial para la activación de las ISCs)^{170,171}. Las células satélite del músculo (SCs) presentan a *PAX7* (*Paired box protein 7*) como su marcador por excelencia^{172,173}, aunque también se utilizan otros marcadores celulares para aislarlas como *CD34* (del que ya hemos hablado en las HFSC) o *CXCR4*¹⁷⁴. Por último, en los nichos del SNC también podemos encontrar algunos marcadores ya mencionados como *Sox2*, proteína que no deja de expresarse hasta etapas tardías del proceso de diferenciación de las ASCs en cerebro; otros marcadores específicos que caracterizan a estas células son *GFAP* (*Glial fibrillary acidic protein*) y *Nestin*¹⁷⁵.

Algunas enzimas implicadas en el metabolismo de las hormonas tiroideas también están muy presentes en nichos de células madre ya descritos y juegan un papel clave en su regulación. Este es el caso de las enzimas *DIO2* y *DIO3* presentes en las SCs encargadas de la regeneración del músculo. Al principio no se dio mucha importancia a la función de estas dos desyodasas ya que su expresión en el tejido es muy pobre, pero más adelante se observó que están altamente expresadas en las células madre musculares. Concretamente, la expresión de *DIO2* aumenta en los primeros pasos en la diferenciación de las SCs y su actividad catalítica es esencial para la correcta formación y fusión de nuevas miofibrillas, como se demostró en ratones *DIO2-knockout* en los que se producía un retraso agudo en estos procesos de diferenciación. *DIO3*, en cambio, se expresa en fases todavía más tempranas ya que es esencial para la inactivación de la T_3 , proceso esencial en la proliferación previa diferenciación de las SCs¹⁰⁷.

3.4 ASCs EN ÓRGANOS ENDOCRINOS

Han sido muchas las evidencias de poblaciones de ASCs en los diferentes órganos endocrinos. En algunos como el hipotálamo o la hipófisis estas poblaciones ya están muy bien caracterizadas y estudiadas; en otros, como el páncreas o la tiroides, no se han encontrado muchas evidencias que apoyen la existencia de nichos de células encargados de su renovación y mantenimiento.

La hipófisis es el principal componente del sistema endocrino ya que regula el metabolismo, la reproducción, la respuesta al estrés, el crecimiento y otras muchas respuestas fisiológicas a través de la secreción de diversos tipos de hormonas^{169,176}. Un gran número de trabajos han estudiado y caracterizado poblaciones de ASCs en la glándula. En 2005 se publicó el primer trabajo que describía la existencia de células madre en la adenohipófisis; en él se describe una población positiva para *OCT4*, *Nanog* y *Scal* con capacidad para bombear el Hoescht fuera de la célula y que forman clones de esferas en cultivo¹⁷⁷. En 2008, se propuso una población *Sox2+* en hipófisis de ratón que generaba esferas en cultivo mezcladas con células diferenciadas. En 2009, nuestro grupo demostró tanto en ratones como en humanos que ese nicho de ASCs localizado en la adenohipófisis coexpresaba tres de los cuatro factores de Yamanaka (*Sox2*, *Oct4* y *KLF4*) junto a dos marcadores muy específicos, *GFR α 2* (*GDNF Family Receptors α -2*) y *Prop1* (*Prophet of Pit1*), además de otros como β -Catenina y E-cadherinas de una manera muy característica, sugiriendo una polarización del nicho¹²⁸. Estas células también eran capaces de formar esferas en cultivo que pueden ser diferenciadas en células productoras de distintos tipos de hormonas hipofisarias¹²⁸. Desafortunadamente, las células *Scal* eran también *Sox2+*, aunque no se correspondían con las ASCs hipofisarias y el mismo grupo que las había propuesto recapituló después sumándose a las evidencias del nuestro con marcadores como *Sox2*, *Sox9*, *CD34* y *CD133*¹³¹.

El córtex adrenal, lugar por excelencia donde se producen los compuestos esteroideos, libera glucocorticoides encargados de regular el metabolismo de la glucosa o las respuestas al estrés o la inflamación y mineralocorticoides, implicados en el control del volumen extracelular de fluidos, en el metabolismo del Na^+ y están muy implicados en el control de la presión sanguínea. Se han identificado células en esta glándula endocrina capaces de autorrenovarse mediante el uso de ratones transgénicos¹⁷⁸. Más adelante se describieron células *Gli1(+)* (*Zinc finger protein Gli1*) alojadas en los compartimentos capsular y subcapsular del córtex de ratones¹⁷⁹ y ratas¹⁸⁰. Las células más cercanas al límite con el córtex pueden perder su respuesta a SHH (*Sonic Hedgehog*) y adquirir la expresión de *Sf1* (*Steroidogenic factor 1*) (ya descrito como esencial para el desarrollo de la glándula durante la embriogénesis¹⁸¹). Estas células progenitoras pueden convertirse en células maduras de las diferentes capas que conforman el córtex adrenal: pueden migrar a la Zona Glomerulosa (ZG) y secretar aldosterona o a la Zona Fascicular y Reticular (ZF) y convertirse en célula secretora de glucocorticoides¹⁷⁹.

En el testículo el proceso de formación de espermatozoides a partir de células progenitoras está bien identificado. Según la teoría actual, conocido como el modelo "As", existen 3 tipos de células Tipo A clasificadas según su morfología (que representaría su estado de diferenciación): células As (células aisladas), Apr (cadenas de dos células conectadas) y Aal (cadenas de 4, 8, 16 o más células). Las SSCs serían las células As (que no sobrepasarían el 0,03% de la población total) que se dividen en 2 células hijas Apr las cuales se dividen para dar lugar a células Aal^{182,183}. Las espermatogonias Aal son la fuente de los espermatozitos primarios que darán mediante divisiones haploides, en última instancia, los espermatozoides maduros¹⁸⁴.

En el ovario se pensó durante muchísimos años que los individuos nacen con todos los oocitos formados que irán liberando durante su vida; sin embargo, en 2004, investigadores cambiaron este concepto ya que observaron que el número de folículos sanos y atrésicos de ratones hembras no cuadraba con la teoría actual. Así se empezó a asentar la teoría de que podría haber células madre germinales femeninas (FGSCs, *Female germline stem cells* y también conocidas como OSCs, *oogonial stem cells*)¹⁸⁵. Más adelante un grupo de investigadores identificaron FGSCs en ratones neonatos y adultos mediante inmunofluorescencia analizando la incorporación de BrdU (Bromodeoxiuridina). Después consiguieron aislar estas células y mantenerlas en cultivo durante dos meses mientras que expresaban marcadores de línea germinal. El marcaje de estas poblaciones celulares mediante GFP y su implantación en ratones estériles demostró mediante análisis histológico la presencia de muchos oocitos en diferentes etapas del desarrollo, algunos de ellos marcados con este GFP¹⁸⁶. Mediante el uso de trasplantes intragonadales de las FGSCs se consiguió restaurar la función ovárica y que los ratones pudieran tener crías de nuevo^{186,187,188}.

En el páncreas existen muchos estudios con diferentes teorías acerca de la capacidad de regeneración y de la existencia o no de ASCs en el mismo. Algunos investigadores postulan que la regeneración pancreática ocurre a través de la autorrenovación de sus propias células donde las células β generarían nuevas células β y las demás células acinares harían lo propio ellas mismas^{189,190,191,192} (algo parecido a lo que ocurre en el hígado cuando se produce daño hepático). Estudios más recientes han mostrado una alta heterogeneidad en las células β de los islotes pancreáticos, identificando algunas más inmaduras y con más capacidad proliferativa que otras. Esta diversidad podría explicar por qué algunas células β presentan esa capacidad tan alta de división mientras que otras no^{193,194}. Algunos estudios todavía más actuales describen poblaciones en el tejido ductal del páncreas que son capaces de generar células productoras de insulina en ratones, sugiriendo que existen poblaciones no endocrinas que pueden diferenciarse a productoras de insulina¹⁹⁵.

3.5 ASCS EN TIROIDES

Los primeros estudios orientados en identificar células madre en la tiroides adulta se diseñaron en ratones. En ellos se identificó una pequeña población que expresaban Oct4, nucleostemina y ABCG2 (*ATP-binding cassette transporter G2*) (que más tarde se identificó por su capacidad para bombear el marcador nuclear Hoechst), mientras expresaban marcadores fenotípicos a niveles muy bajos como Tg, el receptor de TSH, TPO o TTF1. A esta población se le denominó *Side Population* (SP)¹⁹⁶.

En humanos se realizaron estudios histológicos y cultivos celulares de bocios que mostraban una población celular también positiva para Oct4 y para otros marcadores de endodermo como Gata4 y HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor α 4*) mientras eran negativos para otros de fenotipo como Tg¹⁹⁷. En base a estos estudios, se aislaron células procedentes de bocios humanos mediante citometría de flujo que mostraban características de ASCs: pequeño tamaño con un núcleo relativamente grande comparado con su citoplasma. También presentaban perfiles de expresión compatibles con poblaciones celulares no diferenciadas. Estas células representaban el 0,1% de la población total y fueron capaces de diferenciarlas *in vitro* en tirocitos maduros mediante tratamientos con TSH (5mU/mL) pero sin previa purificación. Detectaron mediante análisis de RT-PCR los marcadores ADCG2 y Oct4, aunque no fueron capaces, en cambio, de detectarlos mediante FACS; además, esta población era negativa para marcadores de fenotipo tiroideo como Tg, NIS, TSHR y TPO⁹⁶. En 2008, investigadores generaron tirosferas en cultivo a partir de dispersiones celulares de tejido tiroideo humano cultivadas con EGF y BFGF¹⁹⁸. Estas esferas tenían capacidad autorreplicante y eran CD34+ CD45- TSHR-. Algunas de estas esferas ya eran positivas para hormonas antes de la diferenciación mientras que otras eran negativas. Eran capaces de producir hormonas tiroideas cuando se las trataba con medio de diferenciación pero el propio medio contenía suero bovino que contiene T₄¹⁹⁸. También se diferenciaban a adipocitos o células β 3-tubulina clase III positivas, sugiriendo quizá una mezcla de poblaciones¹⁹⁸.

Otros estudios basados en tiroidectomías parciales en ratones mostraron regiones proliferativas en ambos lóbulos. Se diseñaron microarrays posteriores que revelaron rutas de señalización embriogénicas que sugerían la existencia de células madre o progenitoras residentes en la glándula. La hormona T₄, que disminuía sus niveles después de la tiroidectomía, recuperaba sus niveles fisiológicos en unas semanas; acorde con esto se detectaron aumentos en los niveles de TSH en los días posteriores a la intervención quirúrgica¹⁹⁹. Estos estudios, sin embargo, no aclaraban si la regeneración de la tiroides venía de una población de ASCs, del propio epitelio tiroideo activado o de una población ajena no residente en la tiroides.

Otros trabajos se centraron en observar la capacidad regenerativa de la glándula en patologías como la tiroiditis autoinmune (EAT, *Experimental Autoimmune Thyroiditis*). Utilizando ratones a los que se les reprodujo esta patología, detectaron niveles muy altos del marcador CD24 durante la reparación del tejido y niveles también elevados de Oct4 a los 100 días posteriores al EAT. Intentaron demostrar que CD24 es esencial para la regeneración de la tiroides en ratones CD24 *null*, pero encontraron que la capacidad regenerativa era aún mayor. La conclusión a la que llegaron fue que, probablemente, el aumento de los niveles de CD24 era debido a la alta infiltración de linfocitos circulantes que se producía cuando se inducía la enfermedad a los ratones²⁰⁰.

Estudios de inmunofluorescencia en tejidos de bocios humanos observaron la presencia de algunas células Oct4 positivas, así como de células Oct4+/Gata-4+/HNF4 α en cultivos celulares derivados de bocios humanos adultos, sugiriendo la presencia de células precursoras de endodermo¹⁹⁷. También se ha descrito una *Side Population* (SP) en humanos con una ratio

elevado núcleo/citoplasma (típico de célula madre), siendo positivas para Oct4 y que conformaban el 0,1% de la población total. Además, dicha población era más elevada en bocios que en tiroides normal. Sin embargo, la SP no expresaba los marcadores de célula precursora de endodermo antes mencionados (Gata-4 o HNF4 α), ni tampoco factores de diferenciación tiroideos como Tg, NIS, TPO o TSHR (que sí fueron detectados en la población de tejido restante). La SP era capaz de crecer y formar folículos en presencia de colágeno, añadiendo al medio EGF y FGF. Estos folículos estaban formados de hasta el 5% de células ABCG2+/Oct-4+ (población SP) o Gata-4+/HNF4 α (población no SP), ambas denominadas células madre tiroideas en este trabajo. En respuesta a suero y a TSH, las células *in vitro* comenzaban a expresar marcadores de fenotipo tiroideos (Pax8, NIS, TPO, TSHR y Tg) y dejaron de expresar los marcadores de célula progenitora de endodermo y de *stemcell*⁹⁶.

3.6 CANCER STEM CELLS (CSCs) EN TIROIDES

Las CSCs son grupos de células presentes en muchos tipos de cáncer que, por sus características (patrones de comportamiento y expresión de marcadores), se cree que son las responsables del crecimiento y mantenimiento de la mayoría de los tumores. Además, muchas de ellas parecen ser las más resistentes a tratamientos con quimioterápicos.

La existencia de CSCs en tiroides no ha sido demostrada, pero hay muchas evidencias que apoyan esta teoría. Así, existen tres teorías para explicar el origen de las CSCs en tiroides:

- Los tirocitos diferenciados, a través de una serie de mutaciones, adquieren la capacidad de desdiferenciarse (probablemente mediante una transición de célula epitelial a célula mesenquimal) y formar estas CSCs^{201,202}.
- Otra propuesta es que las CSCs provienen de células embrionarias residuales, que tienen marcadores de célula madre y que residen en nichos sólidos en la glándula^{201,203}.
- La tercera teoría y la más apoyada es que estas CSCs provienen de ASCs propias de la tiroides que, mediante una serie de mutaciones, pierden su capacidad reguladora y comienzan a crecer sin control²⁰⁴. Esta última teoría es la más aceptada ya que combina el concepto de CSCs con el modelo de que múltiples mutaciones genéticas conducen a cáncer. Además, esta teoría explicaría por qué en los estudios de los subtipos de cáncer de tiroides más agresivos se encuentran más alteraciones genéticas, lo que se traduce en un comportamiento más agresivo.

Hay estudios que evidencian una relación entre la vía de Wnt con las CSCs en tiroides; con esto además se quiere explicar la mayor tasa de cáncer en mujeres que en hombres, ya que se piensa que la vía de Wnt también puede ser activada a través de los estrógenos. Algunos estudios observan que los estrógenos circulantes incrementan las patologías tiroideas en mujeres a través de la activación de la ruta de PI3K y la consecuente represión de p27²⁰⁵. Estos trabajos creen que los estrógenos podrían ser reguladores de la función de las CSCs, ya que observan una mayor formación de tirocitos en cultivos de bocios humanos comparado con tiroides normal, en presencia de 17 β -estradiol (E2), aunque no se describe muy bien cómo definen o generan dichas tirocitos. Otro mecanismo por el que los estrógenos estarían implicados en las diferencias en cuanto a sexo de la prevalencia de estas patologías es mediante la vía de Wnt, ya que se han descrito conexiones entre las β -cateninas y el receptor ER- α . Concretamente, este grupo demostró que estas dos proteínas son capaces de formar inmunocomplejos, además de ser reclutados recíprocamente a los promotores de sus genes diana²⁰⁶. En base a estos estudios, otros sugieren que la estimulación vía E2 se asocia con el

incremento en los niveles de β -catenina, así como con el incremento de la invasión y migración de tumores tiroideos²⁰⁷.

En los intentos de identificar la población responsable del crecimiento y resistencia de los tumores tiroideos, algunos investigadores han aislado pequeñas poblaciones celulares provenientes de PTCs (cáncer papilar de tiroides, el más común) a las que llamaron esferas tumorales. Estas esferas podían crecer *in vitro* indefinidamente y eran mucho más resistentes a los quimioterápicos que el resto de la población tumoral²⁰⁸. En otros estudios utilizaron líneas celulares cancerosas y cultivos celulares de pacientes con cáncer de tiroides para postular la presencia de CSCs. En ambos, observaron pequeñas poblaciones celulares que eran capaces de retener tinciones nucleares (característico de CSCs) y que expresaban el marcador SSEA-1 (*Stage-specific Embryonic Antigen 1*), además de otros marcadores de célula madre como Oct4, Sox2 y Nanog. También observaron que eran resistentes a los agentes quimioterápicos y tenían capacidad multipotente²⁰⁹.

Para terminar, también hay estudios intentando relacionar la población SP encontrada en tejido de tiroides de ratón con las CSCs. Mediante *microarrays* de tejido en ratones, observaron que la expresión de la proteína estaniocalcina 1 (STC1) estaba presente en la población SP y ausente en la población no-SP, por lo que decidieron estudiar su expresión en líneas celulares humanas y de ratón derivadas de cáncer de tiroides. Así, demostraron una alta expresión de STC1 tanto en líneas celulares cancerosas de humanos como de ratón; el patrón de expresión de STC1 se correlacionaba inversamente con el estado de diferenciación de cada célula²¹⁰.

En resumen, todos los estudios publicados hasta ahora proponiendo la existencia de ASCs parenquimatosas en tiroides normal de modelos de roedor o en humano o en hiperplasia son de calidad media y poco mecanísticos. Las poblaciones no se han purificado ni caracterizado suficientemente con métodos aceptados en el campo de las stem cells y no ha habido un rastreo de estas poblaciones en la tiroides de modelos animales. Se sabe que la metodología en el campo de las células madre es muy importante ya que hay muchas poblaciones de células madre que engloban células endoteliales, mesenquimales y neurales además de las epiteliales parenquimatosas.

Frente a la existencia de ASCs, la otra posibilidad propuesta es que el propio epitelio tiroideo es capaz de responder a la acción de TSH proliferando durante toda la vida y no necesita de ASCs. El epitelio tiroideo en condiciones normales tiene un bajo índice de proliferación y se calcula que cada célula se divide sólo cinco veces a lo largo de a vida del individuo²¹¹. Pero como se ha comentado más arriba, es posible que algunas poblaciones epiteliales diferenciadas, como las intestinales, se desdiferencien cuando hay una herida grave y retomen marcadores de células stem, comportándose como tales para la reparación tisular²⁰⁴.

4 SOX2

4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Sox2 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de genes *SOX* que se identificó con el descubrimiento del factor determinante del sexo en mamíferos, Sry (*Sex-determining región Y*)^{147,148}. Sry tiene un dominio característico de alta movilidad (HMG, *High-movility group*) que se une al ADN de manera muy específica. Básicamente, cualquier proteína que contenga un dominio HMG con una secuencia de aminoácidos que comparta, al menos, un 50% con la secuencia del HMG de Sry pertenecen a la familia SOX (*Sry-related HMG box*). Existen 20 genes diferentes de *SOX* entre humanos y ratones, los cuales se clasifican en diferentes grupos

de la A a la H²¹². *SOX2* es miembro de la familia *Sox2B1* y es el miembro mejor estudiado de esta. Funcionalmente, Sox2 está involucrado en pluripotencialidad, determinación del destino celular y cáncer.

Sox2 regula la autorrenovación en células madre embrionarias (ESCs) tanto de humano como de ratón. También es muy importante para el mantenimiento de la capacidad pluripotente de muchas ASCs, como ocurre en el SNC o en la piel; además es uno de los factores críticos para generar las IPSs mediante el cóctel de Yamanaka¹⁵².

La expresión ectópica de este factor de transcripción se ha asociado con la aparición y desarrollo de distintos tipos de cáncer en tejidos adultos como el de mama o el de pulmón²¹³.

4.2 FUNCIONES DE SOX2 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE DIFERENTES TEJIDOS

Sox2 se expresa inicialmente en el trofoectodermo y en el blastocisto, aunque más adelante quedará restringido a este último²¹⁴. Si este factor de transcripción se elimina en el cigoto, se produce una muerte repentina del embrión debido a fallos en la formación del epiblasto²¹⁵. Después de la gastrulación, Sox2 se vuelve a restringir y solo se expresa en ciertos tejidos: neuroectodermo, arcos braquiales, endodermo del tracto digestivo y células germinales primordiales^{215,216,217}.

A parte de la importancia de Sox2 en el sistema nervioso, también está muy presente en el desarrollo de otros muchos órganos. En el desarrollo del sistema sensorial, Sox2 es clave para el desarrollo del oído interno ejerciendo de mediador en la señal por Notch, lo cual sugiere que el destino de cada célula en este órgano es definido por Notch y, a su vez, regulado por Sox2. Además, Sox2 actúa como señalizador, enviando señales a varios efectores con funciones críticas en el desarrollo de este sistema²¹⁸. En la lengua, Sox2 se expresa en las células epiteliales basales para regular la diferenciación de células progenitoras de endodermo en células sensoriales del gusto o en diferentes tipos de keratinocitos²¹⁹.

Sox2 también se expresa en el endodermo que origina el tracto digestivo, el esófago y la parte anterior del estómago, donde este factor de transcripción se expresa a altos niveles. Tiene un papel crítico en los límites para la formación del epitelio escamoso del esófago y estómago anterior y la parte granular del estómago posterior de manera directa o indirecta, reprimiendo genes en el epitelio²²⁰.

Durante el desarrollo de la piel, Sox2 se expresa inicialmente en células mesenquimales llamadas en este caso “condensados dermales”, precursores del folículo piloso que formarán de manera eventual vainas y papilas dermales²²¹.

4.3 SOX2 ES ESENCIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE LA CAPACIDAD “STEM” DE LAS CÉLULAS.

Estudios *in vitro* demostraron que la delección de parte del gen de Sox2 resulta en una diferenciación muy temprana de las células asociadas al trofoectodermo, indicando que Sox2 es esencial para el mantenimiento de las ESCs²²². En etapas tempranas del desarrollo, Sox2 dirige a algunas ESCs en el desarrollo del ectodermo, mientras que Oct4 y Nanog promueven la diferenciación de las ESCs a mesodermo²²³.

En el SNC, concretamente en la retina, Sox2 controla la proliferación y diferenciación de sus células mediante la activación directa del gen Notch²²⁴. La pérdida de expresión de Sox2 en células progenitoras de la retina detiene la proliferación y estimula la diferenciación, mientras que un desequilibrio en sus niveles de expresión conduce a patologías como la microftalmia²²⁵.

En algunos casos, Sox2 también promueve la diferenciación celular. En la formación de oligodendrocitos, Sox2 estimula el aumento de los niveles de expresión de miR145, que inhibe la aparición de determinados factores de diferenciación para favorecer así la expresión de otros, lo que se traduce en última instancia en la formación de los oligodendrocitos²²⁶. En células de Schwann, Sox2 estimula la mielinización de axones en el Sistema Nervioso Periférico²²⁷. En los últimos años se ha demostrado que Sox2 también es clave en los procesos de mielinización y remielinización en la etapa adulta, ya que es un regulador esencial para las OPCs (*oligodendrocytes precursor cells*). Si se elimina selectivamente este factor de transcripción en las OPCs, disminuye su densidad y el número de OPCs proliferantes, así como la cantidad de nuevos oligodendrocitos²¹¹.

En 2011 realizaron un mapeado con algunos órganos para evaluar la expresión de Sox2 en tejidos adultos²²⁸. Confirmaron la expresión del factor de transcripción en algunas zonas del cerebro, la retina, lengua, tráquea y epitelio bronquial. La expresión de Sox2 también en testículo, cérvix, estómago glandular y epitelio escamoso fue totalmente inesperado. Para comprobar la importancia de Sox2 en estos tejidos, generaron un modelo de ratón en el que se producía la ablación del gen de Sox2 en un mecanismo inducido por TAM. Esto condujo a una apoptosis masiva de células Sox2+, con efectos dramáticos en la homeostasis de los tejidos que tenía como consecuencia la muerte del ratón a las dos semanas de vida. De esta manera se comprobó la importancia de Sox2 para el mantenimiento de muchas ASCs²²⁸.

Como ya dijimos, Sox2 es un marcador diferencial para las ASCs localizadas en la SVZ y SGZ del cerebro¹²². Cuando se elimina la expresión de esta proteína se altera la autorrenovación y proliferación de las NSCs, ya que estimula la salida del ciclo celular y, en consecuencia, diferenciación²²⁹. La glía de Müller se considera que son las NSCs de la retina, ya que pueden reentrar en ciclo celular y mantener el potencial de diferenciación de neuronas en adultos. La expresión de Sox2 en este tipo celular en la etapa postnatal mantiene sus características progenitoras, por lo que se deduce que la expresión de Sox2 en la glía de Müller después del nacimiento es crucial para promover la quiescencia de estas células²³⁰. En estudios más recientes se ha demostrado que el número de células de Müller Sox2 positivas disminuye con el envejecimiento y que la haploinsuficiencia de Sox2 causa pérdida de visión en ratones. Además observan que Sox2 es esencial para la transmisión de la información entre conos y bastones, lo que sugiere que esta proteína sería crucial en el envejecimiento de las células que forman la retina²³¹.

El nicho de células madre descrito en hipófisis (células GPS, llamadas así por la coexpresión de GFR α 2 y Prop1 y por su capacidad *Stem*) también expresa Sox2 como factor de transcripción esencial para el mantenimiento de este nicho, junto con Sox9 y Oct4. En este caso, aún siendo Sox2 esencial para el mantenimiento del nicho, no es exclusivo del mismo, ya que también se expresa en células diferenciadas¹²⁸. Este hallazgo es otra prueba más de que los nichos se definen por la coexpresión de un conjunto de marcadores que, separados, pueden estar presentes en células madre en diferentes estados de diferenciación o incluso en células ya diferenciadas. Estudios de rastreo celular en los que se utilizaron modelos de ratón similares a los de este trabajo demuestran que, durante el desarrollo, las diferentes líneas celulares que se forman en la hipófisis provienen de células Sox2-Sox9 positivas alojadas en el nicho. En ratones adultos, este nicho puede movilizarse y diferenciarse en el tipo de célula endocrina que se requiera en ese momento²³².

4.4 REGULACIÓN DE SOX2

En las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso, los niveles de expresión de Sox2 son críticos para el destino neuronal de varias poblaciones de ESCs. STAT3 regula directamente la expresión de Sox2 y, entre ambos, regulan a su vez la de Nestina, lo cual conduce al compromiso de las ESCs a convertirse en progenitoras del sistema nervioso²³³. La expansión de estos progenitores neuronales también se regula mediante Sox2, pero en este caso a través de un *loop* de EGFR-Sox2-EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) que estimula la división de estas células en el desarrollo de embriones de ratón²³⁴. En cerebro adulto de ratones se encontró que los reguladores de ciclo celular E2f3a y E2f3b regulan a su vez los niveles de Sox2, controlando así la proliferación de NSCs²³⁵. El represor p21 se une al promotor de SOX2 en NSCs y directamente anula su expresión; de manera inesperada, el aumento de la expresión de Sox2 en ratones *K.O.* para p21 se traduce en daño al ADN con la consiguiente aparición de genes supresores de tumores como p53 o p19arf, lo cual provoca mecanismos que promueven senescencia de las NSCs^{235,236}.

Factores extrínsecos presentes en el microambiente pueden regular también la expresión de Sox2. La hipoxia, por ejemplo, es conocida como un factor activador en la expresión de Sox2; como resultado, se produce una activación de CD133 que conduce a cáncer de pulmón²³⁷.

Se han identificado 3 sitios donde Sox2 puede ser fosforilado: S249, S250 y S251. También se ha comprobado que esta fosforilación promueve la sumoilación, evitando así la unión de la proteína con el ADN^{238,239}. Los resultados sobre las consecuencias de estas modificaciones postranscripcionales son confusos ya que algunos estudios afirman que la fosforilación de Sox2 aumenta la eficiencia en la inducción de iPSCs²⁴⁰, lo que resultaría contradictorio.

Se identificó un residuo de lisina acetilada como responsable de la translocación de Sox2 del núcleo al citoplasma. Bloqueando la acetilación de esta lisina se produce la retención de Sox2 en el núcleo, sosteniendo su expresión en los genes diana²⁴¹.

Por último, se ha encontrado un nuevo regulador esencial para Sox2 que podría tener muchas implicaciones en el futuro: PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase I), proteína con funciones esenciales en la remodelación de la cromatina y los sitios accesibles de la misma; también funciona como enzima para varias modificaciones postranscripcionales. En este trabajo se demuestra que PARP1, además de sus funciones ya descritas, actúa como regulador para muchos procesos transcripcionales en los que está implicado Sox2, proponiendo una nueva forma de unir este factor de transcripción al ADN²⁴². Así, Sox2 ya no solo se uniría al DNA a través de sus motivos de unión típicos, sino que se abriría un campo totalmente nuevo en el que Sox2 podría interactuar con muchas otras regiones de la doble cadena.

4.5 MOLÉCULAS REGULADAS MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE SOX2

Desde el descubrimiento de esta proteína, aunque muchos estudios se han centrado en identificar reguladores de la misma, otros lo han hecho en los mecanismos que esta molécula es capaz de regular. Las moléculas clave para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las ESCs, como son Oct4, Nanog o DPPA4 (*Developmental pluripotency Associated 4*) están reguladas directamente por Sox2²⁴³.

Recientemente se ha demostrado que Sox6, una proteína de la subfamilia SoxD implicada en la regulación de los precursores de los oligodendrocitos, es una diana directa para Sox2 en el SNC. Estudios realizados *in vivo* en ratones confirmaron a Sox6 como diana molecular de Sox2; juntos forman un complejo que se encarga de inhibir la diferenciación prematura durante la neurogénesis²⁴⁴.

Sox2 controla el nicho de NSCs en el hipocampo de ratones neonatos manteniendo su supervivencia mediante mecanismos paracrinos regulando directamente SHH²⁴⁵. Otros estudios

apoyan esta idea del papel clave de Sox2 en la supervivencia de las NSCs. Por ejemplo, se ha identificado que Sox2 activa la expresión de un gen llamado *survivina*, miembro de la familia IAP (*Inhibitor of apoptosis*), para prevenir la muerte programada de las NSCs mediante la interacción con XIAP (*X-linked IAP*), otra proteína de la familia IAP²⁴⁶.

También se han demostrado interacciones entre Sox2 y β -catenina para estimular la expresión de la Ciclina D1 en células de cáncer de mama, promoviendo también la proliferación celular y la tumorigénesis²⁴⁷. Estos hallazgos fueron apoyados posteriormente mediante otros estudios que afirmaban que la propia β -catenina es capaz de aumentar la propia expresión de Sox2¹.





OBJETIVOS





Se han descubierto células madre adultas en la mayoría de los órganos endocrinos. Sin embargo, en la tiroides, aunque se han propuesto, no están caracterizadas como una verdadera población epitelial parenquimatosa que contribuya a la renovación fisiológica durante la vida cotidiana postnatal, y que se active ante situaciones de requerimiento funcional. Los estudios publicados hasta ahora proponiendo la existencia de ASCs parenquimatosas en tiroides normal de modelos de roedor o en tejidos humanos procedentes de tiroides normal o con hiperplasia son de calidad media y poco mecanísticos. Las poblaciones no se han purificado ni caracterizado suficientemente con métodos aceptados en el campo de las *stem cells* y no ha habido un rastreo de estas poblaciones en la tiroides de modelos animales. Se propone incluso que sea el propio epitelio tiroideo el que tenga capacidad plástica para responder ante eventos donde se requiera un aumento de la celularidad de la tiroides.

SOX2 es el marcador más universal que se expresa en células madre postnatales. su expresión *per se* no es exclusiva de las células madre, pero su coexpresión con otros marcadores de células madre caracteriza a muchas de las poblaciones ASCs de los distintos tejidos.

Basándonos en nuestra experiencia previa en el descubrimiento y caracterización de las células madre de la hipófisis como células GPS que coexpresan SOX2, y conociendo la interrelación tan precisa que existe entre los órganos de los ejes endocrinos y la respuesta coordinada que existe entre el hipotálamo, la hipófisis y la tiroides en condiciones basales, pero también de hipotiroidismo primario, esta tesis propone los siguientes objetivos:

1. Identificar, si existe, una población de células SOX2 positivas en la glándula tiroides de ratones adultos de diferente sexo y edad. Localizar la distribución de dichas células dentro de la propia glándula, cuantificarlas y comparar la expresión de los marcadores fenotípicos tiroideos entre esta población y los tirocitos maduros.

2. Establecer modelos fiables de requerimiento celular funcional en la glándula tiroides con el fin de estudiar el comportamiento de las células SOX2 en dichas condiciones y comprobar su capacidad para regenerar el epitelio folicular mediante su división y diferenciación a tirocito funcional productor de tiroglobulina.

3. Establecer un modelo de rastreo de las células SOX2 a través del tiempo y aplicarlo al estudio de la implicación de la población SOX2 en el crecimiento de la glándula desde el momento del nacimiento en ratones neonatos, así como los requerimientos funcionales de la misma en modelos de ratones hipotiroideos y hemi-tiroidectomizados.

4. Estudiar la capacidad de las células SOX2 para formar “tiroferas” *in vitro*, es decir, esferas formadas por células a partir de dispersiones celulares de tiroides de ratón. Realizar estudios funcionales sobre su capacidad de renovación y de diferenciación a células que expresan tiroglobulina.

5. Estudiar si existe una población similar SOX2 en cultivos primarios de tiroides humano, provenientes de tejido normal y de la hiperplasia más frecuente, el bocio multinodular



MATERIALES Y MÉTODOS





1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1.1 ASPECTOS ÉTICOS DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los procedimientos realizados con animales fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité bioético de la Universidad de Santiago de Compostela (procedimiento de la Profesora Clara Álvarez Villamarín: 15003/14/005) y siguiendo la normativa vigente:

- ❖ Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE de 12 de junio de 2013).
- ❖ Decreto 296/2008 del 30 de diciembre, relacionada con la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios, así como la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.
- ❖ Directiva 2010/53/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre, adoptaron la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- ❖ Real decreto 53/2013 del 6 de junio, en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- ❖ Orden ECC/566/2015 del 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Durante el desarrollo de este trabajo se han tenido en cuenta el bienestar animal, intentando reducir el estrés, el dolor o el daño duradero en los animales. De acuerdo con artículo 4 del real decreto 53/2013, se implementa el Principio de las “3 erres”, es decir, reemplazo, reducción y refinamiento de los procedimientos. De esta manera se ha intentado reducir el número de experimentos realizados con animales y evitando el uso innecesario de animales dentro de los mismos, sin que afecte o comprometa el resultado de los experimentos.

Para poder llevar a cabo los experimentos con animales se obtuvo el título correspondiente: Curso de Experimentación Animal Categoría B según RD1201/2005, RD 53/2013 y 2010/63 UE, acreditado por la Comunidad de Madrid.

1.2 MODELO DE RATÓN B6;129S-SOX2^{TM1(CRE/ERT2)HOCH/J} Y B6-129GT(ROSA)26SOR^{TM2SHO/J}

Para estudiar el comportamiento de las células SOX2 positivas en tiroides de roedores se utilizaron estos dos modelos de ratón genéticamente modificado GMO (*genetically modified organism*) que, cruzados entre ellos, generan un nuevo modelo en el que las células que expresen SOX2 pueden seguirse a lo largo del tiempo gracias al reportador EGFP (proteína verde fluorescente).

Para entender mejor el modelo de ratón obtenido, se hablará primero de sus progenitores (imagen 7):

⇒ **Ratón B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}**

Uno de los dos alelos del gen *Sox2* se sustituye por la lectura para la transcripción de una proteína quimera, CreERT^{T2}. Esta actúa como Cre-recombinasa, una enzima capaz de interactuar con sitios LoxP en el genoma con diferentes resultados dependiendo la disposición y el número de dichas secuencias LoxP. Además, la Cre-recombinasa en este modelo de ratón es inducible por Tamoxifeno (T-5648, Sigma), lo que significa que la enzima Cre solo se activa cuando este compuesto es administrado al animal.

Dado que esta secuencia genómica altera de manera significativa el locus del gen *Sox2*, los ratones mutantes homocigotos no son viables ya que SOX2 es una proteína esencial en el desarrollo del individuo. Por tanto, estos ratones siempre han de mantenerse en heterocigosis.

⇒ **Ratón B6-129Gt(ROSA)26Sor^{tm2Sho/J}**

Este modelo tiene el gen para la proteína EGFP insertado en el locus de un alelo del gen *129Gt(ROSA)26Sor*, un ARN no codificante (ARNnc) expresado en la amplia mayoría de células. Además, posee en su secuencia un codón de *STOP* flanqueado por dos sitios LoxP entre el promotor de *129Gt(ROSA)26Sor* y *EGFP*.

Este modelo puede mantenerse en homocigosis, es decir, con los dos alelos mutados, ya que los ratones generados son viables, fértiles, normales en tamaño y no presentan ninguna anomalía física o de comportamiento.

⇒ **Ratón B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J} ↔ Ratón B6-129Gt(ROSA)26Sor^{tm2Sho/J}**

Este es el resultado del cruce entre los dos modelos de ratón explicados anteriormente. Cuando se administra tamoxifeno al individuo, la Cre-Recombinasa se activa (en aquellas células donde SOX2 se exprese suficientemente) y ejerce una acción de corte y empalme cuando encuentra dos sitios LoxP en la misma cadena de ADN (imagen 7).

Como resultado, el codón de STOP que había entre los dos sitios LoxP se elimina y la proteína EGFP comienza a sintetizarse. Desde el punto de vista fisiológico, esto se traduce en que todas las células que en el momento de la administración de tamoxifeno estén expresando SOX2, comenzarán a producir también EGFP de manera constitutiva y, sobretodo, ya independiente de la expresión de SOX2.

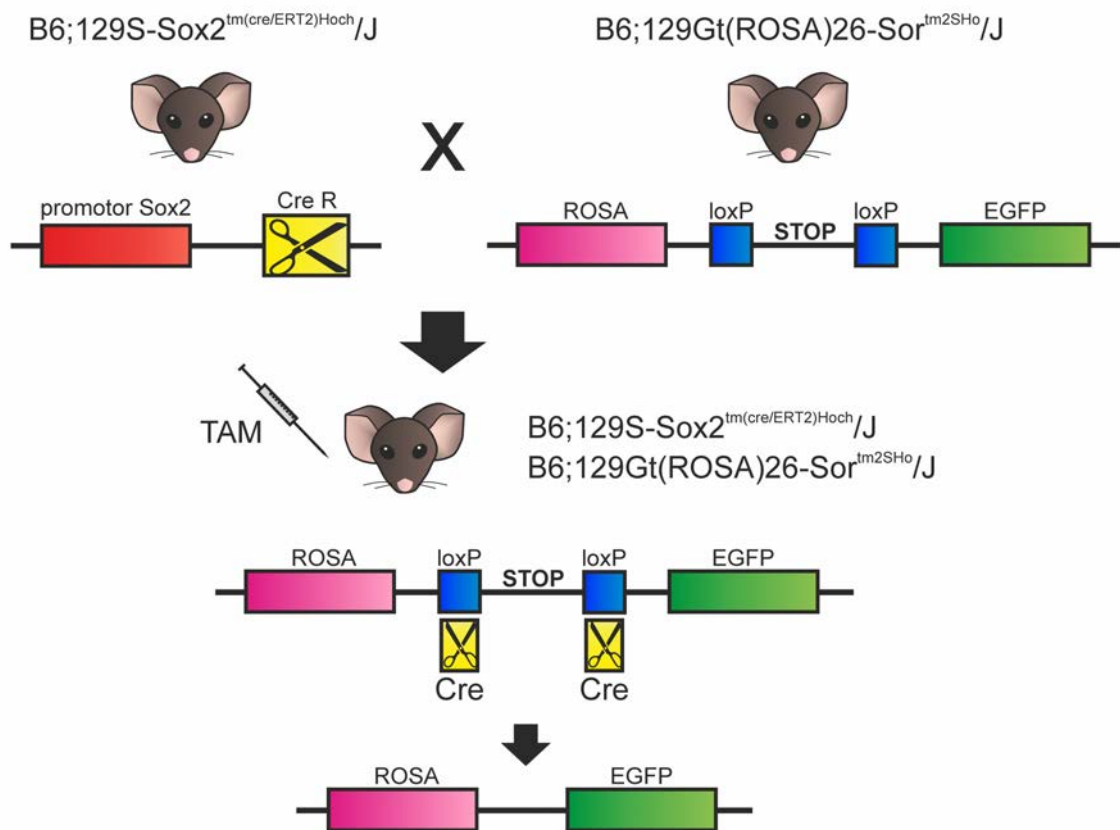


Imagen 7. Esquema simplificado de la generación de ratones GMO dobles mutantes y mecanismo mediante el cual las células Sox2 expresarán la proteína GFP de manera constitutiva mantengan o no la expresión de dicho SOX2. Cuando a un ratón GMO doble mutante se le administra TAM, la Cre-R estará presente sólo en células que expresen SOX2 en ese momento y, por tanto, solo en ellas cortará los dos sitios LoXP para que la proteína EGFP se exprese constitutivamente gracias a su asociación con el promotor fuerte *ROSA26*.

Por tanto, podemos afirmar con seguridad que cualquier célula productora de EGFP o bien expresa SOX2 o bien lo ha expresado en algún momento de su vida.

Los ratones tienen un *background* genético proveniente de ratones *C57BL/6J*, la cepa de roedor más usada en investigación. Por eso, todos los ratones *wildtype* usados como control serán *C57BL/6J*.

1.3 GENOTIPADO DE RATONES

Como ya se explicó previamente en el modelo de ratón GMO, no todos los ratones generados expresan el genotipo de nuestro interés. Para utilizar solo ratones dobles mutantes y, o bien descartar o bien utilizar como control negativo aquellos que no lo sean, se corta un pedazo de cola para su posterior genotipado.

1.3.1 Genotipado para *B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}*

Para este gen en concreto, los ratones que tengan mutado un alelo de *Sox2* (recordemos que los dos mutados hacen que el ratón sea inviable) presentarán una banda de 100pb. La electroforesis se realiza en un gel de agarosa al 3% y el protocolo de la PCR es el que sigue:

- 2.5 μ L buffer 10x
- 0.5 μ L DNTPS 10 Mm
- 0.2 μ L FastGene® Taq DNA Polymerase LS21
- 19.9 μ L H₂O mQ

- 0.5 µL forward 10 µM
- 0.5 µL reverse 10 µM

El cóctel con todos los componentes se introduce en un termociclador (T100™ Thermal Cycler 1861096 BIORAD) y se configura de la siguiente manera (tabla 1):

Tabla 1 Configuración del termociclador para el genotipado de ratones GMO Sox2-Cre

Paso	Temperatura, °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	40
Hibridación	52	30 seg	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	

Los cebadores usados para dicha reacción están formados por estas secuencias de nucleótidos (tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la amplificación del gen en cuestión

Cebadores	Secuencia 5'/3'
Forward	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
Reverse	GTGAAACAGCATTGCTGTCACCT

Aquellas calles que presenten una banda de 100pb corresponderán con individuos mutantes para dicho gen, es decir, poseerán un alelo de *Sox2* con la proteína quimera SOX2-Cre; en las calles donde no se aprecie banda será porque dicho individuo es de tipo *wild type* (imagen 8).

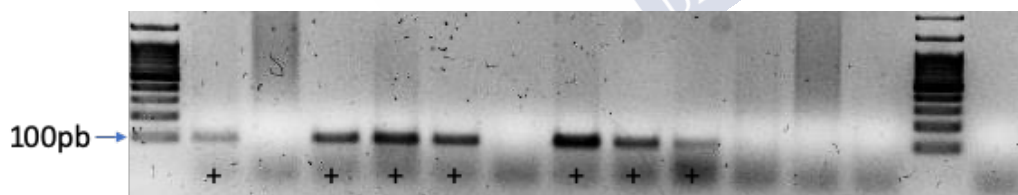


Imagen 8. Imagen de un gel de agarosa correspondiente al genotipado de ratones Sox2-Cre

1.3.2 Genotipado para Ratón B6-129Gt(ROSA)26Sor^{tm2Sho/J}

Este gen, en cambio, puede albergar el constructo LoxP-EGFP en ambos alelos y los individuos serán perfectamente viables; el modelo funciona tanto con un alelo mutado como con los dos. La electroforesis en este caso se realiza en un gel de agarosa al 1,8% y el protocolo de la PCR es similar al anterior:

- 2.5 µL buffer 10x
- 0.5 µL DNTPS 10 Mm
- 0.2 µL FastGene® Taq DNA Polymerase LS21
- 18.8 µL H₂O mQ
- 0.5 µL forward 10 µM

- 0.5 μ L forward 10 μ M
- 1 μ L reverse común 10 μ M

El cóctel con todos los componentes se introduce en un termociclador (T100™ Thermal Cycler 1861096) y se configura de la siguiente manera (tabla 3):

Tabla 3 Configuración del termociclador para el genotipado de ratones GMO LoxP-EGFP

Paso	Temperatura, °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	40
Hibridación	58	30 seg	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	

Los cebadores usados para dicha reacción están formados por estas secuencias de nucleótidos.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del gen en cuestión

Cebadores	Secuencia
Forward mutante	3'-AAGACCGCGAAGAGTTTGTC-5'
Forward <i>wild type</i>	3'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-5'
Reverse común	3'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-5'

Como se puede observar en la imagen 9, se detectan dos tipos de bandas en el gel de electroforesis: aquellas formadas por 320pb que corresponderían a individuos con el alelo mutado LoxP-EGFP y aquellas con 600pb para los *wild type*. Si en una calle específica se observan ambas bandas, este ratón sería heterocigoto (imagen 9).

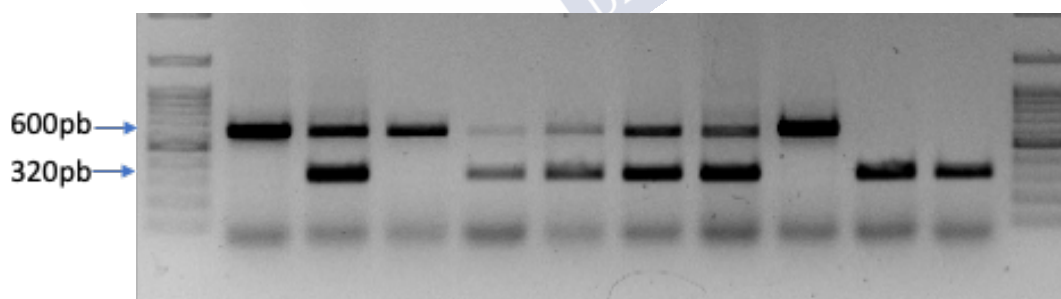


Imagen 9. Imagen de un gel de agarosa correspondiente al genotipado de ratones LoxP-EGFP

1.4 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFENO

Se pesa el tamoxifeno (T5648, SIGMA), dependiendo de la cantidad que se quiera preparar, para dejarlo a una concentración final de 20 mg/mL en aceite de maíz (C8267, SIGMA).

Su administración puede ser tanto vía subcutánea como intraperitoneal; nosotros escogimos esta última debido a que observamos mejores resultados. En el caso de la administración de tamoxifeno en neonatos, escogimos la vía subcutánea debido a que el peritoneo del ratón recién nacido es muy pequeño. Se administraron 5 dosis en días consecutivos y, en todos los casos, dicha dosis fue de 0,2 mg/g de peso del ratón. En los

experimentos con neonatos la dosis se redujo a la mitad y se administró durante 2 días consecutivos.

1.5 ADMINISTRACIÓN DE EdU (5-ETINIL-2'-DEOXIURIDINA)

El EdU es un compuesto análogo al BrdU (5-Bromo-2'-deoxiuridina) y que, por tanto, actúa intercalándose entre las bases de ADN cuando una célula entra en fase S de ciclo celular.

De esta manera, administrando el compuesto al ratón, se podrá detectar posteriormente mediante inmunofluorescencia y así observar células que han entrado en división.

El compuesto se disuelve en agua destilada (20mg/mL) y se administra al animal vía intraperitoneal a una concentración de 0,2mg/g de peso, con dos inyecciones 12 y 24 horas antes del momento de su sacrificio.

1.6 EXTRACCIÓN DE SUERO Y MEDICIÓN DE PESOS

Los pesos de los animales se recogieron mediante una báscula de precisión (Kern EMB 1200-1) y se tomaron el día del inicio de cada experimento, el día del sacrificio y el día situado entre el inicio y el final. En experimentos de 3 días solo se recogen peso el día inicial y el final.

- ❖ La sangre se extrae directamente del ventrículo izquierdo del corazón del animal con una jeringuilla (aguja de 25G x 5/8") hasta obtener un volumen aproximado de 1 mL.
- ❖ Para favorecer la coagulación, las muestras de sangre se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se centrifugan a 13000rpm durante 30 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante que corresponde al suero y se hacen alícuotas que se almacenan a -20°C para su posterior análisis.

Aquellos sueros hemolizados o contaminados con glóbulos rojos se descartan de dichos análisis para evitar que interfieran con la medición y la correcta interpretación de los resultados.

Para monitorizar el peso de los ratones en los experimentos de hipotiroidismo, se midieron estos valores el primer y último día del experimento, así como a la mitad del mismo. Por ejemplo, para ratones a los que se les indujo un hipotiroidismo de 12 días, los pesos se recogieron el día 1, 6 y 12 mediante una báscula de precisión.

1.7 HIPOTIROIDISMO MEDIADO POR PTU (PROPYLTHIOURACIL).

El PTU (P3755, SIGMA) es una molécula capaz de inhibir la producción de hormonas tiroideas mediante su interferencia con la enzima TPO (tiroperoxidasa), encargada de mediar la incorporación de iones yodo (I⁻) a la molécula de tiroglobulina (Alexander, 1959). Además, se ha descrito que el PTU actúa como un potente inhibidor de la deionidasa 1 (DIO1) en mamíferos, siendo sus efectos nulos para las deionidasas 2 y 3 (Larsen 1995 Annu Rev).

El PTU se administra a los ratones a través del agua de bebida a una concentración del 0.1%. Debido al mal sabor que genera este compuesto, se añade también un modificador de sabor al 0.2% (Tang®, sabor frutas del bosque). Se debe monitorizar el consumo de agua en los animales tratados para asegurarnos que beben cantidades de agua adecuadas.

El diseño del experimento consiste en inducir hipotiroidismo de distinta duración (3 días, 6 días y 12 días) a varios grupos de ratones con sus respectivos controles. A estos controles se les administrará agua de bebida con el modificador de sabor, pero sin PTU.

Cada grupo se compone de 6 ratones hembras de 90 días de edad con agua y comida *ad libitum*. La inducción del hipotiroidismo se realizará en 3 experimentos independientes: uno para extracción de ARN y el estudio del transcriptoma, otro para el estudio de proteínas mediante Western-Blot y, por último, otro para inmunofluorescencia que dividiremos, a su vez,

en dos grupos (ratones normales para estudiar las células SOX2 y ratones GMO para seguir dichas células mediante la expresión de EGFP).

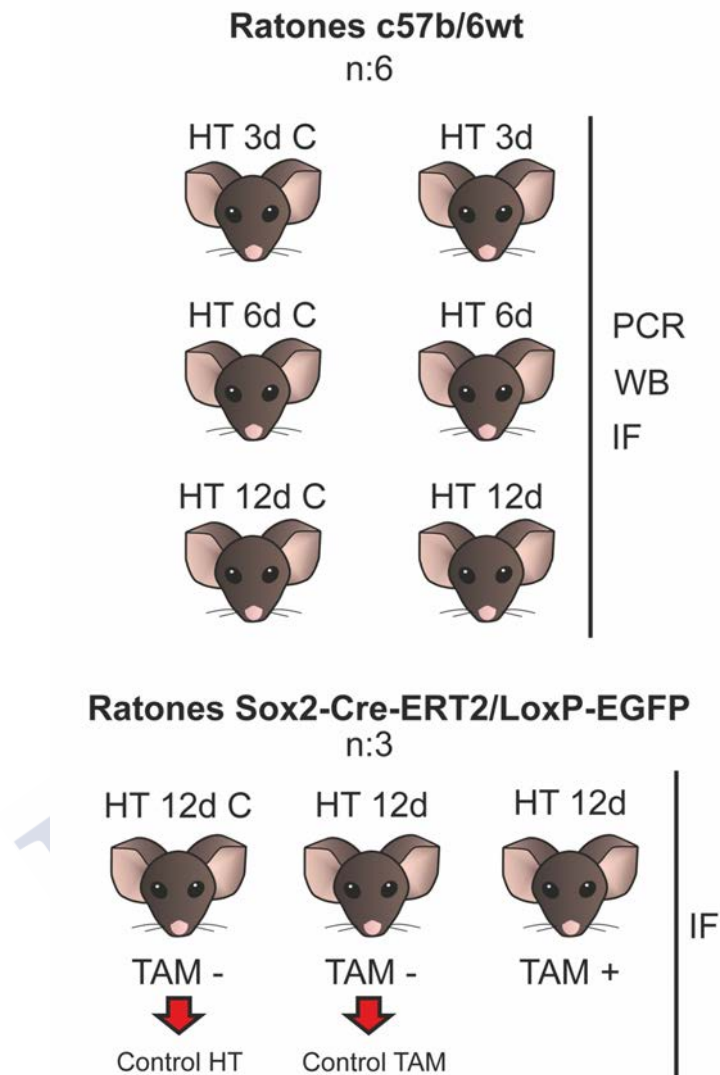


Imagen 10. Esquema de los diferentes experimentos realizados a los grupos de ratones tratados con PTU para la inducción del hipotiroidismo

Hay que tener en cuenta que en el experimento en el que se utilizan los ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP, además del PTU, debe administrarse tamoxifeno para así inducir el mecanismo de la Cre-Recombinasa y que las células SOX2 comiencen a expresar EGFP.

En la imagen 10 se muestra un esquema del diseño experimental para una mejor comprensión del mismo.

1.8 PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES Y RECOGIDA DE MUESTRAS Y TEJIDOS

Una vez finalizado el experimento en cuestión, los ratones se retiran de la sala de estabulado y se anestesian (tabla 5) antes de introducirlos en una campana de extracción para comenzar el proceso de perfusión. Para asegurarnos de que los ratones están bajo los efectos de anestesia

profunda, se utiliza el reflejo palpebral. El proceso se realiza en una campana debido a la toxicidad de la formalina.

Tabla 5. Componentes utilizados para la preparación de anestesia para ratón

Componentes	Volumen	Stock	Referencia
Ketamina (Ketamidor)	1mL	100mg/mL	Richterpharma
Hidrocloruro de xilacina (Rompun)	250µL	20mg/mL	Bayer
Suero fisiológico	6mL	0,9% NaCl	Vitulia

Los animales se perfunden con 50mL de suero glucosado al 5% para eliminar toda la sangre y que esta no interfiera con los resultados debido a su alta tasa de autofluorescencia. A continuación, se perfunden con otros 50mL de formalina tamponada al 10% para la fijación de los tejidos. Dependiendo del tamaño del tejido, este deberá permanecer más o menos tiempo en formalina. En el caso de tejido de tiroides de ratón, se deja 24 horas en este compuesto para completar el proceso de fijado.

1.8.1 Preparación de las muestras para inmunofluorescencia

El procedimiento de parafinado es realizado por el Servicio de Histología del CIMUS y se describe a continuación:

- ❖ Las tiroides que están en una solución de 10% de formalina, se incuban durante al menos 24h en etanol al 70% y se colocan en distintos “cassettes” debidamente etiquetados.
- ❖ Las muestras se incluyen en parafina mediante el sistema de Leica TP1020 Semi-Enclosed Benchtop Tissue Processor, donde se van moviendo automáticamente las muestras a distintas cubetas con distintas soluciones y cuyos pasos son:
 - Deshidratación: 70% etanol (1hora), 96% etanol (3 incubaciones de 1hora y media) y 100% etanol (3 incubaciones de 1hora y media).
 - Lavado: xileno, 2 incubaciones de 2 horas.
 - Infiltración con parafina: parafina, 2 incubaciones de 2 horas.
- ❖ Se retiran los cassettes y se forman los bloques de parafina usando el EG1150H Modular Tissue Embedding Center. Las muestras pueden ser guardadas a temperatura ambiente hasta su uso.
- ❖ Unos minutos antes de proceder al seccionamiento de la muestra se dispone el bloque de parafina en hielo para facilitar el corte de la muestra y por lo tanto, el mantenimiento de las estructuras.
- ❖ Se realizan secciones de 3-4 µm de grosor y se colocan en un baño a 55°C.
- ❖ Por último, estas secciones se montan en los portaobjetos, procurando poner en el mismo las muestras que se quieran comparar.

La cuantificación de las imágenes obtenidas de las inmunofluorescencias se realiza con el programa Fiji-Image J 1.51 y CellProfiler 3.1.9.

1.8.2 Preparación de muestras para el análisis del ARN.

Con los ratones profundamente anestesiados, se procede a retirar la parte de la tráquea en la que se localiza la tiroides. Se coloca toda la pieza en una lupa binocular y con ayuda de unas microtijeras se separan los lóbulos tiroideos de la tráquea. Ambos lóbulos se colocan en un eppendorf con Trizol™ (15596026, Invitrogen) que previamente estará en hielo. Para la

tráquea, se extrae la mucosa raspando el tejido con ayuda de un bisturí. Las muestras se guardan a -20°C hasta su procesamiento.

1.9 MODELO DE DESARROLLO DE LA TIROIDES

Se inyectó TAM (0,1 mg/g de peso del ratón) a varias camadas de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP el día postnatal P1 mediante vía subcutánea, ya que la cavidad peritoneal es demasiado pequeña y corremos el riesgo de pinchar algún órgano. Los neonatos permanecen con sus madres igual que las camadas normales y, en el momento del destete (28 días), se extrae un pedazo de cola para su genotipado. Los ratones que no poseen en ninguno de sus alelos la proteína recombinante SOX2-Cre se descartan, ya que no tienen validez en el experimento. Los individuos con los dos genes modificados (ya descrito en el apartado 5.2) se sacrifican a la edad de 90 días, una vez han alcanzado plena madurez.

Para los controles de este experimento se utilizó otro grupo de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP aplicándose el mismo procedimiento, pero estos se sacrificaron a los 2 días desde el momento de la inyección con TAM, es decir, en P3 (día 3 desde su nacimiento).

1.10 MODELO DE HEMITIROIDECTOMÍA PARCIAL

Los animales fueron anestesiados mediante ketamina-xilacina, como ya vimos en apartados anteriores.

- Una vez anestesiado, el animal se coloca boca arriba sobre la superficie de una lupa estereoscópica (2,5x de aumentos), ajustando el campo de visión a la zona del cuello.
- Se realiza una incisión longitudinal en el cuello de unos 2 cm de longitud y se separa la piel con cuidado. Se coloca un fórceps para mantener la piel abierta.
- Mediante un corte vertical se retiran las glándulas submaxilares hasta llegar al músculo de la tráquea.
- Con ayuda de unas micropinzas y un bisturí se levanta el músculo traqueal para cortarlo longitudinalmente sin romper el cartílago de la tráquea, ya que sería causa de muerte para el animal. El corte de dicho músculo se realiza únicamente para localizar el lóbulo de la tiroides; una vez realizado el procedimiento, el músculo de la tráquea se vuelve a juntar y este cicatrizará sin necesidad de sutura.
- Se localiza el lóbulo derecho de la tiroides y se procede a retirar lo máximo posible del mismo con unas microtijeras.
- Cuando se haya extraído la mayor parte posible del lóbulo, se vuelven a colocar lo mejor posible las glándulas submaxilares, se retira el fórceps que sujetaba la piel y se procede a suturar al animal.
- Para una mejor recuperación, los animales ya operados se alojan en una cama térmica a 37°C y, una vez despiertos, se vuelven a estabular en sus respectivas cajas. Durante la monitorización del individuo mientras se despierta, se le administra desinfectante e ibuprofeno en pomada para evitar posibles infecciones y mejorar el proceso de recuperación.

Se administra una dosis de TAM por día durante 5 días consecutivos, dándose la primera dosis en el momento de finalizar la intervención quirúrgica, cuando el ratón todavía está bajo los efectos de la anestesia.

Los ratones controles (*Sham*) tienen las mismas dosis de TAM y fueron sometidos al mismo procedimiento quirúrgico que los ratones tiroidectomizados, con la salvedad de que no se les extrajo nada de lóbulo tiroideo.

2 CULTIVO CELULAR

2.1 CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS FOLICULARES TIROIDEAS HUMANAS

2.1.1 Aspectos éticos

Este estudio de tesis doctoral ha utilizado muestras de tejido humano normal y tumoral de la colección TIROCHUS incluida con el nº c.0003960 en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III y localizada en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). La utilización de estas muestras cuenta con la evaluación positiva, códigos de registro 2015/238 y 2016/239, del Comité Autonómico de Ética de la Investigación de Galicia (CAEIG) y los consentimientos informados. El Dr. José M. Cameselle Teijeiro es el responsable de dicha colección, siendo la Dra. Clara Álvarez Villamarín la IP promotora de los proyectos con código autorizado CAEIG.

2.1.2 Cultivos celulares humanos

El cultivo se realiza con un sistema protocolizado de forma estricta, para evitar contaminaciones bacterianas, fundamentalmente micoplasmas (Bravo et al, 2013; García-Rendueles et al, 2017). Los patólogos que colaboran en el proyecto reciben alícuotas de medio cultivo h7H (descrito en la Tabla III.1), estériles y selladas, que se mantienen refrigeradas en nevera. El patólogo principal (Dr. José M. Cameselle-Teijeiro) selecciona en los excedentes de tejido de la pieza quirúrgica los fragmentos de tumor (T) o de tejido normal (N) bajo campana horizontal, y los introduce en las alícuotas de medio de cultivo a temperatura ambiente.

Una vez ya en el laboratorio el tejido se divide en dos partes dentro de la habitación de cultivos humanos y campana de flujo laminar de clase IIB:

1. Porción para guardar en fresco congelado: esta parte se guarda en RNA Later (AM7024, Invitrogen) en un tubo eppendorf debidamente etiquetado y se le somete a un proceso de congelado secuencial:
 - o * 24h a 4 °C
 - o * 24h a -20 °C
 - o * Permanentemente a -80 °C
2. Porción para realizar el cultivo primario. Este trozo se tritura lo máximo posible con la ayuda de un bisturí y se pasa a un tubo con PBS (P3813-10PAK, Sigma-Aldrich) enriquecido con 1% de Glucosa (D9434-250G, Sigma-Aldrich); esto se hace para eliminar los posibles restos de medio de cultivo o sangre. Se centrifuga a 300rcf durante 5min. Una vez centrifugado se retira el sobrenadante y se le añade la mezcla de dispersión que consiste en:
 - o * 1mg/mL de Colagenasa tipo IV (C5138-1G, Sigma-Aldrich)
 - o * 1X de Tripsina (T4674-100mL, Sigma-Aldrich)

Se utiliza 1mL de mezcla por mg de tejido, aproximadamente. Esta mezcla de dispersión debe prepararse en el momento en que se va a usar, de la siguiente forma: se pesa la Colagenasa, en torno a 12mg, se resuspende en 10,8mL de PBS y se filtra por un filtro de 0,22 μ m (SLGP033RB-Millex-GP, Millipore), a este filtrado se le añaden 1,2mL de Tripsina 10X.

El tejido en la mezcla de dispersión se incuba durante 45min a 37°C, agitando en varias ocasiones con la pipeta para favorecer la dispersión mecánica. Una vez pasado este tiempo, la mezcla se pasa por un filtro (SX0002500 Millex, Millipore) con una malla de nylon de 41 μ m (NY41000010 Millex-GP, Millipore) y se mezcla con medio de cultivo enriquecido con suero para que se neutralice la tripsina.

Se centrifuga a 300rcf durante 5min, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 2mL de medio h7H completo y que incluya 10 μ M de ROCK-inhibitor (Y-27632 dihydrochloride, Centaur Europe). La suspensión celular se siembra en un pocillo de placas de multipocillo de 12 (COSTAR 3513, Corning) debidamente rotulado; el tubo de las células se lava con un tercer mL que se añade también al pocillo.

Los cultivos primarios son cultivados en el medio de cultivo “h7H” estandarizado por nuestro grupo²⁴⁸. Este es un medio humanizado, en el que se mantienen las concentraciones de siete grupos de aditivos (Hormonas, Transferrina, Yodo, Oligoelementos, Antioxidantes, Metabolitos y Etanol) en rangos de normalidad de suero humano. La base del medio es derivada a partir del Medio Coon's modificado preparada especialmente para nosotros por Sigma-Aldrich-USA (Custom-made) sin piruvato ni rojo fenol para que podamos añadirlo o quitarlo según convenga. A ello se le añade suero (5% FCS, 5% NCS), antibióticos (penicilina y estreptomycin) y glutamina extra por su baja vida media²⁴⁹.

Las células crecen hasta llenar el pocillo de MW12. A partir de ese momento, se lavan dos veces las células con PBS y se añade 0,5mL de tripsina-EDTA 1X (59418C, Sigma-Aldrich) durante 5 minutos en el incubador a 37 °C. Se despegan las células, se recogen en un contenedor universal de 25 ml, se lava bien el pocillo con medio h7H completo, y se centrifugan 5 minutos a 300g. Se resuspenden en el medio adecuado para hacer una dilución 1:2.

A partir de ahí, se mantienen en dilución 1:2 bien aumentando el número de pocillos del mismo tamaño, bien aumentando el tamaño del plato donde se siembran.

Los cultivos se caracterizan de forma rutinaria mediante el estudio de la expresión de marcadores fenotípicos a lo largo de los pases (TTF1/NKX2-1, PAX8, Tiroglobulina, Tiroperoxidasa, NIS y Pendrina). Las técnicas empleadas son de rutina en el laboratorio bien expresión de arns por qRT-PCR (SybrGreen, TaqMan), bien de las proteínas por inmunocitoquímica o inmunofluorescencia; y en algún caso proteína por western. En cultivos normales seleccionados y en todos los cancerosos y sus parejas de normalidad se hace genotipado mediante STRs para comprobar que las parejas vienen del mismo órgano inicial.

2.1.3 Cultivos celulares de tejido de tiroides de ratón. Formación de tirosferas e inmunofluorescencia aplicada a las mismas.

La técnica de digestión y disgregación a célula única se realiza siempre con 4 tiroides de ratón adulto de 90 días. Una vez sacrificados, se les realiza una incisión en el cuello para extraer la pieza conjunta de tráquea, esófago y tiroides. A continuación, y con la ayuda de una lupa y

microtijeras para mejorar la precisión, se recorta únicamente el tejido tiroideo y se despega con mucho cuidado de la tráquea.

Las tiroides colectadas se dejan en una placa con PBS frío para evitar la activación de enzimas de degradación del tejido y preservarlo lo mejor posible mientras se realiza el procedimiento en los 4 individuos.

En una campana de extracción para evitar contaminaciones, las tiroides se cortan en fragmentos más pequeños para mejorar el proceso de digestión enzimática que tendrá lugar a continuación. Se recogen todos estos fragmentos y se colocan en un tubo de polipropileno especial para centrifuga (430052, Corning) en el que ya tenemos nuestro cóctel enzimático (tabla 6).

Tabla 6. Componentes utilizados para la digestión enzimática de tejido tiroideo de ratón para disgregarlo a célula única

Solución de dispersión	Referencia
Tripsina 1X	594227C, Sigma
0,01% Deoxyribonuclease I	DN-25, Sigma
0,4% Colagenasa tipo I	C3891, Sigma
HBSS sin Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco, 14170112
Pesar las cantidades de enzimas necesarias y llevar, con el HBSS, hasta un volumen total de 10 mL. Pasar la solución por un filtro de jeringa de 0,22µm (SLGP033RB MILLEXGP, MERK Milipore).	

La mezcla de enzimas y piezas de tiroides se deja en un incubador de células durante 45 minutos. Cada 10 min aproximadamente se realizan digestiones mecánicas con la ayuda de una pipeta Pasteur para mejorar el proceso. La muestra se centrifuga a 1000 rpm durante 10 min y se lava con PBS dos veces para eliminar cualquier resto de enzimas. Las células se pasan por un filtro de 45µm para desechar los restos y agregados celulares.

Una vez acabada la segunda centrifugación, añadimos 10mL de medio de cultivo de tirosferas, contamos el número total de células en una cámara de Neubauer y las sembramos en una placa multipocillo de 6. Se siembran 30.000 células por pocillo aproximadamente y se le añaden 2mL de medio de cultivo. La elección de este tipo de placa es únicamente debido a su mayor superficie; esto hace más fácil la posterior recuperación de tirosferas ya que este proceso se realiza a mano, con la ayuda de una pipeta.

En la tabla 7 Se citan los componentes utilizados para la generación de estas tirosferas. Al cabo de 9 días, las esferas ya han alcanzado un tamaño óptimo para recogerlas, volver a dispersarlas hasta obtener una suspensión de células individuales y resembrarlas para ver si se vuelven a formar (esferas secundarias). El proceso para generar esferas terciarias es similar.

Tabla 7. Compuestos utilizados para la formación y cultivo de tirosferas a partir de suspensiones celulares de célula única de tejido tiroideo de ratón.

Compuesto	Referencia	Concentración final
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham	D6421, Sigma	---
N-2 supplement (100X)	17502001, Gibco™	1X
B27™ Supplement, serum free (50X)	17504004, Gibco™	1X
Penicilina/Streptomcina	P4333, Sigma	100 IU/mL
Anfotericina B	P9528, Sigma	2,5ng/mL

En cuanto a la inmunofluorescencia en las tirosferas, estas deben aspirarse cortando la punta de una pipeta para evitar su rotura. Se colocan en una placa multipocillo de 48 unos contenedores con filtros específicos (Falcon® Cell Culture Inserts, 353097 Corning) que retienen estas esferas, pero dejan pasar el medio a su través.

- Los pocillos se lavan dos veces con PBS (se llena el contenedor y se deja filtrar hacia el fondo por capilaridad) para eliminar cualquier resto de medio de cultivo que pudiera interferir con la tinción
- Se incuban 20 min con 500 μ L de formalina diluida a la mitad (5%)
- Se lavan 3 veces con PBS
- Se incuban 1 hora con 500 μ L de Tritón X-100 al 0,1%
- Se lavan 3 veces con PBS
- Se añaden 100 μ L de anticuerpos primarios diluidos en PBS al menos 8 horas a 4°C.
 - TTF1 (NCL-L-TTF-1, Leica Biosystems) (1:500)
 - SOX2 (Seven-Hills Bioreagents) (1:1000)
- Se lavan 3 veces con PBS
- Se incuban con los anticuerpos secundarios (mismo volumen que los primarios). Se utilizan las mismas concentraciones que en los cultivos celulares (ver tabla 17).

3 ESTUDIO DE PROTEÍNAS

3.1 WESTERN BLOT

3.1.1 Extracción de proteína

Independientemente del proceso de extracción que se utilice, al final del mismo se guardan 10 μ L de cada muestra a -20°C para ser cuantificada posteriormente y al menos 5mL de tampón de extracción (que se utilizará como blanco en la medición de proteína).

3.1.1.1 Método de extracción de proteína con SDS y tampón de Shlessinger

Este método se utiliza para obtener extractos proteicos totales, incluyendo proteínas nucleares. En este caso, este tipo de extractos no se pueden usar para inmunoprecipitar.

- ❖ Se lavan las células 1 vez con PBS y se aspira completamente el volumen residual para evitar que se diluya el lisado proteico.
- ❖ A cada pocillo se añade un volumen determinado de 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS, stock 10% en agua. L4509, Sigma) de acuerdo con el tipo de placa utilizada (tabla 8). El SDS se mantiene en un *termoblocker* y pipetearlo directamente desde ahí para no perder temperatura.

Tabla 8. Relación entre el tipo de placa utilizada y la cantidad de SDS que debe usarse para la extracción de proteína mediante este método

Tipo de placa de cultivo	Volumen de SDS 1%
Multipocillo-24	5 μ L
Multipocillo-6	15 μ L
Placa 90mm	40 μ L

- ❖ Rápidamente, se recoge el volumen con un scraper en un tubo de 1,5mL y se mantienen durante 10 minutos a 95°C.
- ❖ Se añade tampón de Shlessinger en una proporción 1:4 (respecto al volumen de SDS) a cada muestra y se mantienen en hielo húmedo durante 20 minutos.
- ❖ Las muestras se lisan mecánicamente 20 veces, utilizando una jeringuilla de 1mL con una aguja tribiselada de 25G x 5/8” (Microlance3, 301300, BD).
- ❖ Se centrifugan las muestras a 12000rpm durante 10 minutos a 4°C.
- ❖ Se recoge el sobrenadante y se guarda a -20°C.

3.1.1.2 Método de extracción de proteína de tejido de ratón

Para la extracción de proteínas a partir de tiroides de ratón se utiliza un procedimiento diferente. El tampón de lisis para los tejidos (tabla 9) se puede preparar con antelación y se mantiene estable a 4°C durante meses. En el momento de uso, se han de añadir los inhibidores de proteasas y fosfatasa al tampón de lisis.

Tabla 9. Reactivos usados para la extracción de proteínas de tejido de tiroides de ratón.

Tampón de lisis para tejido	Reactivos y concentración de uso	Referencias	Para 1 L de tampón
Tampón de lisis	Tris-HCl 50 mM pH=7,5	H3375, Sigma	50 mL
	EGTA 0,2M pH=8	E3889, Sigma	5 mL
	Triton™ X-100 1%	T8787, Sigma	1 mL
	EDTA 0,2M pH 8	E9884, Sigma	5 mL
	Sucrosa 0,27M	S7903, Sigma	92 g
	Aqua destilada		Llevar hasta 1 L
Inhibidores de proteasas y fosfatasa	1 pastilla/50mL Cocktail complete-EDTA-free	11 873 580 001, Roche	Ajustar según tejido. En nuestro caso: 4 tiroides ratón = 1cm ² pastilla
	NaF 10mM	S7920, Sigma	2,1 g
	Na ₃ VO ₄ 0,1M	S6508, Sigma	10 mL
	Pirofosfato sódico 10mM	S9515, Sigma	2,1 g

- ❖ En primer lugar, se calcula el peso de las tiroides que va a ser extraídas y se coloca en un eppendorf de 2mL. En todo momento se han mantener en hielo seco para evitar que se degraden las muestras.
- ❖ Se añade un volumen de tampón de lisis con inhibidores de acuerdo con el peso del tejido en una proporción de 0,5mL cada 10mg de tejido.
- ❖ En cada tubo se introduce una bola de acero previamente esterilizada por calor en una estufa.
- ❖ El tejido se homogeniza por acción mecánica en un *TissueLyser* II (85300, Qiagen) a 25rpm durante 3,5 minutos.
- ❖ Las muestras se incuban durante 15 minutos en hielo húmedo.
- ❖ A continuación, las muestras se centrifugan a 12000rpm durante 30 minutos a 4°C.
- ❖ Se recoge el sobrenadante en tubos y se guardan a -20°C.

3.1.2 Cuantificación de la concentración de proteína

Para determinar la cantidad total de proteína que contiene cada muestra que va a ser analizada se utiliza el compuesto Pierce™ 660nm Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). Este método permite medir la concentración de proteína de muestras cuyos tampones de extracción contienen detergentes iónicos y agentes reductores, que pueden interferir en la medida.

❖ En primer lugar, se prepara una recta patrón de BSA (stock 1,6mg/mL en 0,9% de salino y 0,05% de azida sódica) realizando 6 diluciones seriadas 1:2 con el diluyente de la muestra (tampón de extracción) como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Curva de calibrado para la cuantificación de proteína

Recta patrón	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen de diluyente	Volumen de BSA
A	0,8	40 μL	40 μL del stock 1,6mg/mL
B	0,4	40 μL	40 μL de A
C	0,2	40 μL	40 μL de B
D	0,1	40 μL	40 μL de C
E	0,05	40 μL	40 μL de D
F	0,025	40 μL	40 μL de E
Blanco	blanco	40 μL	---

- ❖ Las muestras se diluyen 1/13,33 mezclando 37 μL de diluyente con 3 μL de muestra.
- ❖ En una multiplaca de 96 pocillos se añaden 20 μL de la recta patrón y de las muestras por duplicado.
- ❖ Se disuelve 1 sobre de ICDR (Ionic Detergent Compability Reagent, 22663, Thermo Fisher Scientific) en 20mL de Pierce 660nm Protein Assay Reagent (22660, Thermo Fisher Scientific).
- ❖ Se añaden 300 μL de la solución de ICDR a cada uno de los pocillos y se mezcla completamente.
- ❖ La placa con las muestras se incuba durante 5 minutos en oscuridad.
- ❖ Por último, se miden las absorbancias en un espectrofotómetro a 660nm.

3.1.3 Electroforesis y transferencia de proteínas

La electroforesis SDS-PAGE se realiza en geles que contendrán distinto porcentaje de acrilamida-bisacrilamida de acuerdo con el peso molecular de la proteína que se desee estudiar. Estos geles poseen dos partes principales: parte superior o *stacking* que tiene un porcentaje fijo de acrilamida-bisacrilamida y sirve para concentrar la muestra al permitir que entre a la vez en la segunda parte; la parte separadora o *resolving*, que permite la migración de las muestras de acuerdo con su peso molecular (tabla 11).

Tabla 11. Preparación de geles SDS-PAGE

<i>Stacking</i>	Volumen para 4mL	<i>Resolving</i> al 12%	Volumen para 10mL	Referencias
Agua Destilada	2,7 mL	Agua Destilada	3,3mL	
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0,67mL	Acrilamida-bisacrilamida 30%	4mL	A3574, Sigma
1M Tris-HCl pH 6,8	0,5mL	1,5 M Tris-HCl pH8,8	2,5mL	
SDS 10%	0,04mL	SDS 10%	0,1mL	L4509, Sigma
10% Amonio persulfato (APS)	0,04mL	10% APS	0,1mL	A3678, Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0,006mL	TEMED	0,006mL	T9281, Sigma

Los geles se preparan en el sistema GE Healthcare miniVE Vertical Electrophoresis System (80-6418-77, Fisher Scientific). Como marcador de peso molecular se utiliza el Page Ruler Prestained Protein Ladder (26616, Thermo Fisher Scientific), añadiendo 5 μL por calle del marcador.

Se cargan las muestras en el gel con tampón de carga 1X (Stock 5X: 50% glicerol, 10% β -Mercaptoetanol, 0,5% azul de bromofenol, 0,4M Tris-HCl pH 6,8 y 10%SDS) hasta un volumen máximo de 20 μ L para el peine de 15 o 18 pocillos y 40 μ L para el peine de 10 pocillos.

El gel se coloca en la cubeta con 1L de tampón de electroforesis 1X (Stock 10X 2L: 60g Tris-Base, 288g de Glicina y 20g SDS) Se procede a realizar la electroforesis del gel a un amperaje constante de 15mA durante 2 horas y media.

A continuación, se realiza la transferencia del gel a una membrana (Immun-Blot PVDF 0,2 μ m, 162-0177, Biorad) mediante el sistema de transferencia semiseco (Z34 050-2, Sigma). Los tampones para la transferencia se preparan como se indica en la tabla 12.

Tabla 12. Tampones para la transferencia de geles SDS-PAGE

Tampones	Reactivos	Para 1L
C	0,25M Tris	200mL
	20% Isopropanol	200mL
	Agua destilada	Hasta 1L
B	1,25M Tris	20mL
	20% Isopropanol	200mL
	Agua destilada	Hasta 1L
A	0,4M Ácido 6-aminocaproico en Tris 0,25M	100mL
	20% Isopropanol	200mL
	Agua destilada	Hasta 1L

- ❖ Se corta 1 membrana de un tamaño de 10x8cm y se incuba en metanol durante 1 minuto en agitación constante.
- ❖ Para hidratar la membrana se incuba durante 5 minutos en agua en agitación constante.
- ❖ Se estabiliza en tampón de transferencia (tampón B) durante 5 minutos.
- ❖ El gel se incuba durante 3 minutos en tampón A.
- ❖ Se cortan papeles whatman del mismo tamaño que la membrana. Se mojan 3 en tampón C y se colocan en el sistema de transferencia.
- ❖ Encima de estos, se colocan dos papeles mojados en B, la membrana, el gel y 4 papeles mojados en A.
- ❖ Se cierra correctamente el sistema de transferencia y se corre a un voltaje constante de 0,8mA/cm² durante 2 horas.

3.1.4 Inmunodetección

- ❖ Una vez finalizada la transferencia se lava la membrana durante 5 minutos en agua destilada para eliminar los restos del gel de acrilamida y de los tampones.
- ❖ A continuación, se bloquea la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación (tabla 13). La solución de bloqueo utilizada ha de ser la misma que la requerida por cada anticuerpo primario.

Tabla 13. Soluciones de bloqueo utilizadas en la inmunodetección

Soluciones de bloqueo	Reactivos	Referencias y Stock
I-Block™	2g/L I-Block™	T2015, Thermo Fisher Scientific
	1X TBS	Stock 10X TBS (0,2M Tris, 1,37M NaCl). Se ajusta el pH a 7,6.
	Se calienta en agitación sin que llegue a hervir hasta su completa disolución	
WestVision™ Block and Diluent	Ready to use	SP-7000, Vector Laboratories

❖ Los anticuerpos primarios utilizados poseen condiciones específicas en cuanto al tiempo de incubación, temperatura de esta y concentración adecuada en una de las soluciones de bloqueo previamente descritas. Así, en la tabla 114 se recogen las diferentes condiciones para cada uno.

Tabla 14. Relación de anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección

Anticuerpo primario	Referencia y proveedor	Epitopo	Concentración	Solución	Incubación	Especie huésped
SOX2	sc-59730, Sta Cruz Biotech (SCBT)	Total	1:5000	WestVision™	8h a 4°C y 1h a 25°C	R
TTF1 (SPT-24)	NCL-L-TTF-1, Leica Biosystems	123aa (N-terminal)	1:1000	I-Block™	8h a 4°C y 1h a 25°C	M
GAPDH (6C5)	CB1001, Merk Millipore	Total	1:5000	I-Block™	1h 25°C	M
β-Actina (AC-74)	A5316, Sigma	Total	1:5000	I-Block™	1h 25°C	M

❖ Se lava la membrana 3 veces a intervalos de 5 minutos en solución de lavado (1X TBS y 0,3% Tween20® (P9416, Sigma)).

❖ La membrana se incuba durante 1 hora con el anticuerpo secundario específico (tabla 15) en la misma solución utilizada en el bloqueo y en la incubación con el primario. El anticuerpo secundario utilizado viene determinado por el tipo de huésped en el que se generó el anticuerpo primario y permite detectar y amplificar la señal del mismo.

Tabla 15. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en la inmunodetección. La solución en la que se incuban los secundarios será I-Block exceptuando las incubaciones con Sox2, en la que el anticuerpo secundario también se diluye en WestVision™

Anticuerpo Secundario	Referencia	Concentración	Solución	Incubación
Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	A0545, Sigma	1:10000	I-Block™	1hora 25°C
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Inmunoglobulins-HRP	P0260, Dako	1:5000	I-Block™	1hora 25°C

❖ Se lava la membrana 3 veces a intervalos de 5 minutos en solución de lavado.

❖ La membrana se coloca sobre una superficie lisa y se añade un volumen adecuado de sustrato quimioluminiscente Pierce ECL Western (32106 Thermo Scientific). Este volumen de ECL depende del tamaño de la membrana: 0,125mL de ECL cada cm² de membrana. Los dos reactivos que componen el ECL deben mezclarse en el momento de su

uso en proporción 1:1; uno de ellos es fotorreactivo, por lo que debe protegerse de la luz en todo momento.

- ❖ Se incuba la membrana durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- ❖ Para detectar la luz emitida resultante de la reacción del sustrato con la peroxidasa, se coge la membrana con unas pinzas, se retira el exceso de ECL y se coloca en un cassette de auto-radiografía.
- ❖ Se utilizan películas fotográficas (FUJI Medical X-Ray Film nº8U) y se revelan a distintos tiempos en función de la señal obtenida con revelador y fijador en una sala oscura.

En algunos casos se requiere incubar la misma membrana con distintos anticuerpos primarios sucesivos, por lo que se realiza un procedimiento que retira el anticuerpo anterior sin alterar la detección del siguiente:

- ❖ Se lava la membrana 4 veces a intervalos de 5 minutos en solución de lavado.
- ❖ En un baño caliente a 55°C se incuba la membrana con 25mL de solución de estriado (62,5mM Tris-HCl pH6,8, 2%SDS y 100mM β-Mercaptoetanol) durante 30 minutos.
- ❖ La membrana se lava 10 veces con solución de lavado en agitación durante 30 minutos.
- ❖ Se procede con el bloqueo de la membrana y la incubación con otro anticuerpo diferente, alternando siempre anticuerpos de distintas especies.

3.2 INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA

3.2.1 Inmunofluorescencia en tejidos de tiroides de ratón

Todas las inmunofluorescencias se realizaron en secciones de tejido de ratón de 4 µm de grosor, previamente fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE) según el protocolo utilizado en clínica gracias al sistema EnVision FLEX System (Dako). El método de perfusión de animales e inclusión de sus tejidos en parafina se trató en el apartado de “experimentos *in vivo*”.

Cuando los cortes del tejido se han colocado en el portaobjetos, se procede al desparafinado del mismo. Esto se realiza colocando la muestra en una estufa a 37 °C durante al menos una hora. Debido a que la parafina es un compuesto hidrófobo, el tejido previamente se tiene que deshidratar y, una vez desparafinado, volver a rehidratarse. Los procesos de deshidratación y rehidratación de las muestras se realizan sumergiendo el tejido en concentraciones cada vez mayores o menores de alcohol, respectivamente.

Una vez finalizado el proceso de recuperación antigénica mediante PTLink (DAKO, Agilent) y en tampón TE (Tris-EDTA), las muestras se lavan con PBS para eliminar cualquier resto de parafina que todavía pudieran contener. A continuación, las muestras se incuban en una cámara húmeda a 4°C durante 8 horas con el anticuerpo primario correspondiente. En la siguiente tabla se recogen los diferentes anticuerpos utilizados en el trabajo, así como sus respectivas concentraciones y tampones utilizados para su incubación (tabla 16).

Tabla 16. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunofluorescencias

Anticuerpo primario	Referencia y proveedor	Especie	Incubación	
			Tejido	Cultivo
SOX2	Seven-Hills Bioreagents	R	1:1000 50% NHS 8h 4°C	1:2000 20% NHS 8h 4 °C
GFP	AvesLab, GFP-1010	C	1:1500 20% NHS 8h 4 °C	
TTF1 (SPT-24)	CB1001, Merk Millipore	M	1:500 8h 4 °C	1:200 8h 4 °C

Anticuerpo primario	Referencia y proveedor	Especie	Incubación	
			Tejido	Cultivo
PAX8 (MRO-50)	363M, Cell-Marque	M	1:200 8h 4 °C	1:100 8h 4 °C
Tiroglobulina	GA509, Agilent DAKO	R	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT
NIS	HPA049055, Merk	R	1:300 8h 4 °C	
AECK (Citokeratinas totales)	M3515, Agilent DAKO	M	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT
p63	IR662r, Agilent DAKO	M	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT	
β-catenina	GA70261	M	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT	
E-cadherina	GA05961	M	Rtu 8h 4 °C ó 1h RT	

Una vez acabada la incubación con el anticuerpo primario, las muestras se lavan con PBS durante 5 min 3 veces para retirar el exceso de anticuerpo y a continuación se incuban con el anticuerpo secundario. Después de realizar otros 3 lavados con PBS, se añade medio de montaje (Fluoro-Gel, 17985-10, Electron microscopy Sciences) con 2mg/mL de DAPI (D9542, Sigma) y se monta el cubreobjetos.

La mayoría de las imágenes de las muestras se obtienen con el microscopio confocal Leica TC SP5-AOBS. En los casos restantes, se obtienen con el microscopio de fluorescencia Olympus IX51/U-RFL-T/TH4-200 acoplado a la cámara Olympus DP72.

3.2.2 Inmunofluorescencia en cultivo.

El protocolo llevado a cabo es similar tanto para los cultivos celulares de tiroides humano como para los cultivos de tiroferas y su posterior diferenciación.

- ❖ Se retira el medio de cultivo a las células y se lavan con PBS.
- ❖ Se añade formalina al 5% diluída en PBS y se deja a temperatura ambiente 20 min.
- ❖ 3 lavados con PBS de 5 min cada uno.
- ❖ Se incuba con PBS + Triton™ X-100 0,1% durante 1h.
- ❖ 3 lavados con PBS de 5 min cada uno.
- ❖ Incubación con el anticuerpo primario.
- ❖ 3 lavados con PBS de 5 min cada uno.
- ❖ Incubación con el anticuerpo secundario.
- ❖ Lavado y montaje de la muestra.

En la tabla 17 se recogen los anticuerpos secundarios utilizados en ambos métodos. Cabe destacar que siempre se utilizan anticuerpos preabsorbidos F(ab')₂: en ellos, se realiza una digestión enzimática previa para eliminar parte de la fracción constante del anticuerpo. De esta manera, el anticuerpo es mucho más pequeño que el original sin perder propiedades de adhesión a su antígeno (ya que la fracción que reconoce el epítipo no se toca), por lo que aumenta su capacidad de penetración.

Tabla 17. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Referencia y proveedor	Incubación (diluidos en PBS)	
		Tejido	Cultivo
Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti- Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 715-546-151	1:1000 1h RT	1:600 1h RT
Cy™ ₃ AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti- Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 711-166-152	1:1000 1h RT	1:600 1h RT
Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti- Chicken IgY (IgG) (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 703-546-155	1:1000 1h RT	1:600 1h RT
Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti- Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 715-606-150	1:1000 1h RT	1:600 1h RT

3.2.3 Inmunohistoquímica en tejido de tiroides de ratón

Las muestras se desparafinan y se les realiza el pretratamiento con el PTLINK (DAKO, Agilent) de la misma manera que las inmunofluorescencias.

- ❖ Las muestras se lavan una vez con PBS y se bloquean con peroxidasa al 3% durante 10 minutos.
- ❖ 3 lavados durante 5 minutos con PBS.
- ❖ Incubación con anticuerpo primario 30 minutos a temperatura ambiente (RT).
- ❖ Las muestras se lavan una vez con PBS.
- ❖ Incubación con el mismo anticuerpo secundario (Agilent, DAKO EnVision™ System, HRP) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se lavan las muestras con PBS.
- ❖ Revelado de muestras con DAB (3,3-Diaminobencidina).
- ❖ A continuación, se contratiñe con Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos.
- ❖ Por último, se deshidratan las muestras y se realiza el montaje de estas.
 - Este proceso es válido únicamente cuando se utilizan anticuerpos de ratón o conejo, ya que el anticuerpo secundario solo reconoce estas dos inmunoglobulinas. Para la tinción con el anticuerpo de Sox2 procedente de cabra, se añade un paso más: se utiliza un anticuerpo Conejo-antiCabra que reconocerá el anticuerpo de Sox2 y, a su vez, podrá ser reconocido por el anticuerpo secundario IgG anti-conejo/ratón (Agilent, DAKO EnVision™ System, HRP), conjugado con un polímero marcado con peroxidasa.

Tabla 18. Anticuerpos primarios utilizados en las inmunohistoquímicas

Anticuerpo primario	Referencia y proveedor	Especie
Sox2	Seven-Hills Bioreagents	R
Sox2	AvesLab, GFP-1010	C
GFP	Abcam, ab6556	R

3.2.4 Inmunofluorescencia con el uso de TSAs (*Tyramide Signal Amplification*)

Esta técnica se basa en los trabajos previos de nuestro grupo en microscopía confocal^{128,129} y de los grupos de Mezey, que propuso la utilización de microondas por primera vez²⁵⁰, y de Ginty y Stack que utilizaron la técnica para colocalizar REa (Receptor de Estrógenos alfa) y RA (Receptor de Andrógenos) en testículo o cáncer de mama por microscopía óptica, respectivamente^{251,252}. En ellos se intenta la inmunofluorescencia múltiple utilizando diferentes anticuerpos secundarios o utilizando secundarios no validados clínicamente. En nuestra técnica, las secciones fueron sometidas a una técnica de doble inmunofluorescencia en ciclos, usando siempre el mismo anticuerpo secundario validado clínicamente, lo que supone una modificación sobre las técnicas habituales de tinción. La doble tinción se realizó sobre la misma sección de tejido desparafinada, incubando en ciclos sucesivos con los distintos anticuerpos primarios y el mismo secundario, todos ellos clínicamente validados. El marcaje se hizo mediante Tyramide Signal Amplification (TSAs), moléculas sustrato de la enzima HRP con la que está marcado el anticuerpo secundario. HRP une covalentemente TSA a la cadena lateral del aminoácido tirosina^{253,254}. De esta forma, se forman aductos covalentes O-O` de tirosina que resisten calor y pH, al contrario que los enlaces iónicos característicos de las uniones de los anticuerpos. Tras cada ciclo de marcaje se realiza un paso de desnaturalización mediante calor y pH²⁵⁰. Esto libera los anticuerpos unidos mediante enlace iónico, pero mantiene las TSAs unidas covalentemente a las proteínas.

En nuestro caso, solo utilizamos esta técnica para localizar las células Sox2 positivas y células productoras de Calcitonina en la misma sección de tejido. Debido a que los dos anticuerpos funcionan perfectamente por separado (la Calcitonina, de hecho, está validada clínicamente), decidimos utilizarlos juntos mediante la técnica de TSAs (ya que los dos anticuerpos proceden de conejo y no podríamos hacer una inmunofluorescencia normal).

El protocolo es similar al utilizado para las inmunohistoquímicas, pero se modifica a partir de la adición del anticuerpo secundario:

- ❖ Después de incubar con el anticuerpo secundario conjugado con HRP, se realizan dos lavados de 5 minutos con TBS 1X + 0,1% Tween20.
- ❖ Incubar 5 minutos con TSA Fluorescein (NEL760001KT, Perkin Elmer, Waltham) 1:200 diluido en 1X plus Amplification Diluent (Perkin Elmer, Waltham) a temperatura ambiente durante 5 min. Aquí se está realizando el marcaje de Calcitonina, ya que fue el primer anticuerpo utilizado.
- ❖ Tres lavados de 5 minutos con TBS 1X + 0,1% Tween20.
- ❖ Colocar los portaobjetos sobre el fondo de un recipiente de plástico (12x9x6 cm) (Toth et al, 2007) lleno con 200 ml de tampón TE 10 mM, pH 9.0. Calentar en el microondas (700W) durante 2 min 25 seg al 100% de potencia, hasta llevar al punto de ebullición, pero sin hervir. Inmediatamente, bajar la potencia al 20% durante 15 min. Dejar enfriar en el tampón durante 30 min a temperatura ambiente.
- ❖ Se repiten todos los pasos exactamente igual, utilizando el segundo anticuerpo, en nuestro caso Sox2. Se añade TSA Cyanine 3 (NEL760001KT o NEL744001KT, Perkin Elmer, Waltham) 1:200 diluida en 1X plus Amplification Diluent (Perkin Elmer, Waltham) a temperatura ambiente durante 5 min.

3.2.5 ELISA

Se realizó un ELISA para determinar la cantidad de hormona T4 libre en el suero de ratones tratados para hipotiroidismo a diferentes días, con sus respectivos controles.

El protocolo utilizado fue el descrito por el proveedor salvo una variación: se incubaron los pocillos pretratados de la placa del ELISA con los sueros de los ratones media hora antes

de empezar el protocolo. Esto facilita que las proteínas que tienen que ser detectadas tengan más oportunidad de entrar dentro de la curva.

3.3 MICROSCOPIA

Hay que aclarar que todas las fotografías mostradas de inmunofluorescencia fueron tomadas con microscopía confocal, a excepción de la diferenciación de tirosferas, que no fue posible. Estas últimas, junto con las fotos de inmunohistoquímica, se adquirieron con microscopía óptica. Los videos de tejidos en 3D que se mostrarán en la presentación fueron adquiridos mediante microscopía *light-sheet*.

3.3.1 Microscopía óptica

Se utilizó un microscopio Olympus IX70/IX51, con objetivos de 20X y 40X. El software utilizado fue CellSense® v1.6.

3.3.2 Microscopía confocal

Para la adquisición de imágenes con esta técnica se utilizó un microscopio confocal de banda ancha (Leica TC SP5-AOBS) con láser blanco (470-670 nm) y láser ultravioleta, a través del objetivo seco 20X y a través del objetivo 63X *oil* con 1,4 de apertura numérica. El software para el tratamiento de imágenes fue el LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence), donde se tomaban planos seriados de 0,5 μm de forma secuencial bidireccional.

En la siguiente tabla se recogen los diferentes canales utilizados con sus respectivas características.

Tabla 19. Características de cada canal utilizado en microscopía confocal.

Canal	Fluoróforo	λEx (nm)	λEm (Rang, nm)	Pasadas(Line/Frame average)
Ch01	DAPI	405	414-479	2/2
Ch02	Alexa Fluor 488	492	499-547	4/3
Ch03	Cyanine 3	552	565-624	3/2
Ch04	Cyanine 5	594	609-648	2/2
Ch05	Transiluminación DIC (Differential interference contrast)			

3.3.3 Microscopía Light-Sheet

Este tipo de microscopía se basa en la adquisición de imágenes 3D de un órgano entero o una parte de este gracias a la proyección de seis hojas de luz que inciden sobre la muestra, tres a cada lado. Mediante una cámara de alta resolución sCMOS localizada perpendicularmente a las hojas de luz y moviendo la muestra a través de dichas hojas, se generan las imágenes 3D que serían imposibles mediante microscopía confocal debido a su baja capacidad de penetración en la muestra. El microscopio utilizado en este trabajo fue el Light-Sheet Ultramicroscope II (Miltenyi), con una configuración de objetivo 2X (Olympus MVPLAPO) combinado con un único zoop óptico (Olympus MVX-10 zoom) y una cámara CMOS (Andor Neo NEOCM).

Hay que destacar que para utilizar esta tecnología se debe clarificar la muestra previamente, es decir, hacerla transparente. Para ello se pueden utilizar diferentes técnicas basadas en métodos acuosos u orgánicos; la utilización de uno u otro dependerá del tipo de inmunofluorescencia que se quiera realizar en el tejido o del grado de conservación de las estructuras que lo componen^{255,256}.

Después de realizar muchas pruebas con diferentes métodos de clarificación, tanto acuosos como orgánicos, nos decantamos por uno de los métodos orgánicos que, además, se produce de manera comercial, evitando así posibles problemas que puedan tener otros protocolos que no están tan estandarizados. Los componentes están basados en un compuesto comercial llamado VISIKOL®. El protocolo para realizar el procedimiento de clarificado se obtiene de la página web www.visikol.com, donde dependiendo del órgano, de la especie y del tamaño del mismo, la página te genera un protocolo individualizado que a nosotros, personalmente, nos funcionó bastante bien.

Así, el protocolo utilizado por nosotros fue el siguiente:

- Preparación de la muestra:
 - Etanol 50% - 30 min.
 - Etanol 25% - 30 min.
 - Etanol 10% - 30 min
 - PBS – 1 hora (x2)
 - *Permeabilisation buffer* (VISIKOL) – 90 min.
 - PBS – O/N (*overnight*)
- Permeabilización
 - PBS – 30 min.
 - Metanol 50%/PBS – 45 min.
 - Metanol 70%/dH₂O – 45 min.
 - Metanol 100% - 2 h.
 - Metanol 80%/DMSO – 1 h (x2)
 - Metanol 80%/dH₂O – 45 min.
 - Metanol 50%/PBS – 45 min
 - PBS – 30 min (x2)
 - PBS/1%TritonX-100 – 45 min (x2)
 - Tampón de permeabilización⁽¹⁾
- Tinción
 - Tampón de bloqueo⁽²⁾
 - Anticuerpo primario* [1:100] (diluído en tampón de anticuerpos⁽³⁾) – 3 días
 - Tampón de lavado⁽⁴⁾
 - Anticuerpo secundario* [1:600] (diluído en tampón de anticuerpos) – 3 días
- Clarificado
 - Metanol 50%/PBS
 - Metanol 70%/PBS
 - Metanol 100%
 - Visikol-HISTO™
 - Visikol-HISTO2™ (conservar aquí la muestra indefinidamente)

⁽¹⁾PBS/0,2% TritonX-100/0,3M Glicina/20% DMSO

⁽²⁾ PBS/0,2% TritonX-100/6% NHS (*Normal Horse Serum*)/10%DMSO

⁽³⁾PBS/0,2% Tween®20/Heparina 10µg/µL/ 3% NHS/5% DMSO

⁽⁴⁾PBS/0,2 Tween®20/Heparina 10µg/µL

*Los Anticuerpos fueron los mismos que se utilizaron para las inmunofluorescencias (rabbitSOX2 – Seven Hills) (Donkey antiRabbitCy™3 – Jackson ImmunoResearch), ya citados en la Tabla 16 y 17

4 ESTUDIOS DE ADN

4.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO/TEJIDO

Para la extracción de ADN de los cultivos celulares primarios de tiroides se utiliza el kit DNeasy blood & tissue kit 50 (Cat.69504, QIAGEN). En el caso de tejidos, el kit utilizado es Allprep DNA/RNA Mini kit 50 (Cat. 80204, QIAGEN).

Para la cuantificación tanto de tejido como de cultivo celular el kit utilizado fue el Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Cat.4343895, Thermo Fisher Scientific). A continuación, dicha cuantificación se mide con el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

4.2 GENOTIPADO DE RATONES

4.2.1 Extracción de ADN

Se preparan 200 mL para hacer el stock de *tail buffer* a partir de los componentes referidos en la tabla 19.

Tabla 20. Componentes para la preparación del *tail buffer*

Reactivos <i>tail buffer</i>	Referencia
4mL de NaCl 5M	S9888, Sigma
2mL Tris 1M pH 9,5	---
400µL EDTA 0,5M pH8	E9884, Sigma
20 mL SDS 10%	L4509, Sigma
Se añade agua miliQ hasta un volumen final de 200mL	

Añadimos en el eppendorf que contiene la cola del ratón que se quiere genotipar 150µL de *tail buffer* y otros 5µL de Proteinasa K (EO0491, Thermo Scientific).

Se coloca la mezcla en el termoblock a 55°C, hasta que la cola esté completamente deshecha. A continuación, se centrifugan durante 5 minutos a 2000 rpm.

Se recoge 90 µL de sobrenadante y se descarta lo demás. Se añade a dicho sobrenadante el doble de etanol absoluto frío (en este caso, 180 µL). A continuación, se centrifugan durante 5 minutos a 10000 rpm.

Se decanta el sobrenadante a mano ya que el precipitado de ADN quedará adherido al fondo del eppendorf. Se deja secar unos 10 minutos.

Se añaden 50µL de agua miliQ y se aplica un vórtex. Para la realización de la PCR se usará 1µL.

5 ESTUDIOS DE ARN

5.1 EXTRACCIÓN ARN

La extracción de ARN de tejidos humanos se realiza mediante el kit Allprep DNA/RNA Mini kit 50 (Cat. 80204, QIAGEN).

Para la extracción de ARN de cultivos primarios humanos se usa TRIzol™ (15596026, Invitrogen) y se siguen las indicaciones descritas por el proveedor. El RNA obtenido se trata con 1U de DNasaI libre de RNAasas (EN0521, Thermo Fisher) durante 30 min a 37 °C. Después se purifica mediante el kit GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro kit (K0842, Thermo Fisher).

Para la extracción de ARN a partir de tejidos o cultivos de ratón también se usa TRIzol, pero el ARN obtenido no se purifica, ya que debido a la pequeña cantidad de células no es posible alcanzar un rendimiento adecuado de la columna.

Una vez extraído, se determina la cantidad de ARN presente en la muestra y se procede a su cuantificación con la ayuda de un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher) (ratio deseable $A_{260}/A_{280}=2-2,2$).

5.2 SÍNTESIS DE ADNc A PARTIR DE ARN MEDIANTE RETROTRANSCRIPCIÓN.

En primer lugar, hacemos un pretratamiento de la muestra con ADNasa (es independiente del primer pretratamiento descrito más arriba; esto se realiza para asegurarnos que el ADN queda totalmente eliminado:

- ❖ Se incuba 1µg de ARN total con 1 U de ADNasaI libre de ARNasas (EN0521, Thermo Fisher), 1µL de tampón 10X con MgCl₂ y agua hasta un volumen final de 10µL a 37°C durante 30 minutos.
- ❖ Para inactivar la ADNasaI se añade 1µL de EDTA y se incuba a 65°C durante 10 minutos en un termoblock.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realiza mediante una transcripción inversa (RT-PCR) del ARN de partida:

- ❖ Se añaden 1,5µL de 10mM dNTPs, 0,1 µL de cebadores aleatorios y agua destilada hasta un volumen final de 30µL.
- ❖ Se incuba durante 10 minutos a 65°C.
- ❖ Se añaden 6µL del tampón 5X First-Strand, 3 µL de 0,1M DTT, 1µL de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL) y se incuba a 37°C durante 2 minutos.
- ❖ Se añaden 1,5µL de 300 UI MMLV (28025-013, Invitrogen, USA).
- ❖ En un termociclador se aplica el protocolo descrito en la tabla 20.

Tabla 21. Protocolo utilizado para la RT-PCR

Temperatura (°C)	Tiempo
25	10 min
37	50 min
42	30 min
95	5 min

5.3 PCR CUANTITATIVA

Para cuantificar la expresión de ARN una vez sintetizado el ADNc, se realiza una PCR cuantitativa (qPCR); las cantidades de reactivos varían dependiendo de si los cebadores son comerciales, diseñados por el grupo o cebadores Brilliant III Ultra-Fast SYBR MasterMix (600882, Agilent Technologies) validados previamente (tabla 21).

Tabla 22. Relación de reactivos utilizados para la qPCR

Reactivos	Cebadores comerciales	Cebadores diseñados
Cebador Fw	Mix 0,6µL	0,15µM en 12µL finales
Cebador Rv		0,15µM en 12µL finales
Sonda (Pb)		0,25µM en 12µL finales
Agua	4,4µL	4µL
2X TaqMan Gene Expression MasterMix (4369016 Applied Biosystems)	6µL	
Muestra (ADNc)	1µL	

Se añaden los reactivos a una multiplaca de 96 pocillos y se realiza la qPCR mediante un 7500 Real-Time PCR System (4351105, Applied Biosystems).

Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 22, tanto si son comerciales como los diseñados.

Tabla 23. Relación de los cebadores utilizados para la qPCR

Cebadores	Secuencia	Tamaño de la amplificación	Temperatura de hibridación
TBP humano	Fw: 5'-CTTCGTGCCAGAAATGCTGAA-3'	79bp	60°C
	Rv: 5'-CAGTTGTTCTGGCTCTCTTATTCTC-3'		
	Pb: 5'-AATCCCAAGCGGTTTGCTGCAGTCA-3'		
SOX2 humano	Hs01053049_s1, Applied Biosystems	74bp	60°C
TTF1 humano	Hs00968940_m1, Applied Biosystems	84bp	60°C
PAX8 humano	Hs00247586_m1, Applied Biosystems	83bp	60°C
Tbp ratón	Mm01277042_m1, Applied Biosystems	242bp	60°C
Sox2 ratón	Fw: 5'-GGAAAACCAAGACGCTCATGAA-3'	84bp	60°C
	Rv: 5'-CGCTCGCCATGCTGTTC-3'		
	Pb: 5'-AAGGATAAGTACACGCTTCCCGGAGGCT-3'		

Cada multiplaca de 96 se utiliza para una sola reacción y en cada una se miden las muestras por duplicado junto con controles positivos y negativos de la técnica (todos los reactivos a excepción de MMLV) y blancos (todos los reactivos a excepción del ADNc). Como control de la expresión para los ensayos cuantitativos de ARNm se utiliza TBP, ya que muestra patrón de expresión estable en diferentes tejidos y líneas celulares.

Para expresar los resultados de cada gen se utiliza el método de la diferencia de umbral de ciclos o ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{TBP}$).

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utiliza el programa Graphpad Prism 8.0.1 (San Diego, USA, www.graphpad.com). En el análisis se excluyeron aquellos datos que se desvían ± 2 veces la desviación estándar²⁵⁷, o bien cuando se observa algún fallo durante el

procedimiento experimental. En todos los análisis se considera una diferencia estadísticamente significativa cuando la probabilidad es $p \leq 0,05$ (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$).

Los experimentos *in vitro* se realizan como mínimo 3 veces con al menos 6 replicados por cada grupo o condición. Los datos obtenidos tras los procedimientos se representan como la media de los grupos \pm error estándar de la media (SEM).

Los experimentos *in vivo* se diseñan para que cada grupo contenga como mínimo 3 individuos (debido al poco número de ratones GMO) y, en los casos que fuera posible, hasta un máximo de 6.

Para analizar los datos en primer lugar, se realiza un test de normalidad para conocer que tipo de análisis estadístico se debe utilizar. Se utilizan dos test de normalidad distintos de acuerdo con el tamaño muestral. Para un conjunto de muestras grande ($n \leq 20$ y ≥ 7) se utiliza el test de Shapiro-Wilk²⁵⁸ y para un conjunto de muestras pequeño ($n \leq 6$) se utiliza el test Kolgomorov-Smirnov²⁵⁹. Si las poblaciones siguen una distribución normal (Gaussiana) se realizan test estadísticos paramétricos y en el caso contrario, se realizan test estadísticos no paramétricos.

6.1 TEST PARAMÉTRICOS

Cuando las muestras siguen una distribución normal se realizan dos tipos de análisis:

- ❖ ANOVA: se utiliza para determinar si hay diferencias entre las medias de 3 o más grupos o poblaciones independientes que siguen una distribución normal. En primer lugar, se realiza el test F que indica si hay diferencias entre las medias de los grupos. En el caso de que haya diferencias significativas se pueden realizar 3 test distintos para comparar los grupos²⁶⁰. El test de Tukey compara únicamente dos medias entre sí y ejecuta todas las posibles comparaciones. El test de Dunnett permite comparar todas las medias con un solo grupo, normalmente el grupo control. El test de Bonferroni que es el más potente, realiza comparaciones entre más de tres grupos²⁶¹. Para este trabajo se utilizaron todas las correcciones y se indicarán en cada pie de figura.
- ❖ T-Test: se utiliza para comparar las medias de dos poblaciones independientes que siguen una distribución normal. Puede comparar grupos con un tamaño muestral pequeño ($n \leq 5$), por lo que se considera un test robusto^{262,263}. Se pueden realizar dos tipos de contraste de hipótesis para comparar las medias: bilateral (2 colas) o unilateral (1 cola). En el primer caso, se consideran como regiones críticas del estadístico la cola inferior y superior de la distribución de los datos. En el segundo caso, solo se considera una de ellas. En este trabajo se utiliza el t-test de dos colas.

6.2 TEST NO PARAMÉTRICOS

Se pueden realizar dos tipos de análisis estadísticos cuando las poblaciones no siguen una distribución normal:

- ❖ Test de Kruskal-Wallis: se utiliza para identificar si existen diferencias entre 3 o más grupos de poblaciones que no siguen una distribución normal. En el caso de existir diferencias significativas entre los grupos o poblaciones, se realiza el test de Dunn para determinar las diferencias entre las medianas de los grupos^{264,265}.
- ❖ Test de Mann-Whitney: se utiliza para comparar las medianas de dos grupos independientes que no siguen una distribución normal²⁶⁶.



RESULTADOS





1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN SOX2 EN RATONES NORMALES

1.1 EXPRESIÓN DE SOX2 A NIVEL DE ARN.

Como nuestro objetivo final era aclarar la existencia de células madre en la tiroides adulta, nuestra primera acción fue explorar si había expresión del gen de *Sox2* en esta glándula. Como se explicó en la introducción *Sox2* es un factor de transcripción que se expresa en muchas de las ASCs postnatales, y sobre el que teníamos experiencia previa durante el descubrimiento de las ASCs hipofisarias^{128,267}.

Decidimos analizar inicialmente la expresión de *Sox2* a nivel de ARN mensajero puesto que dichos trabajos previos de nuestro grupo en la hipófisis observaron que una diferencia en la expresión de ARN mensajero en algunos genes representaba una regulación propia de la expresión de ese gen, pero en otros casos se relacionaron cambios en la expresión cuantitativa de un gen de células madre en la glándula total con cambios en las proporciones de las poblaciones celulares de la hipófisis¹²⁸. Para ello se extrajo ARN total de tejido de tiroides para comprobar su expresión en ratones de diferentes edades y sexos. Se estudiaron ratones hembra de 15 (prepuberales), 30, 60 y 90 (adultas) días y ratones macho de 30 (prepuberales), 60 y 90 días.

En la figura 1A se observa la expresión de ARNm de *Sox2* en todos los grupos. Estos datos se compararon con ARN de epitelio procedente de la tráquea de los mismos ratones, ya que su epitelio es muy rico en células *Sox2* positivas como puede observarse por la elevada detección²⁶⁸. En esta figura también se observa una disminución de los niveles de *Sox2* en hembras al empezar la pubertad (30 días) y un marcado incremento en el ARN de *Sox2* al alcanzar la etapa adulta (90 días) (Figura 1A, izquierda). Sin embargo, no encontramos estas diferencias en machos, que en cambio presentan pequeño un pico en la pubertad (60 días) (Figura 1A, derecha). No se observan diferencias a lo largo del crecimiento, sin embargo, al analizar la expresión del ARN mensajero de *Tshr*, un gen fuertemente expresado en el epitelio folicular tiroideo (Figura 1B).

Se compararon los niveles de expresión de *Sox2* entre hembras y en machos en cada una de las etapas temporales. Sabemos que en hembras el inicio de la pubertad se correspondería con 30 días y final de la pubertad con 60 días. En los machos, el inicio de la pubertad sería posterior estando a los 60 días en medio de esta etapa. Ambos sexos alcanzan la etapa adulta de madurez a los 90 días²⁶⁹. En nuestros datos, podemos observar claramente que en adultos hay niveles significativamente mayores de *Sox2* en la tiroides de las hembras (Figura 1C). No se observa en cambio ninguna diferencia entre ratones adultos de diferente sexo en *Tshr* (Figura 1D).

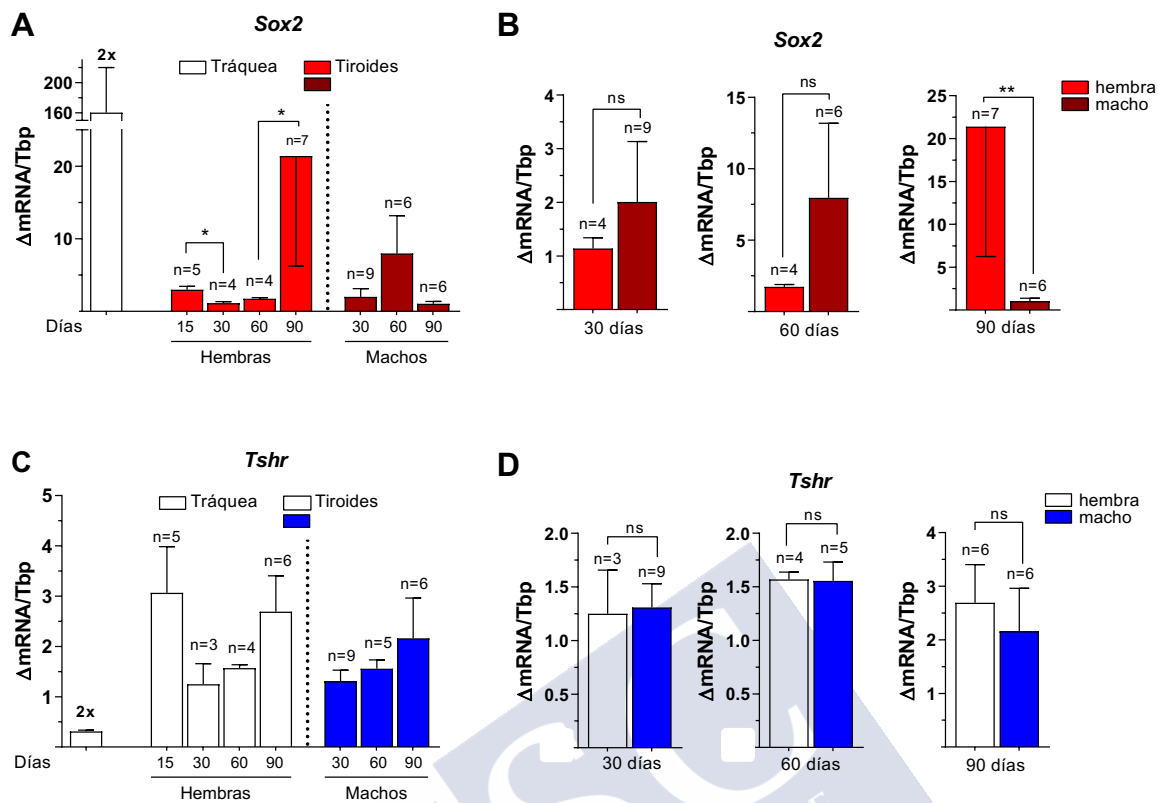


Figura 1. La expresión del ARNm de *Sox2* pero no de *Tshr* se incrementa tras la pubertad en la glándula tiroides de ratones hembras, pero no de machos. Expresión del ARNm de *Sox2* (A, C) y *Tshr* (B, D) en hembras y machos a 15, 30, 60 y 90 días. Se utilizó el epitelio de la tráquea como control positivo de la expresión de *Sox2*. A) Expresión de *Sox2* en la tiroides de ratones de diferentes edades. Izquierda: ratones hembras de 15, 30, 60 y 90 días. Derecha: ratones machos de 30, 60 y 90 días. B) Expresión de *Tshr* en los mismos grupos de edad. C) Comparación de la expresión de *Sox2* entre sexos en grupos de la misma edad. D) Comparación de la expresión de *Tshr* entre sexos en grupos de la misma edad. En las gráficas se representan la media±el error estándar de Taqman qRT-PCR con un tamaño muestral (n) mostrado encima de cada barra. Se utiliza un test de Kruskal-Wallis para los apartados A y C; y un test de Mann-Whitney para los apartados B y D; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$.

1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE SOX2

1.2.1 Expresión de *Sox2* mediante Western-Blot en ratones

No siempre las diferencias encontradas en la cuantificación del ARNm de un gen coinciden con la de la expresión de su proteína en un tejido. Para comprobar los resultados obtenidos en el apartado anterior, cuantificamos la expresión de la proteína total de SOX2 en ratones individuales de ambos sexos a dos edades distintas mediante western blot (Figura 2). Como se puede observar, la proteína SOX2 se detecta al peso correcto mediante comparación con el epitelio de la tráquea, tomado como control positivo por su abundancia (Figura 2A). El western se rehibridó para β -actina, una proteína de citoesqueleto tomada como control de carga en cada calle. Cuantificamos la expresión relativa de SOX2 (Figura 2B). Pudimos observar cómo SOX2 es significativamente más abundante en tiroides de ratones hembras comparadas con machos de la misma edad. Lo más destacado es que el resultado en adultos (90 días) confirma el resultado obtenido para el ARNm.

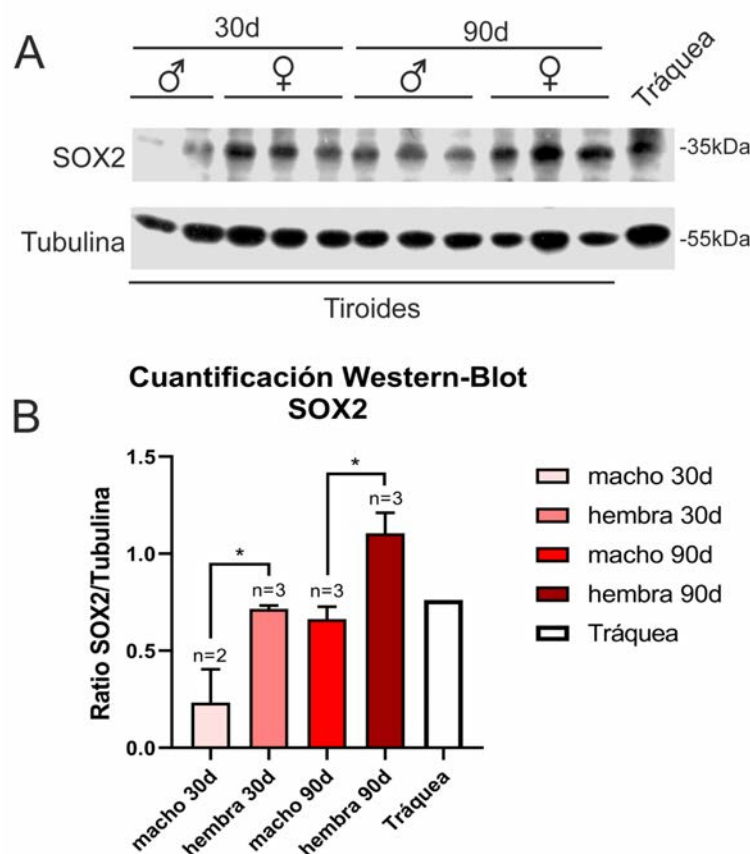


Figura 2. La expresión de la proteína SOX2 en la glándula tiroides es significativamente mayor en ratones hembras que en machos. Expresión de proteínas en ratones individuales machos y hembras de 30 y 60 días. El epitelio de la tráquea se utilizó como control positivo. A) Western blot para SOX2 y la proteína de citoesqueleto α -tubulina. B) Cuantificación de la expresión específica de SOX2 en tiroides comparando el grupo de hembras y machos a cada una de las dos edades. Se representa la media \pm el error estándar de la intensidad de las bandas a partir del western blot, con un tamaño muestral (n) mostrado encima de cada barra. Se utiliza un test de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$.

En conjunto, nuestros resultados podrían sugerir que las hembras adultas podrían tener más población celular SOX2+ que los machos adultos. Esto podría estar relacionado con unos mayores requerimientos funcionales de la tiroides en el sexo femenino inducidos bien por factores hormonales o genéticos, como ha sido descrito previamente en humanos^{270,271,272}. A partir de ese momento, y sabiendo la importancia del sexo en la patología hiperproliferativa benigna y maligna de la tiroides, realizamos nuestros siguientes experimentos fundamentalmente en hembras.

1.2.2 Estandarización de la tinción de secciones de tejido de ratón hembra de 90 días por IHQ con diferentes anticuerpos de Sox2

Nuestro siguiente paso fue localizar qué células expresaban SOX2 en la glándula tiroides para ver dónde se localizaban y cómo se disponían en el tejido. Mediante técnicas de inmunohistoquímica en secciones de tejido fijado y parafinado (*Formalin-fixed Paraffin-embedded*, FFPE) realizamos una primera estandarización de la tinción de SOX2 en la tiroides de ratones, un tejido que al tener coloide lleno de tiroglobulina glicosilada provoca ciertos problemas técnicos en la detección de proteínas.

Para ello utilizamos dos anticuerpos anti-SOX2: uno procedente de conejo y otro de cabra. Con ambos anticuerpos observamos una tinción nuclear clara del epitelio de la tráquea, tomado como control positivo (Figura 3A, asteriscos). En la tiroides, la tinción no fue tan abundante ni intensa. Sin embargo, con ambos anticuerpos observamos una tinción específica de células individuales que estaban situadas por el exterior de los folículos, y algunas en íntimo contacto con el epitelio folicular (Figura 3B). Con ambos anticuerpos tuvimos el mismo resultado (comparar en la Figura 3B, la derecha con la izquierda).

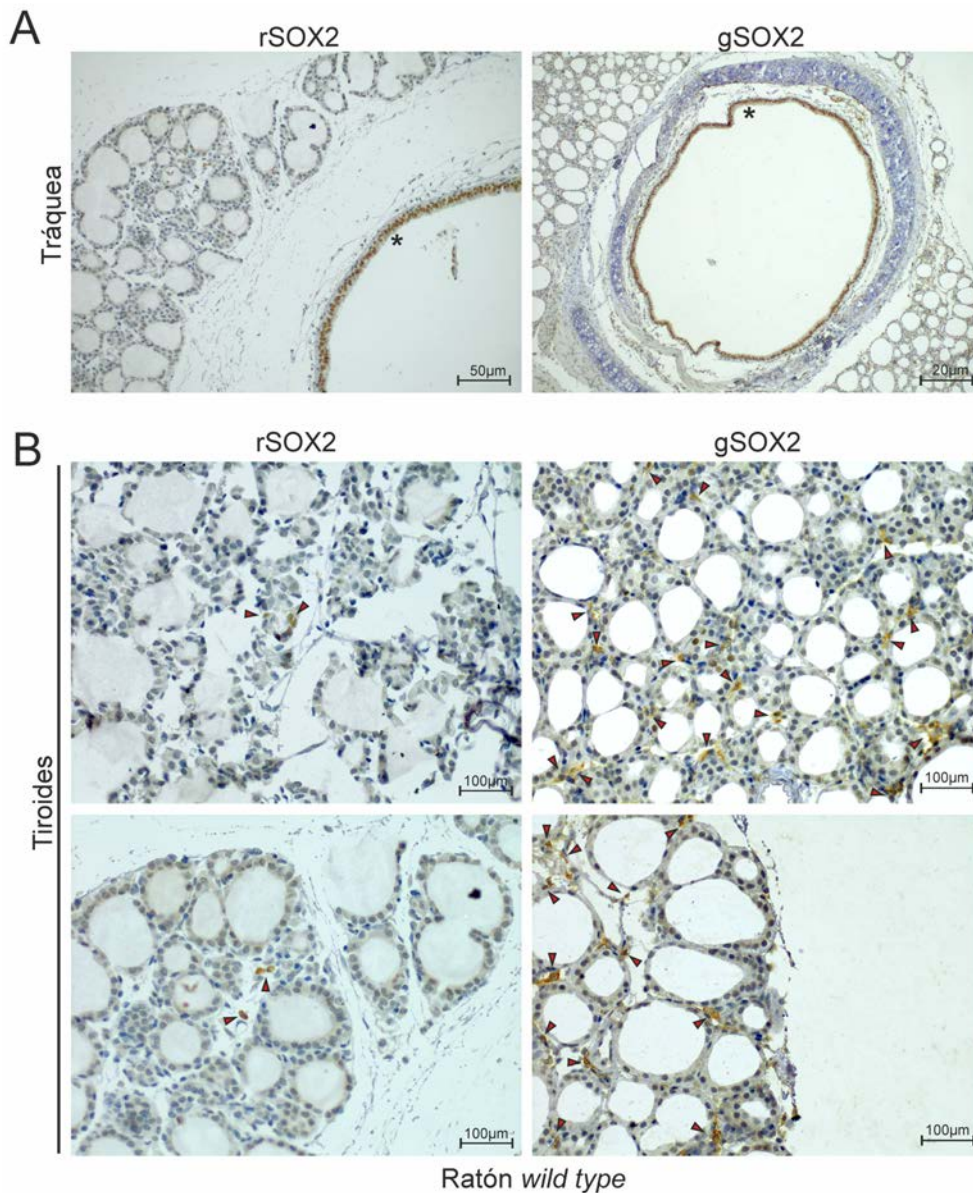


Figura 3. Las células SOX2+ son distintas al epitelio folicular, pero están íntimamente asociadas con éste. Inmunohistoquímica en ratones hembra de 90 días (marrón) contrateñido con hematoxilina diluida para revelar los núcleos (azul). Se utilizaron dos anticuerpos de SOX2 de distinta especie: conejo (rSOX2) y cabra (gSOX2). A) Las secciones de tráquea (asteriscos) muestran que el epitelio es completamente positivo, con una tinción nuclear, para SOX2 con el anticuerpo rSOX2 (izquierda) y con el anticuerpo gSOX2 (derecha). En la tiroides no se detecta tinción en el epitelio folicular. B) En las secciones de tiroides, a mayor aumento, se observa el marcaje positivo con ambos anticuerpos de células Sox2 (señaladas con asteriscos); estas células se disponen normalmente en la zona interfolicular.

Aunque tanto el anticuerpo de cabra^{273,274} como el de conejo^{275,276} están citados en literatura y ambos son válidos para estas técnicas, nos decantamos por este último debido a que en la tinción con el anticuerpo de cabra aparecía señal difusa de manera inespecífica en partes de restos de sangre en vasos sanguíneos, e incluso a veces se unía al coloide (no mostrado), dando una señal de fondo molesta que con el anticuerpo de conejo no teníamos. Esto no pasaba cuando incubábamos con el anticuerpo secundario sólo, por lo que dedujimos que era *background* proveniente del goat-anti-SOX2.

1.2.3 Colocalización de diferentes marcadores en las células Sox2 positivas en ratones hembras de 90 días.

Para caracterizar las células SOX2 encontradas estudiamos marcadores que pudieran coexpresarse con SOX2 mediante tinciones dobles por inmunofluorescencia. Utilizamos el anticuerpo de SOX2 junto con marcadores de tipo celular (filamentos intermedios), fenotipo de epitelio endocrino de la tiroides y otros marcadores típicos ya descritos en poblaciones de células madre de otros órganos.

Nuestra primera tinción fue identificar el tipo celular de la población SOX2. La colocalización con citokeratinas fue definitoria, como se pudo observar al teñir con AECK, una mezcla de dos anticuerpos (AE1 y AE3) que detecta muchos tipos de queratinas. El anticuerpo AE1 detecta citokeratinas de la subfamilia A (CK10, CK13, CK14, CK15, CK16 y CK19); el anticuerpo AE3 detecta citokeratinas de la subfamilia B (CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7 y CK8) (Figura 4A). Observamos que el epitelio folicular es positivo para citokeratinas, como se espera ya que es epitelial, pero en las células SOX2 se colocalizan ambas tinciones demostrando que la población SOX2 es epitelial. La intensidad del marcaje es mayor en las células SOX2 comparada a las células foliculares, aunque puede haber diferencias de tamaño entre las dos poblaciones celulares que originen una diferencia aparente.

En esta caracterización inicial estudiamos la colocalización con otras proteínas asociadas a la membrana plasmática como son β -catenina y E-Cadherina. La β -catenina es una proteína asociada a la cara citoplasmática de la membrana, mientras que E-Cadherina es una proteína transmembrana donde se anclan los filamentos del citoesqueleto para formar uniones entre células epiteliales como desmosomas y bandas de adhesión. En resultados anteriores de nuestro propio grupo, demostramos que las células madre GPS de la hipófisis co-expresan de forma intensa ambas proteínas^{128,129}. Las células SOX2 expresaban β -catenina, que rodeaba el marcaje nuclear (Figura 4B). Ninguno de estos marcajes colocalizaba subcelularmente, puesto que SOX2 era nuclear, y las otras dos proteínas están relacionadas con la membrana plasmática. Pero pudimos observar alguna célula con núcleo SOX2 positivo completamente rodeada de β -catenina. Las células SOX2 colocalizaron con E-Cadherina, aunque este marcador se expresaba de forma poco intensa en comparación con su expresión fuerte en el epitelio folicular, negativo para SOX2 (Figura 4C).

El siguiente paso fue teñir para los dos factores de transcripción de fenotipo tiroideo, TTF1 y PAX8, que colocalizan en el epitelio folicular desde el desarrollo embrionario. Las células SOX2 positivas lo eran también para TTF1, aunque con mucha menos intensidad que el epitelio folicular tiroideo (Figura 5A-B). Nosotros definimos estas células a partir de ahora como SOX2⁺/TTF1_{low} a partir de ahora. Estas células SOX2⁺/TTF1_{low} eran negativas para PAX8 (Figura 5C-D).

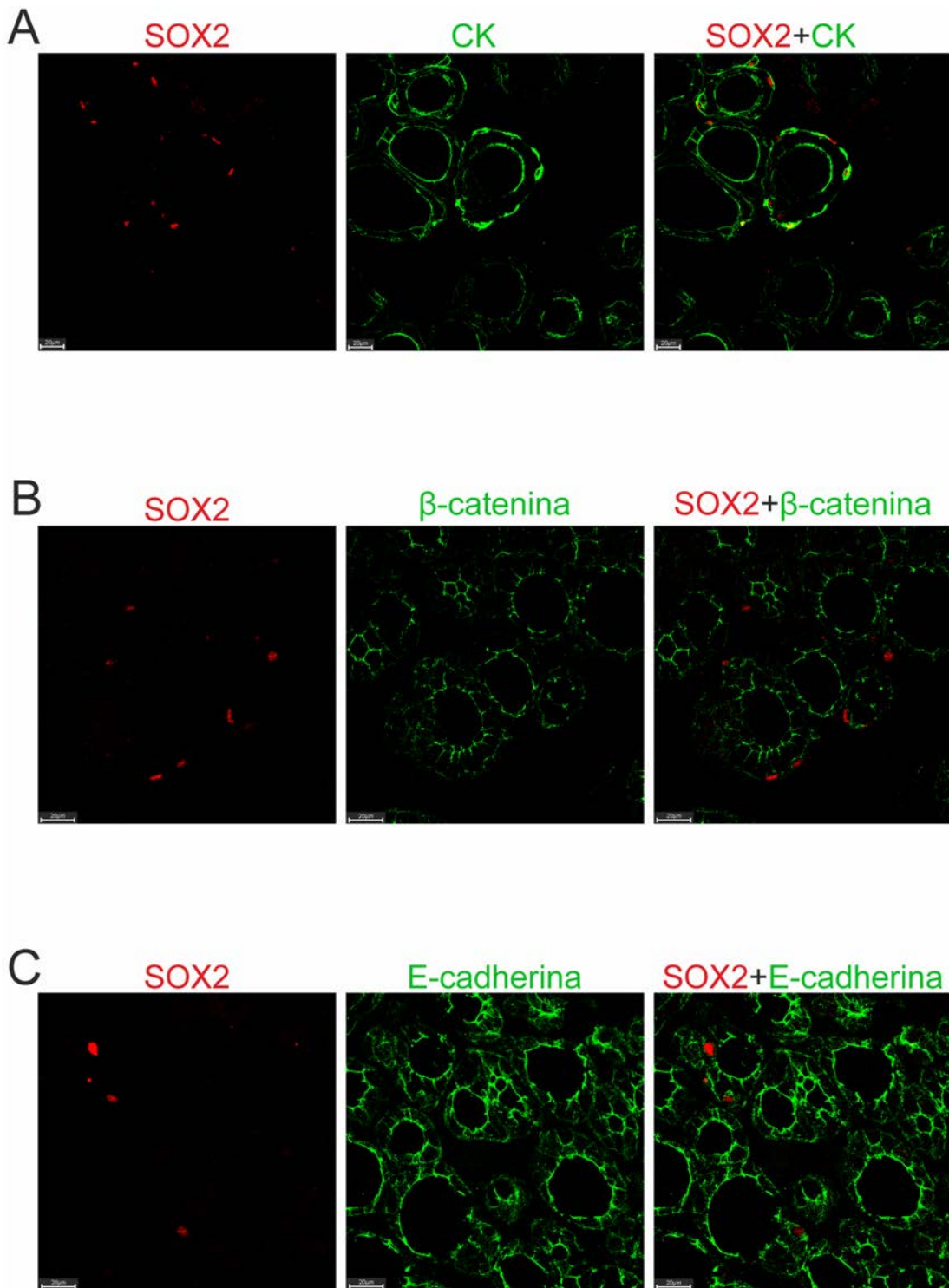


Figura 4. Las células SOX2 expresan citokeratinas, β -Catenina y E-Caderina. Inmunofluorescencias dobles estudiadas con microscopía confocal para identificar a las células Sox2 positivas (marcaje nuclear, rojo) frente a las proteínas asociadas a la membrana (marcaje citoplasmático, verde). A) SOX2 colocaliza con citokeratinas que también se expresan en el epitelio folicular. La tinción parece más intensa en las células SOX2. B) Las células SOX2+ coexpresan β -catenina que rodea el marcaje nuclear. C) SOX2 colocalizan con E-cadherina, aunque no la sobreexpresan como ocurría en el caso de citokeratinas, y el marcaje parece más intenso en el epitelio folicular.

Figura 7 (parte 2)

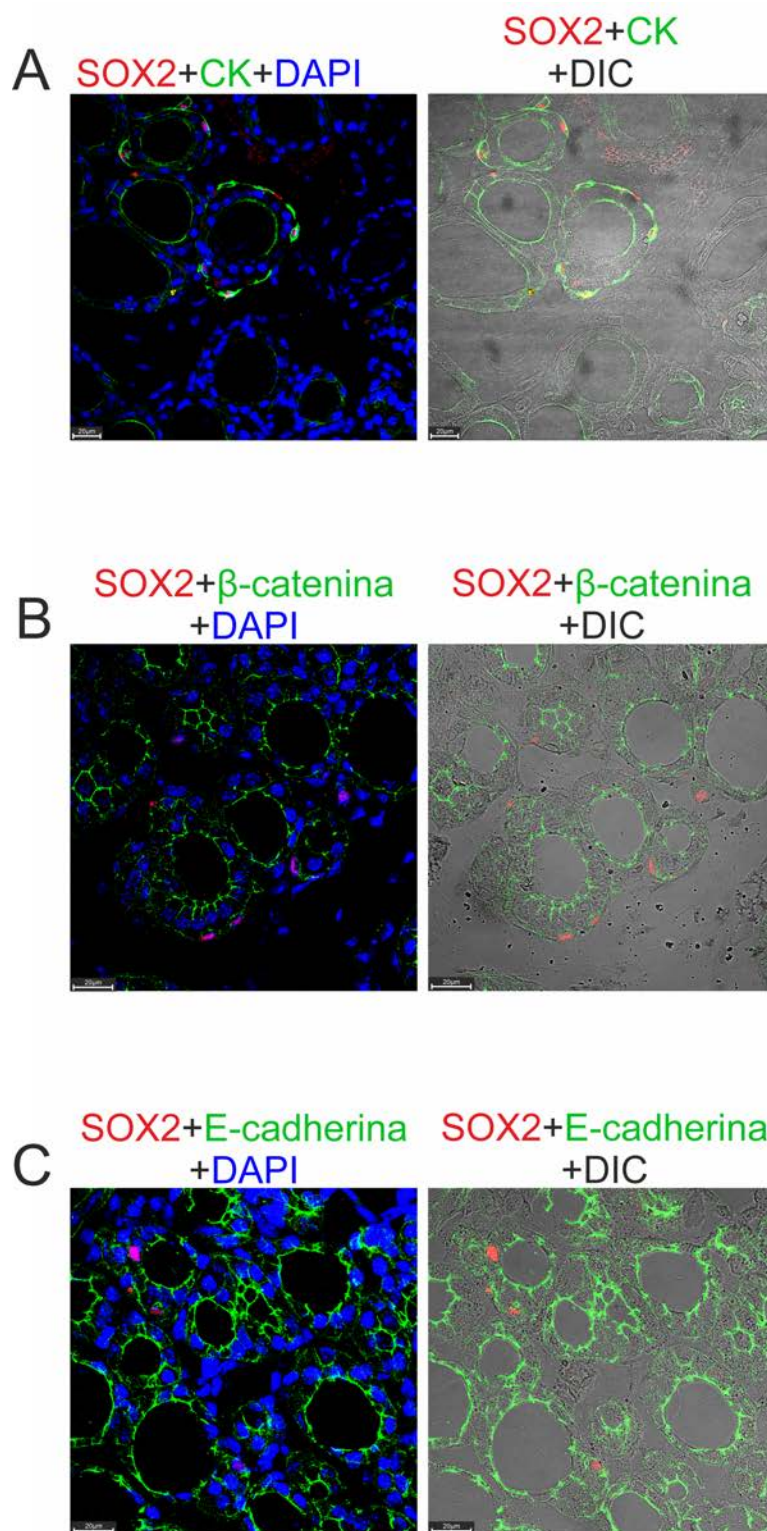


Figura 4 (parte 2)

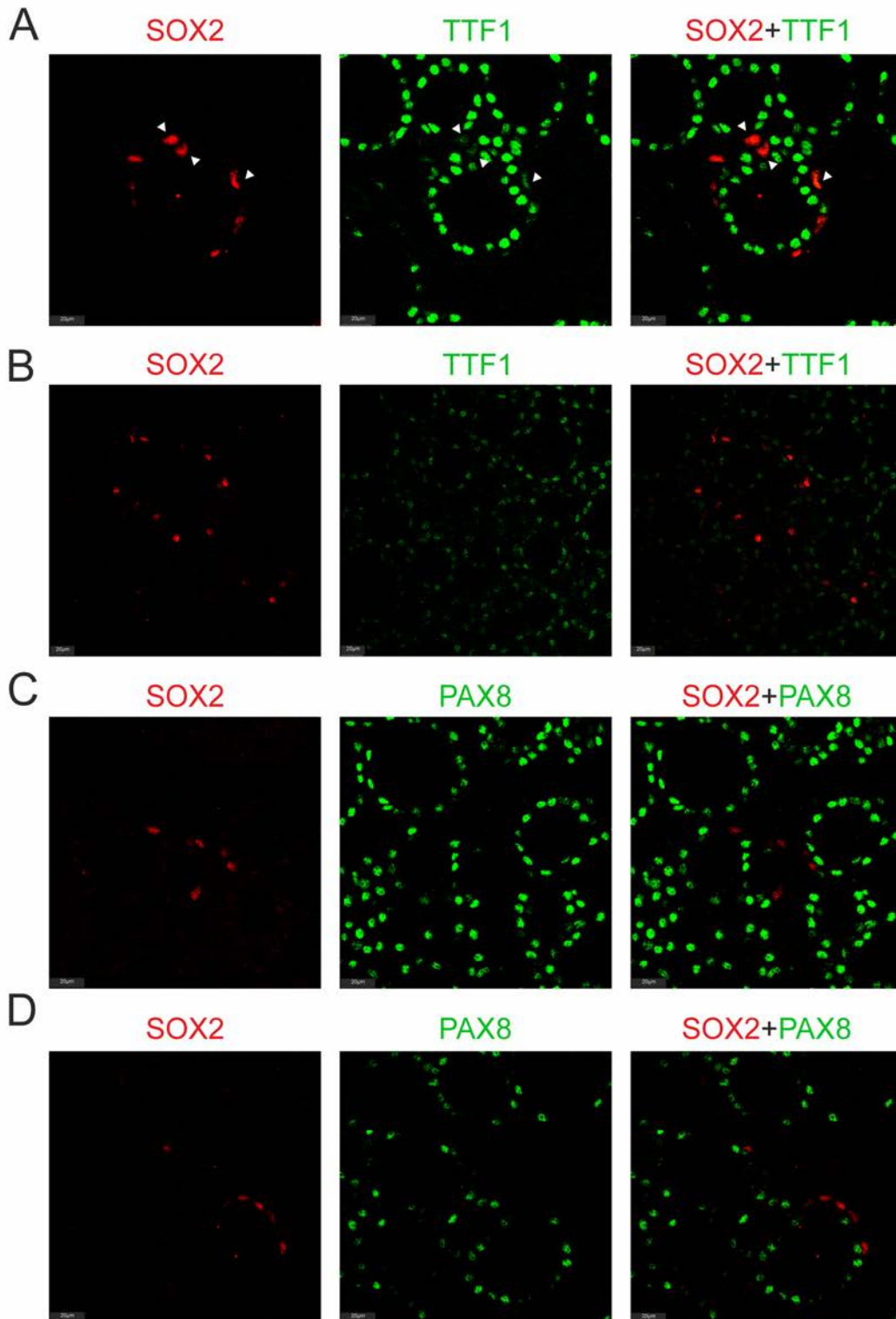


Figura 5. Inmunofluorescencia para estudiar la colocalización de SOX2 con los factores de transcripción característicos de epitelio folicular. A) Las células SOX2+ co-expresan el factor de transcripción TTF1 característico de tiroides. Este marcaje siempre es más débil que las demás células que componen el tejido, catalogadas por nosotros como "Sox2+TTF1_{low}" e indicadas con flechas. B) Campo a menor aumento para dar una visión global de este resultado en el lóbulo tiroideo. C) Las células Sox2+ son negativas para PAX8, aunque las células del epitelio folicular de la glándula son PAX8+, algunas con más intensidad que otras por razones de la sección. D) Otro campo distinto en otro lóbulo tiroideo demostrando de nuevo que las células SOX2 no expresan PAX8.

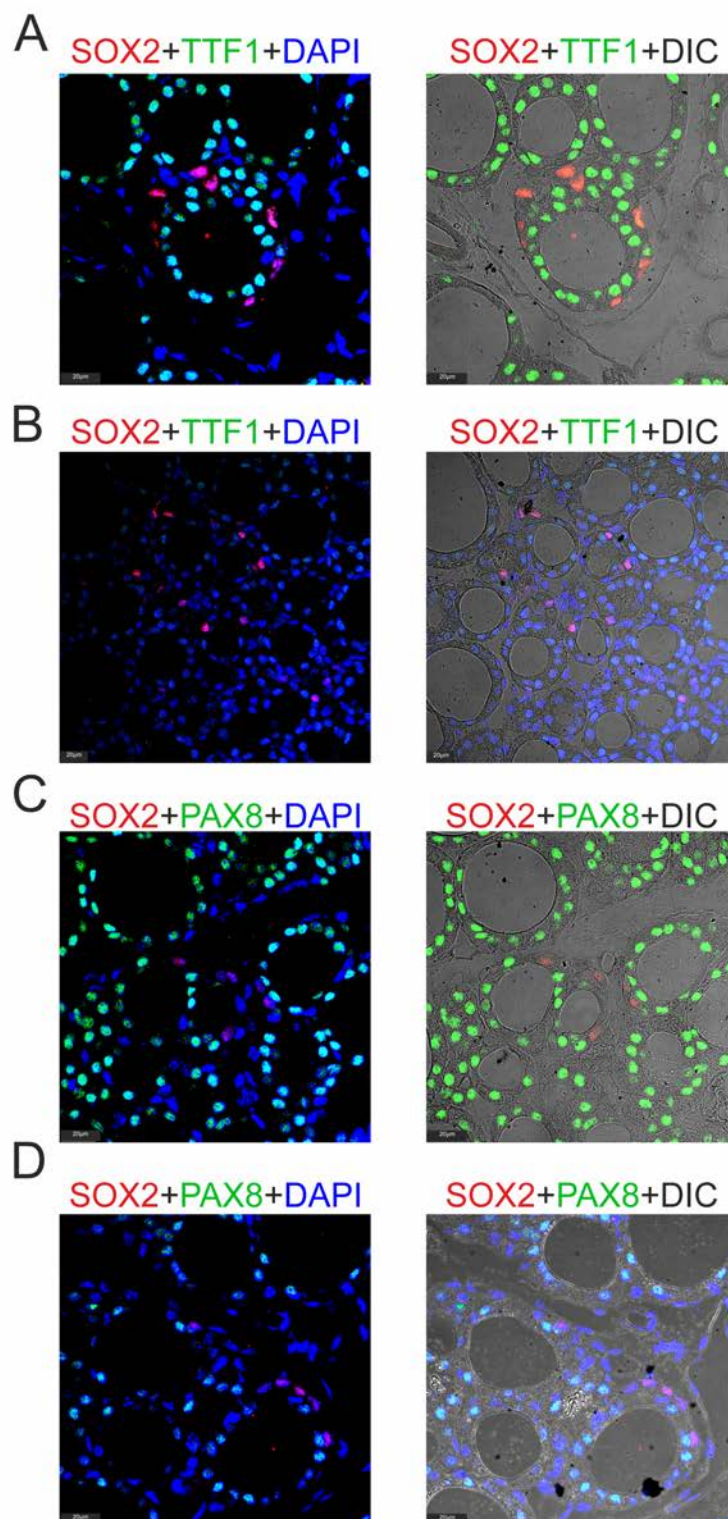


Figura 5 (parte 2)

En la glándula tiroides hay dos poblaciones epiteliales endocrinas, el epitelio folicular secretor de hormonas tiroideas de origen endodérmico y las células C productoras de Calcitonina cuyo origen embrionario es aparentemente la cresta neural según experimentos clásicos en embrión de pollo²⁷⁷, aunque hay cierto debate sobre ello con experimentos más recientes proponiendo que su origen embrionario es endodérmico^{278,279}. Nuestro siguiente paso fue estudiar si las células SOX2 eran células C. Como se puede observar en la Figura 6, ninguno de los campos fotografiados presentó co-localización entre Calcitonina y SOX2. Se puede observar además que las zonas de la tiroides donde hay abundancia de células C tienen pocas células SOX2, y viceversa.

p63 es una proteína nuclear que en epitelios glandulares exocrinos se expresa en células basales, que son las células madre (por ejemplo, próstata o mama). También, en el epitelio de vías aéreas las células p63 se consideran las células madre desde la época embrionaria, más restringidas en su potencialidad tras el nacimiento^{280,281}. En la tiroides, p63 es el marcaje encontrado en los llamados “nidios sólidos” en tiroides humano que se propusieron como agrupaciones de células madre de tiroides^{282,283,284}. En la base de datos Human Protein Atlas, tres anticuerpos validados para tinción en FFPE de tiroides humano, detectaban p63 en mayor o menor porcentaje de células (desde <25% hasta >75%) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000073282-TP63/tissue/thyroid+gland>).

Nuestro resultado fue muy interesante. p63 mostró un marcaje nuclear abundante en el epitelio folicular tiroideo negativo para SOX2 (Figura 7). Pero entre la población SOX2 pudimos observar una sub-población donde SOX2 y p63 colocalizaban, mientras que otra sub-población era absolutamente negativa para p63 (Figura 7). Ambas poblaciones estaban entremezcladas, con alguna célula aislada tanto SOX2+p63- como SOX2+p63+.



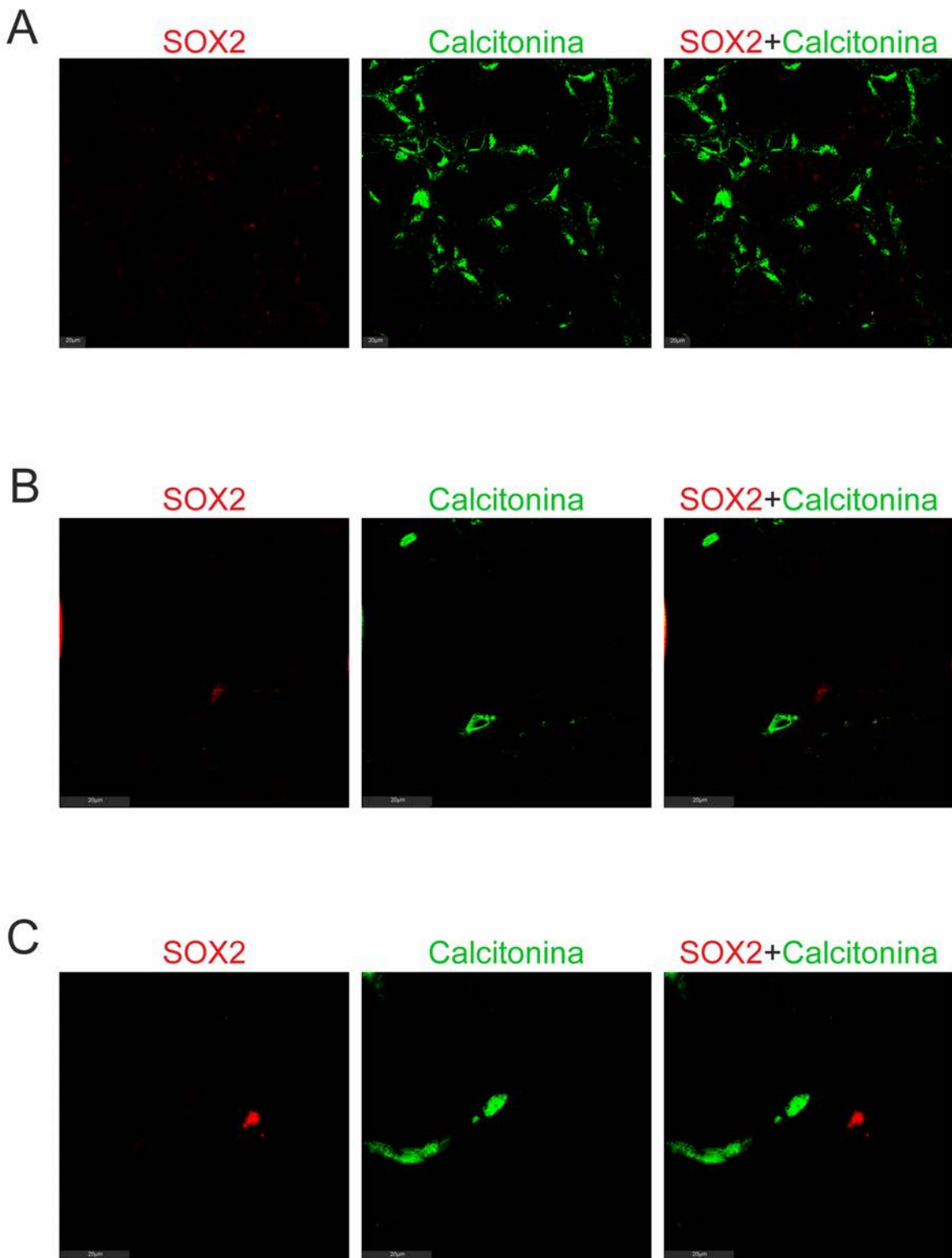


Figura 6. Las células SOX2 no son células C productoras de Calcitonina. Inmunofluorescencias dobles estudiadas con microscopía confocal para identificar a las células Sox2 positivas (marcaje nuclear, rojo) frente a las células C (marcaje citoplasmático, verde). A) Un campo a pequeño aumento con pocas células SOX2+ pero muchas células C, localizadas entre los folículos o subfoliculares. B-C) A mayor aumento, las células SOX2 no expresan Calcitonina.

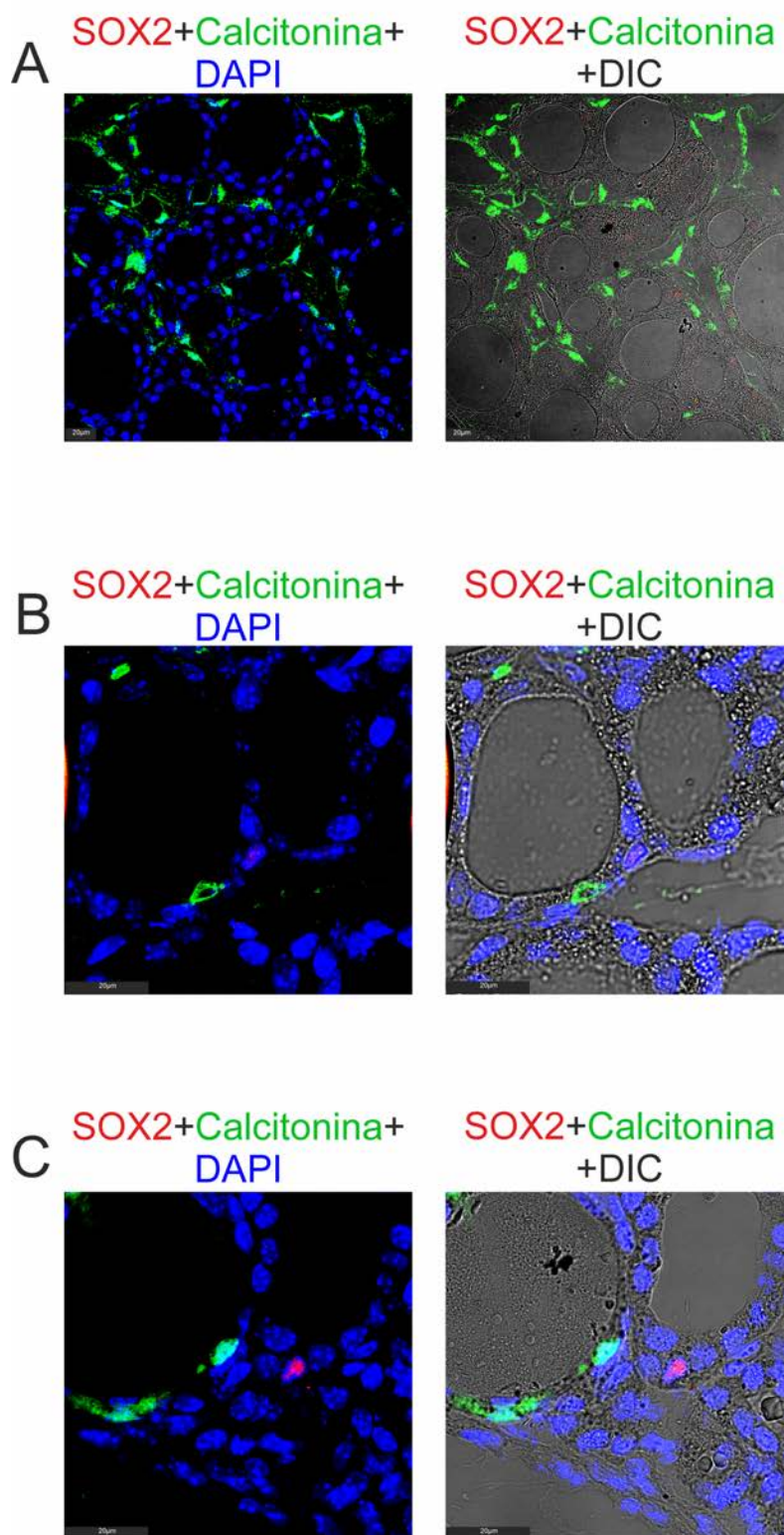


Figura 6 (parte 2)

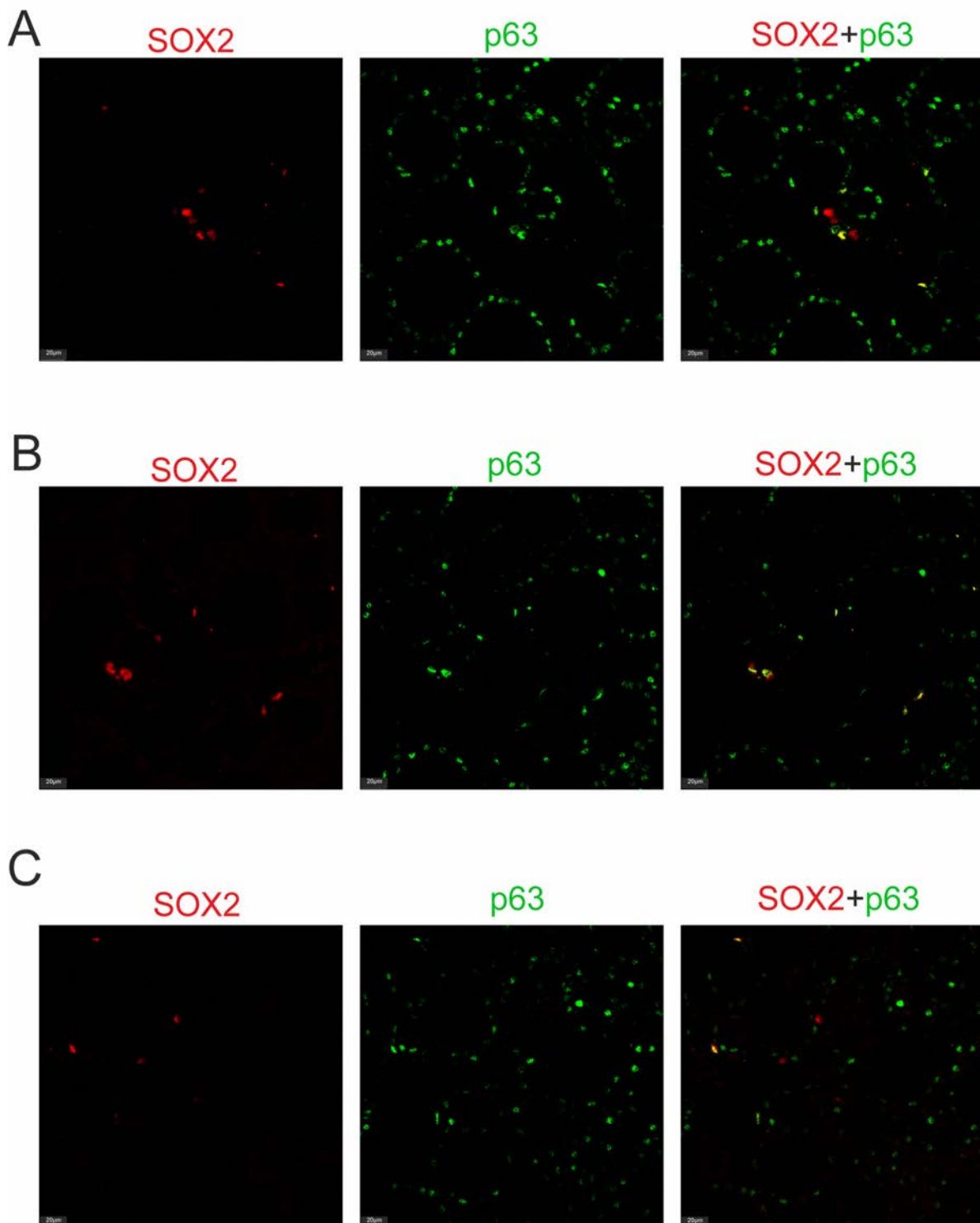


Figura 7. Algunas células SOX2, pero no todas, co-expresan p63. Inmunofluorescencias dobles estudiadas con microscopía confocal para identificar a las células Sox2 positivas (marcaje nuclear, rojo) y a las células p63 (marcaje nuclear, verde). A) Algunas células SOX2 colocalizan con p63, y se observan en color amarillo que demuestra colocalización nuclear de ambas proteínas. Sin embargo, p63 es muy abundante en el epitelio tiroideo folicular siendo estas células negativas para SOX2. Por otra parte, se observan células intensamente positivas para SOX2 que no expresan p63. B-C) Otros campos que muestran el mismo resultado.

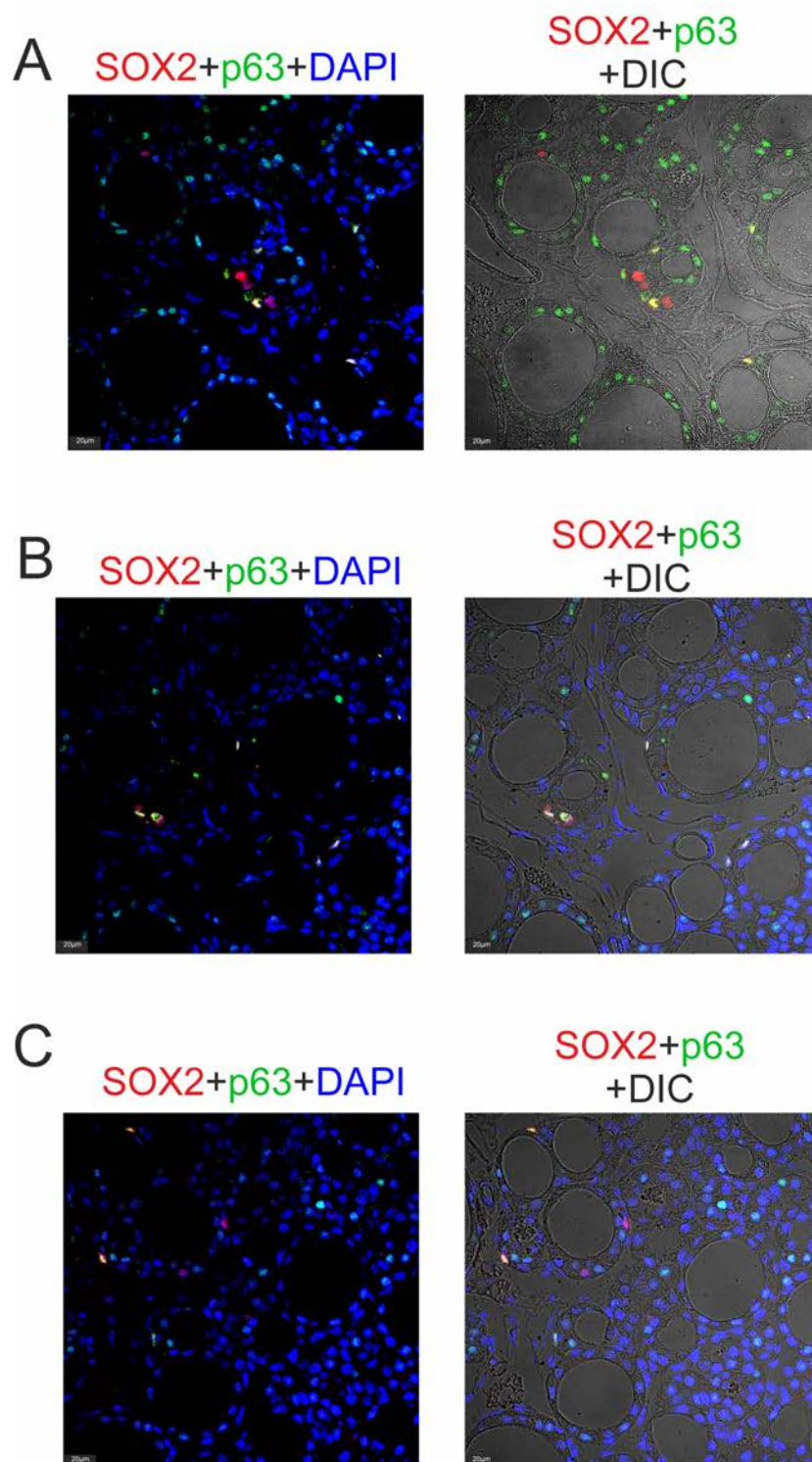


Figura 7 (parte 2)

1.3 DISTRIBUCIÓN POSICIONAL DE LA POBLACIÓN SOX2 EN LA GLÁNDULA TIROIDES COMPLETA

Nuestros resultados previos parecían sugerir que la distribución de las células SOX2 era desigual, ya que en algunas secciones conseguíamos fotografiar varias, mientras que en otras pocas o ninguna (Figura 8). Este hecho podría explicarse por dos causas distintas: una primera posibilidad es que hubiera un nicho de SOX2 exclusivo de cada folículo, y solo cuando la sección lo cruzaba aparecían varias células SOX2 juntas. Frente a eso una segunda posibilidad podría ser que hubiera una distribución desigual de la población SOX2 a lo largo del eje mayor longitudinal de la glándula, ya que nuestros cortes siempre eran axiales. Ambas hipótesis no eran excluyentes.

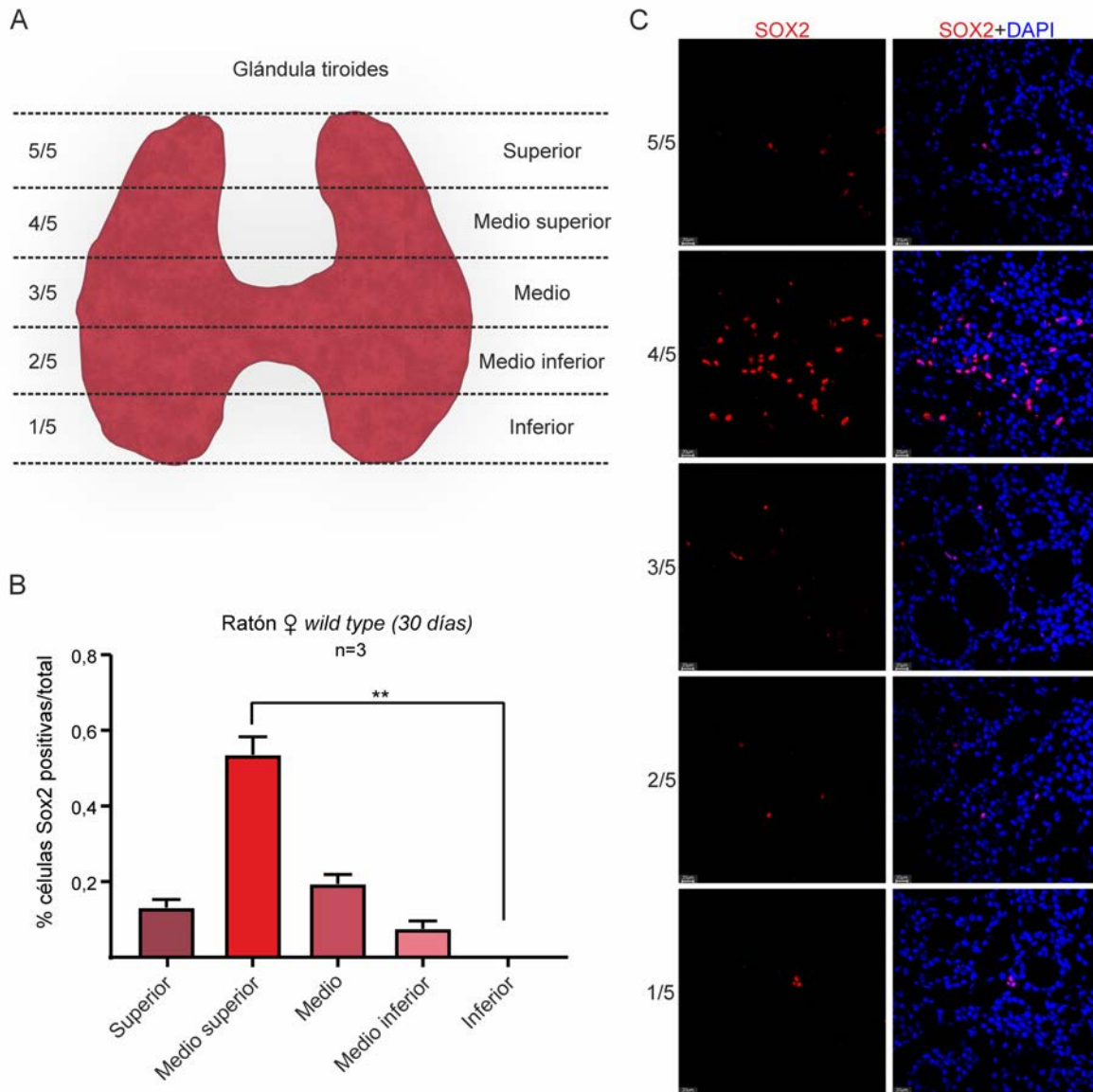


Figura 8. Localización y cuantificación de las células SOX2⁺ en glándula tiroides de ratones hembras de 30 días mediante sección completa. A) Esquema de las secciones en las que se ha dividido la glándula. La tiroides se dividió en 5 secciones para entender mejor su distribución. B) Gráfica en la que se representan los contajes realizados de las células SOX2⁺ en las diferentes secciones. La mayoría de las células SOX2⁺ se acumulan en la mitad superior de la glándula. En la gráfica se representa la media±el error estándar con un tamaño muestral (n=3). Se utiliza un test ANOVA de una vía seguido de una corrección de Bonferroni; *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001. C) Fotos representativas de cada sección.

Para aclarar este punto se escogieron ratones hembras de 30 días y se realizaron cortes de 4µm en parafina de la tiroides completa para localizar y cuantificar las células SOX2 positivas mediante inmunofluorescencia (Figura 8). En algunas de estas secciones se colocaron con alguno de los otros marcadores estudiados anteriormente.

Para realizar este experimento escogimos hembras de 30 días en vez de 90 días para tener tamaños globales de las glándulas muy similares y evitar que técnicamente haya mucha dispersión en los datos. Además, al realizar secciones de la glándula completa con un grosor de 4µm implica manejar un número muy elevado muestras, por lo que las tiroides de 30 días nos permitían obtener un número alto de secciones, pero manejable técnicamente.

La Figura 8 muestra la cuantificación de dichas células que revela un patrón específico y repetido de expresión en cuanto a su localización. Dividimos el volumen total de la glándula en cinco quintos en sentido caudo-craneal, según se realizaron las secciones en el micrótopo (Figura 8A). La población global total de células SOX2 es menor al 1% de las células totales como ya se sugería de nuestros resultados previos por secciones de diferentes animales, pero su distribución varía. En el polo superior, encontramos que las células SOX2 son un poco más del 0,1% de las células, con muy poca desviación en las secciones a lo largo de ese quinto. En el quinto medio superior encontramos la mayor acumulación de células SOX2 de toda la glándula, llegando a más del 0,5%. A partir de ahí, el porcentaje va descendiendo hasta ser inconsistentemente por encima del 0% en el polo inferior (Figura 8B y 8C).

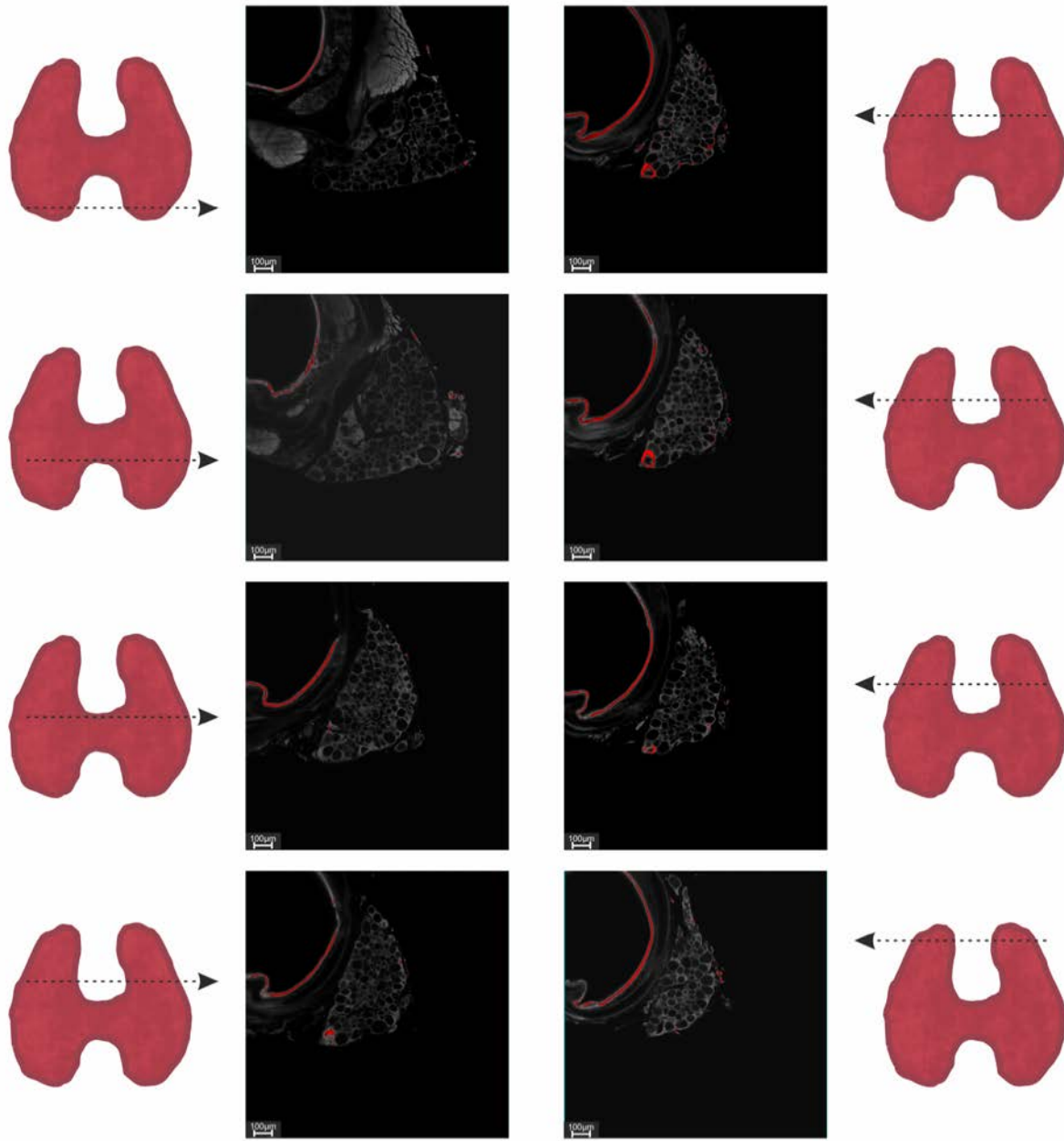
1.4 DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN SOX2 A TRAVÉS DE MICROSCOPIA *LIGHT-SHEET*.

La cuantificación y distribución geográfica en la tiroides adulta (>90 días) era técnicamente impensable con esta técnica de seccionamiento completo y reconstrucción. Las tiroides son demasiado grandes a esta edad y sería difícil cortar todas las secciones en la orientación perfecta axial para su cuantificación posterior.

Para poder observar esta distribución en animal adulto realizamos experimentos en órgano entero mediante microscopía tridimensional (3D) *Light-Sheet*. Esta microscopía permite registrar fluorescencia en un órgano sin seccionar si se ha tratado y vuelto completamente transparente. A este proceso se le denomina Clarificación. Hay varios tipos de clarificación, que debe adaptarse al órgano concreto, en nuestro grupo la tiroides con su coloide lleno de tiroglobulina glucosilada. También hubo que estandarizar la tinción de la tiroides entera con el anticuerpo de SOX2 y su secundario, ya que hay variables como el tiempo de penetración, la unión no específica al exterior del órgano cuando hay exceso de anticuerpo, frente a la concentración del anticuerpo que diese señal en el tiempo incubado.

En el Vídeo 1, (mostrado aquí como secciones extraídas con Imaris), observamos que la distribución de células SOX2 en ratón hembra adulto de 90 días conserva el patrón encontrado a los 30 días, acumulándose en el tercio medio superior (4/5). Nuestro resultado se repitió en n=6 ratones. El epitelio de la tráquea actúa como tejido control positivo, que no varía a las distintas alturas. Como control negativo se tiñeron piezas similares con sólo secundario, que no dieron señal (datos no mostrados).

SOX2



Ratón♀ C57/BL6J 90D

Vídeo 1. SOX2⁺ en glándulas tiroideas de ratones *C57BL6/J* hembra adulta (>90 días) mediante microscopía 3D Light-sheet. Se muestra un esquema de la altura a la que se han extraído con Imaris las secciones mostradas a partir del vídeo registrado en el microscopio Light-Sheet. La fluorescencia roja muestra la tinción de células o grupos de células con SOX2, con tinción conocida en el epitelio de la tráquea que actúa como control positivo y no varía en las diferentes alturas.

2 MODELOS DE RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS MADRE EN LA TIROIDES: RASTREO DE LA POBLACIÓN SOX2 EN EL MODELO SOX2-CRE-ERT2/LOXP-EGFP

Una vez caracterizada en lo posible la población SOX2 quisimos hacer estudios funcionales. Para ello, nuestro siguiente grupo de experimentos utilizó el modelo de rastreo con GFP con la obtención del ratón *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* a partir del cruce de la cepa *Sox2-CRE-ERT2 +/-²²⁸* y la cepa *LoxP-EGFP +/-²⁸⁶*. Si todo funcionase correctamente, las células SOX2 no expresarían EGFP en ausencia de tratamiento inductor, a pesar de expresar Cre-ERT2. Cuando se inyecta Tamoxifen (TAM) la proteína Cre-ERT2 que es citoplasmática e inactiva se vuelve dimérica y nuclear al activarse el fragmento derivado del receptor de estrógenos (ERT2). La parte recombinasa actúa sobre los locus LoxP permitiendo la expresión de EGFP bajo la expresión del promotor del locus ROSA26, de expresión ubicua en ratones²⁸⁷. El tiempo que se necesita desde la inyección de TAM hasta la detección de GFP en células SOX2 depende mucho del órgano y tejido estudiado, y debe caracterizarse cuidadosamente.

2.1 CARACTERIZACIÓN EN LA TIROIDES DEL MODELO *SOX2-CRE-ERT2/LOXP-EGFP* TRAS TAMOXIFEN (TAM) A TIEMPO CORTO O LARGO.

2.1.1 Inmunohistoquímica de SOX2 con tamoxifen a lo largo del tiempo frente a controles en la tráquea

Antes de todo quisimos comprobar que el modelo de ratón funcionaba correctamente. Para ello, administramos a ratones adultos la misma concentración de TAM (vía intraperitoneal) en una inyección al día y en días consecutivos, pero variando el número de dosis. Así, llamamos tiempo corto cuando administramos dos dosis de TAM y tiempo largo cuando se administran cuatro dosis. Los ratones fueron sacrificados al día siguiente a la administración de la última inyección y las secciones se tiñeron para GFP que detecta también la proteína EGFP.

El epitelio de la tráquea está compuesto por una capa de células en la que la mayoría de las células son positivas para SOX2. Gracias a esta numerosa expresión de SOX2 fue fácil comprobar el correcto funcionamiento del modelo. Como se aprecia en la Figura 9, comprobamos que también expresaban gran cantidad de GFP en la tráquea cuando a los ratones se les administraba TAM y que, además, esta cantidad de GFP variaba dependiendo del número de dosis de TAM, siendo la tinción con GFP menos numerosa o en parches cuando se administraban dos dosis (Figura 9A, izquierda), y más numerosa o continua cuando se administraban cuatro dosis (Figura 9B, izquierda).

Al estudiar la glándula tiroides de estos ratones, también pudimos observar células teñidas para GFP, aunque menos intensas que la tráquea y muy aisladas, demostrando de nuevo que este tejido tiene células SOX2, pero que éstas son mucho menos abundantes que en el tejido respiratorio (Figura 9A-B, derecha). Al no hacer una tinción exhaustiva de las glándulas completas, y debido a la desigual distribución de la población SOX2 en la tiroides y ser el número de células detectado por sección pequeño no encontramos diferencias cuantitativas en la tiroides entre el tratamiento corto y largo (Figura 9A-B, derecha). Sin embargo, la tinción fue específica de la existencia de recombinación genética ya que ratones normales inyectados con TAM por cuatro días no presentaron tinción para GFP ni en la tráquea ni en la tiroides (Figura 9C).

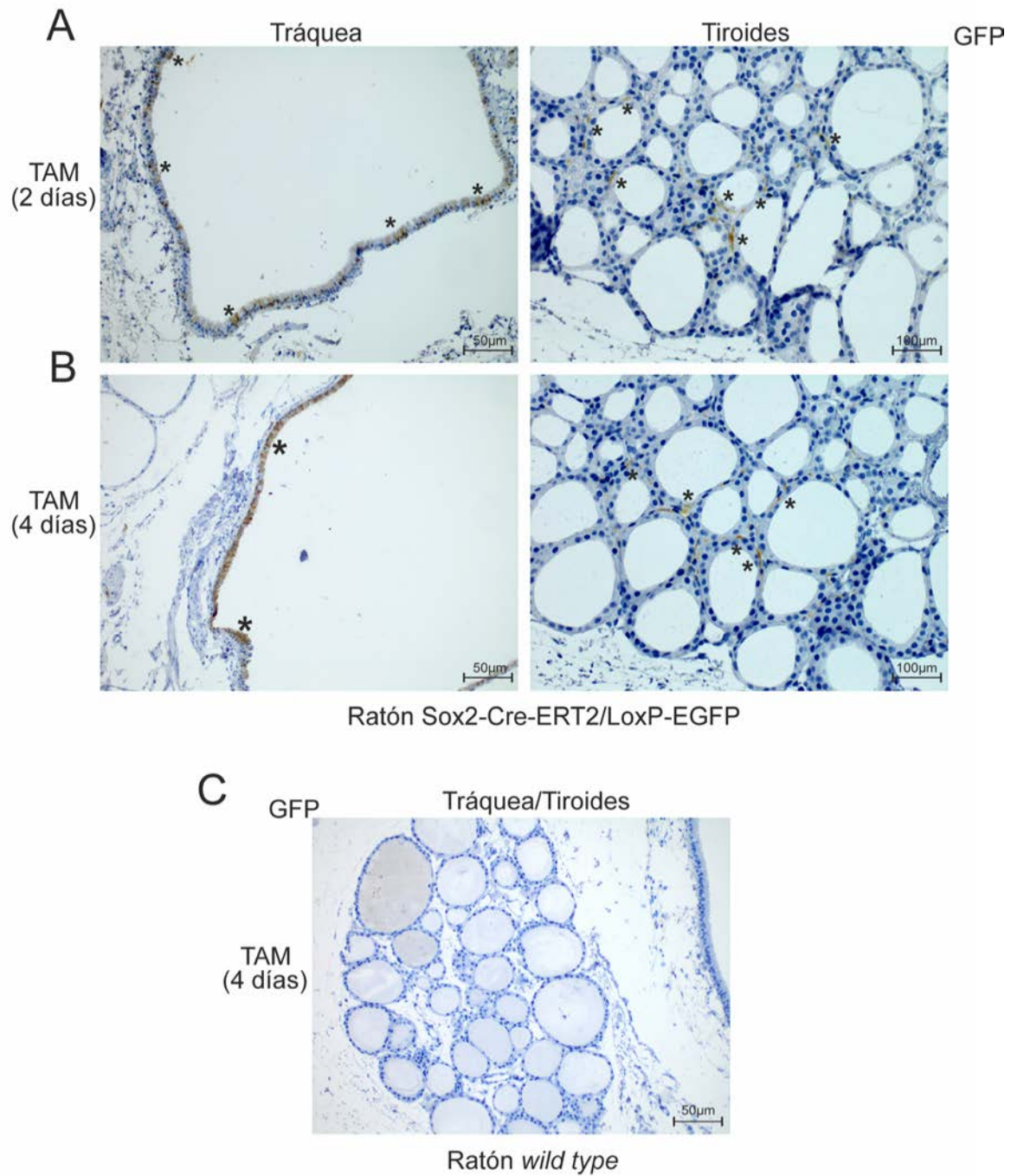


Figura 9. Nuestro *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* es un modelo cuantitativo para estudiar la expresión de SOX2. Se muestran secciones teñidas para inmunohistoquímica de GFP contrateñidas para hematoxilina en ratones a los que se les inyectó TAM durante un tratamiento corto (2 días) o largo (4 días). A) Izquierda: Tras un tratamiento corto con TAM, el epitelio de la tráquea se vuelve positivo para GFP en forma de parches alejados entre sí interpuestos con células negativas. Derecha: en la tiroides se detectan células GFP en localizaciones compatibles con nuestra población SOX2. B) Izquierda: Tras un tratamiento largo con TAM, el epitelio de la tráquea aparece de forma prácticamente continua teñido para GFP. Derecha: En la tiroides, se observa un número de células GFP discreto que no aparenta tener variaciones con el tratamiento corto debido al bajo número de células SOX2. C) Las secciones de ratones con genotipo normal *wildtype* son negativas para GFP tanto en la tráquea como en la tiroides a pesar de recibir el mismo tratamiento con TAM, demostrando la validez del modelo.

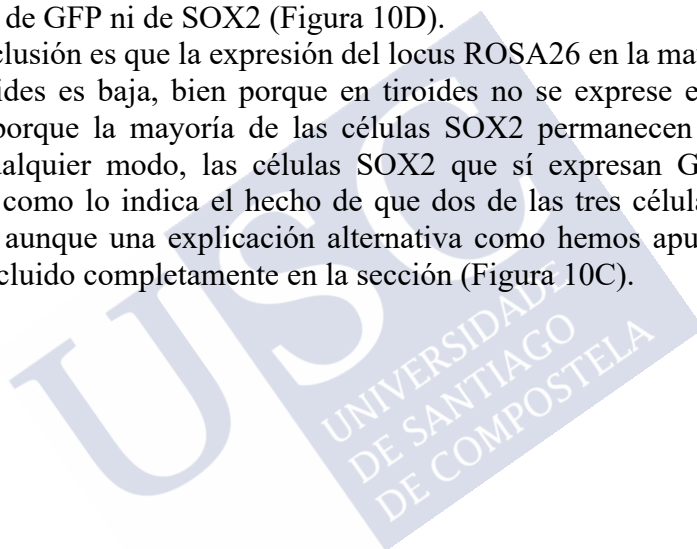
2.1.2 Inmunofluorescencia para GFP en la tráquea y en la tiroides tras tamoxifen en ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP

Como la inmunohistoquímica no nos permite realizar dobles y triples tinciones, estandarizamos la doble tinción de GFP asociada a SOX2 por inmunofluorescencia para ver la relación de las células SOX2 con las GFP. En la tráquea vemos una vez más cómo hay una alta expresión de SOX2 nuclear y su consecuente relación directa con la expresión de GFP citoplasmática (Figura 10A). El marcaje fue específico puesto que animales del mismo genotipo en ausencia de TAM, no pudimos detectar células GFP+SOX2 dobles positivas en la tráquea (Figura 10B).

En la tiroides no ocurría lo mismo, ya que fue difícil encontrar células SOX2 positivas que también lo fueran para GFP. Directamente fuimos a la zona de la tiroides donde sabíamos que SOX2 era muy abundante (medio-superior). Incluso en estas secciones, donde había un porcentaje alto de células SOX2, la expresión doble de GFP y SOX2 fue escasa (Figura 10C).

Se observa que de las cuatro células GFP mostradas, dos tienen su núcleo completo dentro de la sección detectado por la intensidad del DAPI. Sólo estas dos células fueron doble positivas para SOX2 y GFP. La tinción fue específica, ya que si omitimos los anticuerpos primarios no detectamos señal de GFP ni de SOX2 (Figura 10D).

Nuestra conclusión es que la expresión del locus ROSA26 en la mayor parte de las células SOX2 de la tiroides es baja, bien porque en tiroides no se exprese ese promotor de forma intensa, o bien porque la mayoría de las células SOX2 permanecen en un estado de baja actividad. De cualquier modo, las células SOX2 que sí expresan GFP pudieran tener un recambio rápido como lo indica el hecho de que dos de las tres células GFP con núcleo no expresen SOX2, aunque una explicación alternativa como hemos apuntado arriba es que el núcleo no esté incluido completamente en la sección (Figura 10C).



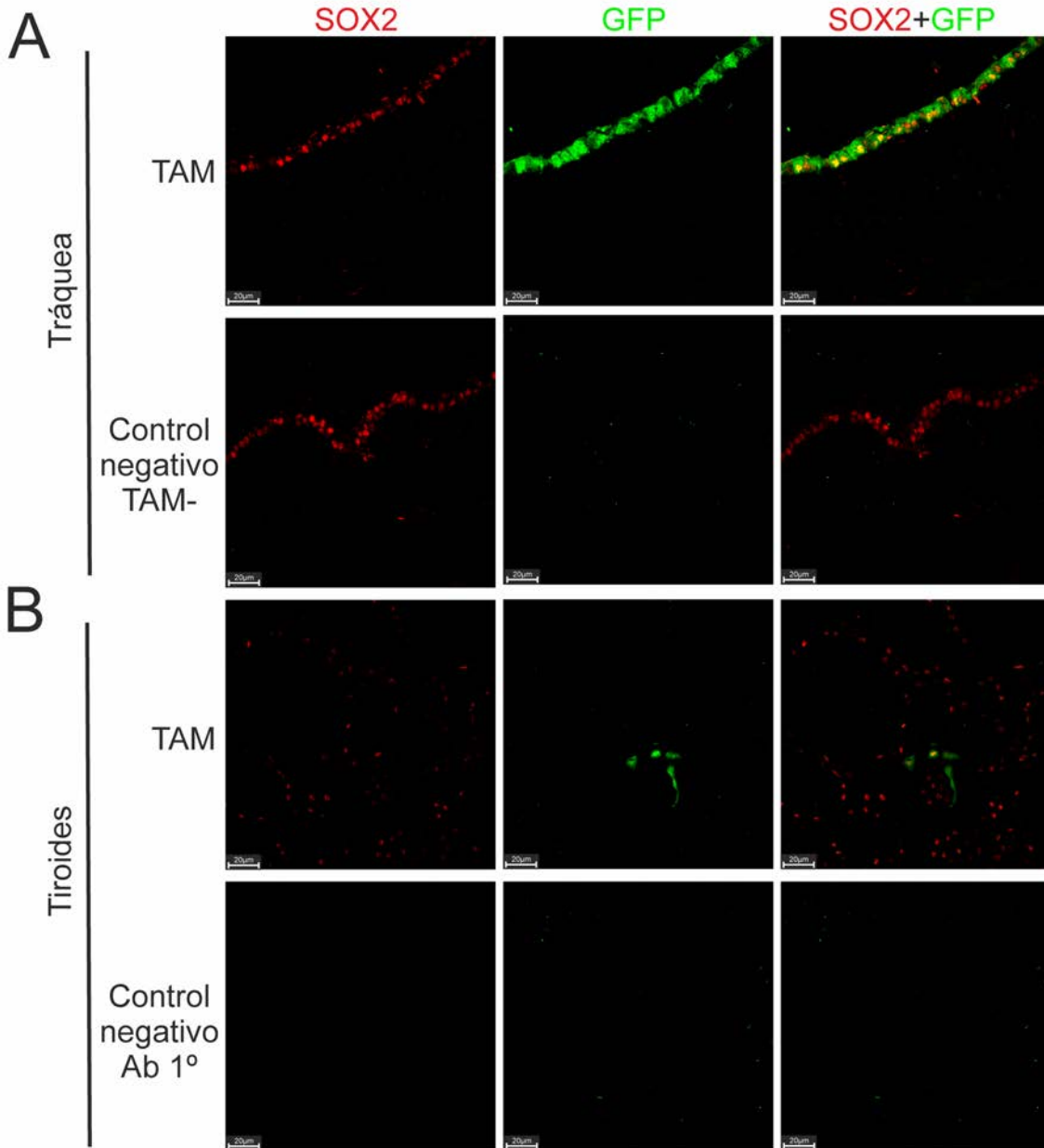


Figura 10. Marcaje SOX2-GFP en la tráquea y en la glándula tiroides tras el tratamiento con TAM. Inmunofluorescencia doble para GFP y SOX2 en secciones de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP a los que se les administró TAM o Vehículo durante 4 días. A) En la tráquea, prácticamente todo el epitelio muestra SOX2 en el núcleo y GFP en el citoplasma. B) Esto no sucede si se inyecta vehículo en vez de TAM, y el epitelio de la tráquea SOX2 positivo no expresa GFP. C) En la tiroides se buscó una sección con abundancia de células SOX2 (tercio medio-superior) pero sólo cuatro de esas células son GFP. Las dos células en las que el DAPI demuestra que la sección contiene el núcleo completo, son doble positivas para SOX2 (nuclear) y GFP (citoplasmático). D) Si omitimos los anticuerpos primarios, no se obtiene marcaje (Control negativo).

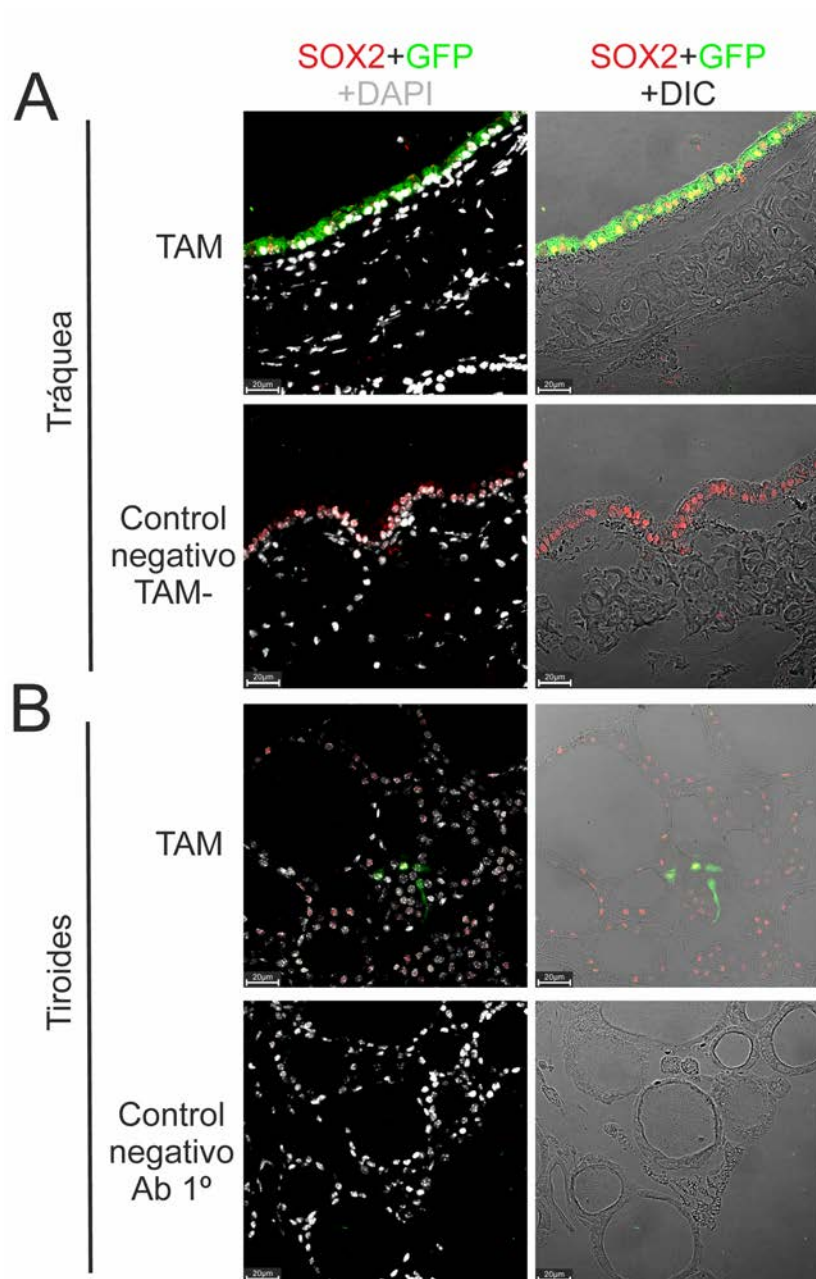


Figura 10 (parte 2)

2.2 MODELO DE RECLUTAMIENTO INDUCIDO POR HIPOTIROIDISMO FARMACOLÓGICO

Hasta este momento habíamos caracterizado una pequeña población SOX2 rodeando al epitelio tiroideo, cuyos marcadores TTF1+low/PAX8-neg/p63+/- eran compatibles con células madre, y que teníamos un modelo con el que podíamos rastrearlas, decidimos estudiar sus implicaciones funcionales. Para ello, y dada la dificultad de obtener ratones con el genotipo adecuado y por la regla de las 3R de la experimentación animal, decidimos realizar en paralelo el estudio del recambio normal de la glándula adulta con el estudio del reclutamiento tras un estímulo. Nos preguntamos entonces, si en una situación de requerimiento funcional de la glándula tiroides, esta población se activaba.

2.2.1 El hipotiroidismo inducido en ratones hembra mediante PTU disminuye la cantidad de T4 libre en sangre alcanzando niveles de hipotiroidismo moderado.

Basándonos en los protocolos descritos en la literatura decidimos utilizar el hipotiroidismo (HT) farmacológico inducido por propiltiouracilo (PTU), como modelo conocido de requerimiento funcional en la tiroides^{109,110,111}. Nuestro objetivo era establecer un hipotiroidismo relativamente moderado compatible con un buen funcionamiento del eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo. Y para ello, comenzamos estudiando qué pasaba con la población SOX2 en ratones normales tras hipotiroidismo inducido con PTU.

Para estandarizar el protocolo tratamos ratones C57BL/6J hembra de 90 días de edad, durante días progresivos (Figura 11) y se les extrajo sangre para su posterior medición mediante un ELISA de T4 libre en suero (FT4; Figura 12). Nuestro kit considera la normalidad para población humana entre 0,8-2 ng/dL. En roedores no hay rango admitido, pero se asumen niveles equivalentes.

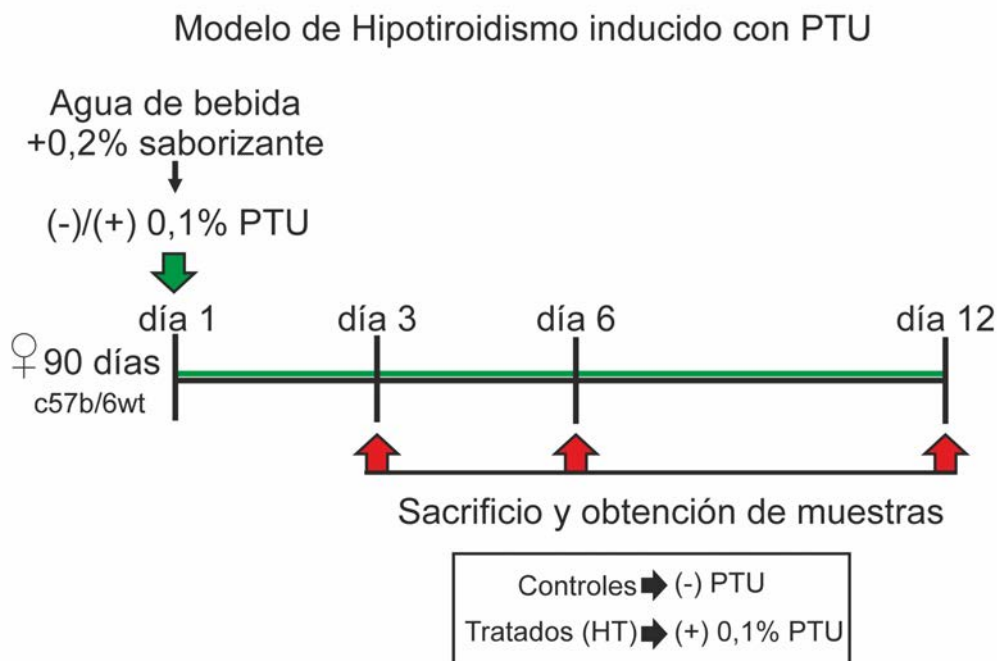


Figura 11. Protocolo de hipotiroidismo inducido por PTU. Esquema temporal de los experimentos de hipotiroidismo (HT) inducido con PTU realizados en ratones normales C57BL/6J.

Se observa una disminución progresiva de esta hormona conforme pasan los días con el tratamiento, comparado con los controles (Figura 12). Aunque a día 3 la FT4 todavía está en valores inmediatamente por debajo de la normalidad, ya ha disminuido significativamente. A partir del día 6 de tratamiento los ratones entran en niveles de hipotiroidismo franco que se mantiene hasta los 12 días donde termina el experimento.

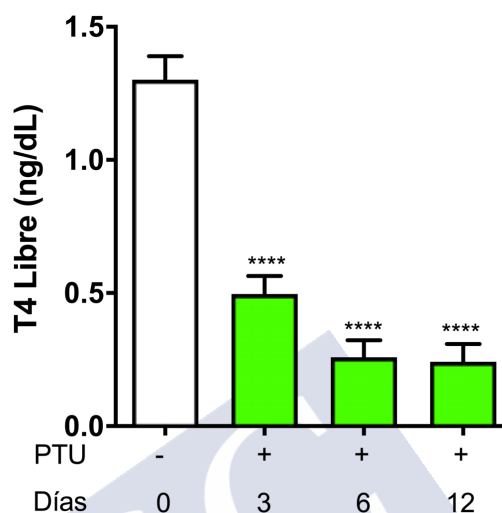


Figura 12. La FT4 desciende progresivamente en ratones hembra tras el tratamiento con PTU. ELISA de T4 libre en ratones hembra C57BL/6 tras tratamiento con PTU (propiltiouracilo). Gracias a la acción inhibitoria de este compuesto frente a la proteína TPO, la glándula es incapaz de unir el yoduro (I⁻) a la tiroglobulina y la síntesis de hormonas no se produce correctamente. En la gráfica se representa la media±el error estándar con un tamaño muestral (n=6). Se utiliza un test ANOVA de una vía seguido de una corrección de Dunnett; *p≤0,05, **p≤0,01 y ***p≤0,001.

2.2.2 Aumento en la expresión del ARN de SOX2 en ratones hipotiroideos de 3, 6 y 12 días

Cuando se comprobó que el PTU funcionaba correctamente disminuyendo la cantidad de FT4 en sangre y originando así ratones hembra C57BL/6 HT, se quiso observar la expresión de genes característicos del epitelio folicular, los de fenotipo tiroideo (*Tshr*, *Nis* (*Slc5a8*), *Pds* (*Slc26a4*), *Tg*, *Tpo*, *Duox2*) frente a la expresión de Sox2, que representaría a la población celular no folicular que estamos investigando (Figura 13).

PTU inhibe la organificación de yoduro a yodo, y la yodación de la Tiroglobulina por inhibición del complejo Tpo/Duox2²⁸⁸. Además, inhibe a la enzima Desyodasa D1 impidiendo la conversión de T4 a T3 en los grandes órganos (hígado, riñón), pero también la degradación de T3 a T2, y la generación de rT₃²⁸⁸. Como era de esperar, inmediatamente (3 días) tras el comienzo de la administración de PTU los genes del receptor de *Tsh* y de los transportadores de yoduro (*Nis*, *Pds*) se inducen, probablemente para intentar compensar la falta de hormona mediante una mayor respuesta funcional a la Tsh en el epitelio folicular (Figura 13A). Mientras que el *Tshr* sigue aumentando a medida que prosigue el tratamiento a 6 y 12 días, no así lo hacen los genes de transportadores, probablemente por un efecto Wolff-Chaikoff antes el exceso de Yoduro libre no organificado²⁸⁹.

Por el contrario, no observamos ningún incremento significativo de expresión en *Tg*, *Tpo* o *Duox2* excepto una pequeña inducción inicial (Figura 13B). Esto podría ser porque al haber

suficiente enzima, o incluso un acúmulo de Tg no yodada, aunque no sea funcional, no se pueda activar ningún mecanismo de inducción de estos genes.

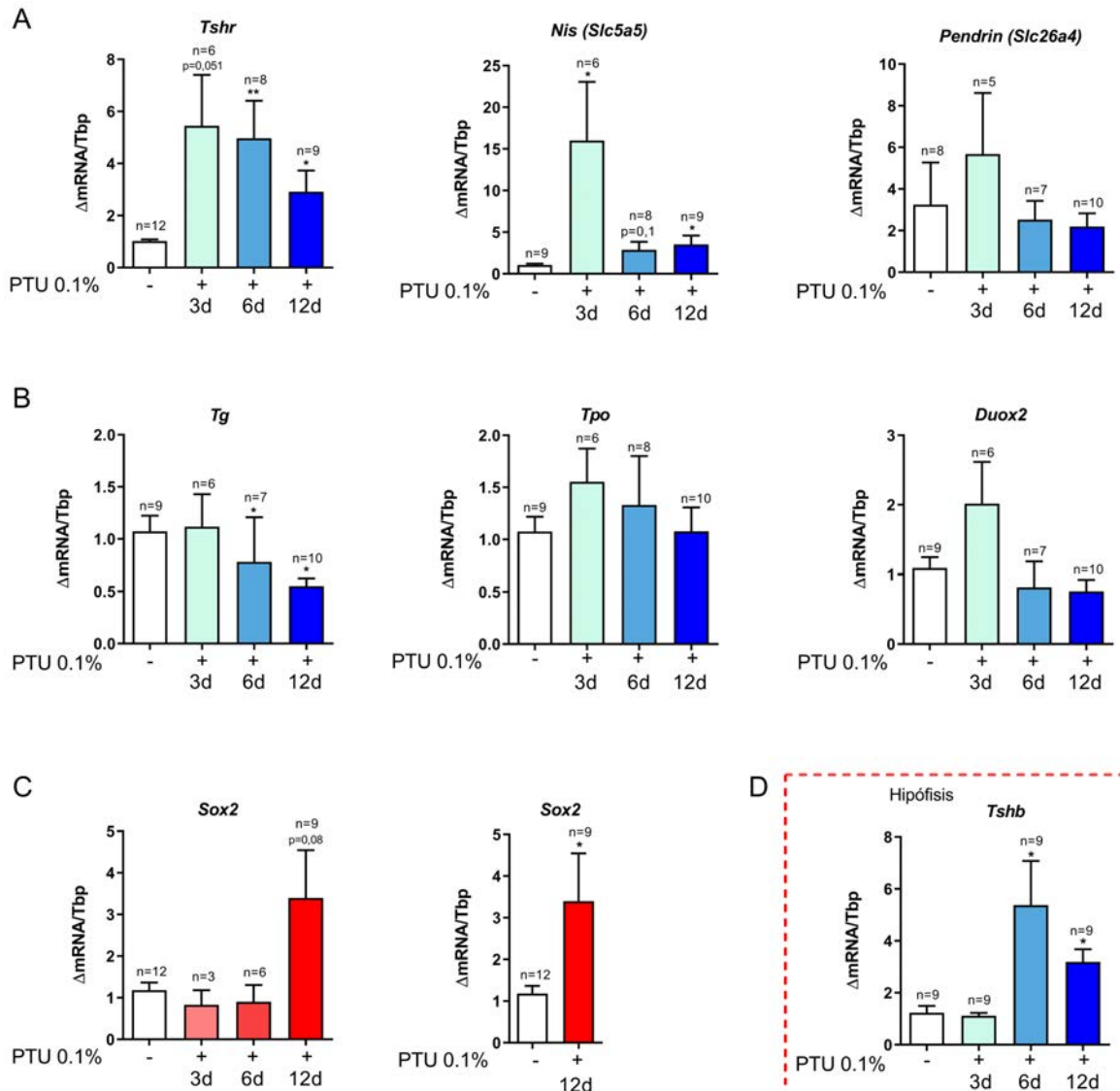


Figura 13. Incremento específico en la expresión de ARNm de Sox2 a largo plazo tras el hipotiroidismo inducido con PTU. Expresión en glándula tiroides de ratones hembra C57BL/6 hipotiroides de 3, 6 y 12 días de cada ARN mensajero de genes de interés (barras azules o rojas) en relación al gen control *housekeeping Tbp*. A) Genes de membrana plasmática del polo basal como *Tshr*, *Slc5a* (*Nis*) y *Slc26a4* (*Pendrin*), B) Genes de polo apical como *Tg*, *Tpo* y *Duox2*. C) el gen *Sox2* (barras rojas). D) En la hipófisis midió la expresión del ARNm de *Tshb* Se observa que dicha expresión es significativa en individuos con hipotiroidismo de 12 días. En las gráficas se representan la media±el error estándar de Taqman qRT-PCR con un tamaño muestral (n) mostrado encima de cada barra. Para las comparaciones globales se utiliza un Kruskal-Wallis seguido de una corrección de Dunnnett; para la comparación de dos grupos se utiliza Mann-Whitney; *p≤0,05, **p≤0,01.

En relación con la cantidad de expresión de *Sox2* en la tiroides, se puede observar que PTU induce un aumento tardío significativo y muy marcado a los 12 días de hipotiroidismo (Figura 13C).

Cuando observamos lo que pasa en la hipófisis, podemos ver que inicialmente, 3 días, no hay ningún incremento de expresión, pero a los 6 días se incrementa mucho la expresión del gen *Tshb*, que continúa posteriormente aumentado (Figura 13D). Justo después, a los 12 días es cuando aparece el incremento en *Sox2* en la tiroides, sugiriendo que pueda estar relacionado.

2.2.3 El hipotiroidismo de 12 días en ratones hembra C57BL/6 aumenta la expresión de la proteína SOX2

Para estudiar si los datos obtenidos de ARN coinciden con la expresión de SOX2 en proteína, se extrajo la proteína total de tejidos de tiroides de ratones hipotiroides de 12 días junto con la proteína total de ratones controles. Todo ello se midió mediante la técnica Western-Blot (Figura 14A).

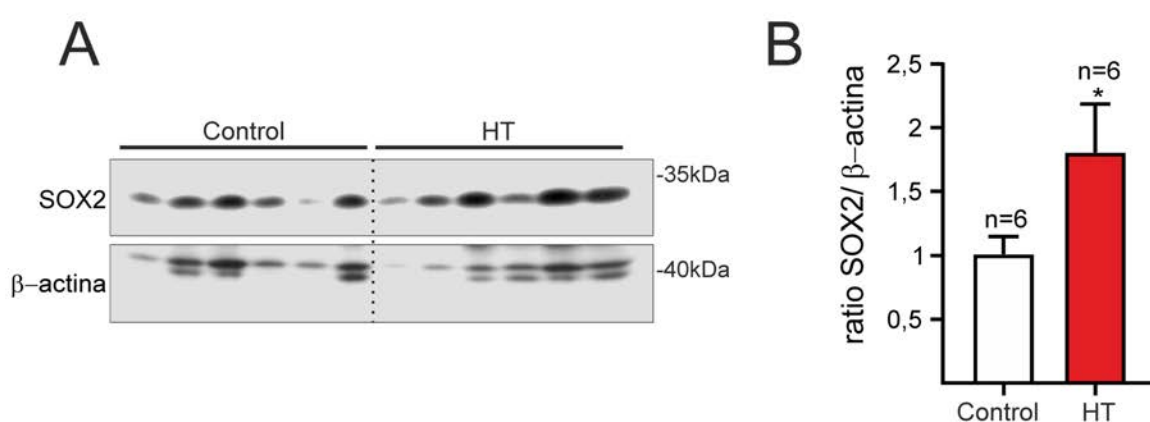


Figura 14. Incremento de la proteína SOX2 en hipotiroidismo de 12 días. A) Western blot para la proteína SOX2 de extractos proteicos de tiroides tratados con vehículo (Control) o PTU (HT) durante 12 días. La membrana se rehibridó para β -actina tomado como control de carga o *housekeeping*. B) Cuantificación relativa de la proteína SOX2 respecto de β -actina. En la gráfica se representa la media \pm el error estándar con un tamaño muestral (n=6). Se utiliza un test de Mann-Whitney bilateral; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$.

Se produce un aumento significativo de la detección de la proteína SOX2 en ratones hembra C57BL/6J a los que se les ha inducido hipotiroidismo durante 12 días en comparación con los ratones control (Figura 14B). En conjunto los datos de ARNm (Figura 13C) y de proteína (Figura 14) nos están indicando que o bien se induce específicamente este gen *Sox2* como resultado del hipotiroidismo, o bien lo que estamos observando es una expansión de la población celular SOX2 positiva que nos lleva a un aumento relativo respecto al epitelio folicular.

2.2.4 Expansión de la población de células SOX2 en ratones hipotiroideos de 12 días.

Para aclarar si esta expansión de nuestra población era posible, a continuación, se quiso estudiar de manera más exacta el número y distribución de las células SOX2 en estos ratones hipotiroideos. Para ello se utilizó la misma técnica (inmunofluorescencia cuantitativa) que la utilizada para el estudio de la población normal de SOX2 en ratones hembras de 30 días.

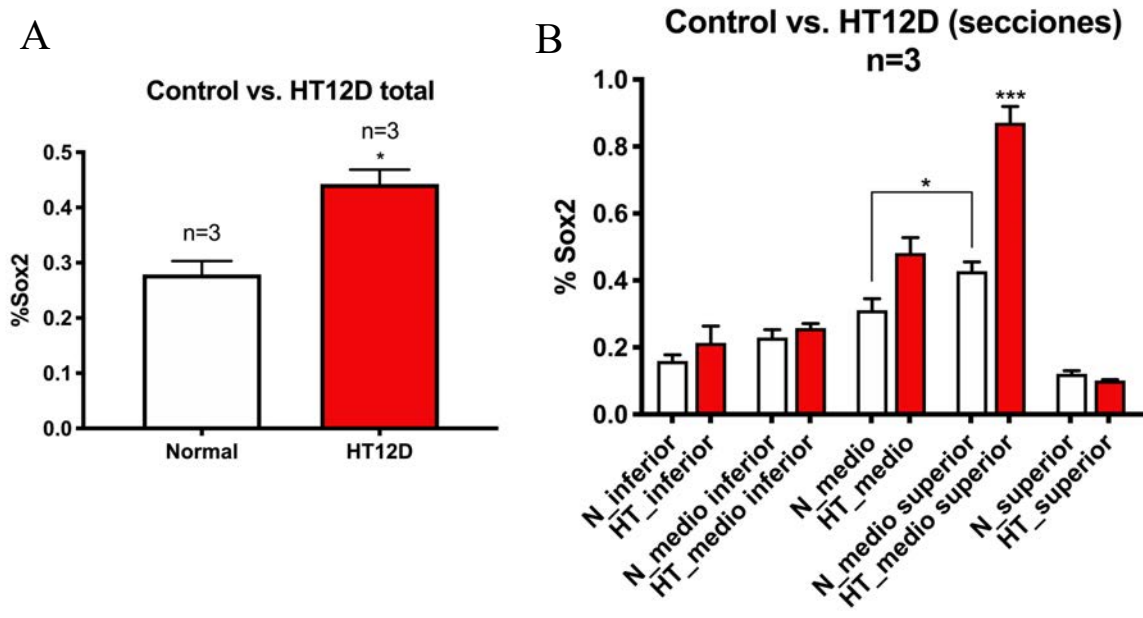


Figura 15. Abundancia de células SOX2 en ratones hipotiroideos (HT), comparados con ratones control. Los resultados se representan por porcentaje respecto al número total de células. A) Contaje de células SOX2 positivas respecto al total de células de las tiroides completas. B) Contaje de células de la tiroides divididas por regiones, tal como se hizo en individuos normales de 30 días; En las gráficas se representan la media±el error estándar con un tamaño muestral (n) encima de cada barra. Para la comparación de dos variables (A) se utiliza un test de Mann-Whitney bilateral. Para comparación múltiple (B) se utiliza un test ANOVA de dos vías seguido de una corrección de Bonferroni; *p≤0,05, ***p≤0,001.

Tanto en el análisis de células totales (Figura 15A) como en el análisis por secciones (ya descrito en el apartado 1 de Resultados) (Figura 15B), se observó un incremento significativo en la población de células SOX2 en las tiroides de ratones hembra HT de 12 días comparadas con los controles (Figura 15A). En los animales HT este incremento fue específicamente marcado, de más del doble, y significativo en el segmento medio-superior, como se observa en la figura 15B. En la región media, conforme nos íbamos acercando al segmento medio superior también se aprecia una tendencia al aumento de células SOX2 pero dichos incrementos no llegaron a ser significativos.

En la figura 16 se muestran campos representativos de este experimento.

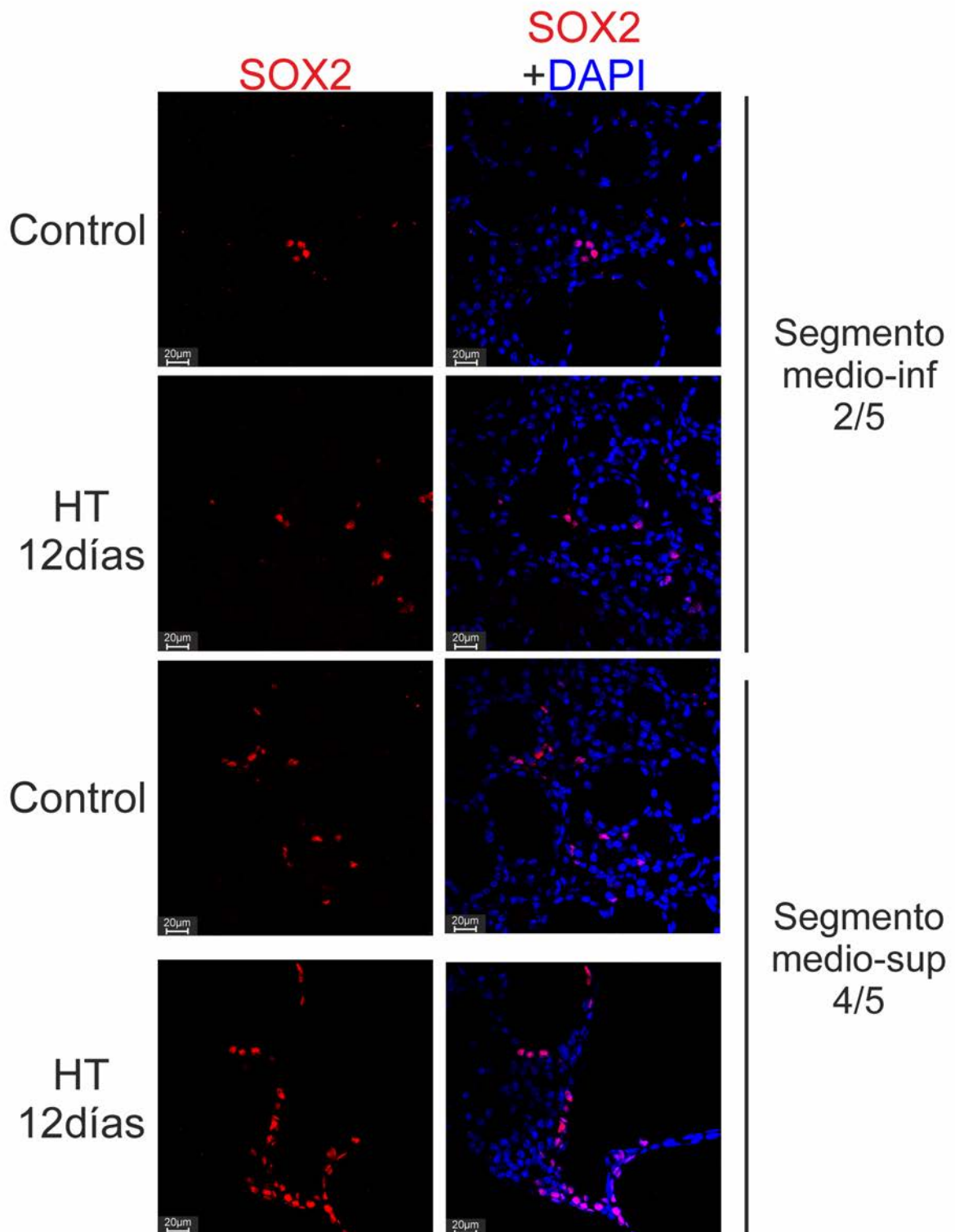


Figura 16. Aumento específico de la población celular SOX2 con el hipotiroidismo. Campos representativos de secciones de tiroides de ratón a diferentes alturas de la glándula de ratones hembra hipotiroideos (HT) o vehículo (Control) tras 12 días de tratamiento. Inmunofluorescencia para SOX2 (rojo) con DAPI (azul) para cuantificar núcleos.

2.3 TRAZAMIENTO DE CÉLULAS SOX2 EN RATONES HIPOTIROIDEOS FRENTE A CONTROLES EN EL MODELO *B6;129S-Sox2^{TM1(CRE/ERT2)HOCH/J} ↔ RATÓN *B6-129Gt(ROSA)26Sor^{TM2Sho/J}* (*SOX2-CRE-ERT2/LoxP-EGFP*)*

Para seguir en el tiempo y rastrear (*Tracing*) si la población de células SOX2, que nosotros consideramos podrían ser células madre adultas, era capaz de diferenciarse a tirocito maduro, se utilizó el modelo de ratón *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* que habíamos estandarizado previamente.

Se les administró TAM para activar la expresión de EGFP en las células que expresaban *Sox2* e inmediatamente se les indujo hipotiroidismo de 12 días (Figura 17).

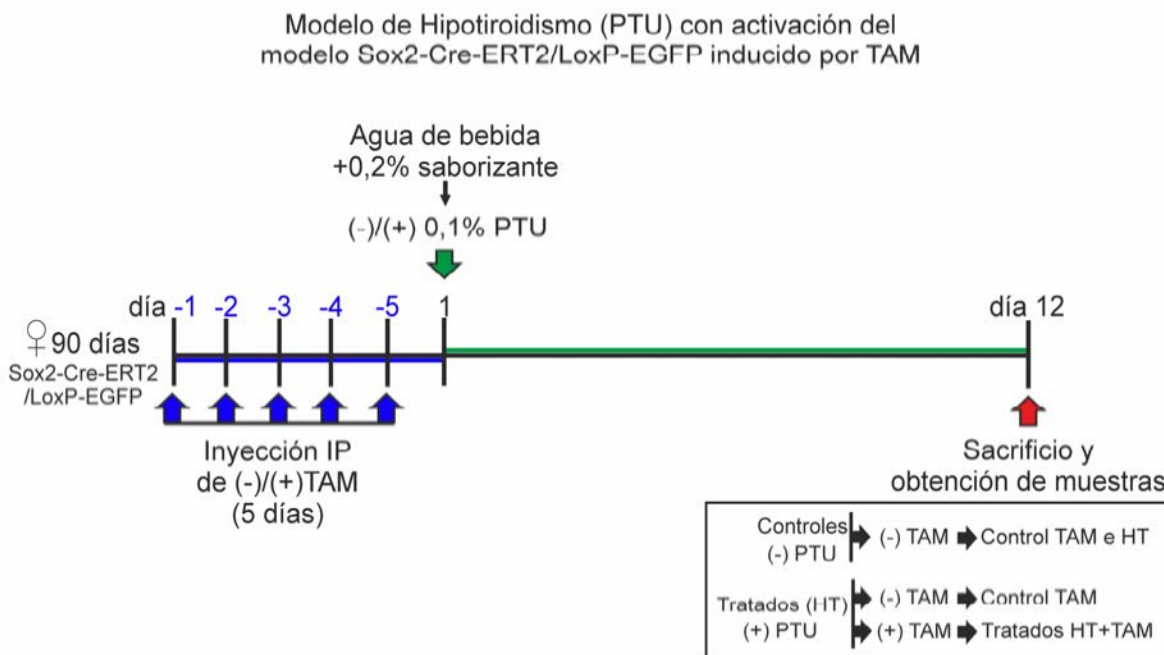


Figura 17. Esquema temporal de la activación del modelo mediante administración de TAM seguido de la inducción del hipotiroidismo (PTU) a ratones *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP*.

Se realizaron inmunofluorescencias dobles para GFP (que marca células que expresan o han expresado en algún momento SOX2) y para otras proteínas de epitelio folicular de tiroides diferenciado como tiroglobulina (Tg) o el simportador de Sodio/Yoduro (I⁻), NIS (Figuras 18-19).

En la Figura 18A se muestran campos de dos lóbulos distintos a aumento bajo para señalar que la colocación de GFP con Tg tras 12 días de hipotiroidismo con PTU existe, pero es desigual. A mayor aumento se observa que la colocación de GFP con Tg resulta en pseudocolor amarillo de mezcla en el citoplasma, pero no coloide (Figura 18B). Esta colocación con Tg tras 12 días de rastreo tras el TAM se encontró también en ratones no hipotiroideos (Controles), pero el número de células positivas para la doble tinción fue mayor en los hipotiroideos (Figura 19A). El mismo resultado se obtuvo en la tinción para GFP y NIS (Figura 19B). NIS es un marcador de membrana localizado en el polo basal del epitelio

folicular. Las células dobles positivas demostraron GFP en el citoplasma y NIS rodeando por el polo basal.

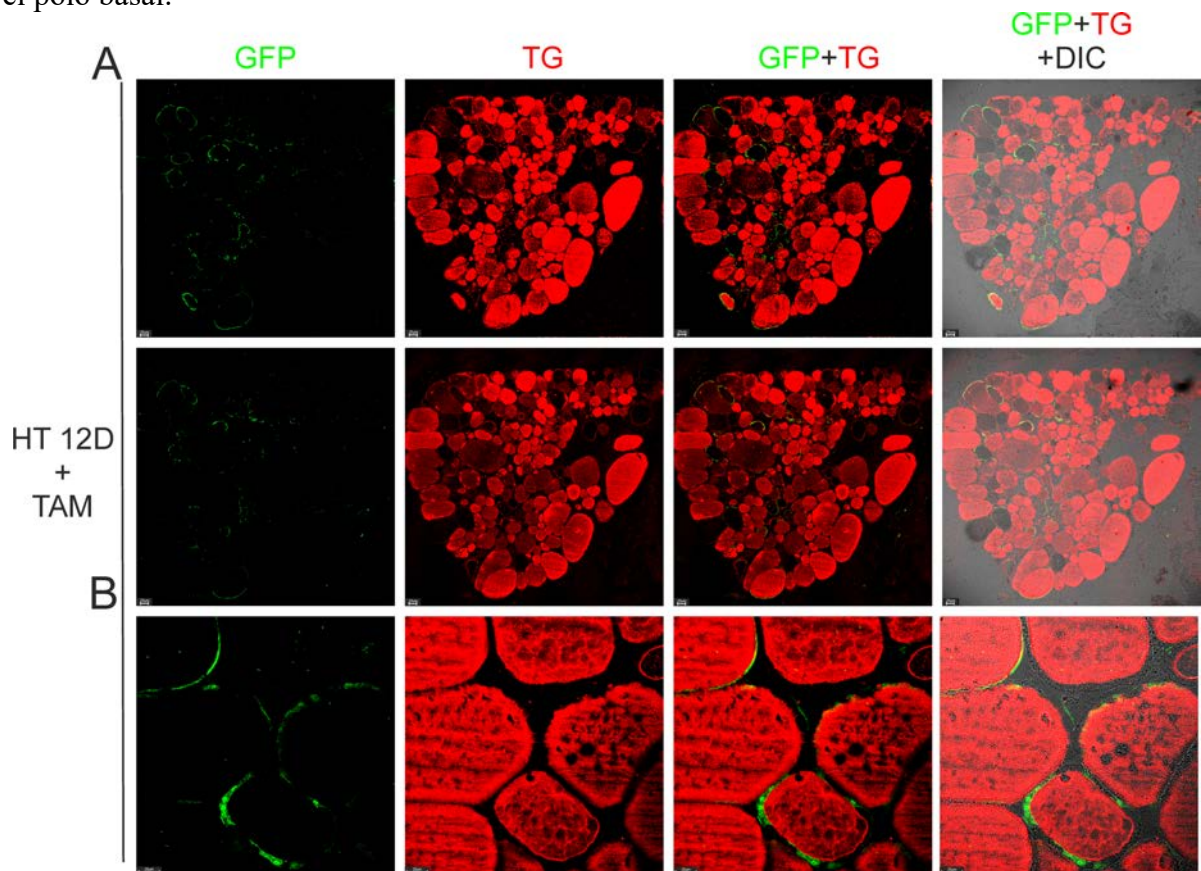


Figura 18. Campos representativos de la tiroides de ratones de 90 días tratados con TAM y posteriormente con PTU que induce hipotiroidismo (12 días) con doble inmunofluorescencia para GFP y TG. A) A poco aumento, dos lóbulos distintos de ratones hipotiroideos de 12 días mostrando colocación de GFP con Tg. B) A mayor aumento se observa el pseudocolor de mezcla amarillo (GFP+Tg) en el epitelio de algunas células foliculares.

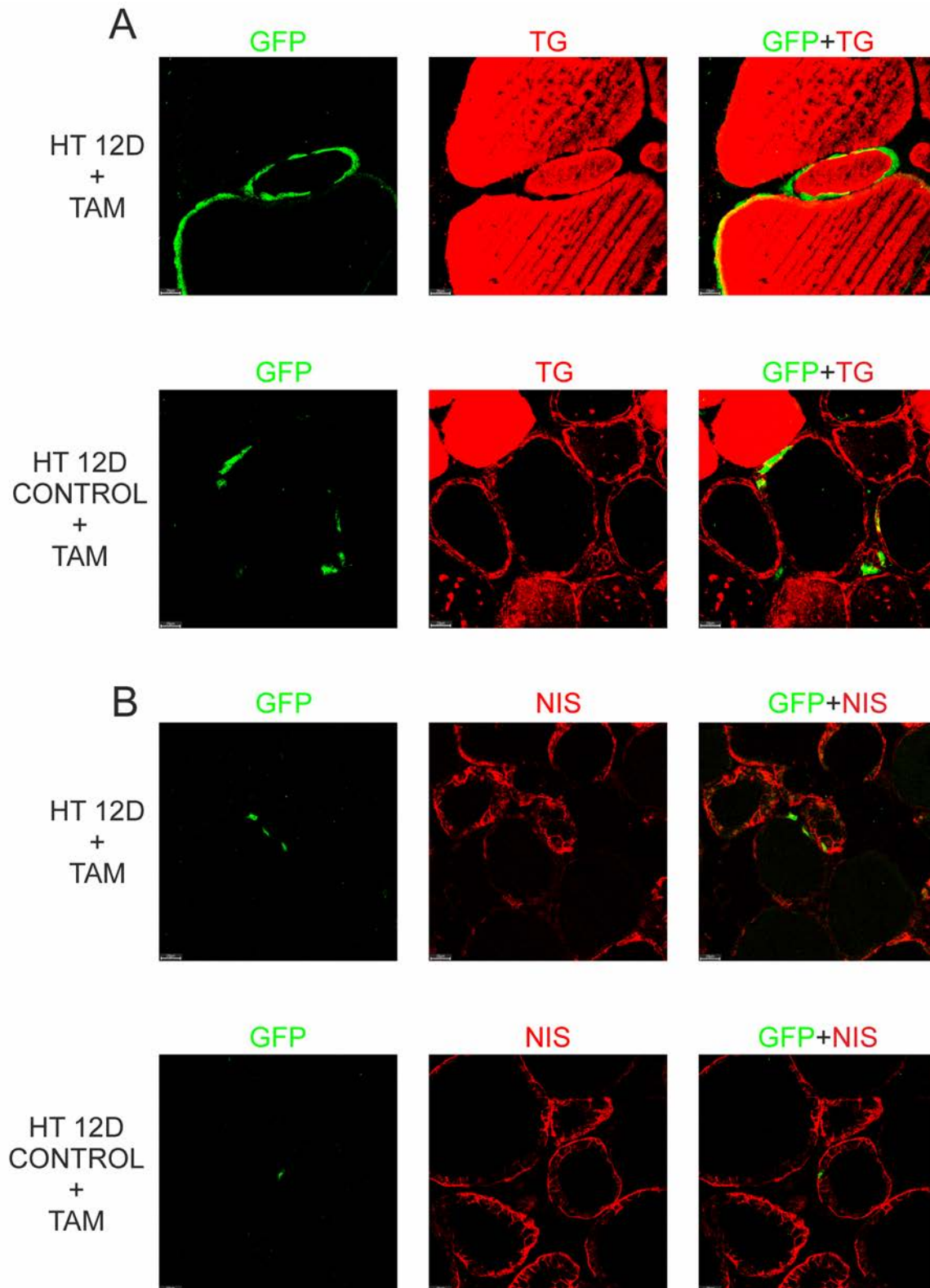


Figura 19. Tiroides de ratones de 90 días tratados con TAM y con PTU o solución de bebida control durante 12 días) y estudiados con doble inmunofluorescencia para GFP y Tg o NIS. A) La colocalización de GFP y Tg se produce tanto en los ratones no hipotiroideos como en los tratados con PTU, pero es más elevada en número de células en hipotiroidismo. B) Lo mismo sucede con la colocalización de GFP y NIS, un marcador con refuerzo de membrana en polo basal. Encontramos doble tinción GFP+NIS tanto en ratones controles como hipotiroideos, pero el número de células doble positivas es mayor en estos últimos.

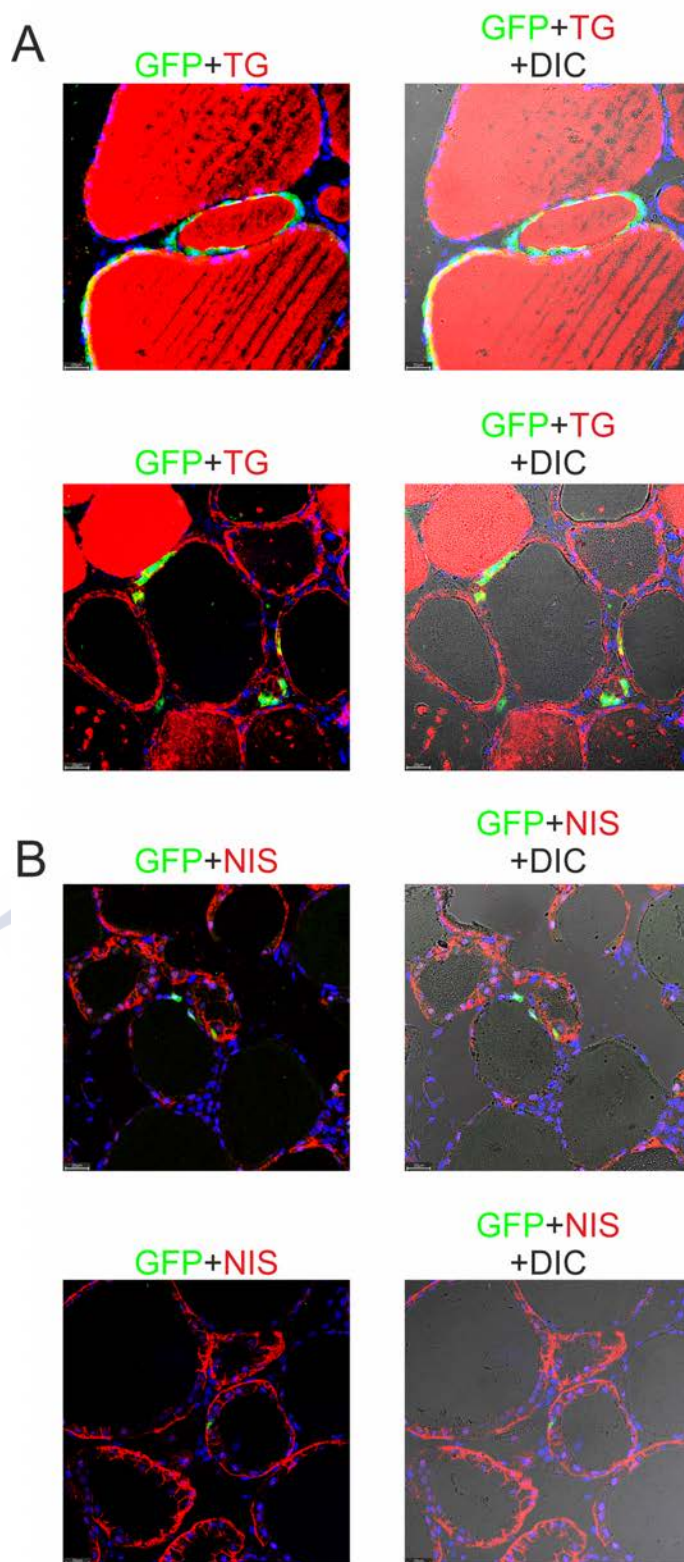


Figura 19 (parte 2)

3 HEMITIROIDECTOMÍA PARCIAL

La diferenciación de células GFP a epitelio folicular tras 12 días de rastreo e hipotiroidismo existía, pero no era una diferencia tan marcada comprada con los ratones control. Pensamos que podrían estar pasando dos cosas. O bien el recambio era muy lento para poder ser observado con tan sólo 12 días, o bien el propio tratamiento con PTU podría interferir con dicho recambio, al inhibir la enzima TPO en la tiroides (y la DIO1), pudiendo ser estas mismas enzimas claves, de alguna forma, para el proceso de diferenciación a tirocito maduro. Por otra parte, una tercera alternativa sería que se necesite una cantidad mayor de T₃ localmente para que pueda haber diferenciación terminal a tirocito a partir de células madre.

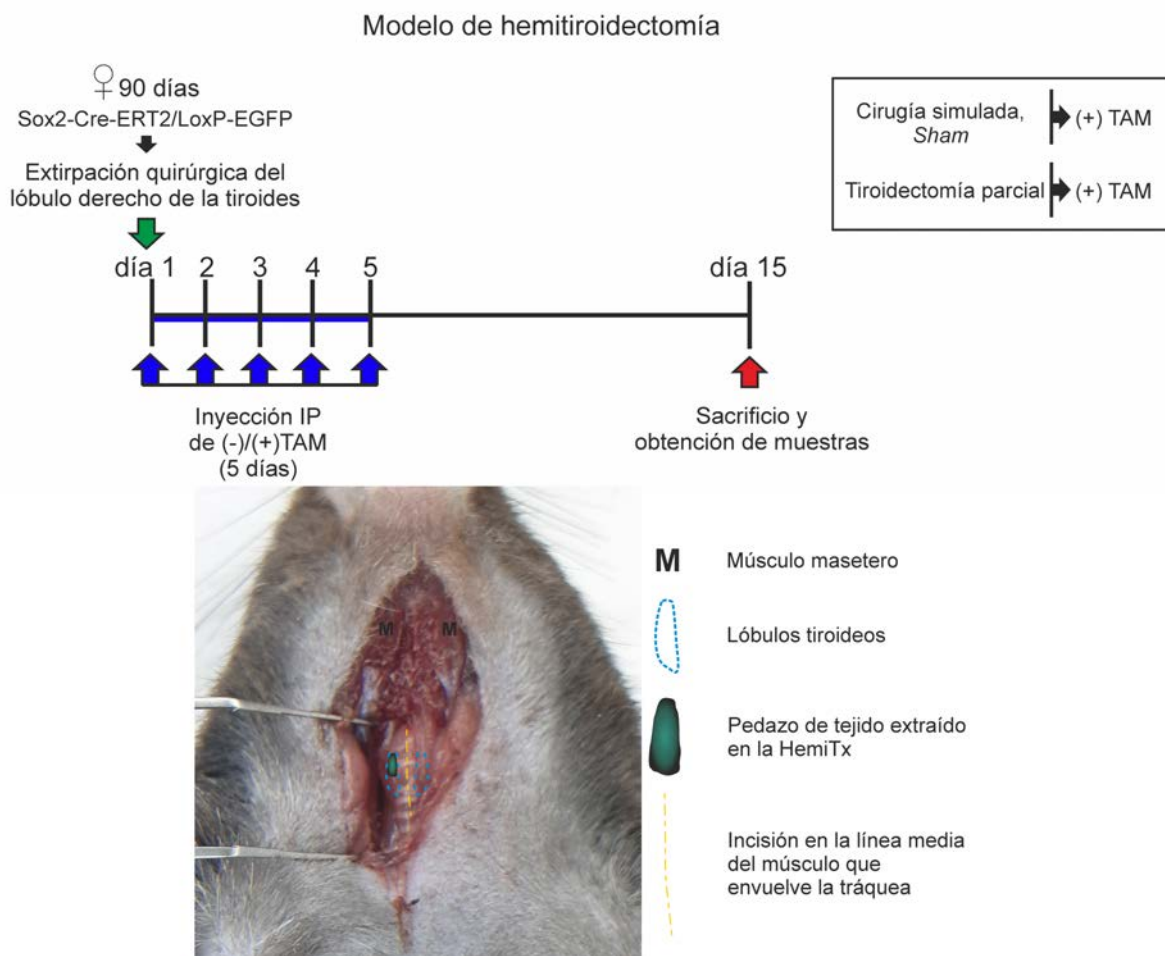


Figura 20. Modelo de hemitiroidectomía parcial (HemiTx) en ratón *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP*. A) Esquema a lo largo del tiempo en el que se incluyen todas las etapas, desde la resección quirúrgica de media glándula tiroides derecha (HemiTx), el tratamiento con TAM y el *tracing* durante los siguientes 10 días. B) Foto de uno de los ratones donde muestra la vía quirúrgica de llegada al lóbulo derecho de la tiroides y se observa que la cirugía no afecta a los músculos del lado izquierdo, y distienden sin lesionar la mayoría de los músculos del lado derecho. En los ratones hemitiroidectomizados (HemiTx) se extrajo con un corte y una pequeña pinza la mayor parte del lóbulo derecho de la tiroides. En los animales controles (Sham) solamente

Para intentar resolver la relevante cuestión de si nuestra población SOX2 de la tiroides participan en el recambio funcional de la glándula (*Cell Turnover*) decidimos completar nuestro estudio con otro modelo en el que se indujese recambio, pero sin comprometer la diferenciación ni las concentraciones locales de T3 activa. Decidimos entonces emplear un modelo de daño mecánico parcial para reemplazar al modelo químico de PTU y así evitar la interferencia de cualquier compuesto externo al proceso de regeneración y diferenciación de la glándula. Se sabe que la hepatectomía parcial²⁹⁰ o la pancreatectomía parcial²⁹¹, activan el reservorio de células madre induciendo su reclutamiento y diferenciación.

En la Figura 20A se detalla nuestro complejo diseño experimental, que incluye una nueva técnica quirúrgica no descrita previamente en la literatura. Lo primero que hicimos es diseñar un protocolo quirúrgico de tiroidectomía parcial en ratones, que mantuviese intactos los músculos de la deglución y accesorios de la vía respiratoria relacionados con la laringe. (Figura 20B).

Una vez adquirida la destreza para realizar la hemitiroidectomía, se utilizaron ratones hembras adultas Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP a los que se les aplicó una hemitiroidectomía parcial del lóbulo derecho seguida de la administración de TAM intraperitoneal para la activación del modelo genético (Figura 20A). Los ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP tiroidectomizados y *sham* fueron sacrificados el día 15 después de la cirugía (Figura 19A). Como se administran 5 inyecciones de TAM en días consecutivos nada más finalizar la operación se implementa, por tanto, un *tracing* de 10 días (Figura 20A).

Cuando se analizó mediante inmunofluorescencia para GFP el *tracing* en la hemi-tiroides izquierda de las ratonas con HemiTx derecha, se observaron grandes poblaciones de células GFP positivas, con una media superior al 30% de las células de cada tiroides (Figura 21). En los ratones *Sham* la cantidad de células GFP era prácticamente indetectable (Figura 21).

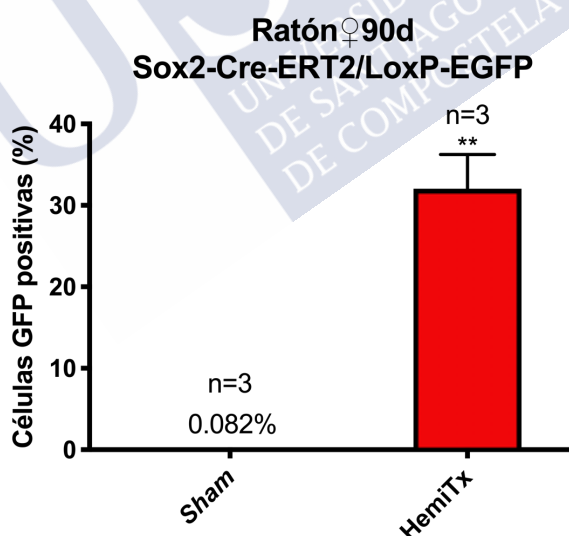


Figura 21. Acumulación masiva de células GFP en la tiroides izquierda de ratones hembra Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx) del lado derecho. Porcentaje de células GFP positivas en hembras de 90 días a las que se les realizó una hemitiroidectomía parcial del lóbulo derecho, comparadas con ratones a los que se les realizó el mismo proceso quirúrgico, pero sin extracción de tiroides (*Sham*). En la gráfica se representa la media \pm el error estándar con un tamaño muestral (n) representado encima de cada barra. Se utiliza un test de Mann-Whitney bilateral; ** $p \leq 0,01$.

El siguiente paso fue estudiar si esas células GFP expresaban SOX2 o si por el contrario expresaban marcadores de diferenciación. (Figura 22). Como podemos observar, el número de células SOX2 se mantuvo bajo, aunque las células SOX2+GFP aparecían en parejas, como si se hubieran dividido. Las células GFP+ negativas para SOX2 fueron abundantes.

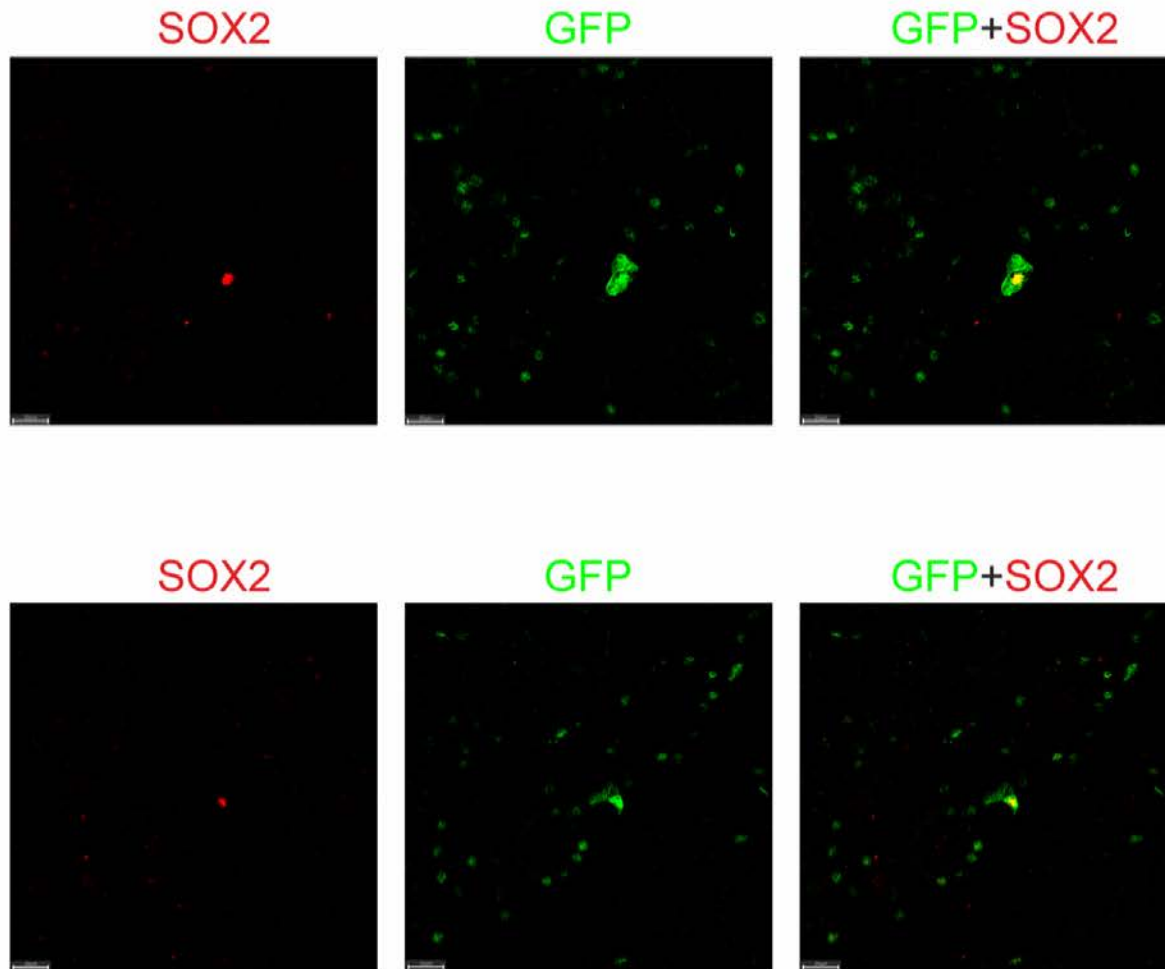


Figura 22. Colocalización de GFP y SOX2 en la tiroides de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx). Campos representativas del lóbulo tiroideo izquierdo de ratones hembra Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP hemitiroidectomizados.

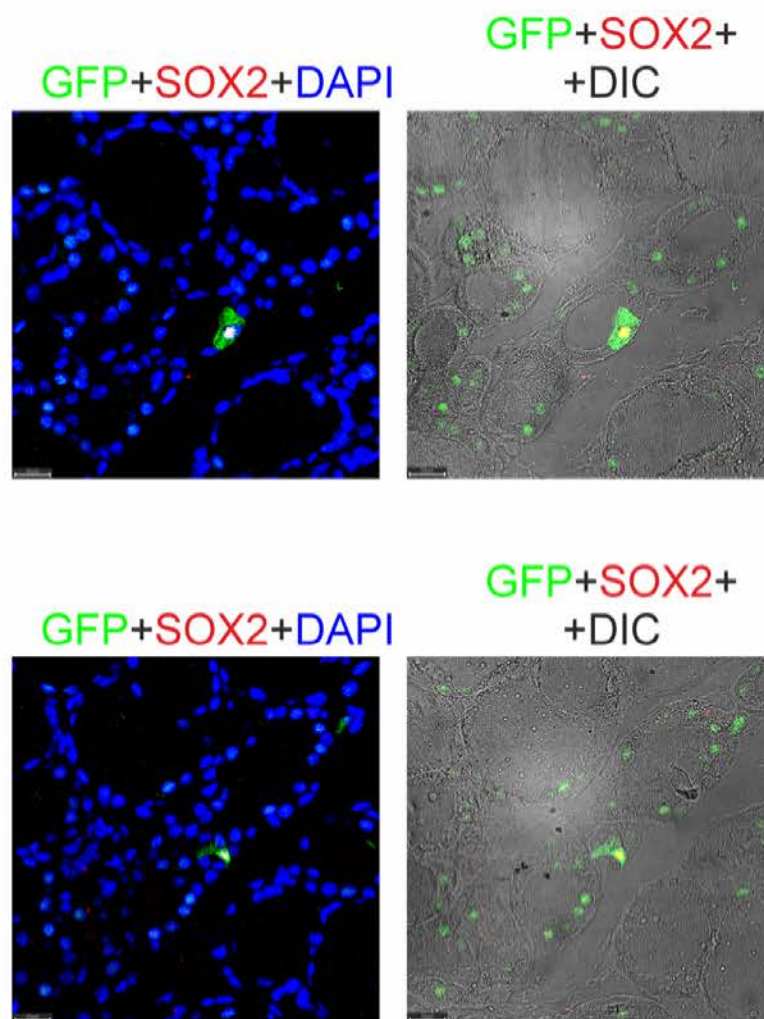


Figura 22 (parte 2)

Para demostrar que las células GFP positivas se habían diferenciado a tirocito maduro y eran funcionales, utilizamos marcajes para Tg y NIS en inmunofluorescencias dobles con GFP de la hemi-tiroides izquierda para estudiar la colocalización de dichos marcadores.

En las Figuras 23 y 24 se observa que la mayoría de las células GFP positivas, tan abundantes, encontradas en las tiroides de ratones hembra *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* diez días después de la hemitiroidectomía son doble positivas para GFP y Tg (Figura 23) y para GFP y NIS (Figura 24) como se deduce de su intenso pseudocolor amarillo en la suma de canales. En ambas figuras se puede observar cómo la tinción de GFP es citoplasmática, la tinción de Tg tiene refuerzo de membrana en polo apical y tiñe también el coloide, y la tinción de NIS tiene refuerzo en polo basal donde se concentra esta proteína. Pues bien, en la fusión de colores se observa el color amarillo en el polo apical cuando la fusión es con Tg pero en cambio en el polo basal cuando la fusión es con NIS, y por fuera se ve una línea roja que corresponde a la membrana plasmática sólo con NIS y no con GFP como es lógico. Esto indica que todas esas células GFP se han diferenciado a epitelio folicular.

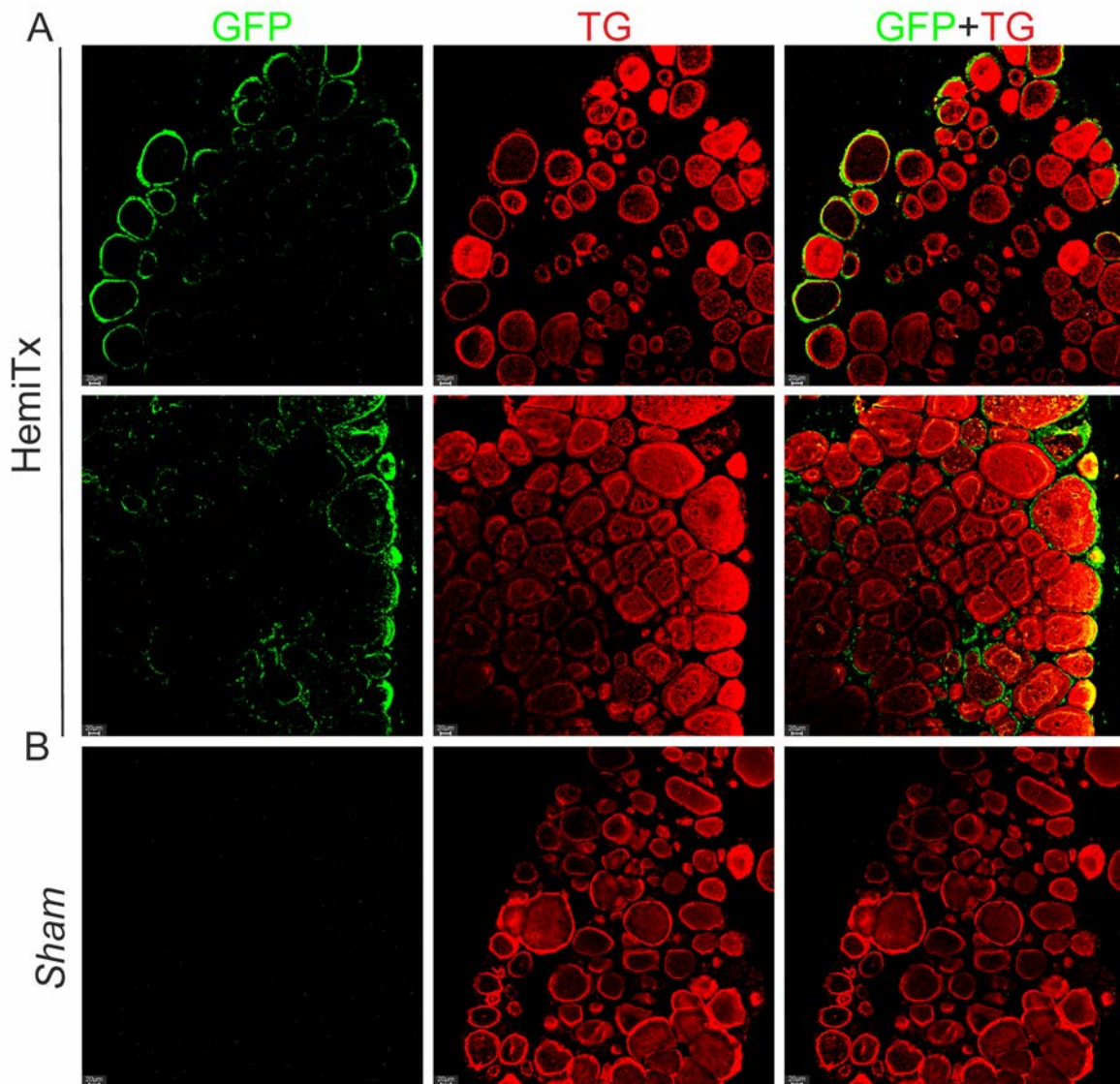


Figura 23. Diferenciación de células GFP en epitelio folicular secretor de Tg por su polo apical en la tiroides de ratones *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx). Campos representativos del lóbulo tiroideo izquierdo de ratones hembra *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* hemi-tiroidectomizados de su lado derecho y controles (*Sham*), tras diez días de *tracing*. Se observa coexpresión de GFP (verde) con Tg (rojo) dando un color amarillo en la fusión de canales que se concentra en el polo apical del epitelio folicular, indicando que células *Sox2* se han diferenciado y comienzan a producir y secretar dicha Tg. La Tg secretada se acumular en el coloide fuera de las células.

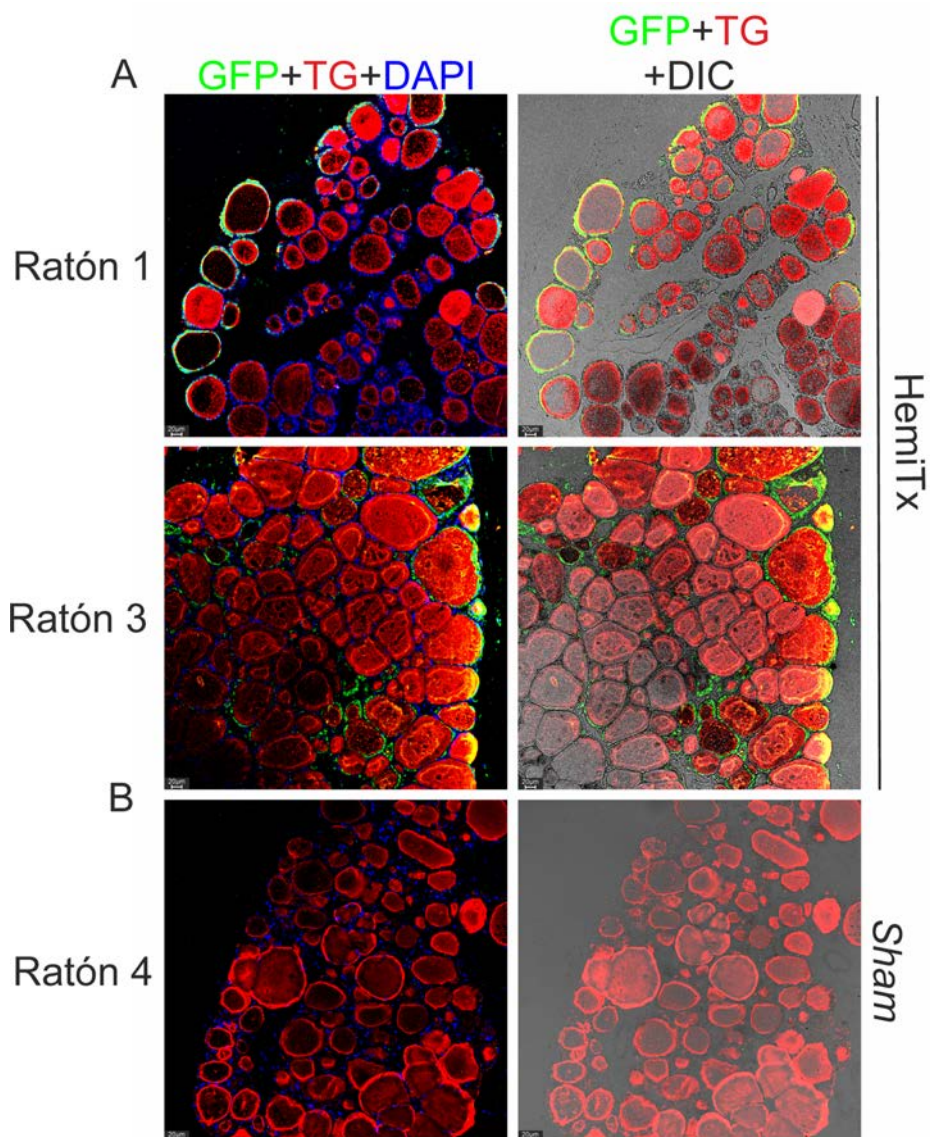


Figura 25 (parte 2)

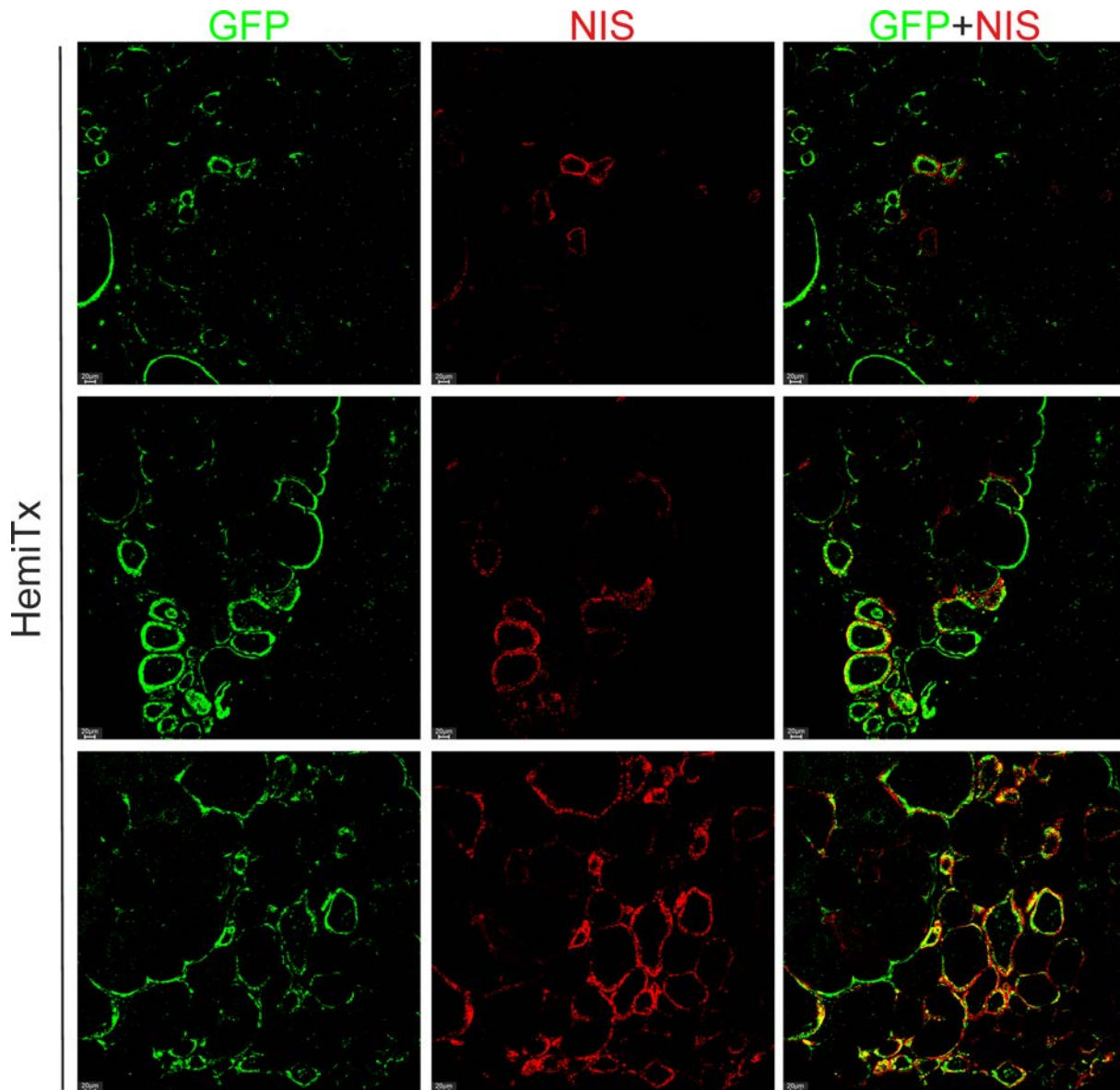


Figura 24. Diferenciación de células GFP en epitelio folicular captador de yoduro a través de NIS por su polo basal en la tiroides de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx). Campos representativas del lóbulo tiroideo izquierdo de ratones hembra Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP hemitiroidectomizados de su lado derecho y controles (*Sham*), tras diez días de *tracing*. Se observa coexpresión de GFP (verde) con NIS (rojo) dando un color amarillo en la fusión de canales que se concentra en el polo basal del epitelio folicular, indicando que células Sox2 se han diferenciado en células que captan yoduro de la sangre. Los folículos con epitelio amarillo, aun así, se ven rodeados de una delgada línea roja que corresponde al NIS localizado en la membrana plasmática del polo basal.

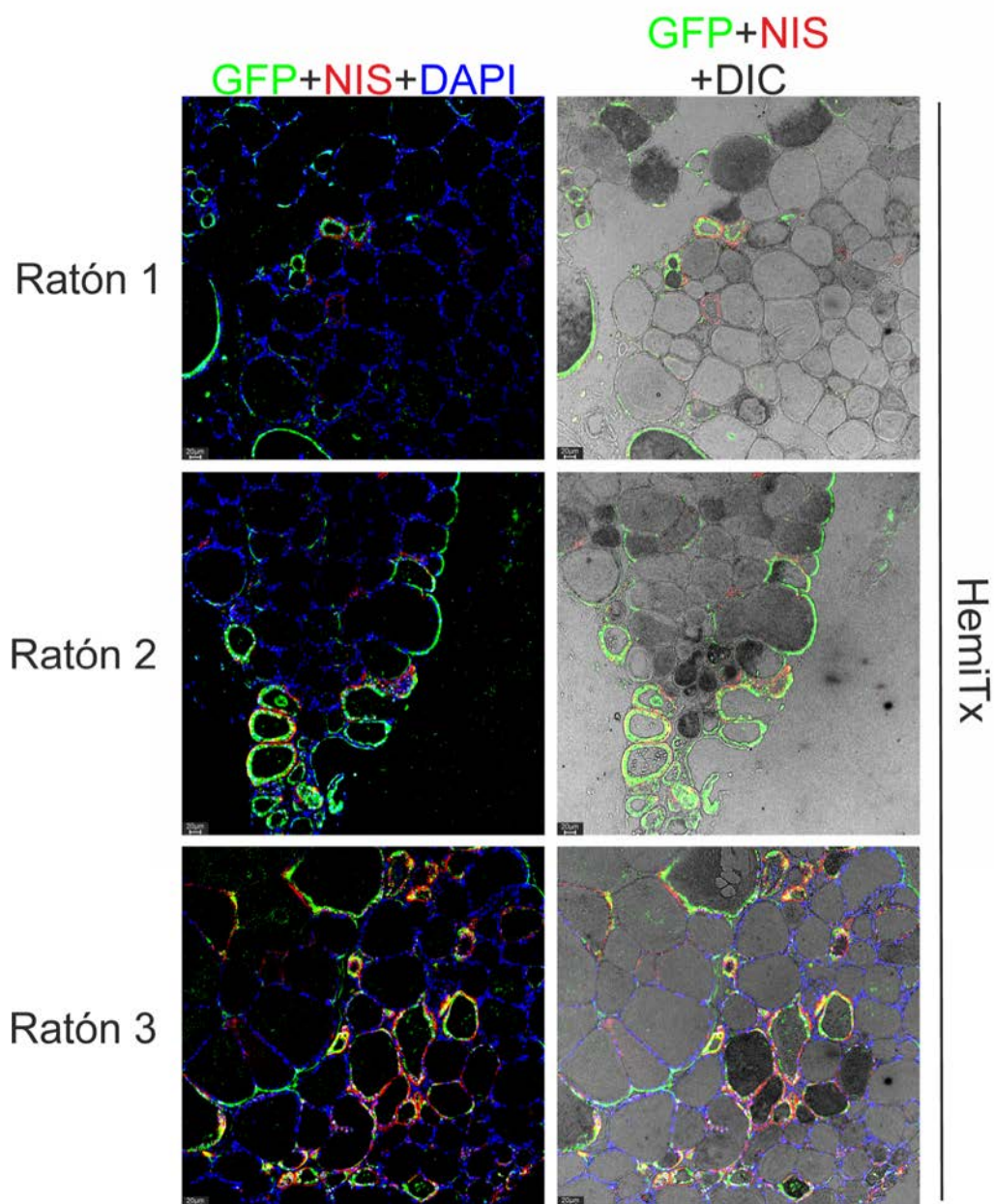


Figura 24 (parte 2)

En conclusión, de estos experimentos, se demuestra que la tiroides de ratonas adultas es capaz de responder a daño mecánico estimulando una pequeña población de células SOX2 capaces de proliferar y, en última instancia, diferenciarse a células foliculares tiroideas que además son funcionales.

Nuestro último razonamiento vino de la siguiente pregunta. Si tras la HemiTx se reclutan células SOX2 para luego diferenciarse, estas deberían activarse de alguna forma para empezar a proliferar antes de la diferenciación.

Para comprobar que quisimos comprobar si el aumento en el porcentaje de células Sox2 positivas era consecuencia de su activación y proliferación. Para poder responder a esta

pregunta utilizamos ratones hembra C57BL/6 en los que 3 días tras la HemiTx se inyectaron dos pulsos de EdU, uno cada 12 horas, antes del sacrificio (Figura 25).

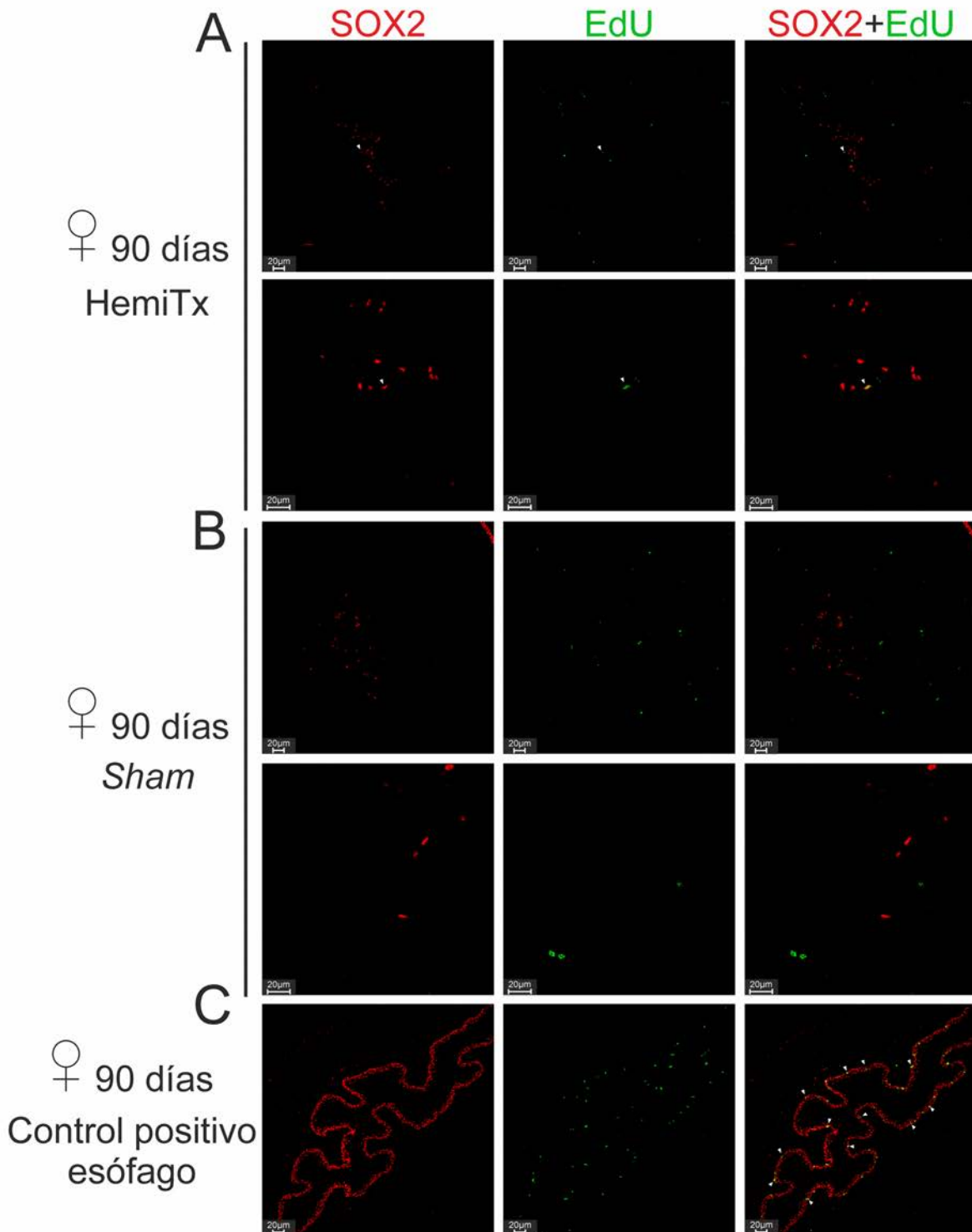


Figura 25. Incremento de la proliferación de la población SOX2 inmediatamente tras la HemiTx. Campos representativas de ratones hembra 3 días después de la HemiTx (A) y Sham (B) con marcajes dobles para EdU (verde) y SOX2 (rojo) que dan un color amarillo en la combinación. Se aprecian células dobles positivas para Sox2

y EdU en individuos HemiTx. No se encontraron estos marcajes dobles en individuos Sham. C) Epitelio del esófago, donde se produce un alto recambio celular, hay muchas células dobles positivas SOX2-EdU.

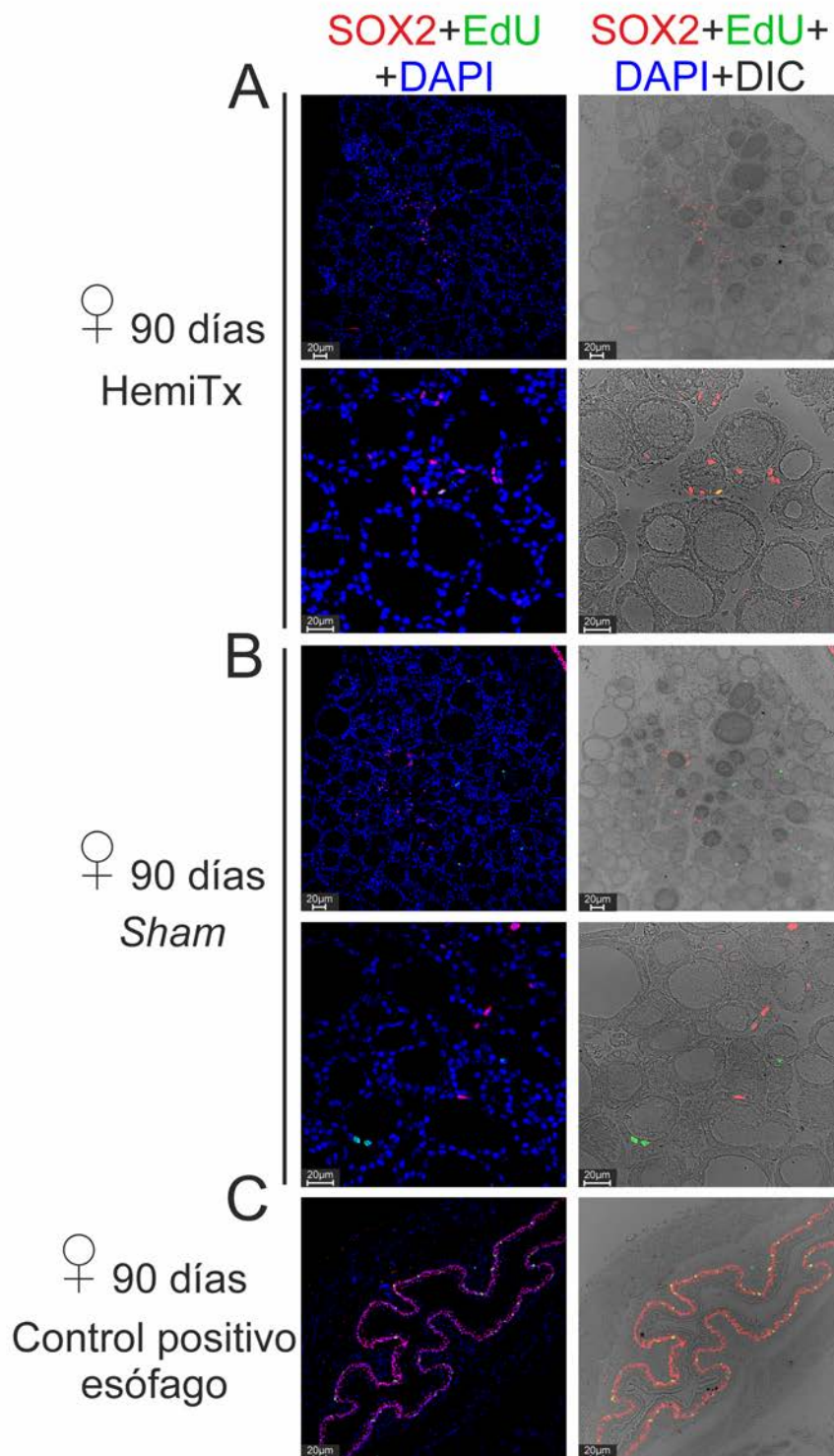


Figura 25 (parte 2)

La EdU se incorpora es un nucleótido análogo a la Uridina que se intercala en el ADN cuando una célula entra en fase S de división celular. El marcaje en las células con EdU en su núcleo se realiza mediante Click Chemistry y se puede añadir a la inmunofluorescencia de SOX2. Inmediatamente tras la HemiTx (3 días) se pueden ver varias células SOX2 colocalizadas con EdU (color amarillo) (Figura 25A). Esta abundancia por sección no se observa en los ratones controles Sham (Figura 25B). La técnica funciona ya que como control se utiliza el epitelio del esófago, un tejido con alto recambio (Figura 25C). Pudimos comprobar mediante dobles inmunofluorescencias que había un aumento de células Sox2 positivas que retenían EdU en los ratones hemitiroidectomizados comparados con los ratones Sham (Figura 25), por lo que se encontraban en fases de síntesis de DNA previos al proceso de división celular.

4 MODELOS DE DESARROLLO DE LA GLÁNDULA TIROIDES

Los resultados anteriores nos indicaron que la población Sox2 se activa y recluta ante una necesidad funcional, y, además, una vez reclutadas, las células se diferencian progresivamente a epitelio folicular. Esto cumplía una de las condiciones para considerar a esta población como células madre adultas de la tiroides.

Un segundo modelo de *tracing* en los estudios de células madre postnatales es el seguir la población desde el momento del nacimiento, ya que los órganos endocrinos crecen durante la infancia y la pubertad conforme van siendo mayores los requerimientos de sus hormonas. La pregunta es cuánto contribuye la población SOX2 a dicho crecimiento postnatal.

Por ello se inyectó TAM subcutáneo a ratones en día postnatal P1 de varias camadas donde se cruzó el modelo *Sox2-Cre-ERT2* con el *LoxP-EGFP* y los animales se sacrificaron a los 90 días. Se dividieron en grupos una vez realizada la PCR para comprobar cuáles de esos ratones tenían modificado los dos genes y cuáles no; de esta manera se obtienen ratones del genotipo requerido *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP*, pero también ratones sólo positivos para *LoxP-EGFP* que sirven como controles negativos del modelo.

En la figura 26 se observa que, en individuos adultos, a día 90, más de un 75% de su glándula tiroides es GFP positiva. Sin embargo, cuando se estudiaron las tiroides de ratones a P3, dos días después de la inyección, sólo un porcentaje muy pequeño de células expresaba GFP. Esto quiere decir que inicialmente, sólo las células SOX2 comienzan a expresar GFP. Y en los ratones adultos, todas esas células GFP provienen de precursores que expresaba la proteína SOX2 en el día postnatal P1, en el momento en que nosotros inyectamos el TAM.

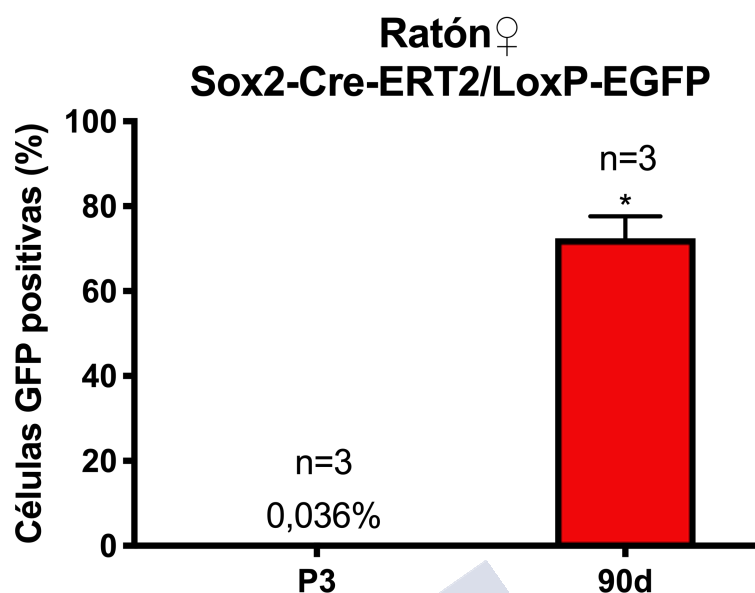


Figura 26. Recambio celular (*Cell Turnover*) postnatal en la tiroides a partir de las células SOX2. Porcentaje de células GFP positivas de ratones hembra de 90 días frente al de ratones sacrificados en P3, ambos grupos con el mismo número de dosis de TAM inyectado a P1. A los 3 días no existe prácticamente células GFP en la glándula. Cuando el individuo crece la mayoría de la tiroides es positiva para dicho marcador, por lo que se deduce gracias a nuestro modelo que el recambio del epitelio folicular se realiza en gran medida a partir de células Sox2. En la gráfica se representa la media±el error estándar con un tamaño muestral (n) representado encima de cada barra. Se utiliza un test de Mann-Whitney bilateral.

Realizamos las co-tinciones con marcadores de epitelio folicular tiroideo para comprobar que estas células GFP en los ratones hembra adultos expresaban proteínas fenotípicas de tirocitos diferenciados, tales como Tg (Figuras 27) o NIS (Figura 28). Se observa el color amarillo de colocación con cada uno de estos marcadores. Además, cada uno de estos sale reforzado en un polo del epitelio folicular, polo apical y coloide para Tg (Figura 27) o polo basal para NIS (Figura 28) y aquí ya no se ve el GFP.

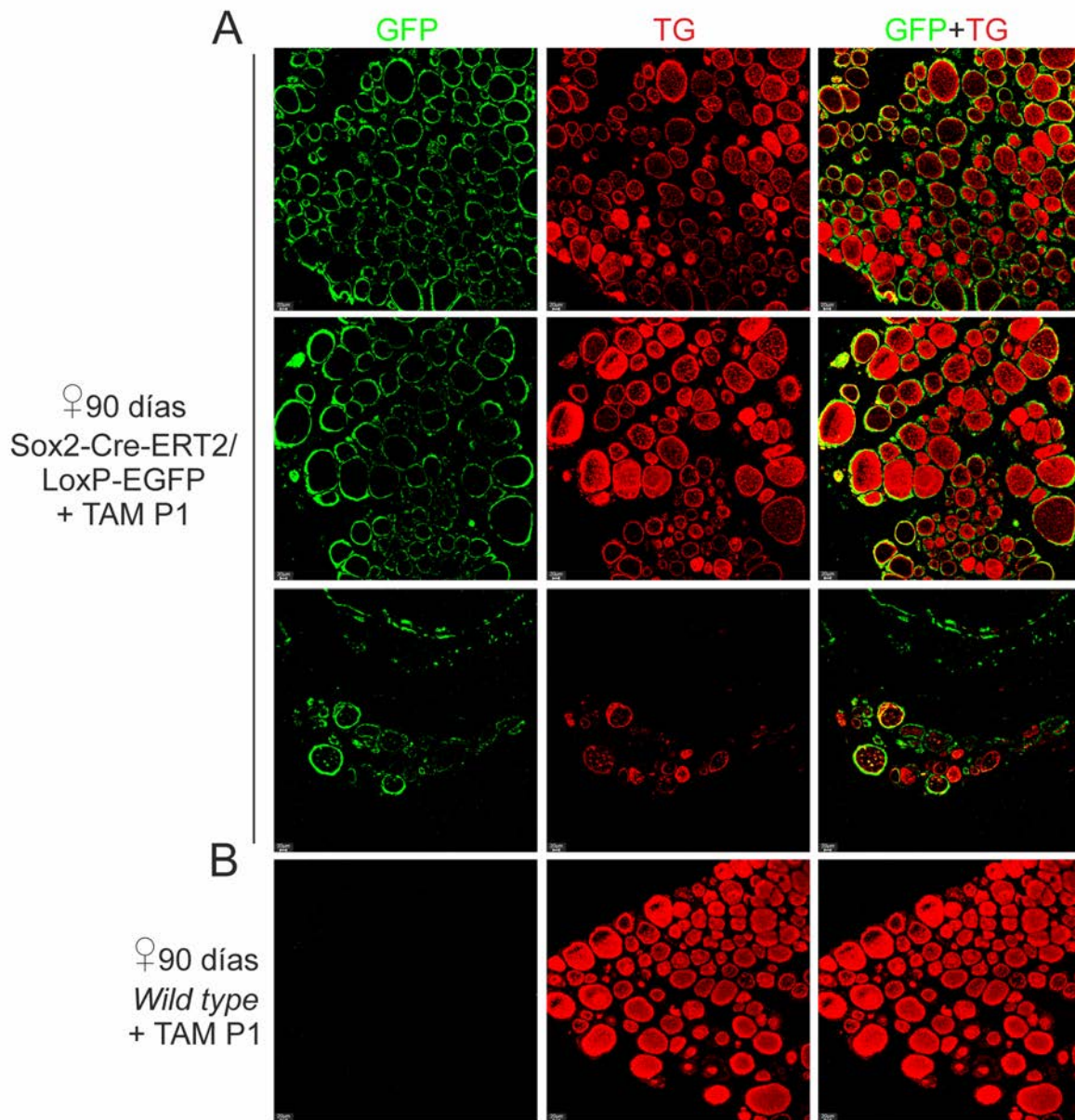


Figura 27. Reclutamiento postnatal fisiológico de células SOX2, evidenciado por marcaje con GFP en epitelio folicular adulto. Campos representativas de tres ratones hembra adultos de 90 días a los que se les administró TAM en P1, es decir, el día del nacimiento. A) El epitelio folicular secretor de Tg por su polo apical (rojo) es en gran medida positivo para GFP (verde) en los tres animales. Se observa color amarillo en la fusión de canales que se concentra en el polo apical del epitelio folicular, indicando que células Sox2 se han diferenciado a epitelio folicular secretor de Tg. La Tg secretada se acumula en el coloide fuera de las células. B) Como se esperaba, no se observa tinción con GFP en el ratón que carece del alelo Sox2-Cre-ERT2 (abajo).

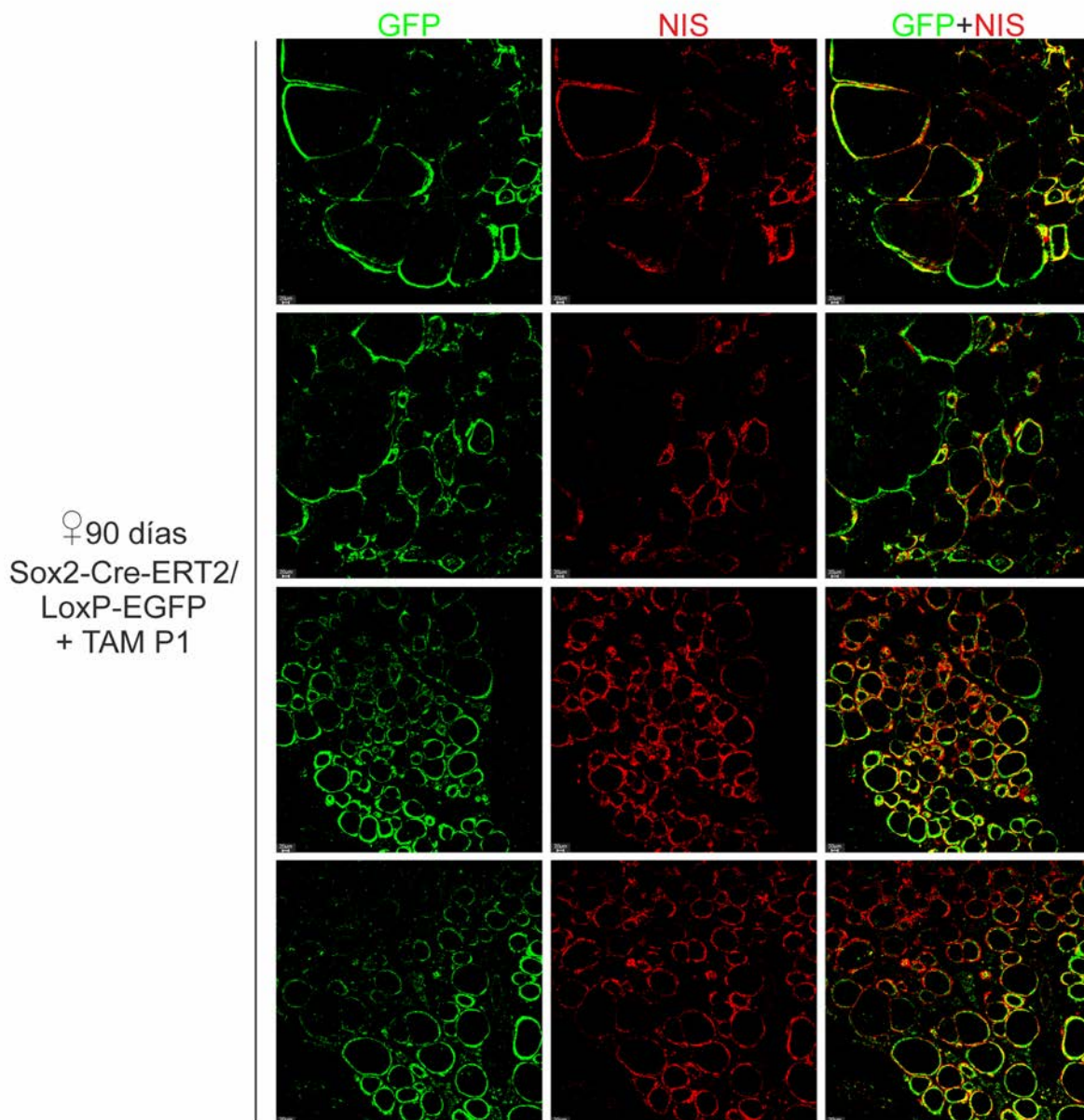


Figura 28. Reclutamiento postnatal fisiológico de células SOX2, evidenciado por marcaje con GFP y NIS en epitelio folicular adulto. Campos representativas de tres ratones hembra adultos de 90 días a los que se les administró TAM en P1, es decir, el día del nacimiento. El epitelio folicular que concentra yoduro a partir de la sangre a través del transportador de polo basal NIS (rojo) es en gran medida positivo para GFP (verde) en los tres animales. Se observa color amarillo en la fusión de canales en el citoplasma del epitelio folicular, indicando que células Sox2 se han diferenciado a epitelio folicular. Los folículos amarillos aun así se ven rodeados de una delgada línea roja que corresponde al NIS localizado en la membrana plasmática del polo basal.

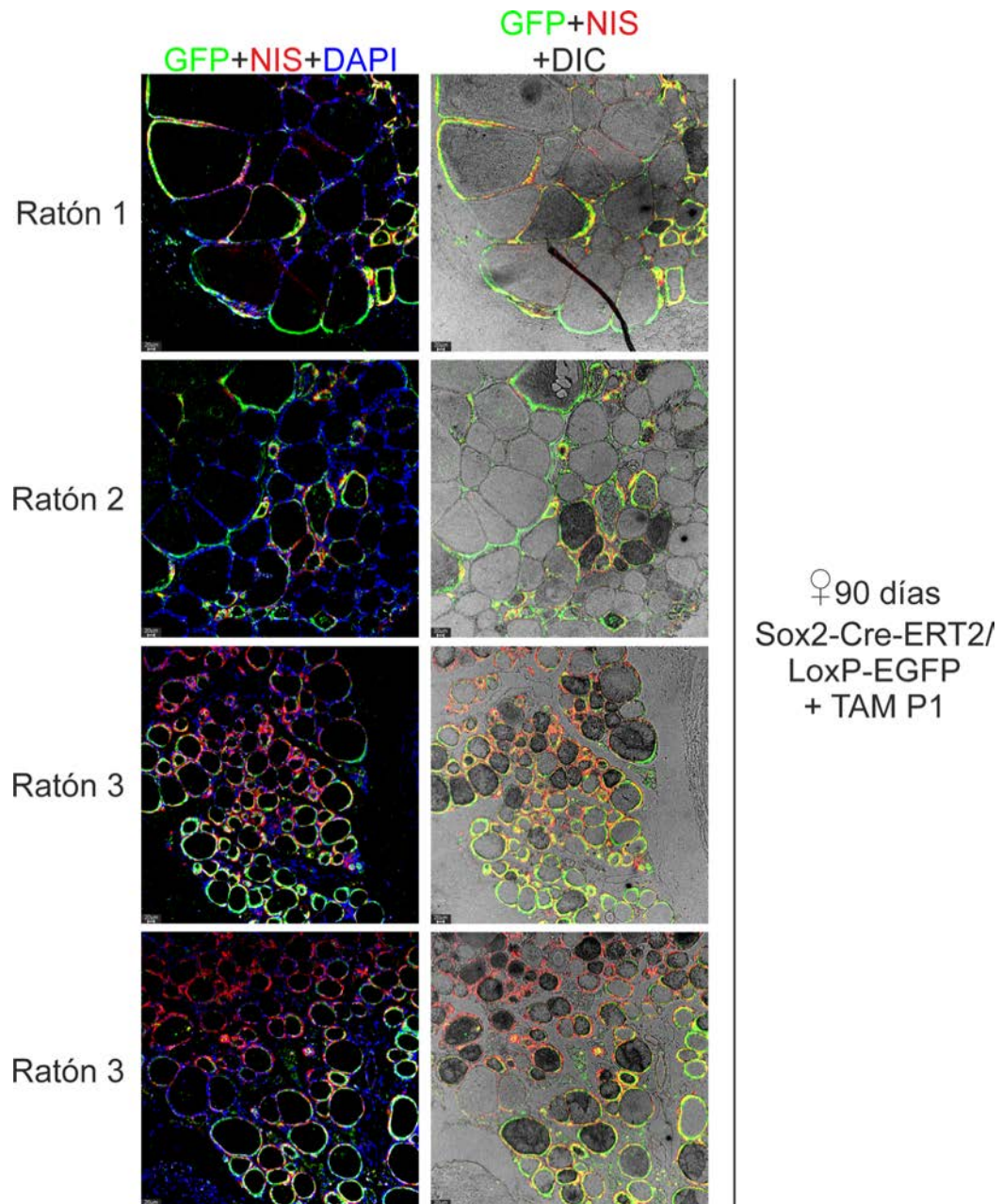


Figura 28 (parte 2)

Para comprobar que las células SOX2 activadas por el TAM son las responsables del recambio celular postnatal de la tiroides, se sacrificaron también ratones a día P3, es decir con un tracing muy corto tras la inyección de TAM a día P1. Al teñir para doble inmunofluorescencia SOX2 y GFP, solamente se observó tinción con GFP en células aisladas distantes y en las células SOX2 del área de la glándula tiroides (Figura 29).

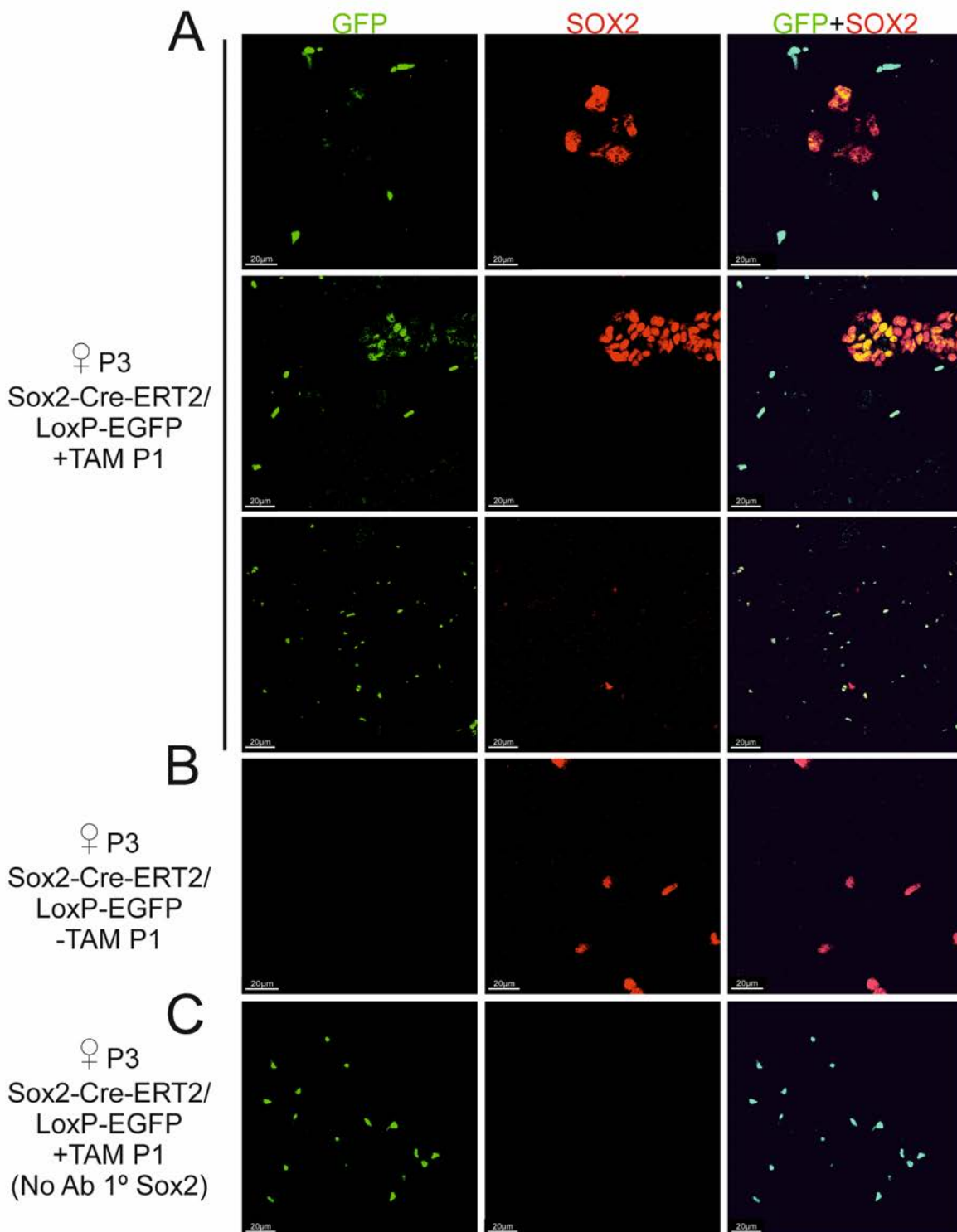


Figura 29. Tracing corto a día P3 de neonatos inyectados con TAM a P1 demuestran que sólo parte de la población SOX2 expresa GFP. Campos representativas de tiroides de ratones hembra Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP a día P3, dos días después de la inyección de TAM. A) Casi la totalidad de la glándula está exenta de expresión de GFP; sólo algunas células SOX2 positivas lo eran también para GFP. B) Como primer control negativo se muestra un ratón al que no se le administró TAM a P1, y por tanto es negativo para GFP. C) Como segundo control se muestra una sección de ratón Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP inyectado con TAM en el que se omitió anticuerpo primario de SOX2, y por tanto no muestra marcaje en el canal rojo. Se marcaron algunos folículos con líneas naranjas en la combinación con DIC, para indicar la situación de las células SOX2 y GFP, o las dobles.

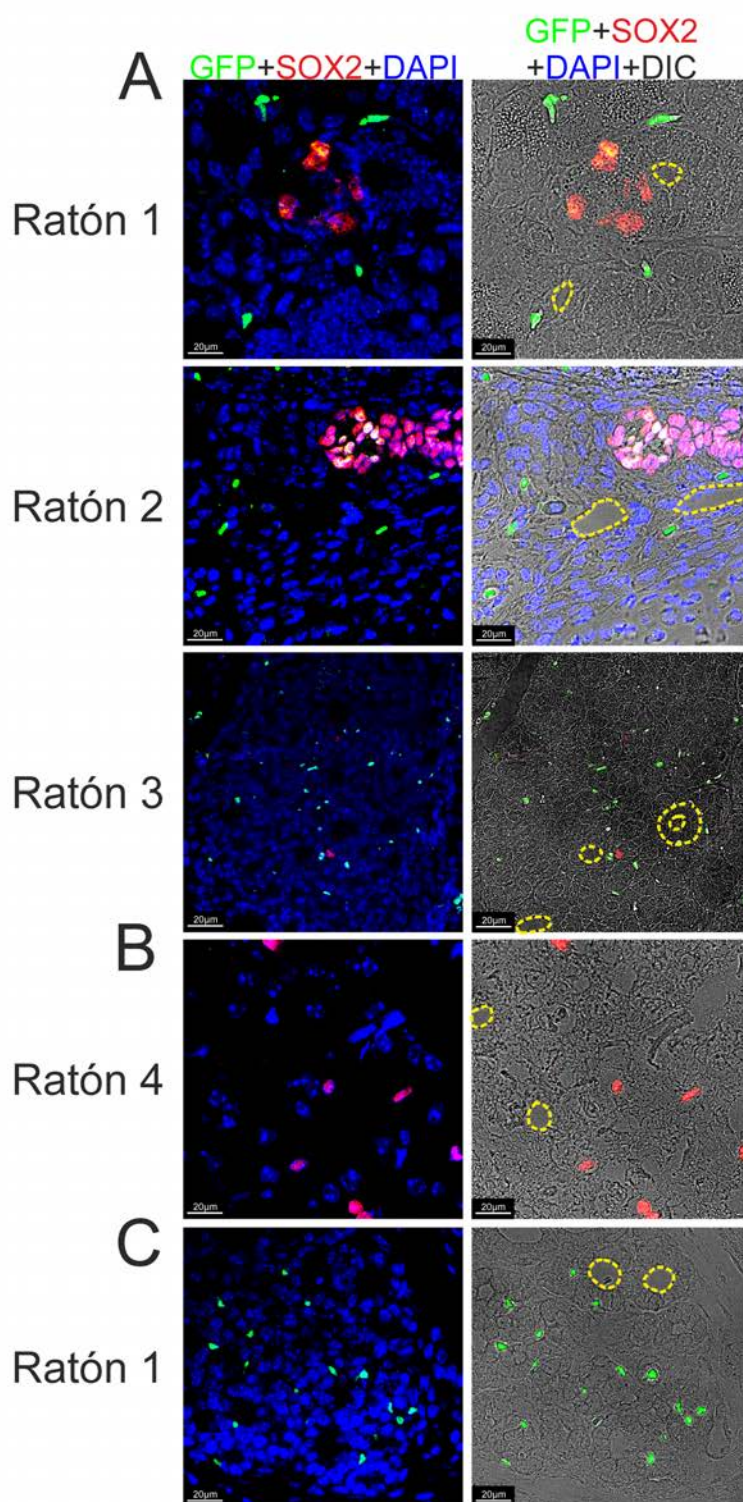


Figura 29 (parte 2)

Todos los controles realizados salieron correctos, tanto el control del ratón no inyectado con TAM que no tiene GFP, como el control del ratón en el que se omitió el anticuerpo primario para SOX2, que no presenta marcaje SOX2 (Figura 29). Esto indica que el marcaje genético inicial a P1 del modelo *Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP* -TAM es exclusivo de las células SOX2 y que de ellas derivan todas las encontradas en el adulto. Para demostrar que las células SOX2 se activan y son las responsables del desarrollo de la tiroides, se sacrificaron también ratones a día P3 para ver que únicamente las células SOX2 en ese momento eran positivas para GFP, como se observa en la figura 29.

5 GENERACIÓN DE TIROSFERAS

Las células madre adultas deben cumplir ciertas características para ser consideradas como tales. Por una parte, *in vivo* en el órgano deben presentar marcadores de células madre; mantenerse quiescentes, pero poder ser activadas ante un requerimiento funcional; ser capaces de diferenciación terminal al parénquima de ese tejido. Por otra parte, *in vitro* tras ser purificada la población, las células madre deben poder crecer en ausencia de suero, en forma de esferas con el medio más común que incluye los dos suplementos comerciales N2 y B27^{115,128}. Esas esferas deben conservar los marcadores presentes en la población original, ser capaces de crecer en una dilución muy baja, ser capaces de autorrenovación y, por último, ser capaces de diferenciación *in vitro*.

Nuestra población Sox2 de la tiroides cumplía bien las características de célula madre adulta *in vivo*. Procedimos entonces a explorar sus características *in vitro*.

5.1 GENERACIÓN DE TIROSFERAS PRIMARIAS

Desgraciadamente, carecíamos de un marcador de superficie que nos permitiese purificar nuestra población SOX2+ por sorter o por métodos magnéticos (se intentaron ambas cosas basándonos en varios marcajes funcionales como EGFP y tamaño, pero el porcentaje era tan bajo que no tuvimos éxito). Procedimos entonces a realizar los experimentos con una dispersión celular de toda la tiroides de ratones hembra de 30 días, asumiendo que la población de células madre SOX2+ sería la que formaría tiroesferas, y la que podría diferenciarse a epitelio folicular. Para ello se disgregaron a célula única tiroides de ratón hembra y se sembraron en placas con el medio de cultivo de crecimiento de esferas de células madre adultas, a una densidad baja de 1000-500 células por pocillo de plato mw6, lo que supone 500-250 células/mL respectivamente.

Pasados tres días desde el sembrado, la mayoría de las células sembradas comenzaban a presentar eventos de muerte celular excepto alguna célula que era capaz de mantenerse viva y crecer a lo largo de los subsiguientes días, generando estructuras esféricas a las que hemos llamado “tiroesferas” (Figura 30A). Dichas tiroesferas seguían creciendo conforme pasaban los días. En los días 7 y 9 estas esferas habían duplicado e, incluso, triplicado su tamaño y número de células que las conformaban (Figura 30A). Nuestro número encontrado de esferas en cultivos repetidos fue alrededor de 5 esferas/pocillo, independientemente de si sembrábamos 500 o 1000 células/mL (Figura 31A). Si calculamos que el porcentaje de células SOX2 en la tiroides adulta normal nos sale por debajo del 0,3%, más bien cercano al 0,25% en ratones hembra de 30 días (Figura 8, contaje de porcentaje de células SOX2 en ratones hembra de 30 días; Figura 15, contaje en el experimento de hipotiroidismo a ratones hembra controles tratados con vehículo) podríamos esperar un máximo de 7 esferas en 1000 células/mL y 4 esferas en 500 células/mL. Por lo tanto, la eficiencia de esferas obtenidas coincide en su mayor parte con lo esperado, por lo que sugiere que las tiroesferas derivan de nuestra población SOX2+. El porcentaje de esferas

obtenidas sobre células totales sembradas fue más eficaz en la menor concentración (Figura 31B). Quizás el exceso de grumos de células muertas más numerosos en 1000 células/mL condicione el crecimiento de las tiroesferas.

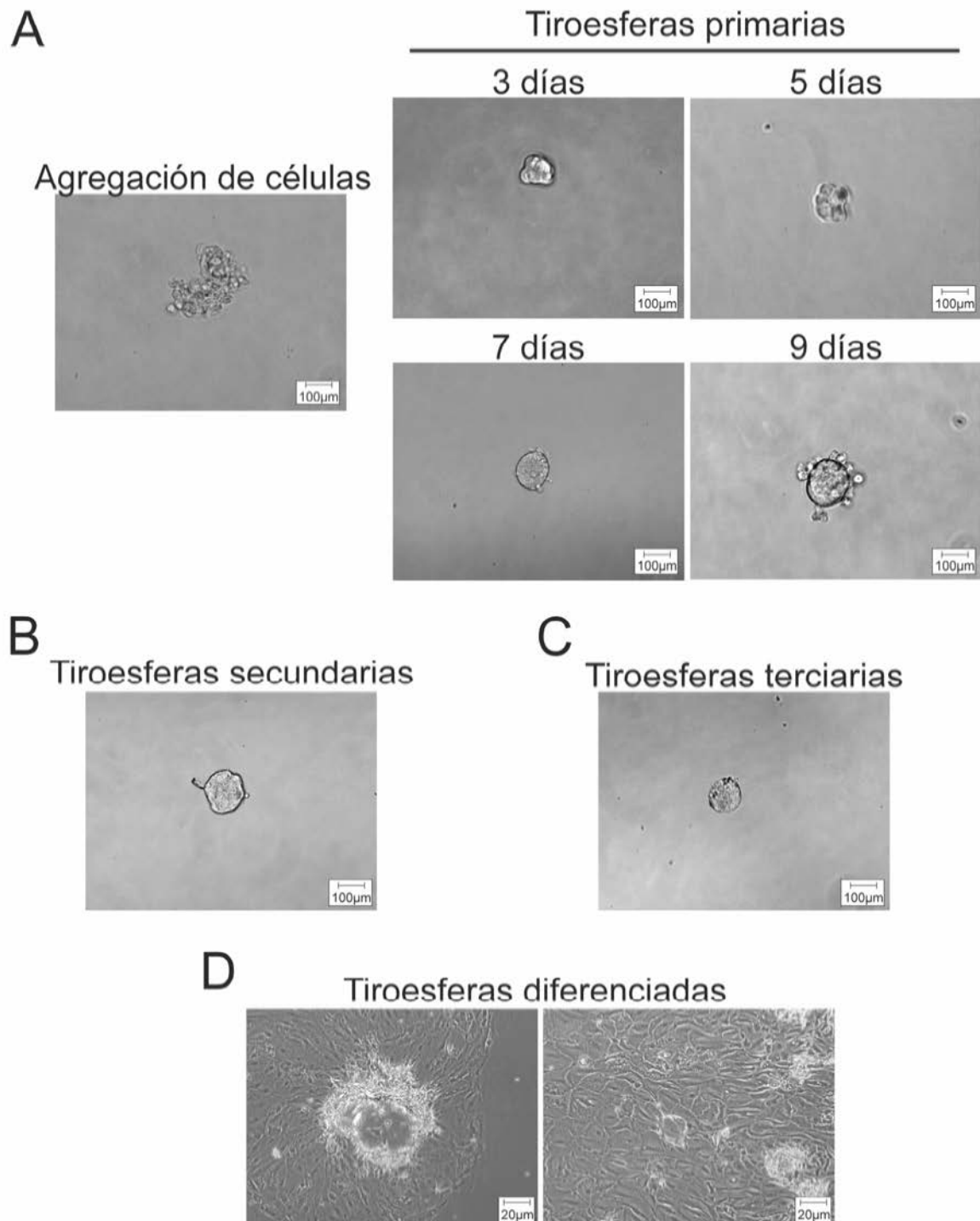


Figura 30. Crecimiento de Tiroesferas en cultivo in vitro a partir de una dispersión de células tiroideas de ratón hembra adulta (90 días). Microscopía de contraste de fases con un objetivo de 40X en el seguimiento de tiroesferas vivas en diferentes estadios. A) Crecimiento de las esferas a lo largo de los días. B) Tiroesferas secundarias generadas mediante disgregación de las esferas primarias. C) Tiroesferas terciarias generadas mediante disgregación de las esferas secundarias. D) Cultivos derivados de Tiroesferas sembradas con suero y medio de diferenciación (TSH). Tienen aspecto de tirocitos en cultivo y forman estructuras foliculares 3D.

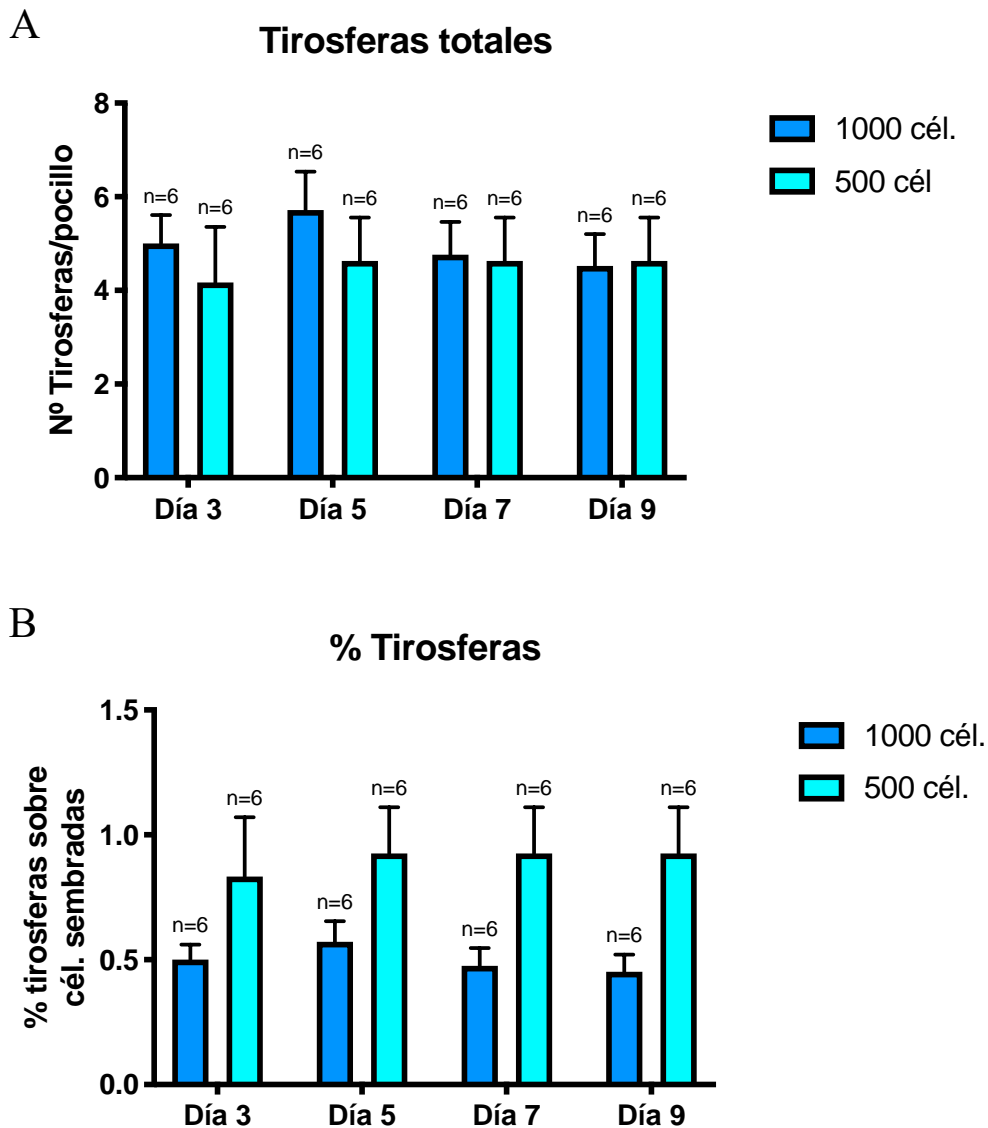


Figura 31. Obtención de Tiroesferas en cultivo in vitro a partir de una dispersión de células tiroideas de ratón hembra adulta (90 días). A) Tirosferas totales generadas por pocillo a partir del sembrado de 1000 ó 500 en cél/mL con 3 mL por pocillo. B) Formación de tiroesferas expresado en porcentaje sobre células totales sembradas.

5.2 GENERACIÓN DE TIROSFERAS SECUNDARIAS Y Terciarias

A continuación, se quiso comprobar si las células que conformaban estas esferas eran capaces de volver a generar más tiroesferas a partir de una única célula.

Para ello, se disgregaron mecánicamente hasta conseguir células individualizadas y se volvieron a sembrar en un medio similar al usado en la formación de las esferas primarias (Figura 30B). Se sembraron unas 10 células/pocillo mw6 (~3 células/mL) y se obtuvieron tras 9 días hasta 10 esferas por pocillo. Repitiendo exactamente el mismo procedimiento, se comprobó que estas células eran capaces de volver a generar estas estructuras esféricas con formación de esferas terciarias (Figura 30C).

5.3 INMUNOFUORESCENCIA EN TIROSFERAS

Nuestro siguiente paso fue comprobar si estas tiroferas, -que crecían en medio de cultivo de stem-cell sin suero, y con la forma esperada de stem-cell adultas (esferas flotantes) y el número esperado si creciesen a partir de nuestra población SOX2 de la tiroides-, expresaban los mismos marcadores que habíamos encontrado en el estudio de tejido, sobre todo el factor de transcripción SOX2.

Para ello hicimos tinciones de estas tiroferas mediante inmunofluorescencias. Pudimos observar que las tiroferas expresan SOX2 (Figura 32A). Las esferas expresaban bajos niveles de TTF1, comparando con alguna célula folicular aislada que seguía viva alrededor (Figura 32B). Y las esferas eran absolutamente negativas para Tg (Figura 32C).

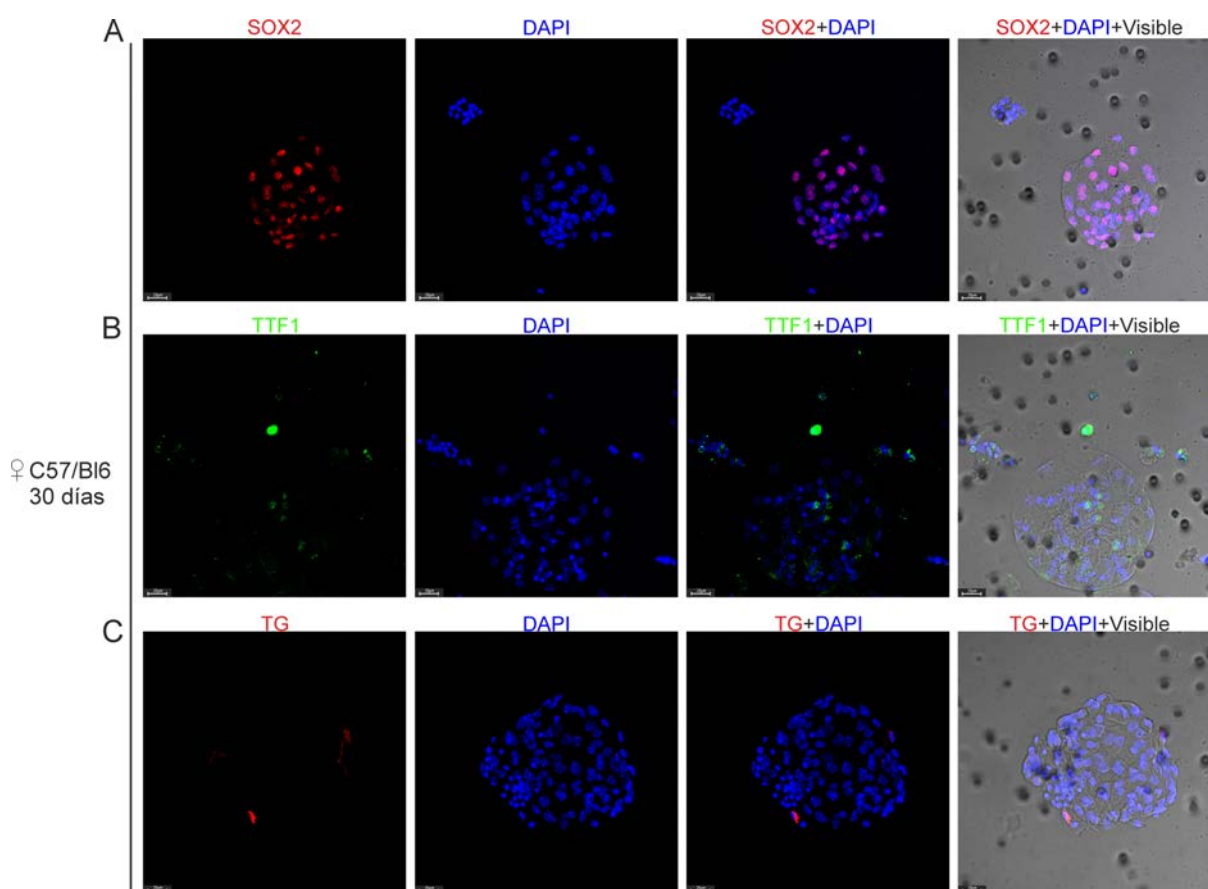


Figura 32. Caracterización de las Tiroferas mediante expresión de marcadores. Estudio por microscopía confocal de la expresión de SOX2 (A), TTF1 (B) y TG (C) de tiroferas obtenidas 9 días en cultivo.

5.4 DIFERENCIACIÓN TIROSFERAS

Una siguiente condición que faltaba es demostrar que esas esferas de células SOX2+ pero negativas para marcadores de epitelio folicular, eran capaces de diferenciarse *in vitro*. Para inducir la diferenciación añadimos un medio con suero, que induce adherencia al plato a las pocas horas, y hormonas importantes para el mantenimiento del fenotipo folicular tiroideo entre las que se encuentra la TSH, hormona hipofisaria que mantiene el trofismo en la tiroides.

Se pipeteó una esfera individualizada en plato multipocillo de plástico. Tras la adición del medio de diferenciación, las tiroferas comienzan a adherirse al plato. Las células se mantuvieron con ese medio durante 14 días. Tras este período los pocillos se fijaron y tiñeron para Tiroglobulina (Figura 33).

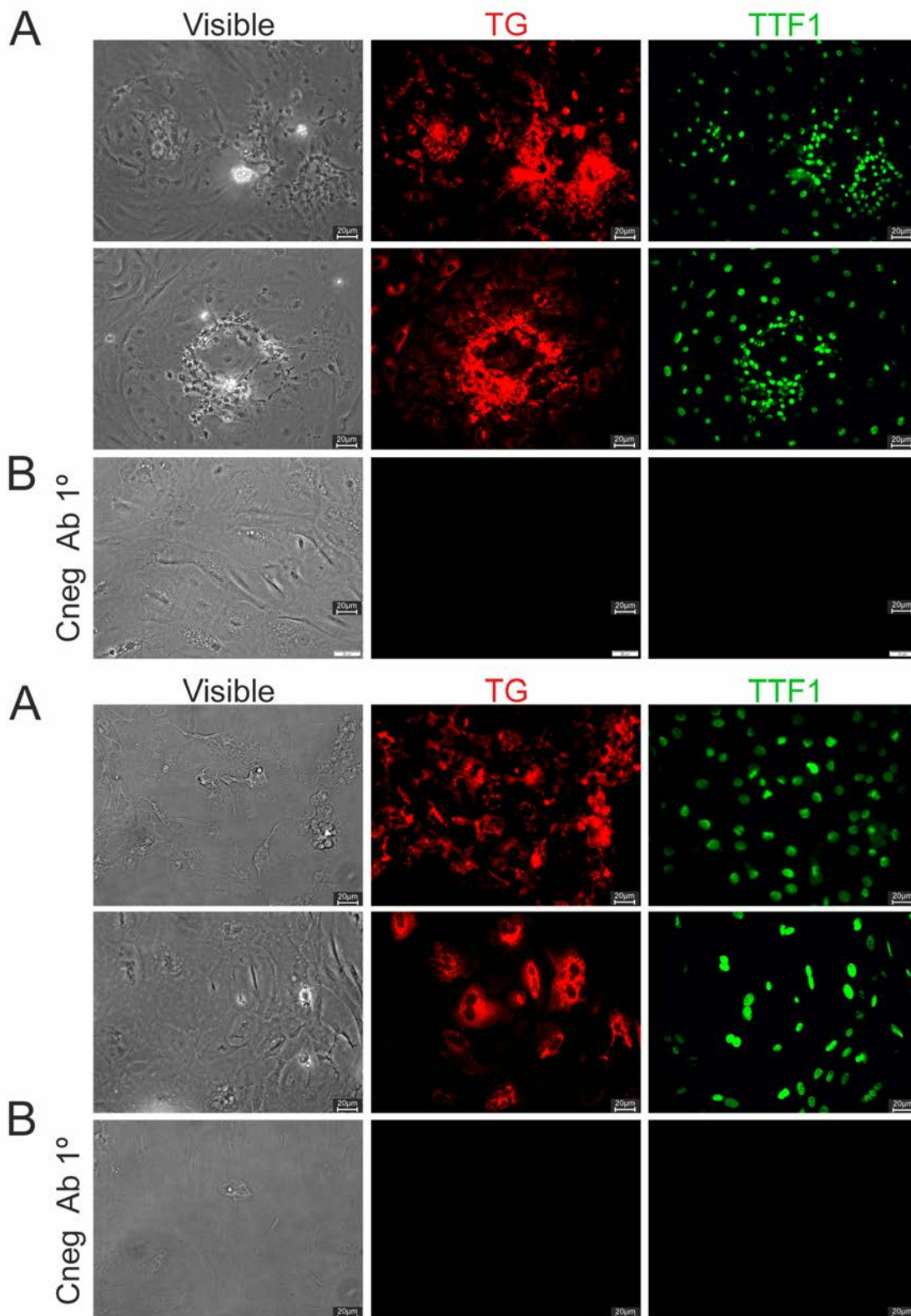


Figura 33. Diferenciación de Tiroesferas a epitelio folicular. Fotos representativas de inmunofluorescencia de tiroesferas diferenciadas tras 14 días en medio con TSH y hormonas. Las células se fijaron y tiñeron para TG y TTF1. A) Se muestran diferentes campos de diferentes cultivos. Se observa cómo las tiroesferas se han adherido a la placa de cultivo y comienzan a formar estructuras parecidas a folículos. Además, expresan marcadores de fenotipo diferenciado tiroideo como TTF1 y Tg. B) La omisión de anticuerpos primarios no dio señal (Cneg 1°).

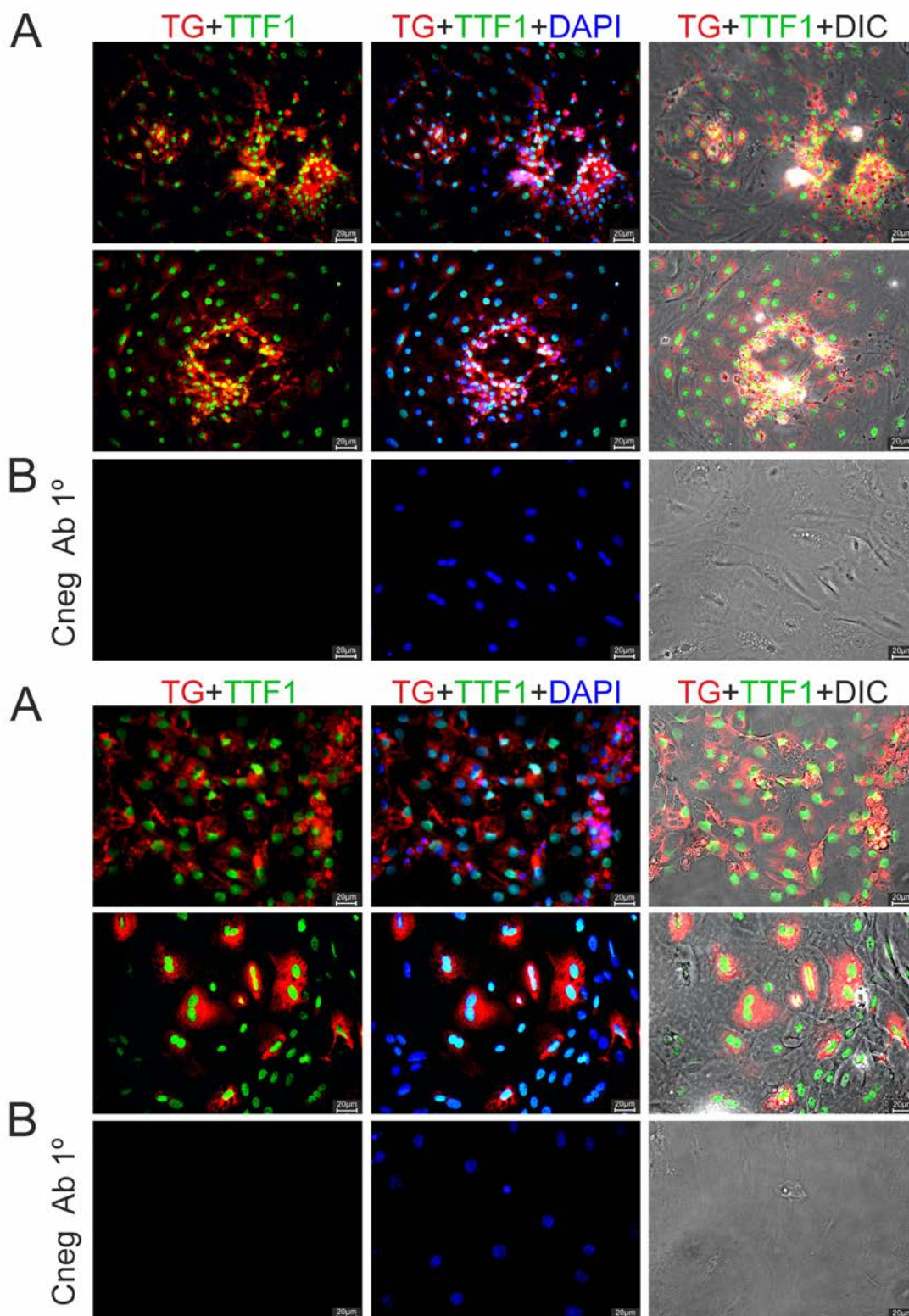


Figura 33 (parte 2)

Como se observa en la figura 33, las células obtenidas a partir de tiroferas SOX2/lowTTF1 negativas para Tiroglobulina se convierten en células de intenso marcaje nuclear para TTF1, capaces de expresar esta proteína clave de la función tiroidea tras su diferenciación.

6 EXPRESIÓN DE SOX2 EN TEJIDO Y CULTIVO CELULAR DE TIROIDES HUMANO

6.1 EXPRESIÓN DE SOX2 TANTO EN CULTIVOS CELULARES DE TIROIDES NORMAL (T-NT) Y BOCIOS MULTINODULARES (T-MNG) COMO EN SUS PROPIOS TEJIDOS A NIVEL DE ARN MENSAJERO, PERO NO HAY DIFERENCIAS ENTRE ELLOS.

Una vez caracterizadas y descritas estas poblaciones de células madre presentes en la glándula tiroidea de ratones, quisimos observar si existe una población análoga en tejido de tiroides humano. Estudios ya publicados en nuestro laboratorio demuestran que, en la hipófisis, otra glándula endocrina, se conserva la localización, estructura anatómica y marcadores expresados de células madre entre roedores y humanos^{115,128}. Nosotros teníamos la ventaja de poseer la colección TIROCHUS que reúne tejidos y cultivos del mismo paciente procedentes de cirugía de tiroides de nuestro hospital.

Comenzamos por analizar la expresión de *SOX2* y genes de fenotipo tiroideo a nivel de ARN mensajero en una serie de tejidos humanos de tiroides normal (TH-NT) y bocio multinodular (*Multinodular Goiter* o MNG, TH-MNG). Las características de la serie en cuanto a sexo (M=mujer; H=hombre) y edad fueron tenidas en cuenta, pero corresponden a la distribución del número de pacientes que afrontan cirugía por enfermedad hiperplásica benigna de tiroides, en su mayoría mujeres⁸⁰. Esta serie constaba de 15 TH-NT (11 M+ 4H) y de 18 TH-MNG (19M + 3H). La edad media entre ambos grupos fue de 48,5±4 años en TH-NT y 51,2±3,4 años en TH-MNG y no presentó diferencias significativas ($p=0,615$, distribución normal de las variables con el test D'Agostino & Pearson; t-test paramétrico).

El ARNm de *SOX2* se expresaba de forma detectable en tejido tiroideo normal y en bocio multinodular (Figura 33A derecha), pero no hay diferencias entre ambos grupos en cuanto a su expresión.

Al mismo tiempo, estudiamos si existía positividad para *SOX2* en cultivos primarios establecidos a partir de esos tejidos (T-NT y T-MNG). Es importante indicar que en nuestros cultivos la proporción de células de epitelio folicular es superior al 95%²⁴⁸. En este caso nuestra serie consistía en 15 cultivos T-NT y 22 T-MNG. Las edades de ambos grupos, aunque cercanas, sí que tuvieron diferencias significativas siendo 43,8±3,9 para T-NT y 53,4±2,4 para T-MNG ($p=0,035$; distribución normal de las variables con el test D'Agostino & Pearson; t-test paramétrico).

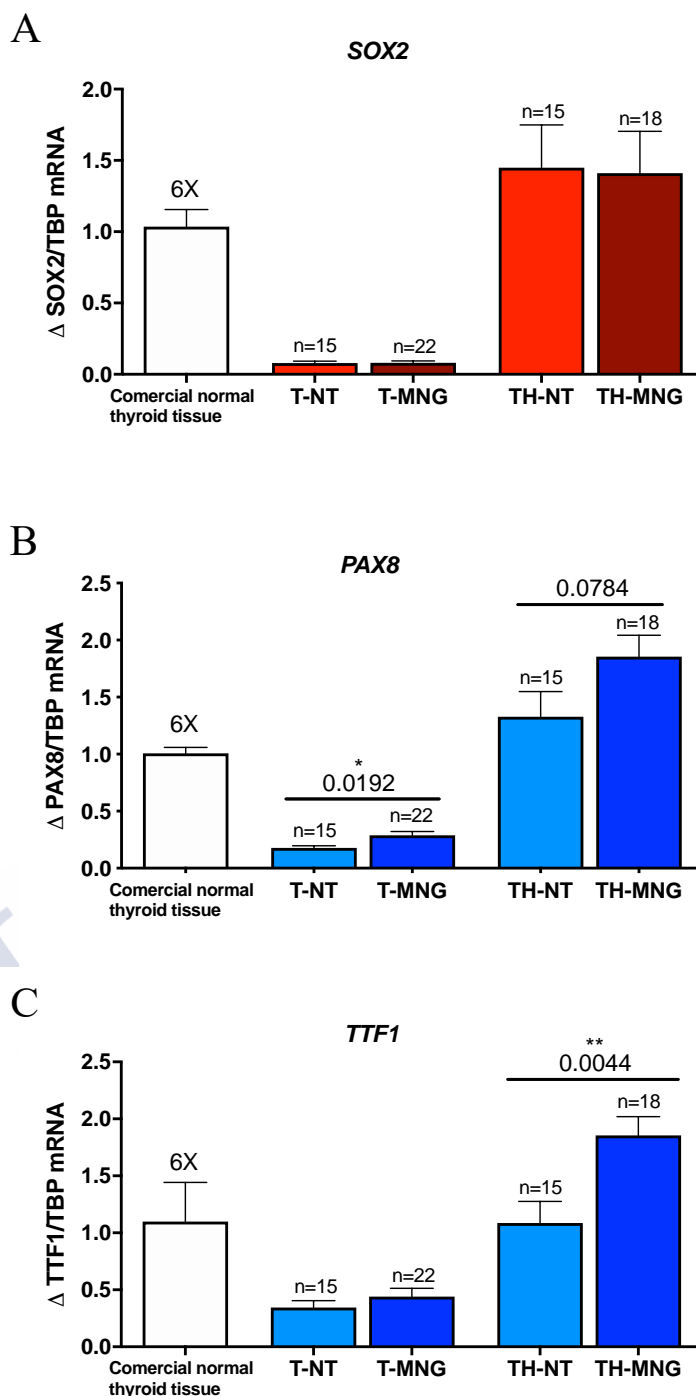


Figura 34. Detectable expresión del ARNm de *SOX2* en muestras de glándula tiroidea y cultivos de epitelio folicular tiroideo. La serie se compone de tejidos normales (TH-NT) y de bocio multinodular (TH-MNG), y cultivos derivados de tejidos normales (T-NT) y de bocio multinodular (T-MNG). A) Expresión relativa del ARNm de *SOX2*. B) Expresión relativa del ARNm de *PAX8*. C) Expresión relativa del ARNm de *TTF1*. Se representa la media±el error estándar de Taqman qRT-PCR con un tamaño muestral (n) mostrado encima de cada barra. Se utiliza un test de Mann-Whitney. **p≤0,01.

Se encontró expresión de *SOX2* en los cultivos, marcadamente menor que en los tejidos. Pero no se encontraron diferencias en la expresión del ARNm de *SOX2* entre ambos grupos de cultivos (Figura 33A centro). La expresión del ARNm de *SOX2* no se correlacionó significativamente con la edad del paciente: r de Pearson=0.133, p=0.318 (n=15) para TH-NT, y r=-0.189, p=0.226 (n=18) para TH-MNG. Los datos de esta correlación sugieren que si

ampliamos el número de muestras pudiese haber una correlación negativa débil con edad y expresión de *SOX2* en TH-MNG

Como control positivo se utilizó la expresión de ARNm para las proteínas *PAX8* y para *TTF1*, los dos factores de transcripción coexpresados en el epitelio folicular tiroideo que corrobora que nuestras muestras corresponden a dicho tejido (Figura 33B-C). Curiosamente, tanto el tejido MNG como los cultivos procedentes de MNG expresan una mayor cantidad de *PAX8* (Figura 33B). La diferencia de expresión en ARNm de *TTF1* encontrada en tejido TH-MNG no llegó a ser significativa en cultivos (Figura 33C). Como dato confirmatorio, esto se había descrito para la proteína, pero no para el ARNm en un trabajo previo²⁹².

6.2 AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA SOX2 EN CULTIVOS HUMANOS DE BOCIO MULTINODULAR (T-MNG), COMPARADO CON TIROIDES NORMAL (T-NT)

6.2.1 Estudio de la expresión de proteína Sox2 en cultivos primarios humanos

El resultado anterior indicaba que podría haber células SOX2 en la tiroides humana, ya que SOX2 no es un marcador descrito como positivo en el epitelio folicular de tiroides humano. Pero hasta ahora no había evidencia de esta población en tejido de tiroides humano. Realizamos una inmunohistoquímica en secciones de una muestra de tejido de tiroides normal humano, fijadas con formol y embebida en parafina como nuestras muestras de ratón, que además estaban perfundidas primero para eliminar la sangre.

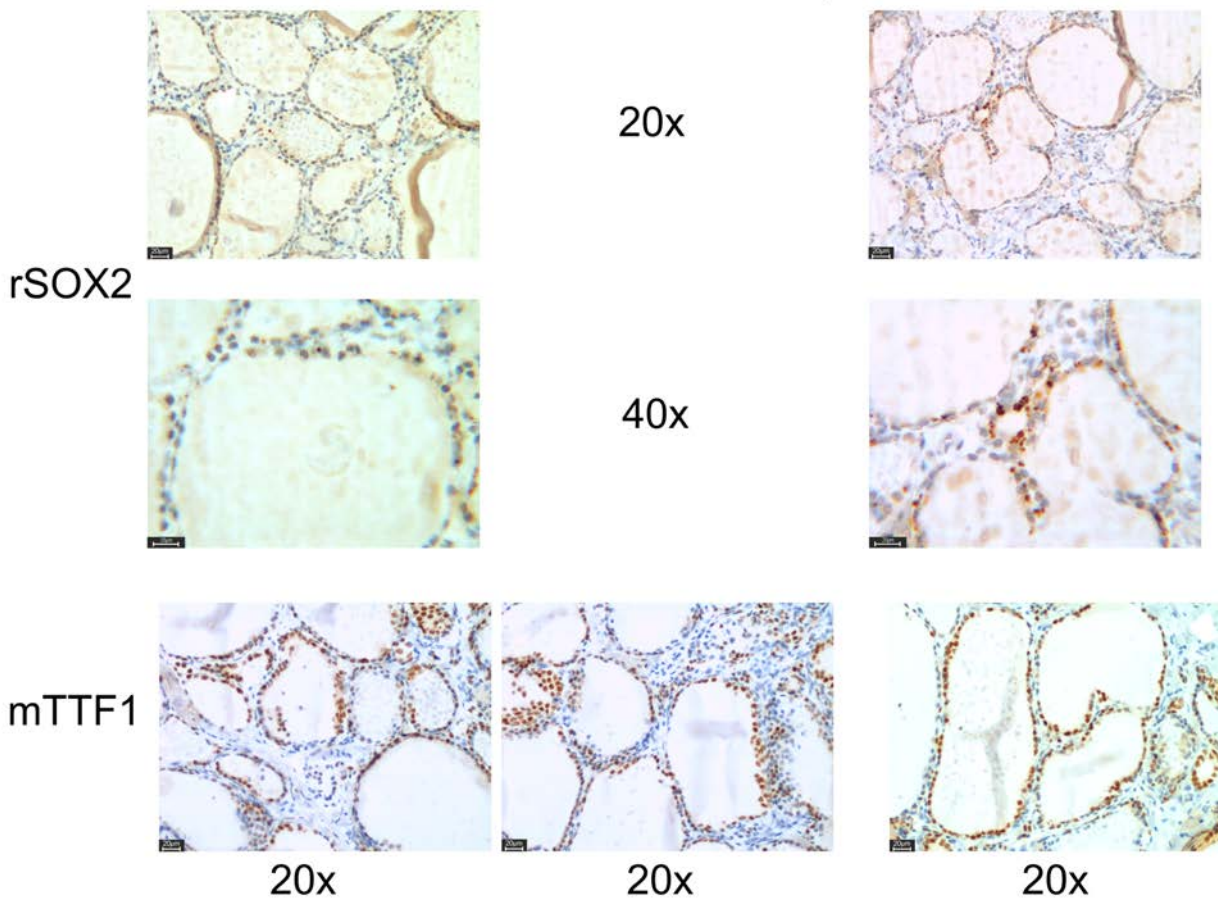


Figura 35. Expresión de SOX2 y TTF1 en tejido de tiroides humano normal mediante inmunohistoquímica. Aumentos 20X y 40X.

Observamos que el anticuerpo de SOX2 teñía células discretas mientras que la inmensa mayoría del epitelio folicular era negativo, aunque la inmunohistoquímica realizada en este tipo de muestras daba fondo debido a la forma de fijación (tejido no perfundido) (Figura 35 arriba). Secciones inmediatamente contiguas se tiñeron para TTF1 comprobando que todo el epitelio folicular se teñía en sus núcleos para el factor de transcripción TTF1 (Figura 35 abajo).

6.2.1 Estudio de la expresión de proteína Sox2 en cultivos primarios de tiroides humano

Este dato, junto con la detección del ARNm de *SOX2* en cultivos sugerían incluso que habría alguna célula en nuestros cultivos, remanente del tejido inicial, que expresaba la proteína SOX2 ya que, aunque no detectábamos ninguna diferencia en cuantificación entre cultivos normales o de enfermedad hiperplásica benigna la mayor parte de nuestra población en cultivo son epitelio folicular que expresa altos niveles de citokeratinas, junto con TTF1, PAX8, y Tiroglobulina²⁴⁸, y no pensábamos que pudieran co-expresar SOX2. Para comprobar que la expresión de ARNm de *SOX2* se corresponde con proteína del peso correcto se recolectaron extractos de proteína total de varias muestras de cultivos celulares (en pases tempranos) de tiroides humano (T-NT) y de bocios multinodulares (T-MNG). Cuando se analizaron por *Western-Blot* se observó un aumento de expresión de la proteína SOX2 en cultivos de bocios multinodulares, comparados con cultivos de tiroides normal (Figura 36).

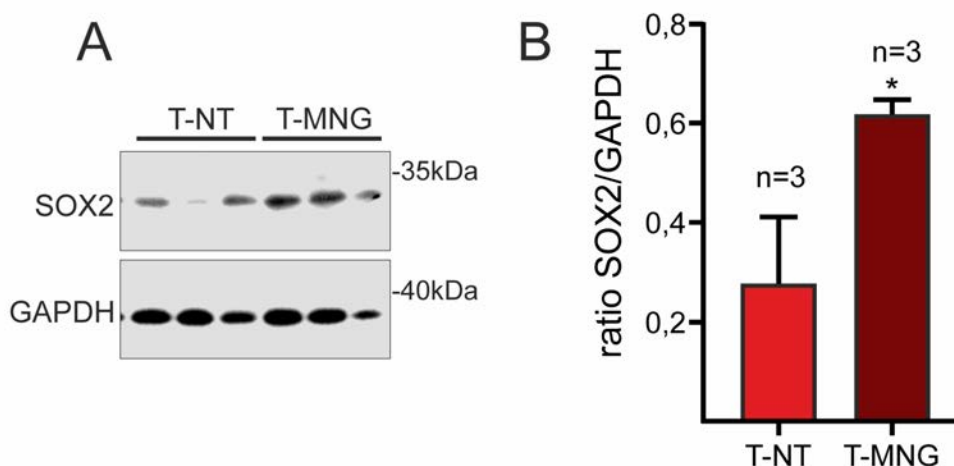


Figura 36. La proteína SOX2 se expresa en cultivos primarios de tiroides humano, y está aumentada en cultivos de hiperplasia. A) Western blot para SOX2 en extractos de cultivos de tiroides normal (T-NT) y de bocio multinodular (T-MNG). La membrana fue rehibridada para la proteína GAPDH, considerada el control de carga. B) Cuantificación del western. En la gráfica se representa la media±el error estándar de la intensidad de las bandas con un tamaño muestral (n=3). Se utiliza un test de Mann-Whitney bilateral; * $p \leq 0,05$.

En las tiroides de ratón, no había ninguna célula doble positiva para SOX2 y marcadores de tiroides. Este aumento de proteína total en extractos proteicos de cultivos sugería que habría más células SOX2+ en los cultivos hiperplásicos que en los de tiroides normal.

Nuestro siguiente paso fue realizar una doble inmunofluorescencia para SOX2 y TTF1 en un cultivo de tiroides normal (T-NT19, pase 5) y en paralelo realizar una transfección transitoria de un plásmido en el que la expresión de GFP está dirigida bajo el promotor de SOX2 humano. Este plásmido se co-transfectó con un plásmido de expresión de proteína roja Fp650 bajo un promotor fuerte de expresión general, CMV. La transfección se fotografió con las células vivas, en microscopía óptica fluorescente y de contraste de fases (Figura 37A).

T-NT19p9

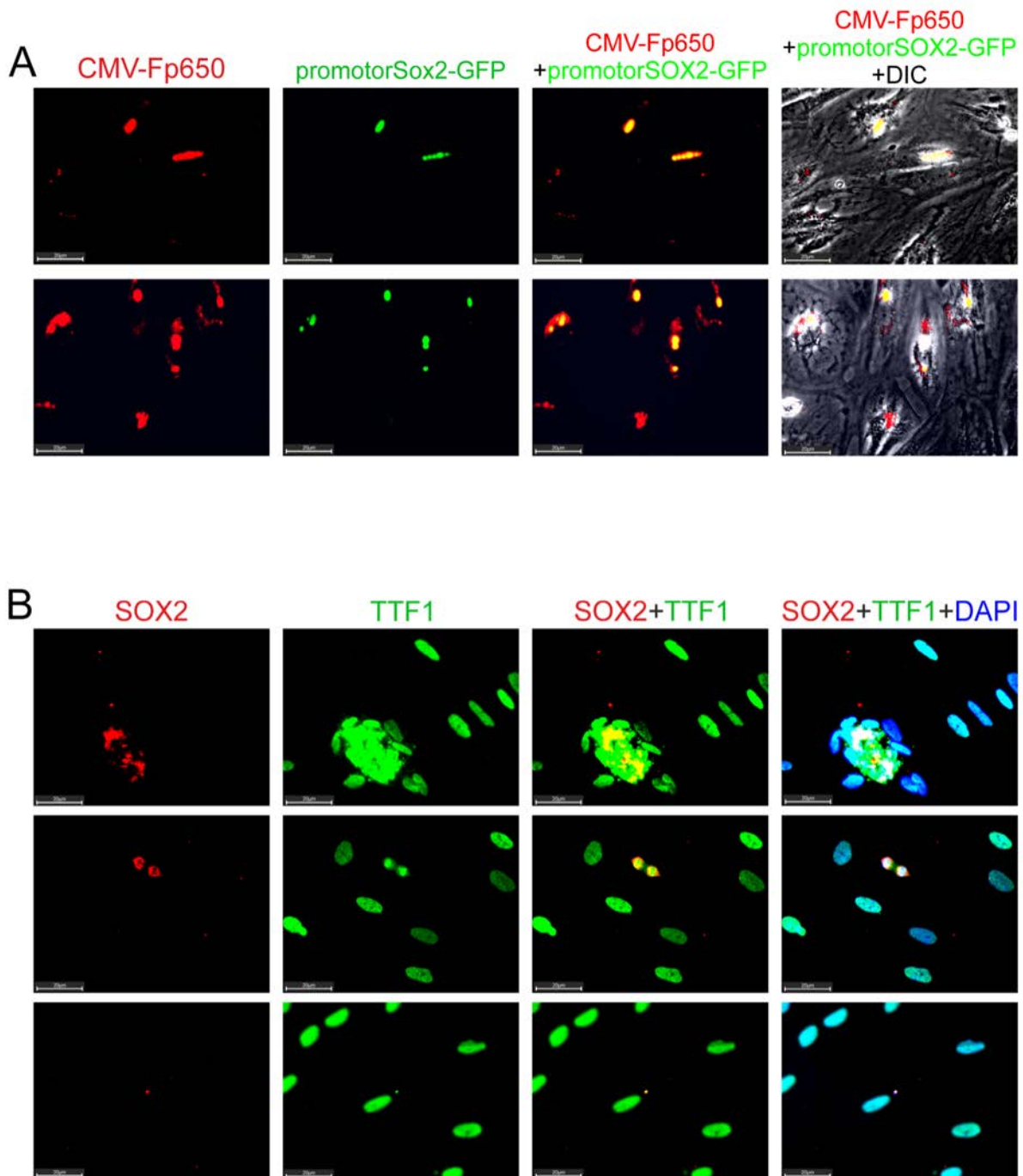


Figura 37. Expresión de SOX2 en un cultivo primario de tejido de tiroides normal humano. A) Transfección transitoria del plásmido en el que la expresión de GFP se dirige bajo el promotor de SOX2, co-transfectado a su vez con un plásmido que expresa la proteína roja Fp650 bajo control del promotor fuerte CMV. B) Expresión de SOX2 y TTF1 en I mediante inmunofluorescencia.

Como podemos observar, sólo algunas células muy pequeñas en el cultivo primario expresan GFP, mientras que la proteína roja se expresa también en algunos tirocitos mucho más grandes. En los pocillos en donde se tiñó en paralelo para SOX2 y TTF1 con doble inmunofluorescencia, se pudo observar que todas las células expresan TTF1, pero muy pocas células muy pequeñas son positivas para SOX2/TTF1, indicando el DAPI que sí eran núcleos, aunque pequeños (Figura 37B).

Nuestro siguiente paso fue cuantificar esta población SOX2 en 5 cultivos consecutivos obtenidos de tiroides normal (T-NT) y otros 6 de bocio multinodular (T-MNG, 5 pacientes).

Tabla 24. Características generales de cada tipo de cultivo primario utilizado para la cuantificación de células SOX2 positivas. Se incluyen, además, datos como el sexo y la edad de cada paciente que se le extrajo parte de la glándula

Nombre	Sexo (M=Mujer; H=Hombre)	Edad (años)	Diagnóstico Patología	Otra patología en la glándula
T-NT71 p4	M	75	Tiroides Normal	Tiroiditis linfocítica Carcinoma papilar
T-NT72 p4	M	51	Tiroides Normal	Tiroiditis linfocítica Carcinoma papilar
T-NT73 p4	H	45	Adenoma Folicular	
T-NT74 p4	H	33	Tiroides Normal	Carcinoma papilar
T-NT75 p4	M	60		Tiroiditis linfocítica Carcinoma papilar
T-MNG227 p4	M	49	Bocio Multinodular	
T-MNG231 p4	M	63	Bocio Multinodular	
T-MNG232 p4			Bocio Multinodular	
T-MNG234 p4	H	75	Bocio Multinodular	Carcinoma papilar
T-MNG236 p4	M	56	Bocio Multinodular	Tiroiditis de Hashimoto
T-MNG239 p4	M	49	Bocio Multinodular	Tiroiditis linfocítica

Como no podíamos purificar la población por sorter al no tener un marcador de superficie, las células crecían sobre cubre-objetos que se fijaron y tiñeron contra la proteína SOX2 y TTF1 junto con DAPI que nos revelaba los núcleos (Figura 38).

Se tomaron fotos de campos aleatorios para cuantificar las células totales y las positivas para dicha proteína, estableciendo así un porcentaje de células SOX2 positivas respecto al total en cada cultivo. En general, se observó a simple vista que había más células SOX2 positivas en cultivos celulares T-MNG comparados con T-NT (Figura 38).

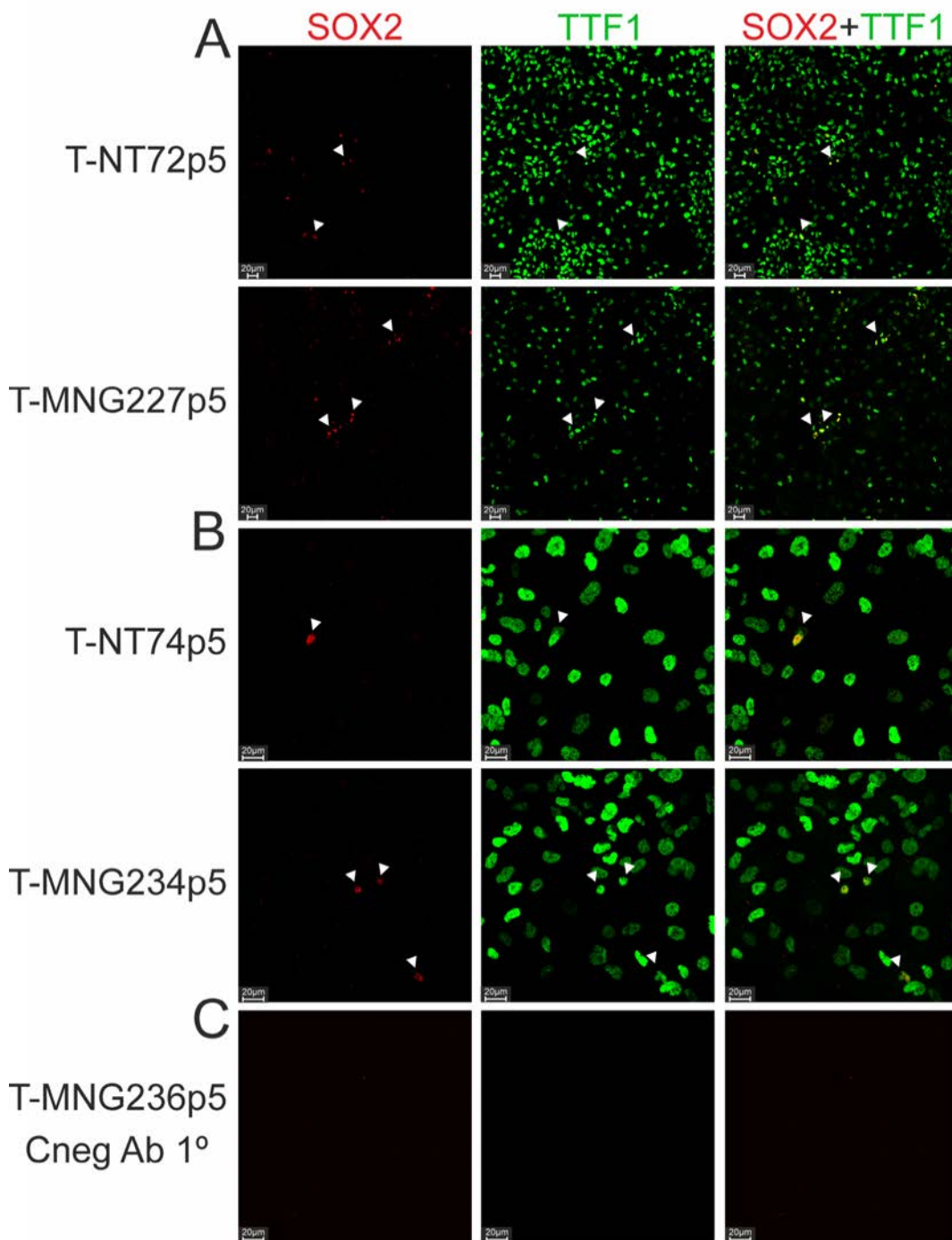


Figura 38. Detección de la población SOX2/TTF1 en cultivos primarios de tiroides humano. Campos representativas del marcaje con el anticuerpo de SOX2 (rojo) y TTF-1 (verde) junto con DAPI (núcleos) y el contraste de fases (DIC) en microscopía confocal. A) y B) Se muestra cultivos normales (T-NT72 y T-NT74) y los de bocio multinodular (T-MNG234 y T-MNG236), ambos en el mismo pase 5 pero a diferente magnificación. C) Omitiendo los anticuerpos primarios no se obtiene señal (Cneg).

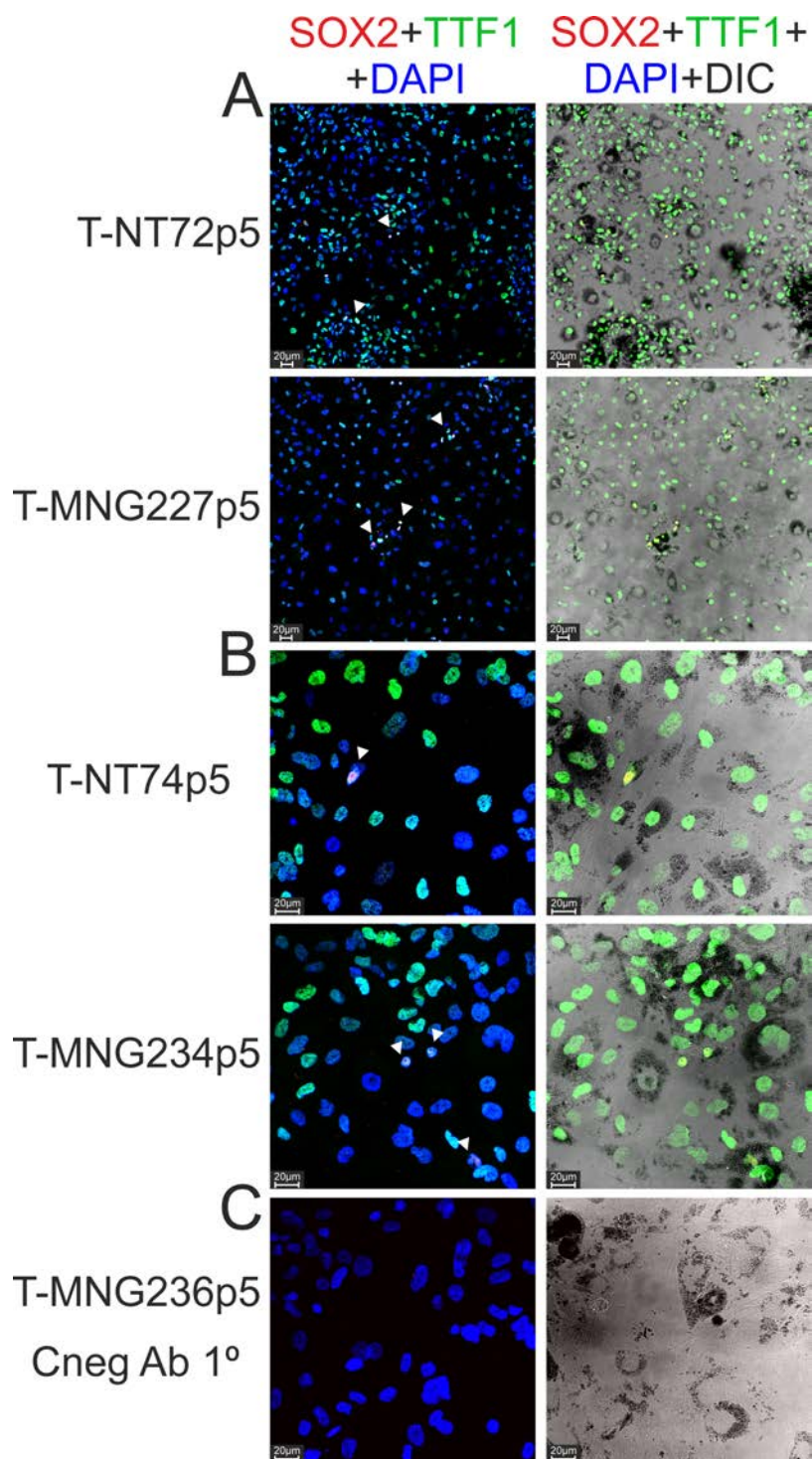


Figura 38 (parte 2)

Cuando cuantificamos el número de células SOX2, observamos que había una diferencia significativa de más de tres veces en T-MNG comparados con T-NT (Figura 39).

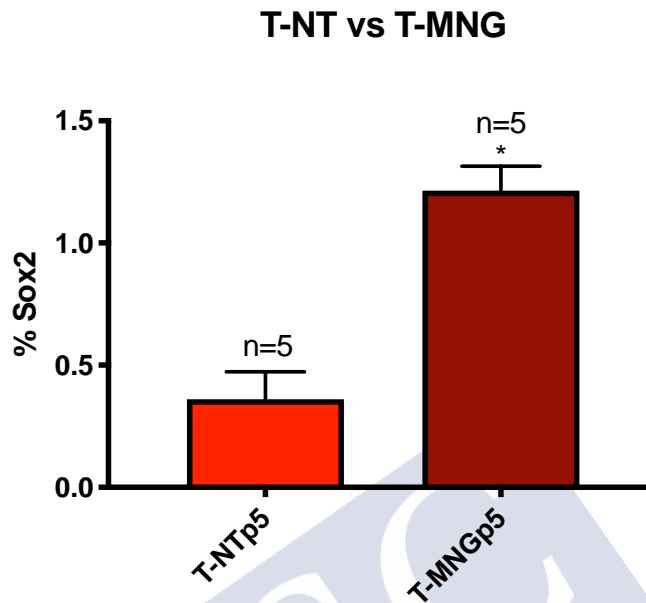


Figura 39. Representación gráfica del porcentaje de células SOX2 positivas respecto al total en cultivos humanos de tiroides normal (T-NT) y bocio multinodular (T-MNG). Todos los contajes se realizaron en el pase 5 para disminuir variables y se utilizaron 5-6 muestras de 5 pacientes diferentes para cada grupo. En la gráfica se representa la media±el error estándar con un tamaño muestral (n=5, 6 cultivos en T-MNG). Se utiliza un test de Mann-Whitney bilateral; *p≤0,05.

DISCUSIÓN

Más de 60 años de investigaciones en el sistema de formación de nuevas células sanguíneas han dado como resultado un claro consenso en cómo se desarrollan estas nuevas células, las vías utilizadas para la formación de las mismas y cómo las HSCs son capaces, al mismo tiempo, de autorrenovarse para mantener este *pool* de ASCs^{293,294,295}. Así surgió el modelo jerárquico utilizado para describir la formación de las diferentes líneas sanguíneas que componen la sangre. En este modelo, la división de las HSCs será siempre asimétrica, dando como resultado una célula precursora de los diferentes tipos sanguíneos y una HSC exactamente igual a la célula progenitora; de esta manera el número de HSCs se mantiene constante al mismo tiempo que se generan nuevas células sanguíneas. La migración hacia los diferentes progenitores en este modelo jerárquico siempre es unidireccional: la célula hija pierde progresivamente su capacidad pluripotente e irá tomando decisiones consecutivas que determinarán el tipo de célula sanguínea que se va a formar (Imagen 10 izquierda).

Investigaciones posteriores tomaron este modelo como referencia (mismos marcadores, mismas vías de señalización o misma manera de generar células diferenciadas) para así poder descubrir nuevos tipos de ASCs en otros tejidos. Pronto se dieron cuenta que el sistema de formación de nuevas células de la sangre poco tiene que ver con la fisiología de otros tejidos, ya que el ambiente del sistema hematopoyético es líquido, mientras que en la mayoría de los órganos son sólidos. Además, la tasa de recambio celular difiere mucho entre tejidos: en la mayoría de ellos como próstata, hígado o pulmón, el recambio celular en condiciones fisiológicas es muy pequeño; en cambio, en otros como la epidermis, testículo o epitelio del tracto intestinal tienen un recambio celular muy alto. Con todos estos datos se empezó a creer en la posibilidad de que cada órgano adulto varíe en el número, localización, marcadores expresados o vías de señalización implicadas en sus ASCs.

A parte de las diferencias en cuanto a la consistencia del tejido en el que se alojan o a la tasa de recambio celular, con el avance en el estudio de las ASCs se observó que el modelo jerárquico establecido para las HSCs no era válido para otros nichos de células madre. Con las mejoras de microscopía *in vivo*, se lograron marcar células madre de la epidermis para así estudiar su comportamiento a lo largo del tiempo. Los datos observados muestran que estas células tienen un 50% de probabilidad de dividirse simétricamente para generar 2 nuevas ASCs o, por el contrario, dividirse directamente para formar dos células adultas propias del tejido en cuestión²⁹⁶. En base a este y a otros muchos estudios que surgieron en paralelo, surgió la necesidad de establecer otro modelo de mantenimiento y diferenciación de las ASCs que no fuera el actual modelo jerárquico. Así, el modelo estocástico explica el comportamiento de ASCs en muchos tejidos sólidos ya que plantea que una célula madre adulta puede dividirse simétricamente para dar lugar a dos ASCs, dividirse de manera asimétrica para dar lugar a una ASC y a otra célula diferenciada o incluso que la propia ASC de lugar a dos células diferenciadas (Imagen 10 derecha). Este modelo también plantea que algunas células diferenciadas del tejido adulto tengan la capacidad, en caso de daño o patología en dicho tejido, de perder su fenotipo diferenciado para convertirse en ASC.

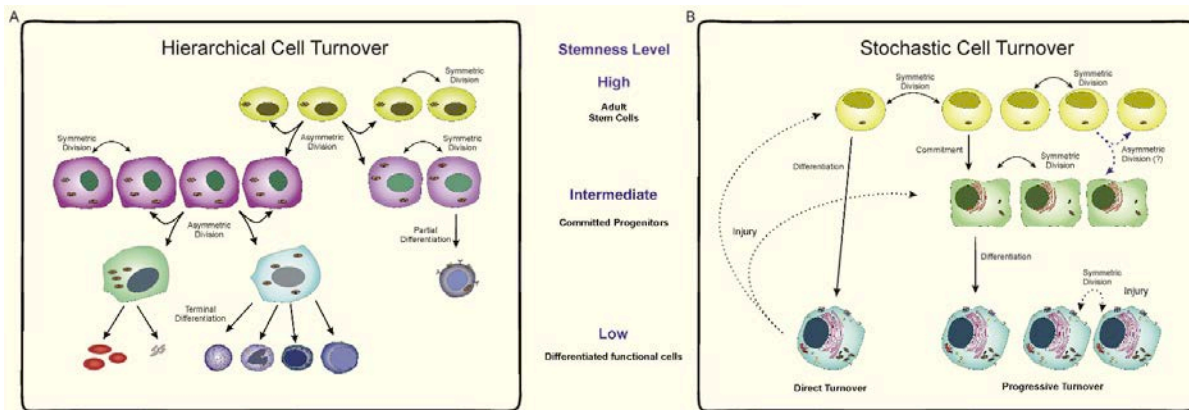


Imagen 6. Modelo jerárquico y estocástico utilizados para explicar la autorrenovación y diferenciación de los diferentes tipos de ASCs (Álvarez et al., 2017¹⁶²). No se necesitan permisos de Copyright debido a que el autor de esta figura es el firmante de la tesis y EIServier® cede dichos permisos.

Células madre postnatales de la tiroides: siempre propuestas, nunca definidas ni probadas

Han sido muchos los estudios que han intentado aislar y caracterizar poblaciones de células madre adultas (ASCs) en tiroides de ratones, aunque la mayoría de ellos sólo arrojan resultados muy preliminares o poco precisos y concluyentes.

Ozaki *et al* hicieron experimentos con tiroidectomía parcial de ambos lóbulos basados en los experimentos clásicos de hepatectomía y regeneración, inyectando BrdU en los animales. Los animales tiroidectomizados presentaban marcaje con BrdU, y la presencia de unas células “claras (o de citoplasma claro)” –que ellos distinguían –aunque es difícil la interpretación con el control- de las células endocrinas o neuroendocrinas cargadas de gránulos-. Estas células eran negativas para Calcitonina o marcadores de epitelio folicular, pero positivas para FOXA2. También sugieren que la Citokeratina 14 (pero no la Citokeratina 19) pueda ser un marcador de las poblaciones stem (mesenquimales y epiteliales) participantes en la regeneración¹⁹⁹.

Hoshi *et. al* fue de los primeros en hablar de poblaciones de células madre adultas en tiroides de ratones al aislar una pequeña población a la que llamó SP (*Side Population*) para diferenciarla de la población diferenciada o MP (*Main Cell Population*). La principal característica de las células SP es su capacidad para bombear hacia fuera de la membrana plasmática el colorante *Hoechst 33242* gracias a la expresión de ABCG2, como ya se describieron previamente en las HSCs. El análisis posterior de las células SP en tiroides divide esta población en dos, atendiendo a 3 marcadores: una población era CD45⁻/c-KIT⁻/Sca1⁺ y la otra CD45⁻/c-KIT⁻/Sca1⁻. El análisis de genes expresados mostró que ambas poblaciones SP eran positivas para algunos marcadores de *stem cell* como OCT4 o nucleostemina. La población MP expresaba los marcadores típicos de fenotipo tiroideo (NIS, TPO, Tg...) pero no expresaba los de célula madre²⁰⁴. Estos datos podrían arrojar unos primeros enfoques a la investigación en célula madre tiroidea, pero no serían concluyentes ya que faltan muchos datos complementarios como análisis proteicos o estudiar el comportamiento y la diferenciación de estas células en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas. El mismo año, Mitsutake *et. al* lograron aislar también una población SP en líneas celulares humanas de cáncer de tiroides. Sin embargo, el estudio demostró que las poblaciones SP y no SP compartían las mismas propiedades tumorigénicas en ratones desnudos²⁹⁷.

El grupo de Derwahl's *et. al* usó secciones de tejido de tiroides humano con bocio para demostrar la existencia de una población OCT4⁺/GATA4⁺/HNF4α⁺ que no expresaba marcadores de fenotipo tiroideo, mientras que las células OCT4⁺/GATA4⁺/HNF4α⁺ sí eran positivas para Tg y TPO²⁰⁴. Un año después, el mismo grupo aisló estas mismas células SP mediante *sorting* y las cultivó con EGF y bFGF aumentando el porcentaje de células SP del 0,1% al 5% y la consecuente formación de “tirosferas”. Cuando añadían suero y TSH, las células comenzaban a expresar marcadores de fenotipo tiroideo⁹⁶. Como en estudios anteriores, se echan de menos trabajos más completos con una caracterización más exhaustiva de las células y con estudios más enfocados a su capacidad para responder a situaciones patológicas, lo que respaldaría mucho más estos resultados.

Fierabracci *et. al* en 2008 aisló “células madre tiroideas” a partir de diferentes líneas celulares humanas de tiroides normales, adenomas y enfermedad de Graves (con un total de 23 muestras). Concretamente, obtuvieron tirosferas usando un “medio de esferoides” suplementado con EFG y bFGF. La caracterización molecular e histoquímica de todas las líneas mostró una pequeña población CD45⁺/CD34⁻; algunas de ellas expresaban Tg y TPO, ausencia de Tshr y NIS y una sobreexpresión de Nestina, Oct4 y Nanog. lo que más destacan los autores del estudio es que dichas células, bajo condiciones apropiadas de cultivo, eran capaz de diferenciarse a células neuronales y con fenotipo adipogénico sugiriendo precursores mesenquimales o una mezcla de poblaciones¹⁹⁸.

Gracias a los estudios de la fisiología de la glándula, se sabe que la tiroides tiene una capacidad de recambio de su epitelio folicular muy bajo en condiciones normales, ya que la glándula se renueva totalmente durante la vida de un individuo unas 4-5 veces²⁹⁸. Todos estos datos condujeron a Dummont *et. al* a hipotetizar por primera la posibilidad de la existencia de una población residente de células madre en la tiroides con capacidad de autorrenovación. Según estos datos, el número de células madre en el órgano debía ser aproximadamente 1:1000, es decir 0,1%. Nuestros datos, donde encontramos 0,2-0.3% en ratones hembra adultos y puberales avalan esta teoría.

Una de las características más importantes de las ASCs para ser consideradas como tal es su capacidad de regenerar el tejido al que pertenecen. En base a esto, muchos han sido los investigadores que han tratado de describirlas utilizando modelos que producen daño a la glándula tanto químico como mecánico.

Uno de los trabajos más interesantes sobre la regeneración de la tiroides después de daño agudo fue el de Okamoto *et. al* en el que utilizaron un modelo de ratón transgénico con el reportero β-gal asociado al promotor de TPO, el marcaje con SCA1 asociando a ambos el test de retención de BrdU. A estos ratones se les realizaba una tiroidectomía parcial en ambos lóbulos al mismo tiempo que durante los siguientes días se les inyectaba BrdU y se les seguía por los siguientes 120 días. Inmediatamente después de la tiroidectomía encontraron células SCA1⁺/BrdU⁺ en las áreas no foliculares del tejido, que eran por supuesto negativas para β-gal. El análisis inmunohistoquímico presentó que estas células eran negativas para OCT4 y GATA4; también eran negativas para CD34 (endotelio positivo) o CD133 (considerado como marcador de HSC). Sin embargo, dicen que presentaban cierta positividad para Citokeratina 14 (difícil de interpretar por las figuras presentadas) por lo que según ellos eran epiteliales. Estas células fueron encontradas a los 35, 75 y 120 días después de la operación ya integradas en los folículos tiroideos. A los 35 días después de la tiroidectomía, estas células dobles positivas fueron encontradas en los folículos en reparación con células *de novo* “ciliadas en polo apical” según ellos BrdU⁺/Sca1⁺/TTF1⁻ además, eran β-gal negativas, lo que indica que no se habían formados a partir de folículos tiroideos anteriores. Cuatro meses después de la operación se encontraron células Sca1⁺/BrdU⁺/TTF1⁺ que eran β-gal positivas, indicando que estas células

que antes no tenían fenotipo tiroideo ahora están integradas en folículos y expresan la proteína TPO²⁹⁹. La limitación de este trabajo era la imposibilidad de definir el origen de las células Sca1⁺, postulando que podrían ser bien residentes de la propia glándula o bien células infiltradas procedentes de la médula ósea (HSCs), aunque esto lo descartaban por ser CD133 negativas. Por otra parte, el hecho de hablar de cilios para hablar de diferenciación del epitelio folicular, confunde bastante ya que el epitelio tiene microvellosidades y no cilios. Al no teñir específicamente para cilios o microvellosidades, hace dudar del resultado. Los cilios se teñían muy intensamente para Sca1.

Se cree que el SCN (*Solid Cell Nest*) es un remanente del UBB (*Ultimobranchial Body*) y que ha sido descrito como todavía presente en tiroides de bebés³⁰⁰. Esta estructura, el UBB, es importante ya que origina las células C durante la embriogénesis. En los últimos años, se ha demostrado que el SCN tiene células p63⁺ se propuso que podría contribuir a la histogénesis de las células C y los folículos tiroideos en la embriogénesis y también a participar en la reparación de daños en el tejido^{301,282}. Estudios del desarrollo embrionario de la tiroides en ratones KO para TTF1, para p63 o para ambos demostraron que sin TTF1 no hay tiroides, pero sin p63 sí que lo hay. Además, sin p63 sigue habiendo UBB, pero si además no hay TTF1 el UBB se convierte en una estructura cística con células que ellos llaman “inmaduras” y con cilios. Proponen que estas células son las que aparecen en el remanente SCN. El estudio postula que podrían ser diferentes de las poblaciones que reparan el tejido tiroideo descritas más arriba y que estas células también podrían contribuir a la regeneración del tejido cuando sufre daño³⁰². Uno de los mayores problemas de este trabajo es que las células inmaduras descritas no poseían OCT4 ni ningún marcador de célula madre conocido.

En resumen, de esta perspectiva histórica, se ha propuesto como hipótesis atractiva que si hubiera células ASC en la tiroides que contribuyesen lentamente al recambio del epitelio folicular y que no fuesen más que un 0,1% del contenido total celular de la glándula adulta. Se ha propuesto que células SCA1⁺/TTF1⁻/KRT14⁺, o células OCT4⁺/GATA4⁺ o células p63⁺ serían ASC de la tiroides. Pero en ningún caso se ha demostrado que esa población contundentemente contribuya al recambio folicular ni contengan todas las características esperadas de una población ASC. En nuestro trabajo, demostramos que la población de células SOX2⁺/CK⁺/β-Catenin⁺ ya pertenecían a la glándula en condiciones fisiológicas y, además, expresaban a niveles muy bajos de alguna proteína de fenotipo tiroideo como TTF1, e incluso un sub-población expresaba p63 (SOX2⁺/CK⁺/β-Catenin⁺/TTF1_{low}/p63±) Además, fuimos capaces de rastrearlas con GFP y demostrar su diferenciación a células TTF1_{high}/NIS⁺/Tg⁺, no sólo en un modelo de regeneración, sino también en un modelo de crecimiento fisiológico.

Marcadores, factores de transcripción y vías esenciales de diferenciación: aprendiendo de las Células Madre Pluripotentes (iPS) y Embrionarias (ESC)

En las últimas décadas han sido muchos los intentos de caracterizar y aislar *stem cells* en la glándula tiroides, sobre todo para utilizarlas como fuente de terapia en el hipotiroidismo congénito siendo tan frecuente (1:2000 niños nacidos)³⁰³.

Algunos investigadores se centraron en el uso de células madre embrionarias (ESCs) procedentes de blastocistos de ratones para generar tirocitos maduros mediante su cultivo con diferentes compuestos. Cuando a estas ESCs se les añadía TSH, estas comenzaban a expresar genes expresados específicamente en tirocitos maduros tales como NIS, Tg o TPO. A pesar de los buenos resultados en estos primeros experimentos, el número de “tirocitos” formados no era suficiente para continuar los estudios. Más adelante, el mismo grupo de investigación creó una línea de ratón TSHR-GFP en el que la expresión del receptor de TSH se asociaba a la

expresión del reportero GFP. Para la obtención de tirocitos maduros en este caso utilizaron, además de TSH, otros compuestos como la Activina-A, insulina o moléculas del tipo IGFs. Los resultados demostraron que estas células comenzaban a expresar marcadores de fenotipo tiroideo (PAX8, NIS, TSHR...). Mientras que este último cóctel añadido al medio hacía aumentar el número de tirocitos generados, estos no eran capaces de mantener dicho fenotipo durante más de 12 días (momento en el cual perdían todos estos marcadores)³⁰⁴.

Ma *et. al* fue el primero en usar Activina-A para obtener folículos tiroideos a partir de ESCs humanas. Así, vieron que se reducía la expresión de marcadores de célula madre como OCT-4 y aumentaban otros de endodermo como GATA-4. Además, a partir del quinto día estas células comenzaban a expresar NIS y TSHR. Lo más llamativo de estos experimentos es que conseguían mantener dicho fenotipo hasta el día 21 aproximadamente (independientemente de la adición de TSH o insulina en el medio)³⁰⁵. Todos estos datos sugerían que TSH parece esencial para las primeras etapas de diferenciación de las ESCs a tirocito, pero no se requeriría para el mantenimiento de estas células una vez se hayan diferenciado. Las limitaciones de todos estos estudios con ESCs fueron principalmente la falta de una aplicación funcional a enfermedades relacionadas con la glándula: el número tan extremadamente reducido de tirocitos formados hacía imposible la implantación de hipotéticas terapias que ayuden a luchar contra las enfermedades tiroideas.

Antonica *et. al*, con el grupo de S Costagliola en Bruselas, resolvió este problema diseñando un protocolo en el que sobreexpresaba de manera transitoria factores de transcripción como TTF1 y Pax8 en las ESCs para inducir una primera diferenciación. Cuando estas células exhibían estructuras parecidas a folículos tiroideos (sin llegar a diferenciarse) añadían TSH al medio para terminar de formar tirocitos maduros. Mediante esta técnica los investigadores consiguieron inducir diferenciación hasta en el 60% de las ESCs. lo más llamativo de estos trabajos es que más adelante fueron capaces de injertar estas células en la cápsula renal de ratones hipotiroideos y que estos recuperasen la deficiencia de hormona³⁰⁶.

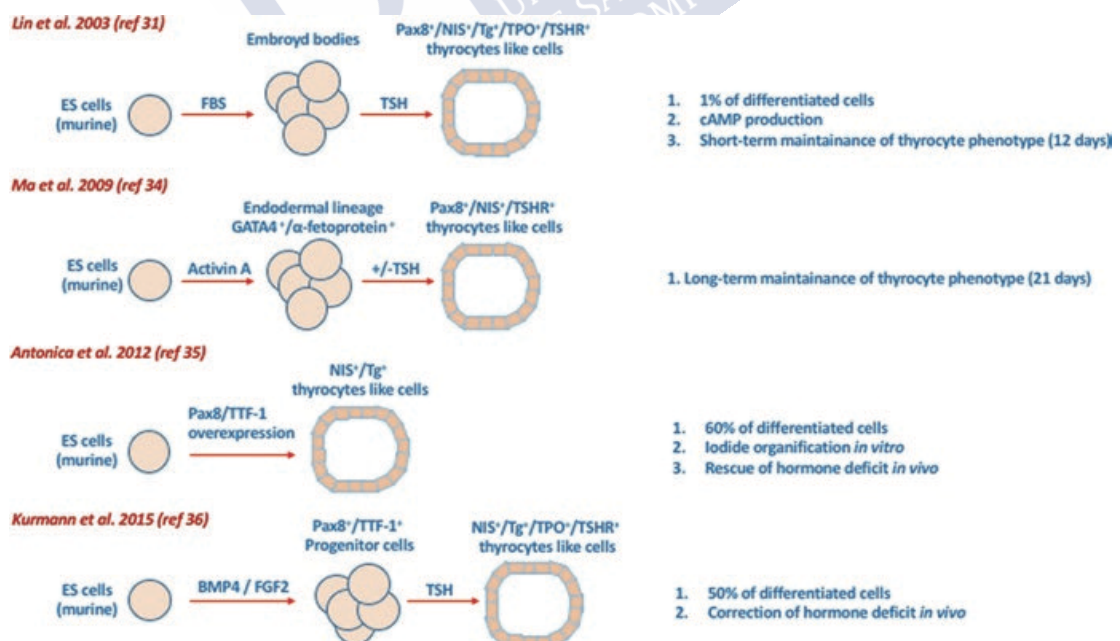


Imagen 11. Representación esquemática de los trabajos realizados por diferentes grupos de investigación para demostrar la presencia de células madre en tiroides. Reproducido de So *et al.*, 2017¹⁴⁴. Copyright 2020 Springer Nature.

Un siguiente trabajo importante vino del grupo de A. Hollenberg y D. Kotton en Boston. En su caso, consiguieron derivar tiroides a partir de iPS con un tratamiento de BMP4 y FGF2³⁰⁷. Esta combinación inducía la expresión de TTF1 y posteriormente la de PAX8. Las células doble positivas se convertían en epitelio folicular funcional in vitro y también inyectadas in vivo. Es más, se demuestra en este artículo que la haploinsuficiencia de TTF1 (un alelo eliminado) afecta profundamente a la eficiencia de la diferenciación. Más recientemente, el mismo grupo mejoró el protocolo de las ESCs demostrando que con una pequeña expresión transitoria exógena de TTF1, en células negativas para FOXA2, es suficiente para inducir diferenciación a tiroides permanente³⁰⁸. FOXA2 es una proteína necesaria para iniciar la especificación de endodermo, pero debe reprimirse en la especificación de tiroides²⁷⁹.

En relación con nuestros datos, lo que estos trabajos demuestran es que la expresión de TTF1 es esencial en la diferenciación a epitelio folicular. Sin embargo, este factor es común para el epitelio respiratorio y para el epitelio folicular tiroideo. De hecho, en la diferenciación de estas iPS lo que reduce la eficiencia es que parte de las células que comienzan a expresar TTF1 son precursores pulmonares y la otra parte tiroideos. Un trabajo reciente, ha conseguido resolver las vías específicas de diferenciación del endodermo derivado de iPS tras tratamiento con Activina seguido e Noggin+SB31542³⁰⁹. Si ese endodermo inicial se trata con Wnt3a y expresará TTF1 y se derivará a epitelio pulmonar. Si ese endodermo inicial TTF1+ se trata con BMP4 y FGF2 BMP4, sin necesidad de TSH, se derivará a un epitelio que empezará a expresar PAX8 y se convertirá en epitelio tiroideo. El papel de HHEX y FOXE1 sería todavía más amplio puesto que se expresa ya en todo el endodermo faríngeo desde su inicio³¹⁰.

Estudios previos, ya habían demostrado que Fgf2 y Bmp4, sin necesidad de TSH, consiguen diferenciar explantes de endodermo anterior (*foregut*) en células expresando fenotipo tiroideo³¹¹.

Nuestra población es claramente ya epitelial (expresa Citokeratinas, E-Cadherina y beta-catenina) y expresa específicamente muy bajas cantidades de TTF1. No hemos encontrado a pesar de buscarlo con detalle que expresen PAX8, ni siquiera a bajas cantidades. Se sabe que TTF1 tiene dos papeles durante la diferenciación embrionaria, uno muy temprano induciendo especificación en el primordio de endodermo anterior, y otro induciendo diferenciación a epitelio folicular (E-Cadherin, CK16) en los estadios terminales de la embriología de la tiroides³¹⁰. Los dos roles se diferencian por una diferente fosforilación de TTF1, cuya alteración con mutaciones puntuales sólo afecta al papel tardío y no al inicial. Juntando eso, y especulando con lo que se sabe de la diferenciación de iPS / ESC descrito arriba, podríamos pensar que nuestra población es una población ASC residuo de esta población final donde ya sólo queda que se induzca diferenciación. Futuros estudios con anticuerpos para TTF1 fosforilado serían necesarios para demostrar esta teoría, y sobre todo para saber si distinguen la población SOX2 activa (que podría tener TTF1 fosforilado) de la quiescente (su TTF1 no estaría fosforilado).

PAX8 sería la diferencia clave entre las células SOX2, a las que nosotros consideramos ASC / progenitoras, y el epitelio folicular. Se sabe que durante el desarrollo embrionario PAX8 es más tardío e induce supervivencia. Las mutaciones de PAX8 provocan hipotiroidismo franco, pero con glándula presente³¹². Entre los genes regulados por PAX8 se conoce a la Citokeratina 16, por lo que se le considera el factor de transcripción implicado en la foliculogénesis terminal^{313,314}. Futuros trabajos tendrán que estudiar si hay alguna población ya con bajo SOX2, donde suba TTF1 y ya haya PAX8 (SOX2_{low} / TTF1_{high} / PAX8+) que nosotros proponemos serían las progenitoras o transit-amplifying de la tiroides, derivadas de nuestra población SOX2+/TTF1_{low}/PAX8-negativas.

La población SOX2: ¿las células madre de la tiroides?

Nuestro modelo de ratón, además de las múltiples ventajas que plantea a la hora de seguir células SOX2 a lo largo del tiempo, también plantea algunos inconvenientes. Tuvimos muchos problemas para encontrar células dobles positivas SOX2/GFP cuando activábamos el modelo y sacrificábamos los animales el día después de la última dosis de TAM, es decir, cuando estudiábamos el modelo sin *tracing* en el tiempo. Al principio empezamos a pensar que probablemente el modelo tenía algún fallo o que directamente no era válido para nuestro tejido de interés (ya que vimos en otras publicaciones que en otros órganos funcionaba muy bien). Más adelante empezamos a encontrar alguna célula doble positiva, siendo todavía la mayoría positiva para SOX2 y negativa para GFP. Otra posibilidad era que el TAM no llegase de manera adecuada a la tiroides y no fuese capaz de inducir la recombinación del modelo en sus células, hecho que se descartó cuando obtuvimos los datos de diferenciación masiva en el modelo de hemitiroidectomía parcial y en los modelos de desarrollo. Una de las explicaciones probables que encontramos es que el propio promotor al que se le asociaba la producción de GFP cuando se producía la recombinación genética no se expresaba en esas células. En este y en otros muchos modelos de ratón similares se acopla la producción de la proteína señal (GFP o cualquier otra) a la expresión de “promotores fuertes”, es decir, genes que son ampliamente expresados por las células de la mayoría de los tejidos. Cuando estas células se activan, se dividen y se diferencian comienzan a expresar otro conjunto de proteínas, entre ellas la que corresponde al promotor fuerte asociado a la producción de GFP en nuestro modelo, lo que las hace detectables. En nuestro caso y con todos los datos obtenidos, parece ser que la mayoría de las células SOX2 permanecen en un estado quiescente en el que su ratio de recombinación para expresar EGFP es muy bajo, aunque no en proliferar puesto que tenemos diferencias en número de SOX2 en ratones normales con el hipotiroidismo. Quizás el gen expresado por ROSA26, un gen ARN sin función conocida, no es tan ubicuo o abundantemente expresado en tiroides. Una última explicación podría ser que la haploinsuficiencia de *Sox2* en las células madre de la tiroides haga que se activen de forma más lenta. Esta haploinsuficiencia se produce porque se aprovecha uno de los alelos del gen *Sox2* para introducir la Cre recombinasa, impidiendo que se exprese *ARNm* en ese alelo.

A pesar de todo, gracias nuestro modelo de seguimiento de células *in vivo*, pudimos estudiar el comportamiento de las células SOX2 positivas en la glándula tiroides.

El primer modelo que usamos era el de hipotiroidismo inducido mediante el anti-tiroideo PTU (hipotiroidismo químico). Las células SOX2 se activaban y su número se incrementaba, especialmente en la zona media-superior donde su número se doblaba. Con el marcaje de dichas células mediante EGFP, nos dimos cuenta de que esta pequeña población SOX2+ era capaz de formar células que se incorporaban al epitelio folicular, pero, al menos tras 12 días, sólo había una diferenciación lenta de estas células a epitelio folicular. El desarrollo de este trabajo tenía entonces tres posibilidades: que las células SOX2 tuvieran un papel diferente en la glándula, es decir, que no fueran ASCs de epitelio folicular sino de otra población; o que sólo tuvieran un papel menor en el “*cell turnover*” de la glándula; o que la acción de TPO fuera esencial para la diferenciación y al estar inhibido por PTU se alterase el correcto reclutamiento y diferenciación de las mismas. Esta última hipótesis la apoyarían otros estudios en los que se utilizaron ratones GMO en los que TPO perdía su funcionalidad debido a una mutación puntual en su secuencia genética (ya se habló de ellos en la introducción). Debido a que la falta de actividad de esta proteína esencial se producía desde el comienzo del desarrollo del individuo, se pueden apreciar mucho mejor las consecuencias de dicha pérdida en cuanto a la estructura de la glándula, ya que se traduce en un desarrollo muy pobre de los folículos y en una hiperplasia de las células

epiteliales, sobre todo en el modelo *Tee* (mutación puntual). Nos gustaría saber si este epitelio pudiera ser nuestra población SOX2 incapaz de diferenciarse.

Para solventar el problema metodológico de la reducida diferenciación en el hipotiroidismo inducido por PTU, decidimos utilizar otro modelo de hipotiroidismo en el que esta enzima no se dañase y el epitelio tiroideo fuera totalmente funcional. Tampoco queríamos utilizar un modelo de tiroidectomía donde los dos lóbulos estuviesen dañados, ya que algunas evidencias sugieren que la regeneración tras una herida es distinta al “*cell turnover*” basal o fisiológico³¹⁵. Así, en la reparación de un órgano herido pueden activarse muchos otros mecanismos independientes a la reparación de células madre. Nuestro modelo de hemitiroidectomía parcial no afecta en absoluto a la glándula ni estructuras (músculos, fascias, vasos, nervios) del lado contrario, manteniendo su vascularización e inervación. Pudimos comprobar que, efectivamente, las células Sox2 son capaces de incorporarse al epitelio folicular, producir y secretar Tiroglobulina y captar yodo por NIS en el polo basal, e incluso formar folículos completos. Nuestros datos también que la proliferación del epitelio folicular *per se* no sería un mecanismo que se ponga en marcha para compensar la función en la glándula y que se necesitarían otro tipo de células menos diferenciadas para restaurarla y recuperar así su plena capacidad funcional. Aquí jugarían un papel fundamental las células SOX2 alojadas en la tiroides y con expresión bajo de TTF1, que serían capaces de responder al daño tisular diferenciándose y adquiriendo funciones de epitelio folicular maduro. Ya hemos visto en el apartado anterior lo importante que es la expresión de TTF1 en los precursores de tiroides.

Como último modelo utilizamos el recambio fisiológico desde el nacimiento, con un *tracing* a largo plazo. Tras la inyección a día P1, muy pocas células expresaban GFP y todas ellas expresaban SOX2. Sin embargo, a día P90 una gran parte del epitelio folicular, más de un 70% de las células de la glándula era EGFP+. Esto sugiere que al menos la mayoría de la misma se genera gracias a la diferenciación de células SOX2 positivas (si bien sabemos que la inducción del modelo no se produce en el 100% de las células SOX2 y que, por tanto, este porcentaje podría ser incluso mayor).

Los experimentos *in vitro* confirmaron nuestros resultados *in vivo*. Las Tiroesferas que crecen en medio de ASC sin suero expresan SOX2 y no expresan Tg. Son capaces de recrecer, al menos en dos pases sembradas a altísima dilución. Por otra parte, también son capaces de diferenciarse a epitelio folicular en presencia de suero, hormonas y sobre todo TSH. La cantidad de esferas obtenidas coincide que el cálculo teórico de lo que obtendríamos a partir de nuestra población. Evidentemente, reconocemos las limitaciones de estos experimentos puesto que no hemos podido purificar la población ni por *sorter*, ni por afinidad ya que no teníamos ningún marcador de superficie.

Por último, recordar aquí que, aunque los cánceres de tiroides (no-medulares) se consideran derivados del epitelio folicular diferenciado, el hecho de reconocer la existencia de una población ASC fisiológica implicada en *cell turnover* puede alterar este concepto, ya que pudiera especularse que el cáncer se originaría en una alteración de este propio proceso bien durante el reclutamiento, la amplificación o la diferenciación. Además, el carcinoma anaplásico de tiroides, también llamado indiferenciado, que no presenta diferenciación o fenotipo de epitelio folicular, es considerado por una parte como una aberración derivada de la pérdida completa de fenotipo a partir de una célula diferenciada, pero por otra como un derivado de una hipotética ASC de la tiroides³¹⁶. Ninguna de las dos hipótesis ha sido completamente aceptada o descartada todavía, y ni siquiera estudios genéticos masivos recientes, en los que nuestro grupo ha participado, consiguen aclarar la situación³¹⁷. En este estudio se demuestra que, si el ATC deriva de un PTC inicial, que a su vez derivase de una célula de epitelio folicular, la divergencia es muy al principio puesto que comparten muy pocas variaciones genéticas en el

mismo paciente. Esto llevaría el péndulo a la hipótesis de la célula madre. Sin embargo, datos de nuestro propio grupo con RNAseq en cultivos y tejidos de pacientes con ATC frente a su tejido benigno demuestra que SOX9 es alto en todos los tipos de muestra mientras que SOX2 prácticamente es indetectable en ninguna (Tesis M. Chenlo de nuestro grupo. Comunicación personal). Esto llevaría de nuevo el péndulo a la pérdida de diferenciación completa a partir de una célula e epitelio folicular que expresa SOX9 (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000125398-SOX9/tissue/thyroid+gland>).

La población SOX2 y la mitad superior de la glándula tiroides

Uno de los datos destacados de nuestro estudio es la demostración de que la población SOX2 se acumula en la mitad superior de la glándula, y más concretamente en el quinto inmediatamente debajo del extremo superior. En humanos, hay una marca anatómica conocida como el Tubérculo de Zuckerland, que es el punto de fusión en la época embrionaria entre el *anlage* o primordio tiroideo lateral con el *anlage* o primordio central derivado del epitelio endodérmico del suelo de la faringe. El primordio lateral es de dónde vendrían las Células C, puesto que derivaría de la 4^a-5^a bolsas faríngeas de células de la cresta neural. Pues bien, ese Tubérculo de Zuckerland conocida marca anatómica en cirugía del cuello por sus relaciones con el nervio laríngeo recurrente³¹⁸. Sería como un residuo del UBB pero en humanos, a la altura del tercio medio y el tercio superior del lóbulo. Se considera el punto donde una mayor densidad de células C se almacenan, y es clave sacarlo en cirugía medular de tiroides³¹⁹. Sin embargo, como podemos observar por las tinciones con Calcitonina, nuestra región con muchas células SOX2 es superior a esta región en el ratón. Y sería, por tanto, en la parte superior del lóbulo.

Tampoco nuestra zona enriquecida en población SOX2 es la zona del istmo que ha sido propuesta como el punto de la tiroides donde los cánceres se diseminan metastásicamente a ganglios con mayor frecuencia, y además a ambos lados³²⁰. El istmo es inferior y nuestra zona es superior.

Pensando en el desarrollo embrionario de la glándula y de su primordio central que acaba bilobulado, separado de la faringe y diferenciándose a epitelio folicular³¹⁰, podríamos pensar que el último reducto de crecimiento sería el extremo final de cada lóbulo que, realmente, podría ser el medio-superior en la posición anatómica final.

La población SOX2, el sexo femenino y los cultivos primarios humanos.

Uno de los resultados más interesantes que tenemos es la diferencia cuantitativa y significativa entre la expresión del ARNm y de la proteína de SOX2 dependiente del sexo. Aunque no hemos cuantificado, interpretamos estas diferencias como una menor cantidad de células SOX2 en los machos. Esto lo basamos en que solamente hemos detectado expresión de SOX2 en nuestra población celular, tanto tiñendo secciones de tiroides de machos como de hembras.

El hecho de que haya una diferencia de sexo en la población SOX2 coincide con todo lo conocido de patología proliferativa de tiroides en humanos. Y abre un campo a las especulaciones e hipótesis futuras sobre la implicación de nuestra población en fisiopatología de la glándula tiroides. Las mujeres tienen una incidencia de bocio multinodular 13 veces mayor que los hombres, los nódulos mantienen una proporción 5 a 1 entre mujeres y hombres, y esta

incidencia sigue siendo superior para los carcinomas de tiroides, aunque la proporción mujer: hombre baja a alrededor de 3:1 aproximadamente^{321,322}. La disparidad no sólo afecta a las enfermedades hiperplásicas o tumorales sino también a la autoinmunidad, siendo la enfermedad de Hashimoto mucho más diagnosticada en mujeres. A su vez, ya se ha estudiado que esto puede tener un impacto en cáncer, con efectos dispares, por un lado, contribuyendo a la mayor incidencia de cáncer, pero por otro se discute si pudiera contribuir a un mejor pronóstico del mismo por la vigilancia inmune.

Hasta el momento, esta disparidad de género en las enfermedades hiperplásicas se ha interpretado como efecto de varios factores. Por un lado, una mayor vigilancia clínica en mujeres (sesgo de diagnóstico). Por otra parte, factores hormonales dependientes de estrógenos, progesterona o ambos²⁷¹. Basándose en las diferencias de incidencia de cáncer a lo largo de la edad de mujeres en diferentes series, se ha propuesto si los ciclos menstruales con sus subidas y bajadas tan marcadas y continuas contribuirían a esta disparidad de género³²³. Sin embargo, los datos son confusos y muchas veces claramente contradictorios, al venir de diferentes series y estudios sumados en meta-análisis²⁷¹. Por ejemplo, hay estudios demostrando una mayor incidencia de cáncer en relación con menopausia más tardía o menarquia precoz, pero también hay otros demostrando el doble de incidencia en mujeres con menopausia inducida temprana. Además, otros factores de confusión están presentes en los estudios como por ejemplo el que demuestra que el número de ciclos menstruales totales a lo largo de la vida tiene una relación significativa directa con la incidencia de cáncer de tiroides, pero también con la incidencia de leiomiomas uterinos³²⁴.

El embarazo es uno de los factores de riesgo de enfermedad tiroidea, y esto incluye el bocio difuso con hipertiroidismo, nódulos o cáncer de tiroides, que se convierte en el segundo cáncer en incidencia en embarazadas tras el cáncer de mama^{271,272}. Sin embargo, hay resultados contradictorios sobre la paridad y el cáncer de tiroides. La mayoría de los estudios encuentran asociación significativa positiva como factor de riesgo, sobre todo en los años cercanos al parto²⁶¹. Y solo tres estudios, con series más pequeñas de pacientes, encontraron que no estaban relacionados o que incluso el embarazo era un factor de protección.

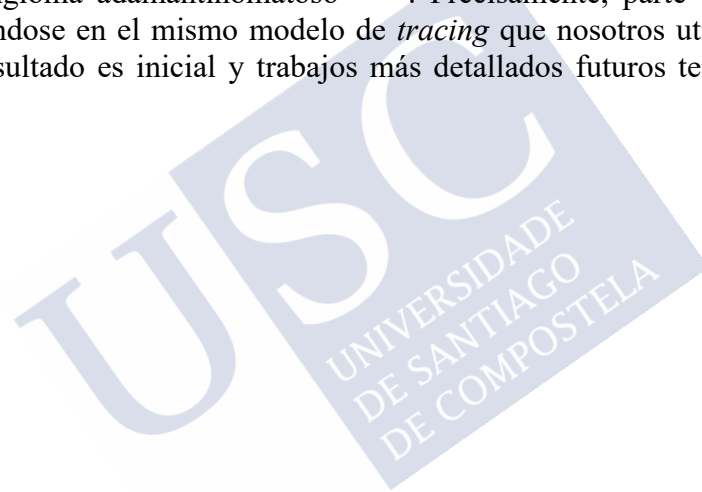
Los efectos del estradiol o la progesterona sobre sus receptores en el epitelio folicular, es el mecanismo biológico propuesto para esta disparidad de género²⁷⁰. Tanto el receptor ER1 o ERalfa como el receptor ER2 o ERbeta han sido propuestos, mediante sus acciones genómicas, como activadores o protectores respectivamente de la proliferación del epitelio folicular normal²⁷⁰, sin que haya datos contundentes al respecto para concentraciones de estradiol fisiológicas ni una explicación exhaustiva de por qué no se encuentra una proliferación (índice Ki-67) mucho más destacada en la tiroides normal de mujeres. También se han propuesto que receptores de membrana, bien el propio ERalfa como otros receptores como el GPR30 pudieran mediar las acciones promotoras de proliferación atribuidas al estradiol²⁷⁰. También se han propuesto que el estradiol altere el fenotipo tiroideo, pero hay acciones contradictorias descritas sobre NIS (represión) o sobre Tg (inducción), dependiendo si se estudiaron en una línea celular de epitelio folicular de rata (FRTL-5) o en cultivos en suspensión de folículos.

Una revisión propone que unas supuestas células madre de la tiroides, o sus progenitoras pudieran verse afectadas por el estradiol y convertirse en células madre cancerosas de la tiroides³²⁵. El único estudio con datos al respecto es el del grupo de Derhwald que encuentra mayor número de tiroesferas si añade estradiol a los cultivos³²⁶.

Nuestros modelos *in vivo* permitirán hacer experimentos en el futuro como el *tracing* a través de la pubertad, inyectando TAM justo antes de la pubertad y observando el porcentaje de diferenciación de novo a día 90 por ejemplo. O durante la preñez. Estos resultados serán

clave para entender si hay alguna relación entre la población SOX2 que nosotros proponemos como célula madre de la tiroides y la patología tiroidea proliferativa.

Por otra parte, nosotros ya hemos comenzado a estudiar qué pasa en cultivos primarios humanos. Hemos visto que la población existe en cultivo de tiroides normal en un porcentaje similar al encontrado en la glándula tiroides de ratón. Y, por otra parte, también la hemos observado en la glándula completa. Nuestros cultivos de tiroides eran 3 de mujeres y dos de hombres y no encontramos diferencias, aunque por supuesto el n es bajo para afirmar nada contundentemente. Pero lo que sí encontramos es un aumento claro en los cultivos de bocio multinodular (MNG). Por supuesto que la mayoría de estos cultivos son del sexo femenino, ya que como hemos dicho arriba esta enfermedad tiene una disparidad de género muy importante. No encontramos diferencias en la edad, aunque sí en una menor frecuencia de tiroiditis linfocítica en las pacientes MNG. Pudiera ser que el bocio multinodular, cuyo origen etiológico no está bien explicado, pudiera ser una enfermedad relacionada de alguna forma con una expansión de la población de células SOX2 bien directamente implicadas en la hiperproliferación o bien secretando factores promotores alterando vías de senescencia, como ha sido demostrado para las células SOX2 implicadas en un tumor benigno de la hipófisis como es el craneofaringioma adamantinomatoso^{327,328}. Precisamente, parte de estos resultados se obtuvieron basándose en el mismo modelo de *tracing* que nosotros utilizamos. En cualquier caso, nuestro resultado es inicial y trabajos más detallados futuros tendrán que aclarar esta hipótesis.





CONCLUSIONES





Los datos recabados en esta tesis nos llevan a las siguientes conclusiones:

1. Hemos identificado una población de células SOX2 presentes en la glándula tiroidea humana y de ratón. Esta población se diferencia del epitelio folicular la población más abundante en la tiroides, tanto en tamaño y localización como en marcadores.
2. La población SOX2 consiste en células únicas o en pequeños grupos al pie del epitelio folicular o en medio de éste, y que se caracterizan por ser células epiteliales, que expresan citokeratinas, y beta-catenina junto con E-cadherina, y baja expresión de TTF1 (SOX2/TTF1low). La población SOX2 es negativa para PAX8.
3. Hay una subpoblación SOX2 negativa para p63 y otra que expresa p63, indicando dos funcionalidades en esta población celular.
4. La población SOX2 tiene distribución dependiente del sexo, con mayor número en ratones hembras. La población SOX2 se distribuye desigualmente a lo largo de la glándula acumulándose en la región medio superior.
5. Las células SOX2 pueden ser rastreadas (*Tracing*) en ratones hembra normales mediante el seguimiento con GFP. Este *Tracing* demuestra un lento recambio basal en la tiroides normal diferenciando estas células SOX2 a epitelio folicular.
6. La población SOX2 aumenta tras el hipotiroidismo inducido por el anti-tiroideo PTU. El rastreo (*Tracing*) de estas células a lo largo del tiempo, demuestra una mayor diferenciación en este tipo de hipotiroidismo comparado con los ratones controles. Sin embargo, el recambio inducido es lento en este modelo.
7. La población SOX2 se activa y prolifera y se recluta diferenciándose a epitelio folicular tras una hemitiroidectomía. Este epitelio folicular expresa el transportador de yodo basal, NIS, y la proteína apical precursora de hormonas tiroideas, Tiroglobulina.
8. La población SOX2 postnatal participa en el crecimiento, expansión y recambio celular (*Cell Turnover*) de la glándula hasta la vida adulta.
9. Las células SOX2 son capaces de crecer como esferas en condiciones de cultivo de células madre adultas ("*adult stem cells*") sin suero.
10. Estas Tiroesferas expresan SOX2 y bajos niveles de TTF1, siendo negativas para Tiroglobulina. Las esferas son capaces de diferenciarse a epitelio folicular productor de Tiroglobulina con mucha expresión de TTF1.
11. Las células SOX2 humanas persisten en los cultivos primarios como células individualizadas que co-expresan TTF1.
12. Hay una mayor cantidad de células SOX2 en cultivos primarios de bocios nodulares que de tiroides normal.



LISTA DE FIGURAS





	<u>Página</u>
- Figura 1. La expresión del ARNm de Sox2 pero no de Tshr se incrementa tras la pubertad en la glándula tiroides de ratones hembras pero no de machos -----	96
- Figura 2. La expresión de la proteína SOX2 en la glándula tiroides es significativamente mayor en ratones hembras que en machos -----	97
- Figura 3. Las células SOX2+ son distintas al epitelio folicular, pero están íntimamente asociadas con éste-----	98
- Figura 4. Las células SOX2 expresan Citokeratinas, b-Catenina y E-Caderina-----	100-101
- Figura 5. Inmunofluorescencia para estudiar la colocalización de SOX2 con los factores de transcripción característicos de epitelio folicular-----	102-103
- Figura 6. Las células SOX2 no son células C productoras de Calcitonina-----	106-107
- Figura 7. Algunas células SOX2, pero no todas, co-expresan p63-----	108-109
- Figura 8. Localización y cuantificación de las células SOX2+ en glándula tiroides de ratones hembras de 30 días mediante sección completa-----	110
- Figura 9. Nuestro Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP es un modelo cuantitativo para estudiar la expresión de SOX2-----	114
- Figura 10. Marcaje SOX2-GFP en la tráquea y en la glándula tiroides tras el tratamiento con TAM-----	116-117
- Figura 11. Protocolo de hipotiroidismo inducido por PTU-----	118
- Figura 12. La FT ₄ desciende progresivamente en ratones hembra tras el tratamiento con PTU-----	119
- Figura 13. Incremento específico en la expresión de ARNm de Sox2 a largo plazo tras el hipotiroidismo inducido con PTU-----	120
- Figura 14. Incremento de la proteína SOX2 en hipotiroidismo de 12 días-----	121
- Figura 15. Abundancia de células SOX2 en ratones hipotiroideos (HT), comparados con ratones control-----	122
- Figura 16. Aumento específico de la población celular SOX2 con el hipotiroidismo-----	123

- **Figura 17.** Esquema temporal de la activación del modelo mediante administración de TAM seguido de la inducción de hipotiroidismo (PTU) en ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP---
-----124

- **Figura 18.** Campos representativos de la tiroides de ratones de 90 días tratados con TAM y posteriormente con PTU que induce hipotiroidismo (12 días) con doble inmunofluorescencia para GFP y TG-----125

- **Figura 19.** Tiroides de ratones de 90 días tratados con TAM y con PTU o solución de bebida control durante 12 días) y estudiados con doble inmunofluorescencia para GFP y Tg o NIS--
-----126-127

- **Figura 20.** Modelo de hemitiroidectomía parcial (HemiTx) en ratón Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP-----128

- **Figura 21.** Acumulación masiva de células GFP en la tiroides izquierda de ratones hembra Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx) del lado derecho-----
-----129

- **Figura 22.** Colocalización de GFP y SOX2 en la tiroides de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx) -----130-131

- **Figura 23.** Diferenciación de células GFP en epitelio folicular secretor de Tg por su polo apical en la tiroides de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx) -----132-133

- **Figura 24.** Diferenciación de células GFP en epitelio folicular captador de yoduro a través de NIS por su polo basal en la tiroides de ratones Sox2-Cre-ERT2/LoxP-EGFP 10 días tras hemitiroidectomía (HemiTx) -----134-135

- **Figura 25.** Incremento de la proliferación de la población SOX2 inmediatamente tras la HemiTx -----136-137

- **Figura 26.** Recambio celular (Cell Turnover) postnatal en la tiroides a partir de las células SOX2 -----139

- **Figura 27.** Reclutamiento postnatal fisiológico de células SOX2, evidenciado por marcaje con GFP en epitelio folicular adulto -----140-141

- Figura 28. Reclutamiento postnatal fisiológico de células SOX2, evidenciado por marcaje con GFP y NIS en epitelio folicular adulto -----	142-143
- Figura 29. Tracing corto a día P3 de neonatos inyectados con TAM a P1 demuestran que sólo parte de la población SOX2 expresa GFP -----	144-145
- Figura 30. Crecimiento de Tiroesferas en cultivo in vitro a partir de una dispersión de células tiroideas de ratón hembra adulta (90 días) -----	146
- Figura 31. Obtención de Tiroesferas en cultivo in vitro a partir de una dispersión de células tiroideas de ratón hembra adulta (90 días) -----	148
- Figura 32. Caracterización de las Tiroesferas mediante expresión de marcadores -----	149
- Figura 33. Diferenciación de Tiroesferas a epitelio folicular -----	150-151
- Figura 34. Detectable expresión del ARNm de SOX2 en muestras de glándula tiroides y cultivos de epitelio folicular tiroideo -----	153
- Figura 35. Expresión de SOX2 y TTF1 en tejido de tiroides humano normal mediante inmunohistoquímica -----	154
- Figura 36. La proteína SOX2 se expresa en cultivos primarios de tiroides humano, y está aumentada en cultivos de hiperplasia -----	155
- Figura 37. Expresión de SOX2 y TTF1 en tejido de tiroides humano normal mediante inmunohistoquímica -----	156
- Figura 38. Detección de la población SOX2/TTF1 en cultivos primarios de tiroides humano-----	158-159
- Figura 39. Representación gráfica del porcentaje de células SOX2 positivas respecto al total en cultivos humanos de tiroides normal (T-NT) y bocio multinodular (T-MNG)-----	160
- Video 1. SOX2 en glándulas tiroides de ratones <i>C57BL6/J</i> hembra adulta (>90 días) mediante microscopía 3D Light-sheet. -----	112

BIBLIOGRAFÍA





1. Maenhaut C, Christophe D, Vassart G, Dumont J, Roger PP, Opitz R. Ontogeny, anatomy, metabolism and physiology of the thyroid. In: Endotext [internet]. MDText. com, Inc.; 2015.
2. Missero C, Cobellis G, De Felice M, Di Lauro R. Molecular events involved in differentiation of thyroid follicular cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;140(1-2):37-43.
3. Di Lauro R, De Felice M. Thyroid gland: Anatomy and development. *Endocrinology.* Philadelphia: Saunders. 2001:1268-1278.
4. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Comprehensive Physiology.* 2011;6(3):1387-1428.
5. 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. *Molecular endocrinology.* 2006;20(8):1796-1809.
6. Kimura S, Hara Y, Pineau T, et al. The T/ebp null mouse: Thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 1996;10(1):60-69.
7. Kimura S, Ward JM, Minoo P. Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie.* 1999;81(4):321-327.
8. Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet J, Gruss P. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development.* 1990;110(2):643-651.
9. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet.* 1998;19(1):87-90.
10. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J.* 1997;16(11):3185-3197.
11. De Felice M, Ovitt C, Biffali E, et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet.* 1998;19(4):395-398.
12. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3035-3043.
13. Fox CS, Pencina MJ, D'Agostino RB, et al. Relations of thyroid function to body weight: Cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Arch Intern Med.* 2008;168(6):587-592.
14. Cheng S, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010;31(2):139-170.
15. Mullur R, Liu Y, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 2014;94(2):355-382.

16. Liu Y, Kogai T, Schultz JJ, Mody K, Brent GA. Thyroid hormone receptor isoform-specific modification by small ubiquitin-like modifier (SUMO) modulates thyroid hormone-dependent gene regulation. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36499-36508.
17. Psarra AG, Sekeris CE. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*. 2008;60(4):210-223.
18. Yavuz S, Salgado Nunez del Prado, Silvia, Celi FS. Thyroid hormone action and energy expenditure. *Journal of the Endocrine Society*. 2019;3(7):1345-1356.
19. López M, Varela L, Vázquez MJ, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med*. 2010;16(9):1001.
20. López M, Alvarez CV, Nogueiras R, Diéguez C. Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med*. 2013;19(7):418-427.
21. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, et al. The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003;24(1):48-77.
22. 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):1083-1105.
23. Vieja Adl, Santisteban P. Role of iodide metabolism in physiology and cancer. . 2018.
24. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na^+/I^- symporter mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27230-27238.
25. Dohán O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na^+/I^- symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(51):20250-20255.
26. Martín M, Modenutti CP, Peyret V, et al. A carboxy-terminal monoleucine-based motif participates in the basolateral targeting of the Na^+/I^- symporter. *Endocrinology*. 2019;160(1):156-168.
27. Bizhanova A, Kopp P. The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*. 2009;150(3):1084-1090.
28. Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet*. 1999;21(4):440-443.
29. Fraser GR, Morgans ME, Trotter WR. The syndrome of sporadic goitre and congenital deafness. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1960;29(2):279-295.
30. Kopp P. Pendred syndrome: Clinical characteristics and molecular basis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 1999;6(4):261.
31. Palos F, Garcia-Rendueles ME, Araujo-Vilar D, et al. Pendred syndrome in two galician families: Insights into clinical phenotypes through cellular, genetic, and molecular studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(1):267-277.

32. Ohtaki S, Moriya S, Suzuki H, Horiuchi Y. Nonhormonal iodine escape from the normal and abnormal thyroid gland. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1967;27(5):728-740.
33. Ohtaki S, Nakagawa H, Kimura S, Yamazaki I. Analyses of catalytic intermediates of hog thyroid peroxidase during its iodinating reaction. *J Biol Chem*. 1981;256(2):805-810.
34. Krinsky MM, Alexander NM. Thyroid peroxidase nature of the heme binding to apoperoxidase. *J Biol Chem*. 1971;246(15):4755-4758.
35. Le SN, Porebski BT, McCoey J, et al. Modelling of thyroid peroxidase reveals insights into its enzyme function and autoantigenicity. *PloS one*. 2015;10(12).
36. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson M, Dème D, Virion A. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*. 1999;274(52):37265-37269.
37. De Deken X, Wang D, Many M, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*. 2000;275(30):23227-23233.
38. O'Neill S, Brault J, Stasia M, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox biology*. 2015;6:135-156.
39. Kizys MM, Louzada RA, Mitne-Neto M, et al. DUOX2 mutations are associated with congenital hypothyroidism with ectopic thyroid gland. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(11):4060-4071.
40. Aycan Z, Cangul H, Muzza M, et al. Digenic DUOX1 and DUOX2 mutations in cases with congenital hypothyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(9):3085-3090.
41. Dunn JT. Thyroglobulin chemistry, biosynthesis, and proteolysis. *Werner and Ingbar's the Thyroid*. 2000.
42. Damante G, Di Lauro R. Thyroid-specific gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*. 1994;1218(3):255-266.
43. Citterio CE, Targovnik HM, Arvan P. The role of thyroglobulin in thyroid hormonogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(6):323-338.
44. Gavaret J, Cahnmann HJ, Nunez J. Thyroid hormone synthesis in thyroglobulin. the mechanism of the coupling reaction. *J Biol Chem*. 1981;256(17):9167-9173.
45. Dedieu A, Gaillard J, Pourcher T, Darrouzet E, Armengaud J. Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. *J Biol Chem*. 2011;286(1):259-269.
46. Taurog A. Hormone synthesis: Thyroid iodine metabolism. *Werner and Ingbar's the thyroid*. 2000:61-85.
47. Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura M, Yamazaki I. Reactions of purified hog thyroid peroxidase with H₂O₂, tyrosine, and methylmercaptoimidazole (goitrogen) in comparison with bovine lactoperoxidase. *J Biol Chem*. 1982;257(2):761-766.

48. Ohtaki S, Nakagawa H, Nakamura M, Yamazaki I. One-and two-electron oxidations of tyrosine, monoiodotyrosine, and diiodotyrosine catalyzed by hog thyroid peroxidase. *J Biol Chem.* 1982;257(22):13398-13403.
49. Lamas L, Taurog A. The importance of thyroglobulin structure in thyroid peroxidase-catalyzed conversion of diiodotyrosine to thyroxine. *Endocrinology.* 1977;100(4):1129-1136.
50. Coscia F, Taler-Verčič A, Chang VT, et al. The structure of human thyroglobulin. *Nature.* 2020;578(7796):627-630.
51. Bernier-Valentin F, Kostrouch Z, Rabilloud R, Munari-Silem Y, Rousset B. Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin molecules. first indication for an internalization of the thyroid prohormone via a mechanism of receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* 1990;265(28):17373-17380.
52. Bernier-Valentin F, Kostrouch Z, Rabilloud R, Rousset B. Analysis of the thyroglobulin internalization process using in vitro reconstituted thyroid follicles: Evidence for a coated vesicle-dependent endocytic pathway. *Endocrinology.* 1991;129(4):2194-2201.
53. Dunn AD, Dunn JT. Thyroglobulin degradation by thyroidal proteases: Action of purified cathepsin D. *Endocrinology.* 1982;111(1):280-289.
54. Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem.* 1991;266(30):20198-20204.
55. Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT. Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes. *Endocrinology.* 1991;128(6):3073-3080.
56. Oppenheimer JH. Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. *N Engl J Med.* 1968;278(21):1153-1162.
57. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev.* 2001;22(4):451-476.
58. Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G. Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. *FEBS Lett.* 1978;91(1):113-116.
59. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Fox JEM, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40128-40135.
60. Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg J, Visser WE, Kester MH, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Molecular endocrinology.* 2008;22(6):1357-1369.
61. Teumer A, Chaker L, Groeneweg S, et al. Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. *Nature communications.* 2018;9(1):1-14.
62. Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Molecular endocrinology.* 2002;16(10):2283-2296.

63. Sagar GV, Gereben B, Callebaut I, et al. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Molecular endocrinology*. 2008;22(6):1382-1393.

64. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002;23(1):38-89.

65. Fliers E, Boelen A, van Trotsenburg A. Central regulation of the hypothalamo–pituitary–thyroid (HPT) axis: Focus on clinical aspects. In: *Handbook of clinical neurology*. Vol 124. Elsevier; 2014:127-138.

66. Nikrodhanond AA, Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, et al. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem*. 2006;281(8):5000-5007.

67. Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, et al. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest*. 2001;107(1):111-120.

68. Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjørbæk C, Flier JS. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem*. 2000;275(46):36124-36133.

69. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*. 2006;147(6):2705-2716.

70. Larsen PR. , *Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders*. Williams textbook of endocrinology. 2003.

71. Rabeler R, Mittag J, Geffers L, et al. Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism. *Molecular endocrinology*. 2004;18(6):1450-1460.

72. Shupnik MA, Chin WW, Habener JF, Ridgway EC. Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J Biol Chem*. 1985;260(5):2900-2903.

73. Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014;10(10):582.

74. Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*. 2002;82(2):473-502.

75. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J. WHO classification of tumours of endocrine organs, 4th edn, vol. 10. . 2017.

76. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(4):292-306.

77. Acquaviva G, Visani M, Repaci A, et al. Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: A review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*. 2018;72(1):6-31.
78. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer*. 2018;124(13):2785-2800.
79. Buzzoni C, Crocetti E, Guzzinati S, Dal Maso L, Francisci S. Cancer incidence and mortality trends from 2003 to 2014 in Italy. *Tumori Journal*. 2019;105(2):121-137.
80. Ward EM, Sherman RL, Henley SJ, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, featuring cancer in men and women age 20–49 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2019;111(12):1279-1297.
81. Hegedüs L. Thyroid ultrasound. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001;30(2):339-360.
82. Marqusee E, Benson CB, Frates MC, et al. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Ann Intern Med*. 2000;133(9):696-700.
83. Medeiros-Neto G. Multinodular goiter. In: *Endotext* [internet]. MDText. com, Inc.; 2016.
84. Malamos B, Koutras DA, Kostamis P, Kralios AC, Rigopoulos G, Zerefos N. Endemic goiter in Greece: Epidemiologic and genetic studies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1966;26(7):688-695.
85. Martin L, Fisher RA. The hereditary and familial aspects of exophthalmic goitre and nodular goitre. *Q J Med*. 1945;14:207-219.
86. Medeiros-Neto G. Iodine deficiency disorders. *Thyroid*. 1990;1(1):73-82.
87. Hegedüs L. Thyroid size determined by ultrasound. influence of physiological factors and non-thyroidal disease. *Dan Med Bull*. 1990;37(3):249-263.
88. Bertelsen JB, HEGEDÜS L. Cigarette smoking and the thyroid. *Thyroid*. 1994;4(3):327-331.
89. Orenstein H, Peskind A, Raskind MA. Thyroid disorders in female psychiatric patients with panic disorder or agoraphobia. *Am J Psychiatry*. 1988.
90. Surks MI, Sievert R. Drugs and thyroid function. *N Engl J Med*. 1995;333(25):1688-1694.
91. Hashimoto thyroiditis: Practice essentials, background, etiology. . 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/120937-overview#a1>. Accessed Jun 14, 2020.
92. Toxic nodular goiter: Background, pathophysiology, epidemiology. . 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/120497-overview>. Accessed Jun 14, 2020.
93. Yong JS, Loh KS, Petersson BF, Thong M. Multinodular goiter: A study of malignancy risk in nondominant nodules. *Ear, Nose & Throat Journal*. 2017;96(8):336-340.

94. Gullo I, Batista R, Rodrigues-Pereira P, et al. Multinodular goiter progression toward malignancy in a case of DICER1 syndrome: Histologic and molecular alterations. *Am J Clin Pathol*. 2018;149(5):379-386.
95. Donmez-Altuntas H, Bayram F, Bitgen N, Ata S, Hamurcu Z, Baskol G. Increased chromosomal and oxidative DNA damage in patients with multinodular goiter and their association with cancer. *International journal of endocrinology*. 2017;2017.
96. Lan L, Cui D, Nowka K, Derwahl M. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(9):3681-3688.
97. Hypothyroidism: Practice essentials, background, pathophysiology. . 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/122393-overview>. Accessed Jun 14, 2020.
98. Pediatric hypothyroidism - conditions and treatments | children's national hospital. <http://childrensnational.org/visit/conditions-and-treatments/diabetes-hormonal-disorders/hypothyroidism>. Accessed Jun 14, 2020.
99. Garmendia Madariaga A, Santos Palacios S, Guillén-Grima F, Galofré JC. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in europe: A meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(3):923-931.
100. Aoki Y, Belin RM, Clickner R, Jeffries R, Phillips L, Mahaffey KR. Serum TSH and total T4 in the united states population and their association with participant characteristics: National health and nutrition examination survey (NHANES 1999–2002). *Thyroid*. 2007;17(12):1211-1223.
101. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, et al. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010;24(1):13-27.
102. Santos Palacios S, Llaveró Valero M, Brugos-Larumbe A, Díez JJ, Guillén-Grima F, Galofré JC. Prevalence of thyroid dysfunction in a large southern european population. analysis of modulatory factors. the APNA study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;89(3):367-375.
103. Persani L. Central hypothyroidism: Pathogenic, diagnostic, and therapeutic challenges. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(9):3068-3078.
104. Yu W, Wu N, Li L, Wang J, OuYang H, Shen H. Side effects of ptu and mmi in the treatment of hyperthyroidism: A systematic review and meta-analysis. *Endocrine Practice*. 2020.
105. Wartofsky L, Glinoe D, Solomon B, et al. Differences and similarities in the diagnosis and treatment of graves' disease in europe, japan, and the united states. *Thyroid*. 1991;1(2):129-135.
106. Roy G, Mugesh G. Selenium analogues of antithyroid drugs—recent developments. *Chemistry & biodiversity*. 2008;5(3):414-439.
107. Luongo C, Dentice M, Salvatore D. Deiodinases and their intricate role in thyroid hormone homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(8):479-488.

108. Bianco AC, Dumitrescu A, Gereben B, et al. Paradigms of dynamic control of thyroid hormone signaling. *Endocr Rev.* 2019;40(4):1000-1047.
109. Ferreira E, Silva AE, Serakides R, Gomes A, Cassali GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2007;59(5):1245-1249.
110. Bianco AC, Anderson G, Forrest D, et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models: Report of the american thyroid association task force on approaches and strategies to investigate thyroid hormone economy and action. *Thyroid.* 2014;24(1):88-168.
111. Vickers NJ. Animal communication: When iâ€™m calling you, will you answer too? *Current Biology.* 2017;27(14):R713-R715.
112. Rakov H, Engels K, Hönes GS, et al. Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice. *Biology of sex differences.* 2016;7(1):36.
113. Johnson KR, Gagnon LH, Longo-Guess CM, Harris BS, Chang B. Hearing impairment in hypothyroid dwarf mice caused by mutations of the thyroid peroxidase gene. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology.* 2014;15(1):45-55.
114. Blanpain C, Fuchs E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science.* 2014;344(6189):1242281.
115. Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, et al. Defining stem cell types: Understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol.* 2012;49(2):89.
116. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: New insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 2019;16(1):19-34.
117. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-846.
118. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425(6960):836-841.
119. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-1121.
120. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* 2005;435(7044):969-973.
121. Cotsarelis G, Sun T, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990;61(7):1329-1337.
122. Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703-716.
123. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 1997;8(6):389-404.

124. Shen Q, Goderie SK, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004;304(5675):1338-1340.
125. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 2007;449(7165):1003-1007.
126. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*. 2007;129(5):999-1010.
127. García-Prat L, Muñoz-Cánoves P. Aging, metabolism and stem cells: Spotlight on muscle stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;445:109-117.
128. Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, et al. A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One*. 2009;4(3).
129. Garcia-Lavandeira M, Diaz-Rodriguez E, Bahar D, et al. Pituitary cell turnover: From adult stem cell recruitment through differentiation to death. *Neuroendocrinology*. 2015;101(3):175-192.
130. Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(8):2907-2912.
131. Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S, Vankelecom H. Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells*. 2009;27(5):1182-1195.
132. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-414.
133. Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2002;197(4):492-509.
134. Lin C, Yu LI. Beta-catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation. *Journal of Medical Postgraduates*. 2003(04).
135. Merrill BJ, Gat U, DasGupta R, Fuchs E. Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev*. 2001;15(13):1688-1705.
136. Chen D, McKearin D. Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Current Biology*. 2003;13(20):1786-1791.
137. Botchkarev VA, Botchkareva NV, Nakamura M, et al. Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin. *The FASEB Journal*. 2001;15(12):2205-2214.
138. Kulesa H, Turk G, Hogan BL. Inhibition of bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J*. 2000;19(24):6664-6674.
139. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):112-117.
140. Ayyaz A, Kumar S, Sangiorgi B, et al. Single-cell transcriptomes of the regenerating intestine reveal a revival stem cell. *Nature*. 2019;569(7754):121-125.

141. Serra D, Mayr U, Boni A, et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nature*. 2019;569(7754):66-72.
142. Lodge EJ, Russell JP, Patist AL, Francis-West P, Andoniadou CL. Expression analysis of the hippo cascade indicates a role in pituitary stem cell development. *Frontiers in physiology*. 2016;7:114.
143. Lodge EJ, Santambrogio A, Russell JP, et al. Homeostatic and tumourigenic activity of SOX2 pituitary stem cells is controlled by the LATS/YAP/TAZ cascade. *Elife*. 2019;8:e43996.
144. So W, Cheung TH. Molecular regulation of cellular quiescence: A perspective from adult stem cells and its niches. In: *Cellular quiescence*. Springer; 2018:1-25.
145. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599.
146. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016;529(7584):37-42.
147. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990;346(6281):245-250.
148. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346(6281):240-244.
149. Olariu V, Lökvist C, Sneppen K. Nanog, Oct4 and Tet1 interplay in establishing pluripotency. *Scientific reports*. 2016;6:25438.
150. Frum T, Halbisen MA, Wang C, Amiri H, Robson P, Ralston A. Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Developmental cell*. 2013;25(6):610-622.
151. Tan MH, Au KF, Leong DE, Foygel K, Wong WH, & Yao MW. An Oct4-Sall4-Nanog network controls developmental progression in the pre-implantation mouse embryo. *Molecular systems biology*. 2013;9(1).
152. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
153. Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *The American journal of pathology*. 2006;168(6):1879-1888.
154. Matthai C, Horvat R, Noe M, et al. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(1):7-10.
155. Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(11-12):1103-1121.
156. Cho YG, Song JH, Kim CJ, et al. Genetic and epigenetic analysis of the KLF4 gene in gastric cancer. *APMIS*. 2007;115(7):802-808.

157. Nakahara Y, Northcott PA, Li M, et al. Genetic and epigenetic inactivation of kruppel-like factor 4 in medulloblastoma. *Neoplasia* (New York, NY). 2010;12(1):20.
158. Yang W, Zheng P. Promoter hypermethylation of KLF4 inactivates its tumor suppressor function in cervical carcinogenesis. *PloS one*. 2014;9(2).
159. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 2009;137(4):647-658.
160. Tian Y, Luo A, Cai Y, et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 in human esophageal cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2010;285(11):7986-7994.
161. Chen H, Lin Y, Chung H, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. *Cancer Res*. 2012;72(14):3631-3641.
162. Alvarez CV, Oroz-Gonjar F, Garcia-Lavandeira M. Future perspectives in adult stem cell turnover: Implications for endocrine physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;445:1.
163. Crisan M, Dzierzak E. The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development*. 2016;143(24):4571-4581.
164. Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*. 2004;303(5656):359-363.
165. Morris RJ, Liu Y, Marles L, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004;22(4):411-417.
166. Greco V, Chen T, Rendl M, et al. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell stem cell*. 2009;4(2):155-169.
167. Vidal VP, Chaboissier M, Lützkendorf S, et al. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Current Biology*. 2005;15(15):1340-1351.
168. Rhee H, Polak L, Fuchs E. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science*. 2006;312(5782):1946-1949.
169. Nguyen H, Merrill BJ, Polak L, et al. Tcf3 and Tcf4 are essential for long-term homeostasis of skin epithelia. *Nat Genet*. 2009;41(10):1068.
170. Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking tcf-4. *Nat Genet*. 1998;19(4):379-383.
171. He XC, Zhang J, Tong W, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt/β-catenin signaling. *Nat Genet*. 2004;36(10):1117-1121.
172. Gros J, Manceau M, Thomé V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*. 2005;435(7044):954-958.

173. Kassar-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomès D, Tajbakhsh S. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 2005;19(12):1426-1431.
174. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93(1):23-67.
175. Zhang J, Jiao J. Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis. *BioMed research international.* 2015;2015.
176. Denef C. Paracrinicity: The story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(1):1-70.
177. Chen J, Hersmus N, Duppen VV, Caesens P, Denef C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology.* 2005;146(9):3985-3998.
178. Walczak EM, Hammer GD. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: Implications for disease. *Nature Reviews Endocrinology.* 2015;11(1):14.
179. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(50):21185-21190.
180. Guasti L, Paul A, Laufer E, King P. Localization of sonic hedgehog secreting and receiving cells in the developing and adult rat adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1-2):117-122.
181. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.* 1997;18(3):361-377.
182. Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec.* 1971;169(3):533-557.
183. Oakberg EF. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse. *Anat Rec.* 1971;169(3):515-531.
184. Huckins C, Oakberg EF. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. I. the normal testes. *Anat Rec.* 1978;192(4):519-527.
185. Martin JJ, Woods DC, Tilly JL. Implications and current limitations of oogenesis from female germline or oogonial stem cells in adult mammalian ovaries. *Cells.* 2019;8(2):93.
186. Zou K, Yuan Z, Yang Z, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol.* 2009;11(5):631-636.
187. Xiong J, Lu Z, Wu M, et al. Intraovarian transplantation of female germline stem cells rescue ovarian function in chemotherapy-injured ovaries. *PloS one.* 2015;10(10).
188. Wu C, Xu B, Li X, et al. Tracing and characterizing the development of transplanted female germline stem cells in vivo. *Molecular Therapy.* 2017;25(6):1408-1419.

189. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic \hat{I}^2 -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004;429(6987):41-46.
190. Desai BM, Oliver-Krasinski J, De Leon DD, et al. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet \hat{I}^2 cell, regeneration. *J Clin Invest*. 2007;117(4):971-977.
191. Murtaugh LC, Keefe MD. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu Rev Physiol*. 2015;77:229-249.
192. Xiao X, Chen Z, Shiota C, et al. No evidence for \hat{I}^2 cell neogenesis in murine adult pancreas. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2207-2217.
193. Wang YJ, Golson ML, Schug J, et al. Single-cell mass cytometry analysis of the human endocrine pancreas. *Cell metabolism*. 2016;24(4):616-626.
194. Bader E, Migliorini A, Gegg M, et al. Identification of proliferative and mature \hat{I}^2 -cells in the islets of langerhans. *Nature*. 2016;535(7612):430-434.
195. Loomans CJ, Giuliani NW, Balak J, et al. Expansion of adult human pancreatic tissue yields organoids harboring progenitor cells with endocrine differentiation potential. *Stem cell reports*. 2018;10(3):712-724.
196. Hoshi N, Kusakabe T, Taylor BJ, Kimura S. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology*. 2007;148(9):4251-4258.
197. Thomas T, Nowka K, Lan L, Derwahl M. Expression of endoderm stem cell markers: Evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands. *Thyroid*. 2006;16(6):537-544.
198. Fierabracci A, Puglisi MA, Giuliani L, Mattarocci S, Gallinella-Muzi M. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J Endocrinol*. 2008;198(3):471-488.
199. Ozaki T, Matsubara T, Seo D, et al. Thyroid regeneration: Characterization of clear cells after partial thyroidectomy. *Endocrinology*. 2012;153(5):2514-2525.
200. Chen CY, Kimura H, Landek-Salgado MA, et al. Regenerative potentials of the murine thyroid in experimental autoimmune thyroiditis: Role of CD24. *Endocrinology*. 2009;150(1):492-499.
201. Davies TF, Latif R, Minsky NC, Ma R. Clinical review: The emerging cell biology of thyroid stem cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(9):2692.
202. Lan L, Luo Y, Cui D, et al. Epithelial-mesenchymal transition triggers cancer stem cell generation in human thyroid cancer cells. *Int J Oncol*. 2013;43(1):113-120.
203. Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: A modified theory based on recent evidence [my opinion]. *Endocr J*. 2014:EJ13-0517.
204. Thomas D, Friedman S, Lin R. Thyroid stem cells: Lessons from normal development and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(1):51.

205. Antico-Arciuch VG, Dima M, Liao X, Refetoff S, Di Cristofano A. Cross-talk between PI3K and estrogen in the mouse thyroid predisposes to the development of follicular carcinomas with a higher incidence in females. *Oncogene*. 2010;29(42):5678-5686.
206. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, et al. Wnt/ β -catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40255-40258.
207. Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, et al. Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells. *Thyroid*. 2010;20(1):33-41.
208. Giuffrida R, Adamo L, Iannolo G, et al. Resistance of papillary thyroid cancer stem cells to chemotherapy. *Oncology letters*. 2016;12(1):687-691.
209. Ma R, Minsky N, Morshed SA, Davies TF. Stemness in human thyroid cancers and derived cell lines: The role of asymmetrically dividing cancer stem cells resistant to chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(3):E400.
210. Hayase S, Sasaki Y, Matsubara T, et al. Expression of stanniocalcin 1 in thyroid side population cells and thyroid cancer cells. *Thyroid*. 2015;25(4):425-436.
211. Kuhbandner K. Uncovering the role of Sox2 in oligodendroglia. *Journal of Neuroscience*. 2018;38(19):4460-4461.
212. Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: Extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell*. 2002;3(2):167-170.
213. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: Current research and its implications in the clinic. *Clinical and translational medicine*. 2014;3(1):19.
214. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: Versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*. 2013;12(1):15-30.
215. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003;17(1):126-140.
216. Wood HB, Episkopou V. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech Dev*. 1999;86(1-2):197-201.
217. Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod*. 2006;75(5):705-716.
218. Pan W, Jin Y, Chen J, Rottier RJ, Steel KP, Kiernan AE. Ectopic expression of activated notch or SOX2 reveals similar and unique roles in the development of the sensory cell progenitors in the mammalian inner ear. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(41):16146-16157.
219. Okubo T, Pevny LH, Hogan BL. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev*. 2006;20(19):2654-2659.
220. Que J, Okubo T, Goldenring JR, et al. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*. 2007;134(13):2521-2531.

221. Driskell RR, Giangreco A, Jensen KB, Mulder KW, Watt FM. Sox2-positive dermal papilla cells specify hair follicle type in mammalian epidermis. *Development*. 2009;136(16):2815-2823.

222. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):625-635.

223. Thomson M, Liu SJ, Zou L, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*. 2011;145(6):875-889.

224. Taranova OV, Magness ST, Fagan BM, et al. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev*. 2006;20(9):1187-1202.

225. Schneider A, Bardakjian T, Reis LM, Tyler RC, Semina EV. Novel SOX2 mutations and genotype-phenotype correlation in anophthalmia and microphthalmia. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2009;149(12):2706-2715.

226. Hoffmann SA, Hos D, Küspert M, et al. Stem cell factor Sox2 and its close relative Sox3 have differentiation functions in oligodendrocytes. *Development*. 2014;141(1):39-50.

227. Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of schwann cell differentiation and myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(7):2596-2601.

228. Arnold K, Sarkar A, Yram MA, et al. Sox2 adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell*. 2011;9(4):317-329.

229. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. 2003;39(5):749-765.

230. Brazel CY, Limke TL, Osborne JK, et al. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging cell*. 2005;4(4):197-207.

231. Moreno-Cugnon L, Anasagasti A, Ezquerra-Inchausti M, et al. SOX2 haploinsufficiency promotes impaired vision at advanced age. *Oncotarget*. 2018;9(94):36684.

232. Rizzoti K, Akiyama H, Lovell-Badge R. Mobilized adult pituitary stem cells contribute to endocrine regeneration in response to physiological demand. *Cell stem cell*. 2013;13(4):419-432.

233. Foshay KM, Gallicano GI. Regulation of Sox2 by STAT3 initiates commitment to the neural precursor cell fate. *Stem cells and development*. 2008;17(2):269-278.

234. Hu Q, Zhang L, Wen J, et al. The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells. *Stem Cells*. 2010;28(2):279-286.

235. Julian LM, Vandenbosch R, Pakenham CA, et al. Opposing regulation of Sox2 by cell-cycle effectors E2f3a and E2f3b in neural stem cells. *Cell stem cell*. 2013;12(4):440-452.

236. Marqués-Torrejón MÁ, Porlan E, Banito A, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell stem cell*. 2013;12(1):88-100.
237. Iida H, Suzuki M, Goitsuka R, Ueno H. Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *Int J Oncol*. 2012;40(1):71-79.
238. Tsuruzoe S, Ishihara K, Uchimura Y, et al. Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(4):920-926.
239. Van Hoof D, Muñoz J, Braam SR, et al. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell stem cell*. 2009;5(2):214-226.
240. Jeong C, Cho Y, Kim M, et al. Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(12):2141-2150.
241. Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, et al. Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(9):2175-2184.
242. Gaullier G, Luger K. PARP1 and Sox2: An unlikely team of pioneers to conquer the nucleosome. *Mol Cell*. 2017;65(4):581-582.
243. Chakravarthy H, Boer B, Desler M, Mallanna SK, McKeithan TW, Rizzino A. Identification of DPPA4 and other genes as putative Sox2: Oct^{3/4} target genes using a combination of in silico analysis and transcription² based assays. *J Cell Physiol*. 2008;216(3):651-662.
244. Lee KE, Seo J, Shin J, et al. Positive feedback loop between Sox2 and Sox6 inhibits neuronal differentiation in the developing central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(7):2794-2799.
245. Favaro R, Valotta M, Ferri AL, et al. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of shh. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1248.
246. Feng R, Zhou S, Liu Y, et al. Sox2 protects neural stem cells from apoptosis via up-regulating survivin expression. *Biochem J*. 2013;450(3):459-468.
247. Chen Y, Shi L, Zhang L, et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(26):17969-17978.
248. Bravo SB, Garcia-Rendueles ME, Garcia-Rendueles AR, et al. Humanized medium (h7H) allows long-term primary follicular thyroid cultures from human normal thyroid, benign neoplasm, and cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(6):2431-2441.
249. Garcia-Rendueles AR, Rodrigues JS, Garcia-Rendueles M, et al. Rewiring of the apoptotic TGF- β -SMAD/NF κ B pathway through an oncogenic function of p27 in human papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2017;36(5):652-666.
250. Toth ZE, Mezey E. Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007;55(6):545-554.

251. Gerdes MJ, Sood A, Sevinsky C, Pris AD, Zavodszky MI, Ginty F. Emerging understanding of multiscale tumor heterogeneity. *Frontiers in oncology*. 2014;4:366.
252. Stack EC, Wang C, Roman KA, Hoyt CC. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods*. 2014;70(1):46-58.
253. Speel EJ, Hopman AH, Komminoth P. Amplification methods to increase the sensitivity of in situ hybridization: Play card (s). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1999;47(3):281-288.
254. Wasielewski Rv, Mengel M, Gignac S, Wilkens L, Werner M, Georgii A. Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997;45(11):1455-1459.
255. Dekkers JF, Alieva M, Wellens LM, et al. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nature protocols*. 2019;14(6):1756.
256. Wan P, Zhu J, Xu J, Li Y, Yu T, Zhu D. Evaluation of seven optical clearing methods in mouse brain. *Neurophotonics*. 2018;5(3):035007.
257. Miller J. Reaction time analysis with outlier exclusion: Bias varies with sample size. *Q J Exp Psychol*. 1991;43(4):907-912.
258. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965;52(3/4):591-611.
259. Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: A guide for non-statisticians. *International journal of endocrinology and metabolism*. 2012;10(2):486.
260. Kao LS, Green CE. Analysis of variance: Is there a difference in means and what does it mean? *J Surg Res*. 2008;144(1):158-170.
261. Ranstam J. Multiple P-values and bonferroni correction. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016;24(5):763-764.
262. De Winter JC. Using the student's t-test with extremely small sample sizes. *Practical Assessment, Research, and Evaluation*. 2013;18(1):10.
263. Thompson HW, Mera R, Prasad C. A description of the appropriate use of student's t-test. *Nutr Neurosci*. 1998;1(2):165-172.
264. Campbell G, Skillings JH. Nonparametric stepwise multiple comparison procedures. *Journal of the American Statistical Association*. 1985;80(392):998-1003.
265. Vargha A, Delaney HD. The kruskal-wallis test and stochastic homogeneity. *Journal of Educational and behavioral Statistics*. 1998;23(2):170-192.
266. Hart A. Mann-whitney test is not just a test of medians: Differences in spread can be important. *BMJ*. 2001;323(7309):391-393.

267. Garcia-Lavandeira M, Saez C, Diaz-Rodriguez E, et al. embryonic stem cell markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as pituitary stem cells but do not coexpress RET/GFRA3 receptors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(1):E80-E87.
268. Que J, Luo X, Schwartz RJ, Hogan BL. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development*. 2009;136(11):1899-1907.
269. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*. 2016;152:244-248.
270. Santin AP, Furlanetto TW. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *Journal of Thyroid Research*. 2011;2011.
271. Moleti M, Sturniolo G, Di Mauro M, Russo M, Vermiglio F. Female reproductive factors and differentiated thyroid cancer. *Frontiers in endocrinology*. 2017;8:111.
272. Krassas GE. Thyroid disease and female reproduction. *Fertil Steril*. 2000;74(6):1063-1070.
273. Burns JC, Kelly MC, Hoa M, Morell RJ, Kelley MW. Single-cell RNA-seq resolves cellular complexity in sensory organs from the neonatal inner ear. *Nature communications*. 2015;6(1):1-16.
274. Tong L, Strong MK, Kaur T, et al. Selective deletion of cochlear hair cells causes rapid age-dependent changes in spiral ganglion and cochlear nucleus neurons. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(20):7878-7891.
275. Chen G, Korfhagen TR, Karp CL, et al. Foxa3 induces goblet cell metaplasia and inhibits innate antiviral immunity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(3):301-313.
276. Balli D, Ustiyani V, Zhang Y, et al. Foxm1 transcription factor is required for lung fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J*. 2013;32(2):231-244.
277. Polak JM, Pearse A, Le Lievre C, Fontaine J, Le Douarin NM. Immunocytochemical confirmation of the neural crest origin of avian calcitonin-producing cells. *Histochemistry*. 1974;40(3):209-214.
278. Nilsson M, Williams D. On the origin of cells and derivation of thyroid cancer: C cell story revisited. *European thyroid journal*. 2016;5(2):79-93.
279. Johansson E, Andersson L, Örnros J, et al. Revising the embryonic origin of thyroid C cells in mice and humans. *Development*. 2015;142(20):3519-3528.
280. Yang Y, Riccio P, Schotsaert M, et al. Spatial-temporal lineage restrictions of embryonic p63 progenitors establish distinct stem cell pools in adult airways. *Developmental cell*. 2018;44(6):752-761. e4.
281. Zuo W, Zhang T, Wu DZ, et al. p63 Krt5 distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature*. 2015;517(7536):616-620.
282. Preto A, Cameselle-Teijeiro J, Moldes-Boullosa J, et al. Telomerase expression and proliferative activity suggest a stem cell role for thyroid solid cell nests. *Modern Pathology*. 2004;17(7):819-826.

283. Reis-Filho JS, Preto A, Soares P, Ricardo S, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. P63 expression in solid cell nests of the thyroid: Further evidence for a stem cell origin. *Modern pathology*. 2003;16(1):43-48.

284. Gucer H, Mete O. Positivity for GATA3 and TTF-1 (SPT24), and negativity for monoclonal PAX8 expand the biomarker profile of the solid cell nests of the thyroid gland. *Endocrine pathology*. 2018;29(1):49-58.

285. Vassileva PI, Hergeldzhieva TG. Avastin use in high risk corneal transplantation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2009;247(12):1701.

286. Srinivas S, Watanabe T, Lin C, et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology*. 2001;1(1):4.

287. Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(8):3789-3794.

288. Manna D, Roy G, Mughesh G. Antithyroid drugs and their analogues: Synthesis, structure, and mechanism of action. *Acc Chem Res*. 2013;46(11):2706-2715.

289. Eftychia GK, Roupas ND, Markou KB. Effect of excess iodine intake on thyroid on human health. *Minerva Med*. 2017;108(2):136-146.

290. Wabitsch S, Benzing C, Krenzien F, et al. Human stem cells promote liver regeneration after partial hepatectomy in balb/c nude mice. *J Surg Res*. 2019;239:191-200.

291. Ota S, Nishimura M, Murakami Y, et al. Involvement of pancreatic stellate cells in regeneration of remnant pancreas after partial pancreatectomy. *PloS one*. 2016;11(12).

292. 1. Huang H, Chen L, Liang B, Cai H, Cai Q, Shi Y. Upregulation of TSHR, TTF-1, and PAX8 in nodular goiter is associated with iodine deficiency in the follicular lumen. *International journal of endocrinology*. 2016;2016.

293. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11(1):35-71.

294. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-644.

295. Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-426.

296. Rompolas P, Mesa KR, Kawaguchi K, et al. Spatiotemporal coordination of stem cell commitment during epidermal homeostasis. *Science*. 2016;352(6292):1471-1474.

297. Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: Cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology*. 2007;148(4):1797-1803.

298. Coclet J, Foureau F, Ketelbant P, Galand P, Dumont JE. Cell population kinetics in dog and human adult thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1989;31(6):655-666.
299. Okamoto M, Hayase S, Miyakoshi M, Murata T, Kimura S. Stem cell antigen 1-positive mesenchymal cells are the origin of follicular cells during thyroid regeneration. *PLoS One*. 2013;8(11).
300. Wollman SH, Hilfer SR. Embryologic origin of the various epithelial cell types in the second kind of thyroid follicle in the C3H mouse. *Anat Rec*. 1978;191(1):111-121.
301. Burstein DE, Nagi C, Wang BY, Unger P. Immunohistochemical detection of p53 homolog p63 in solid cell nests, papillary thyroid carcinoma, and hashimoto's thyroiditis: A stem cell hypothesis of papillary carcinoma oncogenesis. *Hum Pathol*. 2004;35(4):465-473.
302. Ozaki T, Nagashima K, Kusakabe T, Kakudo K, Kimura S. Development of thyroid gland and ultimobranchial body cyst is independent of p63. *Laboratory investigation*. 2011;91(1):138-146.
303. Mio C, Grani G, Durante C, Damante G. Molecular defects in thyroid dysgenesis. *Clin Genet*. 2020;97(1):222-231.
304. Lin R, Kubo A, Keller GM, Davies TF. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro. *Endocrinology*. 2003;144(6):2644-2649.
305. Ma R, Latif R, Davies TF. Thyrotropin-independent induction of thyroid endoderm from embryonic stem cells by activin A. *Endocrinology*. 2009;150(4):1970-1975.
306. Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature*. 2012;491(7422):66-71.
307. Kurmann AA, Serra M, Hawkins F, et al. Regeneration of thyroid function by transplantation of differentiated pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2015;17(5):527-542.
308. Dame K, Cincotta S, Lang AH, et al. Thyroid progenitors are robustly derived from embryonic stem cells through transient, developmental stage-specific overexpression of Nkx2-1. *Stem cell reports*. 2017;8(2):216-225.
309. Serra M, Alysandratos K, Hawkins F, et al. Pluripotent stem cell differentiation reveals distinct developmental pathways regulating lung-versus thyroid-lineage specification. *Development*. 2017;144(21):3879-3893.
310. Nilsson M, Fagman H. Development of the thyroid gland. *Development*. 2017;144(12):2123-2140.
311. Wendl T, Adzic D, Schoenebeck JJ, et al. Early developmental specification of the thyroid gland depends on hox-expressing surrounding tissue and on FGF signals. *Development*. 2007;134(15):2871-2879.
312. Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, et al. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(9):4285-4291.

313. de Cristofaro T, Di Palma T, Fichera I, et al. An essential role for Pax8 in the transcriptional regulation of cadherin-16 in thyroid cells. *Molecular endocrinology*. 2012;26(1):67-78.
314. Koumarianou P, Gómez-López G, Santisteban P. Pax8 controls thyroid follicular polarity through cadherin-16. *J Cell Sci*. 2017;130(1):219-231.
315. Donati G, Watt FM. Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia. *Cell stem cell*. 2015;16(5):465-476.
316. Guo Z, Hardin H, Lloyd RV. Cancer stem-like cells and thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):T285-T300.
317. Capdevila J, Mayor R, Mancuso FM, et al. Early evolutionary divergence between papillary and anaplastic thyroid cancers. *Annals of Oncology*. 2018;29(6):1454-1460.
318. Mohebati A, Shaha AR. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. *Clinical Anatomy*. 2012;25(1):19-31.
319. Irkorucu O. Zuckerkandl tubercle in thyroid surgery: Is it a reality or a myth? *Annals of Medicine and Surgery*. 2016;7:92-96.
320. Hahn SY, Han B, Ko EY, Shin JH, Ko ES. Ultrasound findings of papillary thyroid carcinoma originating in the isthmus: Comparison with lobe-originating papillary thyroid carcinoma. *Am J Roentgenol*. 2014;203(3):637-642.
321. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, et al. 2015 american thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: The american thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.
322. Henley SJ, Ward EM, Scott S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer*. 2020;126(10):2225-2249.
323. Derwahl M, Nicula D. Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):T273-T283.
324. Zamora Ros R, Rinaldi S, Biessy C, et al. Reproductive and menstrual factors and risk of differentiated thyroid carcinoma: The EPIC study. *International journal of cancer*. 2015;136(5):1218-1227.
325. Zane M, Catalano V, Scavo E, et al. Estrogens and stem cells in thyroid cancer. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:124.
326. Xu S, Chen G, Peng W, Renko K, Derwahl M. Oestrogen action on thyroid progenitor cells: Relevant for the pathogenesis of thyroid nodules. *J Endocrinol*. 2013;218(1):125-133.
327. Martinez-Barbera JP, Andoniadou CL. Biological behaviour of craniopharyngiomas. *Neuroendocrinology*. 2020.
328. Andoniadou CL, Matsushima D, Gharavy SNM, et al. Sox2 stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell stem cell*. 2013;13(4):433-445

