

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

“Expansión del nicho de células *stem*/progenitoras asociada a cambios en la expresión de marcadores específicos en hipófisis durante la gestación y lactancia”

Alicia Maldré del Valle Vaca

República Argentina

Córdoba

2016

Director de Tesis:

Prof. Dra. Alicia I. Torres

Comisión de Tesis:

Prof. Dra. Beatriz Caputto

Prof. Dra. Adriana Gruppi

Prof. Dra. Ana M. Masini

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, INICSA-CONICET.

ÍNDICE

Resumen.....	8
Introducción.....	10
Definición y características generales de las células madre o “ <i>stem cells</i> ”	11
Marcadores específicos de pluripotencialidad de las SC	18
Nicho de las SC	19
Plasticidad de las SC adultas	22
Homeostasis hipofisaria y neogénesis celular	24
Aspectos anatómicos de la hipófisis de roedores: la zona marginal	26
Desarrollo embriológico de la hipófisis: localización de las SC.....	27
Células de la ZM candidatas a ser SC en la hipófisis adulta	29
Marcadores de pluripotencialidad de SC de hipófisis	31
Evidencias de ASC en la hipófisis	33
Renovación celular en la hipófisis adulta	38
Objetivos	44
Materiales y Métodos.....	46
Animales y diseño experimental	47
Caracterización de la ZM por microscopía óptica de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión.....	48
Inmunocitoquímica ultraestructural.....	49
Inmunofluorescencia en tejido hipofisario	51
Captación de BrdU en las células del AP y ZM	54
Citometría de flujo.....	55
Microdissección de captura láser y aislamiento del ARNm de ZM y AP hipofisario	57
Cultivo de hipófisis adultas para la obtención de esferoides en suspensión.....	61
Ensayo de diferenciación de los esferoides a células endocrinas y de linaje neuronal...	62
Protocolo de auto-renovación.....	65

Inmunofluorescencia en los esferoides.....	65
Análisis estadístico.....	67
Resultados.....	68
Estudios previos del grupo de investigación sobre la plasticidad celular hipofisaria ...	69
Estudio topográfico de la ZM.....	70
Estudio a nivel ultraestructural de las células que componen la ZM.....	71
Identificación de células con fenotipo <i>stem</i> y progenitor en la ZM.....	72
Localización y distribución subcelular por ICQU de marcadores asociados al fenotipo de las SC en ZM de hipófisis de ratas adultas.....	79
Identificación de células de sostén que forman parte del nicho de SC en ZM de hipófisis adultas.....	81
Localización de β-catenina en células del nicho en ZM de hipófisis de ratas adultas.....	85
Caracterización morfológica de esferoides obtenidos de hipófisis de ratas adultas.....	88
Estudio ultraestructural de las pituesferas obtenidas de hipófisis de ratas adultas.....	91
Determinación de la capacidad multipotente de las CS/P en los esferoides mediante inducción a diferenciación con medios específicos.....	94
Evaluación de la capacidad de auto-renovación de las CS/P en los esferoides mediante generación de “<i>novo</i>”.....	96
Expresión de marcadores asociados a fenotipo CS/P durante ciclo estral y lactancia ...	97
Expresión de marcadores asociados a CS/P durante la gestación y lactancia.....	102
Cuantificación del ARNm de los marcadores de CS/P y de células diferenciadas en ZM y AP de muestras obtenidas por microdissección láser durante la preñez y lactancia.....	107
Análisis de la incorporación de BrdU en células localizadas en ZM y AP durante la gestación y lactancia.....	113
Discusión.....	119
Conclusiones.....	140
Bibliografía.....	142

Abreviaturas y símbolos

Grupos experimentales estudiados

COP: cópula

d5G: día 5 de gestación

d15G: día 15 de gestación

AT: a término de la gestación

d1L: día 1 de lactancia o lactancia temprana

d4L: día 4 de lactancia o lactancia activa

Unidades, reactivos, células y moléculas

°C: grados centígrados

µg/ml: microgramos/mililitro

ACTH: adrenocorticotrofina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AP: adenoparénquima

ASC: adult stem cells

BrdU: bromodeoxiuridina

SC: stem cells

CFE: células folículo estrelladas

CS/P: células *stem*/progenitoras

DAB: diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

dpc: días post coito

E2: estradiol

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ESC: embryonic stem cells

FGF2: factor de crecimiento fibroblástico básico

FICT: isotiocianato de fluoresceína

FSH: hormona folículo estimulante

g: gramo

GFAP: proteína gliofibrilar ácida

GPI: glicosil-fosfatidil-inositol

h: hora

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

ICQU: inmunocitoquímica ultraestructural

IgG: inmunoglobulina G

kDa: kilodalton

LH: hormona leutinizante

M: molaridad

MEC: matriz extracelular

min: minutos

mM: milimolar

ng/ml: nanogramos/mililitro

nm: nanometros

nM: nanomolar

PBS: solución salina taponada con fosfato

PBS-BSA: solución salina taponada con fosfato- albúmina bovina

pM: picomolar

PRL: prolactina

RER: retículo endoplasmico rugoso

TSH: tirotrófina

TA: temperatura ambiente

Tuj-1: β-tubulina clase III

ZM: zona marginal

Resumen

La presencia de células *stem* (*SC*) ha sido demostrada principalmente en órganos con alta renovación celular y capacidad de regeneración, tales como la piel, intestino y médula ósea. Sin embargo, actualmente, han sido descritos nichos de *SC* especializados en tejidos con bajo potencial de renovación o regeneración, tales como músculo, corazón, cerebro y la glándula hipofisaria, entre otros. La población de células adenohipofisarias manifiesta adaptaciones dinámicas en respuesta a fluctuaciones hormonales producidas en diferentes estados reproductivos tales como pubertad, gestación y lactancia, llevando a hipotetizar que la plasticidad que exhibe la glándula en situaciones fisiológicas, podría deberse al reclutamiento y diferenciación de células *stem*/progenitoras (CS/P). Sin embargo, exactamente cómo y cuándo ocurre este proceso aún permanece sin dilucidar.

En el presente trabajo nos propusimos identificar las CS/P en hipófisis adultas, demostrándose la localización topográfica de células con características embrionarias en la zona marginal (ZM) e identificando a nivel ultraestructural, la expresión de marcadores asociados al fenotipo de células indiferenciadas como es el caso del receptor de membrana GFRa2, los factores de transcripción, Sox2, Oct-4 y para células progenitoras, Sox9. Completando la caracterización del nicho de CS/P en la hipófisis, se identificaron células de fenotipo mesenquimal, positivas para Nestin y Vimentina. Para completar la caracterización morfológica y funcional de las *SC*, las mismas fueron aisladas *in vitro* como estructuras esféricas, denominadas “pituesferas” a partir de cultivos hipofisarios de ratas adultas. Las células que componen los esferoides presentaron expresión de GFRa2, Oct-4, Sox2 y Sox9. Luego se realizó el ensayo de auto-renovación el cual reveló que una única célula origina un esferoide completo y que además, mantenidas en medios específicos fueron capaces de diferenciarse a células PRL+ y otras con fenotipo similar al neuronal, Tuj-1+ y GFAP+. Estos resultados demostraron la capacidad de las *SC* de formar esferoides en cultivo y de diferenciarse a distintos linajes celulares, lo cual indica el grado de pluripotencialidad de esta población de células hipofisarias.

El ciclo estral, la gestación y lactancia, representan modelos fisiológicos adecuados para analizar la contribución de la población de *SC* en la generación de poblaciones celulares con diferente grado de diferenciación para finalmente suplir el requerimiento de nuevas

células endocrinas maduras. Para esclarecer este mecanismo, nos propusimos evaluar posibles fluctuaciones de los marcadores de CS/P en los modelos antes mencionados. Los resultados obtenidos mostraron una *up-regulación* de los marcadores de células indiferenciadas (GFRA2, Sox2 y Oct-4) al término de la gestación en ZM, mientras que Sox9 (marcador de células progenitoras) incrementó significativamente a mitad de la gestación y en lactancia activa. En relación al marcador de células comprometidas con un linaje celular, Pit-1, se detectó un aumento en el adenoparénquima (AP) al comienzo de la lactancia.

En los estados reproductivos gestación y lactancia, se evaluó además, la proliferación de células localizadas en ZM y AP, mediante la incorporación de BrdU. En ZM se observó un mayor número de células proliferantes al término de la gestación, disminuyendo en lactancia activa. Sin embargo, en AP se cuantificó un incremento de células BrdU+ en lactancia temprana, seguido por una disminución en lactancia activa. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se observaron células BrdU+ que expresaron GFRA2 en ZM ó Sox9 en AP a término de la gestación y en lactancia temprana, respectivamente.

Los hallazgos obtenidos permitieron identificar y caracterizar las SC en hipófisis adulta y la localización del nicho en la zona marginal. Además, las fluctuaciones observadas en los marcadores específicos de CS/P en forma conjunta con los índices de proliferación cuantificados en ZM y AP, sugieren una expansión del nicho en hipófisis de ratas al término de la gestación e inicio de la lactancia, contribuyendo al origen de poblaciones de células productoras de hormonas y a la plasticidad hipofisaria.

Introducción

Definición y características generales de las células madre o “stem cells”

Los primeros usos de la palabra célula madre o “stem cell” (SC) se registraron a finales del siglo XIX, en el contexto de preguntas fundamentales de la Embriología como la continuidad del plasma germinal y el origen del sistema hematopoyético [1]. La demostración de la existencia de células madre hematopoyéticas [2-5] estableció a estas células como SC prototipo, es decir células capaces de proliferar casi indefinidamente (auto-renovación) y de dar lugar a células especializadas (diferenciación). Utilizando esta definición, actualmente, es posible identificar SC en otros tejidos tales como el sistema nervioso central [6-8], intestino [9], piel [10], hígado [11], hueso, cartílago [12, 13] y ojo [14]. En estos sistemas, las SC se consideran células claves para estimular la renovación y regeneración de los tejidos en el individuo adulto. Por lo tanto, ampliar el conocimiento de la biología de las mismas, específicamente sobre los mecanismos moleculares y celulares involucrados en los procesos de auto-renovación y diferenciación sería imprescindible para su uso en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, permitiendo que las SC sean utilizadas como estrategias terapéuticas específicas. Desde el año 2005 esta área de estudio, se ha convertido en una temática prioritaria desarrollada en el ámbito de la investigación básica y su traslado a la salud pública.

En la bibliografía actual existen varios criterios para clasificar a las SC, siendo uno de los más importantes el que las define en base a su potencial de diferenciación. Tomando en cuenta este criterio se definen cuatro tipos de SC (Figura 1):

- **Totipotenciales:** célula capaz de crecer y formar un organismo completo donde se incluyen los componentes embrionarios, como las tres capas embrionarias

(ectodermo, mesodermo y endodermo), los tejidos que generarán el saco vitelino y los componentes extraembrionarios, como la placenta. Aun así, muchos autores consideran que la única célula totipotente es el cigoto.

- **Pluripotenciales:** pueden dar origen a células progenitoras que formarán cualquiera de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo; pero, para incluirse dentro de esta categoría, una única célula debe ser capaz de diferenciarse en progenitores especializados destinados a cualquier capa embrionaria. Este tipo de células no pueden formar un organismo completo.
- **Multipotenciales:** solo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una única línea celular. Por ejemplo, una célula madre sanguínea será capaz de originar de manera exclusiva diferentes tipos celulares hemáticos maduros y funcionales.
- **Unipotenciales:** célula capaz de dar lugar únicamente a un tipo de célula particular.

Otra forma de clasificar a las SC es la que toma como eje un punto de vista ontogénico:

- **SC embrionarias:** la célula *stem* embrionaria (*Embryonic Stem Cell, ESC*) por excelencia es el cigoto [15]. El cigoto es totipotente, es decir puede dar lugar a todas las células del feto y la placenta. Conforme se desarrolla el embrión, sus células van perdiendo esta propiedad en forma progresiva, llegando a la fase de blastocisto que contiene células pluripotentes en la masa celular interna de las cuales derivan las *ESC*, capaces de diferenciarse a cualquier tipo embrionario. A

medida que avanza el desarrollo ontogénico se forman diferentes poblaciones de *SC* con una potencialidad cada vez más restringida de originar tejidos.

- ***SC adultas***: en un individuo adulto se conocen distintos tipos de células *stem* adultas (*Adult Stem Cells, ASC*). Son células indiferenciadas que pueden estar presentes en tejidos diferenciados con propiedades de auto-renovación [16]. Han sido descritas en diferentes órganos como la piel, la médula ósea, el hígado, el intestino y el cerebro. Diversos estudios han sugerido que son muy versátiles y tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares.
- ***SC pluripotentes inducidas*** (*Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC*): son células adultas que han sido genéticamente reprogramadas para dar origen a una célula embrionaria, al sobre-expresar genes y factores importantes para mantener las propiedades de las *ESC*. Aunque estas células cumplen los criterios para la definición de pluripotentes, se desconoce si las mismas y las *SC* embrionarias difieren de manera clínicamente significativa. Las *iPSC* de ratón fueron descubiertas por primera vez en 2006 [17] y las *iPSC* humanas a finales de 2007 [18]. Las primeras demuestran características importantes de las células pluripotentes, como la expresión de marcadores de *SC*, forman teratomas y son capaces de contribuir a diferentes tejidos cuando se inyectan en embriones de ratón en una fase muy temprana de desarrollo. Las *iPSC* humanas también expresan marcadores de *SC* y son capaces de generar células con características de las tres capas germinales.

Aunque se necesitan muchas más investigaciones, las *iPSC* ya son útiles para el desarrollo de drogas y su aplicación en distintos tipos de enfermedades. Actualmente, una de las herramientas de reprogramación más utilizada en la generación de *iPSC* son los virus, razón por la cual este proceso debe ser cuidadosamente controlado y probado antes de que esta técnica pueda utilizarse en los seres humanos [19]. Este descubrimiento revolucionario ha creado una nueva y poderosa forma de "de-diferenciación" celular, que permitiría que los tejidos derivados de *iPSC* serían casi idénticos al receptor de estas células evitando así el rechazo por el sistema inmune. La estrategia de *iPSC*, crea células pluripotentes que, junto con estudios de otros tipos de *SC*, ayudará en un futuro a reprogramar las células para reparar tejidos dañados en el cuerpo humano.

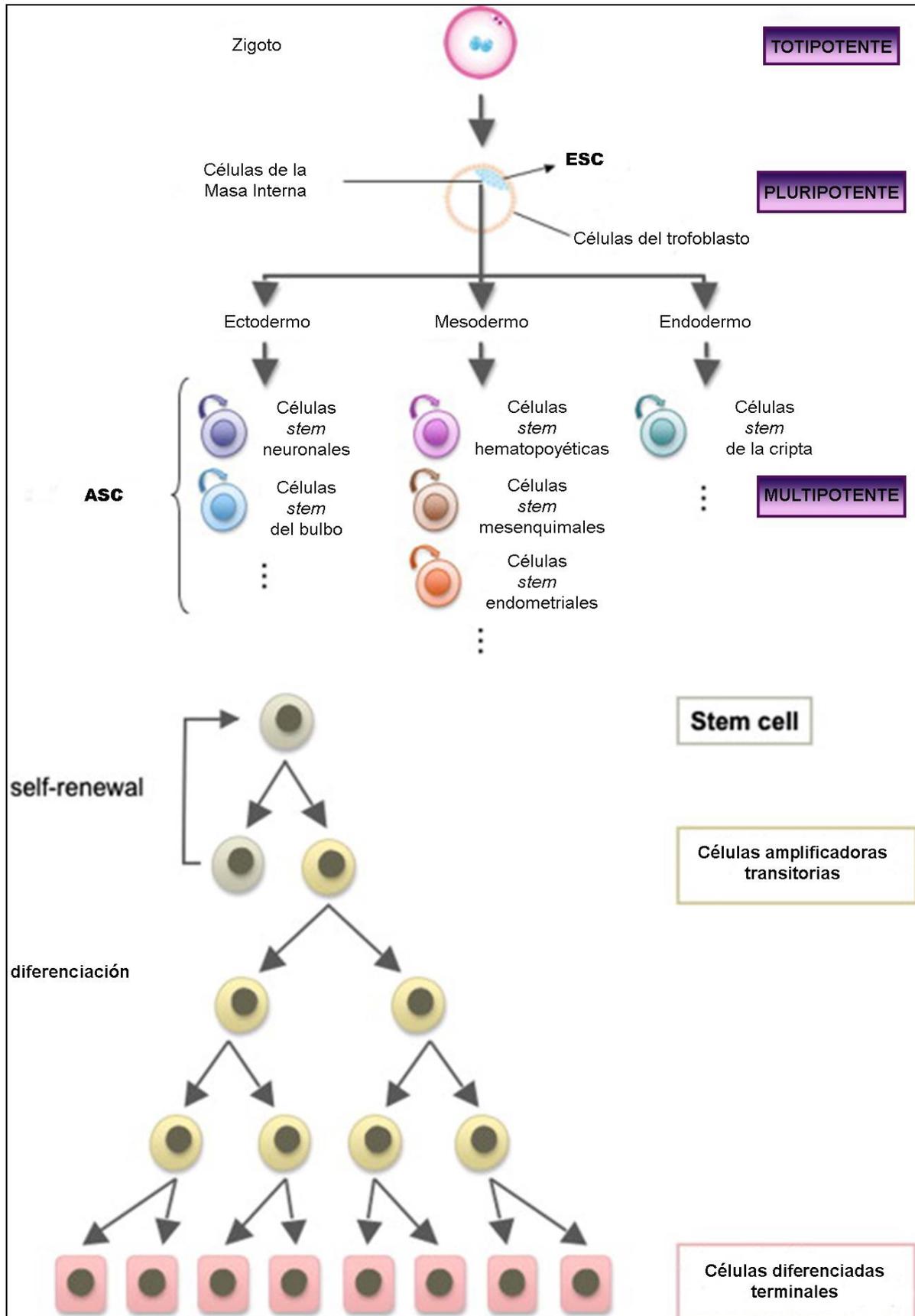


Figura 1. Jerarquía de las SC. A) Jerarquía del desarrollo: un cigoto puede formar tejidos embrionarios y extraembrionarios y por lo tanto se encuentra en la parte superior de la jerarquía de las SC, denominándose totipotente. La masa celular interna del blastocisto da lugar a tres capas germinales. La masa celular interna y las SC embrionarias aisladas de la masa celular interna se denominan pluripotentes. Una SC adulta es una célula indiferenciada que se encuentra entre las células diferenciadas en un tejido, que puede renovarse y diferenciarse para producir todos o algunos de los principales tipos de células especializadas del tejido. Las SC adultas se las denominan SC multipotentes. B) Jerarquía de las SC adultas: estas células en muchos tejidos sólo se dividen en raras ocasiones, pero dan lugar a las hijas que están comprometidas con la diferenciación, llamadas células amplificadoras transitorias, las cuales pasan por una serie limitada de divisiones más rápidas antes de completar el proceso de diferenciación. Modificado de Kyo y col. 2011 [20].

Características específicas de las SC

Hasta ahora hemos definido y clasificado a las SC, mencionando algunas de sus características particulares. Las principales propiedades que permiten clasificar a estas células están sujetas a las condiciones en las que fueron estudiadas *in vivo* o *in vitro*. Básicamente, son tres las propiedades que caracterizan a las SC y que pueden expresarse en distintos grados [21]:

- **Auto-renovación (“self-renewal”)**: estas células tienen la capacidad de perpetuarse, mediante divisiones mitóticas simétricas y asimétricas produciendo una población de células hijas de características similares a la originaria [22] (Figura 2).

A través de este proceso, una célula madre puede proliferar para dar lugar a la expansión de un clon. Un conjunto limitado de SC, en un determinado tejido u órgano, puede mantener su número o incrementarlo cuando dichas células estén participando en un proceso de renovación o regeneración tisular. Esta capacidad de auto-renovación es la que permite a las SC mantener el clon indiferenciado a lo largo del tiempo, actuando como reservorio en distintas condiciones fisiológicas para mantener la homeostasis tisular.

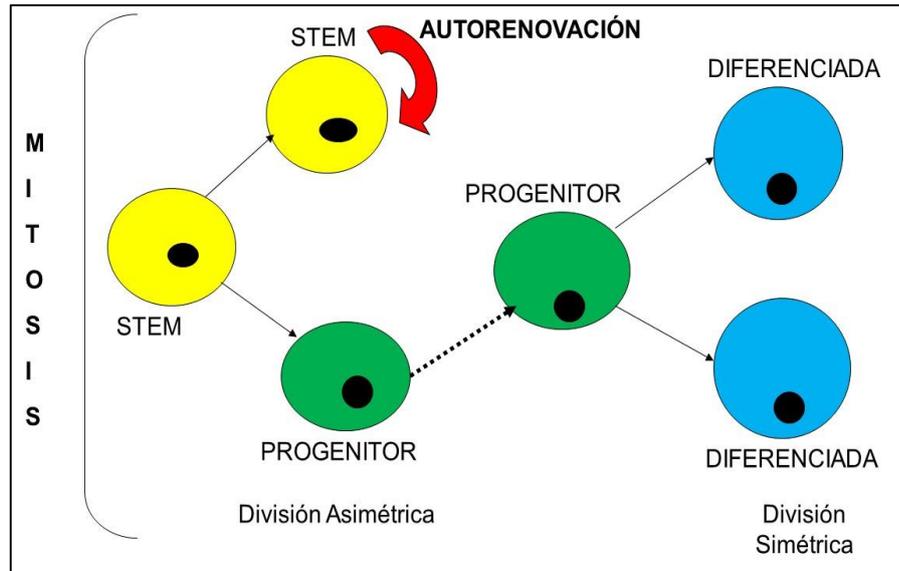


Figura 2. Representación esquemática del proceso de mitosis de una SC que originará células idénticas a sí misma (auto-renovación) y células en un estado de mayor diferenciación (células progenitoras) mediante divisiones asimétricas.

- **Potencial de diferenciación o pluripotencialidad:** las SC son células indiferenciadas capaces de diferenciarse a diversos tipos celulares al ser inducidas por diferentes estímulos [23]. Este proceso estrictamente regulado da lugar a múltiples linajes somáticos por ejemplo células nerviosas, cardíacas y sanguíneas, adquiriendo las características morfológicas y funcionales propias de estos tipos celulares. Esta propiedad, junto con su capacidad de proliferación ilimitada (regulada por divisiones asimétricas o auto-renovación), es la que convierte a las SC en una fuente importante para la obtención de distintos linajes celulares.

- **Reconstitución funcional de un tejido en particular:** una característica general de las ASC es que permanecen quiescentes en condiciones de homeostasis tisular. Al entrar en el ciclo celular, pueden dividirse simétricamente para dar lugar a células idénticas a sí mismas. Alternativamente, pueden dividirse de modo asimétrico, resultando en una célula hija idéntica (auto-renovación) y una hija progenitora, o dos células hijas

progenitoras diferentes. La célula progenitora prolifera y se diferencia progresivamente, dando lugar a una expansión de poblaciones celulares comprometidas a un linaje celular específico. La presencia de *SC* en el tejido adulto puede ser un mecanismo compensatorio evolucionado de reemplazo de células en respuesta a injuria y/o un mecanismo requerido para el recambio en tejidos que tienen una alta renovación celular, tales como la piel y la sangre [24]. Estudios recientes describen la plasticidad de ciertas *ASC* en las que demuestra la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares, incluyendo algunos diferentes de su linaje de origen [25].

Marcadores específicos de pluripotencialidad de las SC

Luego de conocer las propiedades que caracterizan a las *SC* surge el interrogante si estas células tienen marcadores que las identifiquen como tales. En las últimas décadas, gran parte del estudio de las *SC* se ha dirigido a la identificación de los genes que son esenciales para mantener la pluripotencialidad de su genoma. La información actual se ha obtenido principalmente empleando sistemas funcionales diversos tanto *in vivo* como *in vitro*. De esta manera, se ha podido definir un grupo central de cuatro factores de transcripción: Oct-4 (POU5f1), Sox2, KLF4 y NANOG [26], que coordinan la expresión de diferentes genes que pueden ser agrupados como: factores de transcripción de segundo nivel (DPP3 o STELLA, REX1 o ZNF42, y Gbx2), marcadores de superficie celular (SSEA4 en humanos o SSEA1 en roedores), el transportador ABC (ABCG2) y de ciertas enzimas como la fosfatasa alcalina y la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT) [27].

Mediante la utilización de la técnica de secuenciamiento del ARN total de una sola célula ("*single-cell RNAseq*"), se ha identificado al conjunto específico de genes comunes tanto para el epiblasto en el blastocisto de pre-implantación (*Inner Cell Mass, ICM*) como para

las *ESC* que crecen en cultivo. Este conjunto de genes de pluripotencia es distinto del grupo de genes de la *ICM* de post-implantación. Los genes de pluripotencia no sólo incluyen Oct-4, NANOG, y Sox2, sino también a E-cadherina (CDH1), a los relacionados con los receptores de estrógenos β (ESRRB) y a los de ciertas moléculas de las vías BMP, Notch, Frizzled y DPP4. Finalmente, los genes relacionados a programas de diferenciación incluyen Sox9, algunos de la familia HOX, VE-cadherina, además de receptores y ligandos de factores de crecimiento como TGF β y FGFs [28].

Un concepto importante en la biología de las *SC* es que no hay un único factor de transcripción que deba ser sobre-expresado con respecto a cualquiera de los otros para mantener la pluripotencialidad: es un equilibrio constante entre los cuatro factores de transcripción centrales (Oct-4, Sox2, KLF4 y NANOG) que mantienen a la célula en el estado indiferenciado.

Nicho de las SC

En publicaciones recientes se han caracterizado pequeñas zonas de diferentes tejidos del organismo adulto donde reside el control de la actividad de las *SC* [29]. Este medio ambiente único y específico se denomina nicho.

Actualmente, se ha empezado a unificar el concepto de la regulación celular y molecular de estas células, concibiendo el concepto de nicho como ámbito adecuado en el cual se regula la división y la diferenciación. Se ha demostrado que todas las *SC* residen en un microambiente generado por las células que las rodean, conocidas como células de sostén. Las *SC* y otras células que conforman el nicho, interactúan entre sí, formando una unidad

funcional interdependiente que regula señales para perpetuar la auto-renovación, inducir el proceso de diferenciación y otras funciones como la de su propia muerte [30].

Las células de sostén que forman el nicho bordean generalmente la membrana basal del tejido adulto de interés, señalizan a las SC regulando su división y las salvaguardan de estímulos de diferenciación. Tal como se mencionara con anterioridad el proceso de división celular de las SC puede ser simétrico o asimétrico según lo determinen factores locales tales como hormonas y citoquinas y la matriz extracelular (MEC). Como ya se explicó, cuando las divisiones son simétricas, una SC puede producir dos células idénticas a sí misma y cuando las divisiones son asimétricas, la SC se divide y una de las células hijas se mantiene como célula madre para renovar el *pool* de las SC manteniendo y perpetuando de esta manera la conexión con el nicho. La otra célula que se obtuvo de la división asimétrica de la SC, se convierte en una célula progenitora destinada a dividirse y diferenciarse con la adquisición de características propias del tejido específico al que pertenece (Figura 3).

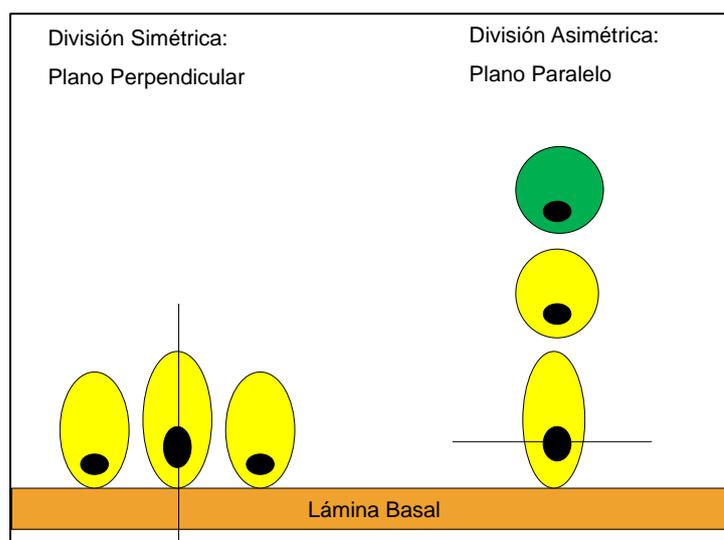


Figura 3. Esquema de los tipos de divisiones de una SC. En caso de ser simétrica, el plano de división es perpendicular a la membrana basal, mientras que si se genera una división asimétrica el plano es paralelo a la lámina basal del tejido de interés.

En esta expansión de poblaciones celulares en distinto grado de diferenciación, se ha reportado recientemente que existen **células amplificadoras transitorias**, que son menos primitivas que su célula progenitora y se dividen más frecuentemente que las SC, pero tienen un potencial proliferativo limitado siendo consideradas el paso inicial para la diferenciación final [20].

Cabe destacar que para poder reconocer un nicho, primero deben ser identificadas las SC mediante sus marcadores específicos, para luego determinar el medio ambiente en el que residen y sus interacciones con las demás células, factores locales y MEC [31]. Estas interacciones dotan al nicho de propiedades reguladoras y vías de señalización importantes para definir el destino de una SC. Cuando una célula progenitora inicia su programa de diferenciación puede ser localizada por distintas vías de señalización y factores locales en la MEC. Además, para adquirir su linaje específico deben actuar mecanismos básicos, en donde primero hay divisiones de células madre específicas. Por ejemplo, una célula madre en el nicho se contacta con el estroma; ésta se localiza asimétricamente y orienta su división para asegurar que sólo una célula hija herede las características de célula madre del nicho y se fije en ese microambiente celular. Al continuar la división celular, una nueva célula hija adquiere información heredada, se relocaliza alejándose de las células estromales y sus señales la estimulan a diferenciarse [32].

Uno de los cambios recientes en el paradigma de la biología de las SC ha sido el descubrimiento de su capacidad de diferenciarse en respuesta a componentes químicos y estructurales de la MEC. Las vías mecano-sensibles de la MEC podrían derivar en señales bioquímicas y biofísicas que obligan a la célula a diferenciarse a un linaje específico [33].

Plasticidad de las SC adultas

Como se mencionara previamente las **ASC son células obtenidas de tejidos de organismos adultos. Estas subpoblaciones celulares están encargadas de reemplazar a las células diferenciadas de tejidos u órganos con ritmo de recambio elevado y pueden reactivar sus funciones para la diferenciación,** según determinados estímulos presentes en su microambiente. Ellas participan **en el proceso continuo de división celular para mantener constante el número de células diferenciadas en tejidos que están sometidos a un desgaste natural por daño, enfermedad o muerte celular.**

Si bien la población de *ASC* es minoritaria, se ha demostrado su presencia en varios tejidos: médula ósea [34], sangre periférica, músculo esquelético, hígado [35], páncreas [36], epitelio de la piel [37] y del intestino [38], pulpa dental [39], córnea [40], cerebro [41], médula espinal e inclusive en nuestro órgano de estudio como lo es la glándula hipófisis. En muchos de ellos realizan una imprescindible tarea de auto-renovación y mantenimiento de la homeostasis tisular. El tipo de *ASC* del que disponemos mayor conocimiento son las del sistema hematopoyético de la médula ósea, capaces de regenerar completamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario [42]. Las *ASC*, sin embargo, son muy difíciles de aislar del órgano de estudio, mantener en condiciones de cultivo y obtener en un número importante para su estudio, debido a que su capacidad de proliferación *in vitro* es mucho más reducida que la de las *ESC*.

Actualmente, nuevos estudios hacen reconsiderar el concepto de la plasticidad de las *ASC* puesto que, bajo ciertas condiciones *in vitro*, estas células demuestran una potencialidad mucho más elevada de lo que se creía hasta ahora. Se ha comprobado que, tanto *in vitro*

como su inoculación *in vivo*, pueden generar tipos celulares de otros órganos, incluso células de capas germinativas diferentes de las originales. Células madre de la médula ósea, de origen mesodérmico, han sido diferenciadas a tejido neural, cuyo origen es ectodérmico [43]. Por otro lado, SC obtenidas del cerebro adulto han generado células hematopoyéticas o incluso muchos otros tipos celulares en un embrión quimérico. Varios estudios han demostrado cómo, después de trasplantadas, estas células son capaces de integrarse en el huésped y exhibir fenotipos maduros [44].

Aislamiento de ASC en cultivos primarios

Si bien se ha logrado aislar las ASC, optimizar las condiciones de cada tipo de cultivo de las mismas requiere de tiempo, debe lograrse que mantengan pluripotencialidad por el periodo deseado y conseguir una eficiente conversión a los tipos de células somáticas normalmente presentes en su órgano de origen. Los protocolos para diferenciación generalmente combinan la adición sucesiva de factores de crecimiento y hormonas durante varios días. En general, la eficiencia de diferenciación es bastante baja y parece ser un proceso aleatorio. Uno de los primeros protocolos descrito fue la conversión de las SC pancreáticas en células Beta productoras de insulina [45], el que actualmente se ha mejorado con el uso de otras técnicas.

Otra metodología que permite estudiar las ASC es la marcación de las mismas y su inoculación *in vivo*, que puede realizarse en el órgano de origen o un sitio utilizado como modelo como la cápsula renal. La inyección de ASC de origen humano en ratones o ratas inmunodeprimidas (cepas inmunocomprometidas o tratadas con ciclosporina) ha demostrado su capacidad de generar una gama completa de diferentes tipos de células

somáticas presentes en su órgano de origen y por lo tanto, se considera que las *ASC* son células pluripotentes [46].

En resumen, las *ASC* son más difíciles de estudiar que las *ESC*, y en consecuencia, en la actualidad se posee un menor conocimiento de su fisiología. Aunque todavía se carece de pruebas suficientes para sus nichos en diferentes tejidos, posiblemente las *ASC* presentan un equilibrado conjunto de marcadores en común con las *ESC*. Está descrito que las *ASC* expresan además, marcadores específicos dependiendo del órgano de origen. **El consenso actual es que la vida de las *ASC* en el nicho sigue un modelo estocástico lento de proliferación basal y un rumbo pausado hacia el compromiso y la diferenciación** [25].

Los estudios que se han realizado durante los últimos años demuestran que las *ASC* tienen la capacidad de transdiferenciarse, es decir, de dar origen a células de una capa germinal diferente de la cual ellas provienen. Sin embargo, todavía son muchas las preguntas que quedan por contestar y mucho lo que falta por conocer sobre la biología de estas células y sus posibles aplicaciones terapéuticas. Las nuevas herramientas disponibles para la investigación básica permiten prever avances importantes en los próximos años sobre la identificación y comprensión de la función de los genes implicados en la proliferación y la diferenciación celular. Este conocimiento será fundamental en el diseño de nuevas y mejores estrategias en la utilización de las *ASC* en los campos de la regeneración tisular y la terapia celular.

Homeostasis hipofisaria y neogénesis celular

La glándula hipofisaria cumple importantes funciones endocrinas regulando la mayor parte de los procesos biológicos del organismo relacionados principalmente a funciones

fisiológicas básicas tales como: el crecimiento [47], homeostasis metabólica [48], la gestación y lactancia [49, 50]. Esto es posible mediante la integración de complejas señales provenientes de la periferia y órganos centrales, así como también de las generadas en la misma glándula [51] regulando la liberación de hormonas y/o la proliferación de los tipos celulares que componen el adenoparénquima (AP) [52, 53]. Así, mientras que la secreción hormonal trófica es controlada de manera precisa para regular la homeostasis, las respuestas plásticas en el crecimiento y proporción de células pueden derivar en hipoplasia, hiperplasia o adenomas hipofisarios [54].

Estudios reportados por diferentes investigadores, inclusive por nuestro grupo de trabajo, han demostrado que células endocrinas diferenciadas exhiben una mayor tasa de proliferación en ciertos estadios reproductivos tales como ciclo estral, gestación y lactancia [55, 56]. Además, recientemente, se ha documentado la generación de nuevas células endocrinas a partir de SC [57, 58]. En conjunto, estas evidencias condujeron a proponer cambios en paradigmas existentes sobre la dinámica de la neogénesis celular en la hipófisis y a la postulación de nuevos mecanismos involucrados en este proceso. De esta manera se proponen como posibles mecanismos a la transdiferenciación (conversión inter-fenotipo)[59, 60], mitosis de células diferenciadas pre-existentes, [61, 62] y el reclutamiento y diferenciación de SC [63, 64]. Sin embargo, al presente, es escaso el conocimiento sobre la contribución del nicho de SC en procesos fisiológicos que requieren una mayor demanda de células hipofisarias endocrinas y en el desarrollo de lesiones proliferativas adenomatosas.

Aspectos anatómicos de la hipófisis de roedores: la zona marginal

La hipófisis es una glándula intracraneal que se ubica debajo del hipotálamo, en una pequeña depresión del hueso esfenoides denominada *silla turca*. Esta glándula está compuesta por la neurohipófisis ubicada en la zona superior, la adenohipófisis que adopta una forma cuneiforme por debajo de la neurohipófisis y el lóbulo intermedio localizado entre la neuro y la adenohipófisis. Se describe además una cavidad residual de la bolsa de Rathke, el *cleft*, que se encuentra en estrecho contacto con la llamada zona marginal (ZM), en continuidad con la adenohipófisis (Figura 4).

Desde el punto de vista embriológico, morfológico, estructural y funcional se distinguen en la hipófisis de rata tres partes bien diferenciadas:

- Pars nervosa (PN) o Neurohipófisis: es una región que comprende axones de las neuronas de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular, que secretan las hormonas vasopresina y oxitocina.
- Pars distalis (PD) o Adenohipófisis: formada por 5 tipos celulares responsables de la síntesis y liberación de hormonas de crecimiento (GH), prolactina (PRL), adrenocorticotrofina (ACTH), tirotrófina (TSH) y las gonadotropinas, la folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) y por células que se disponen en pseudo-folículos, denominadas células folículo-estrelladas (CFE).
- Pars intermedia (PI) o Lóbulo Intermedio: se distinguen células que producen polipéptidos llamados melanotrofinas u hormonas estimulantes de los melanocitos, que inducen el aumento de la síntesis de melanina en las células de la piel.

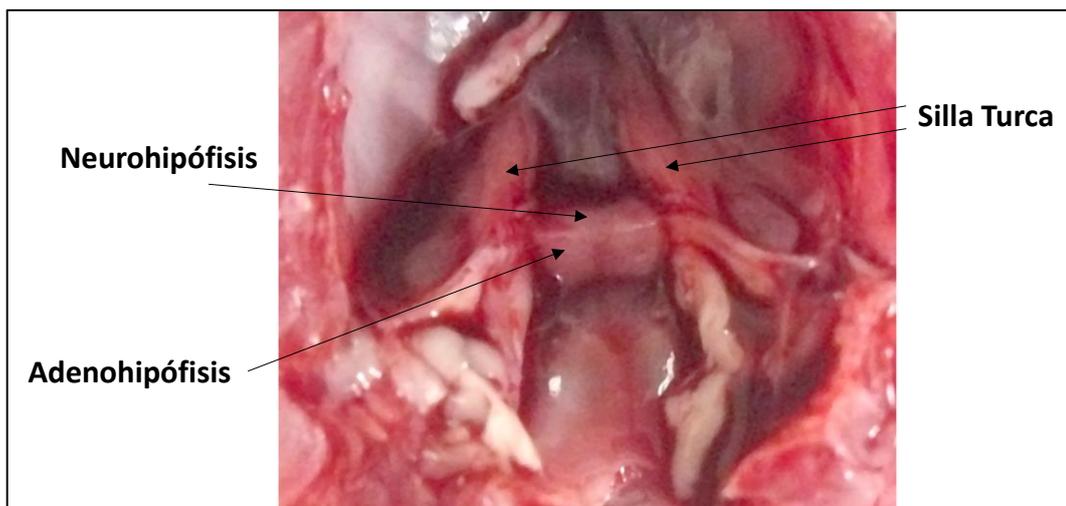


Figura 4. Anatomía y localización de la glándula hipófisis en la rata. La hipófisis está protegida por el hueso esfenoideas y recubierta por la duramadre. En roedores se distinguen dos partes bien diferenciadas anatómica y funcionalmente, la adenohipófisis y la neurohipófisis. Modificado de Pérez y col. 2015 [65].

Desarrollo embriológico de la hipófisis: localización de las SC

En roedores, el primer esbozo de desarrollo de la hipófisis ocurre a los 7,5 días post coito (dpc) con la aparición de un engrosamiento del ectodermo en la línea media de la cresta neural anterior, conocido como placoda hipofisaria (Figura 5). Durante este estadio puede observarse en la parte posterior adyacente, el desarrollo de un territorio hipotalámico presuntivo [66]. En las siguientes 24 h, mientras el tubo neural anterior se curva y expande rápidamente, la placoda hipofisaria se desplaza ventralmente dentro del ectodermo en el techo de la futura cavidad oral. Hacia los 9 dpc la placoda forma la bolsa de Rathke rudimentaria y el primordio del lóbulo anterior e intermedio. A los 10,5 dpc, una región restringida al diencéfalo ventral, por encima de la bolsa, da lugar al infundíbulo del cual tendrán origen la hipófisis posterior y el tallo pituitario. La yuxtaposición de la bolsa de Rathke y el diencéfalo se mantiene durante las primeras etapas de la organogénesis hipofisaria. Esta estrecha relación facilita las interacciones entre los tejidos neurales y el ectodermo bucal fundamentales para las etapas iniciales de la especificación

pituitaria. A los 10,5 dpc la bolsa está desarrollada y al día 12,5 está completamente separada del ectodermo bucal subyacente. La hendidura hipofisaria o *cleft* persiste como la separación entre el lóbulo anterior y el lóbulo intermedio en la glándula madura. La naturaleza de las interacciones inductivas necesarias para la morfogénesis hipofisaria hace que sea muy sensible a mutaciones deficitarias o de ganancia en determinada función. A su vez, estas mutaciones pueden ser de carácter informativo en cuanto a los mecanismos que subyacen a la conducción, invaginación y conformación de la bolsa [67], la migración celular, los patrones de tejido y la especificación de destinos celulares.

La bolsa de Rathke comprende células progenitoras en un estado activo de proliferación que gradualmente se reubican en la zona ventral, lejos de la luz, comenzando a diferenciarse. Recientemente, se ha reportado una zona que contiene células *stem*/progenitoras que se mantiene en el embrión y que persiste en el adulto, la zona marginal (ZM) [68, 69]. Ventralmente, esta relocalización está asociada con la salida del ciclo celular [70] y aún no se sabe si es un evento de migración activa o un proceso pasivo de las células expulsadas por nuevas que proliferan en la ZM.

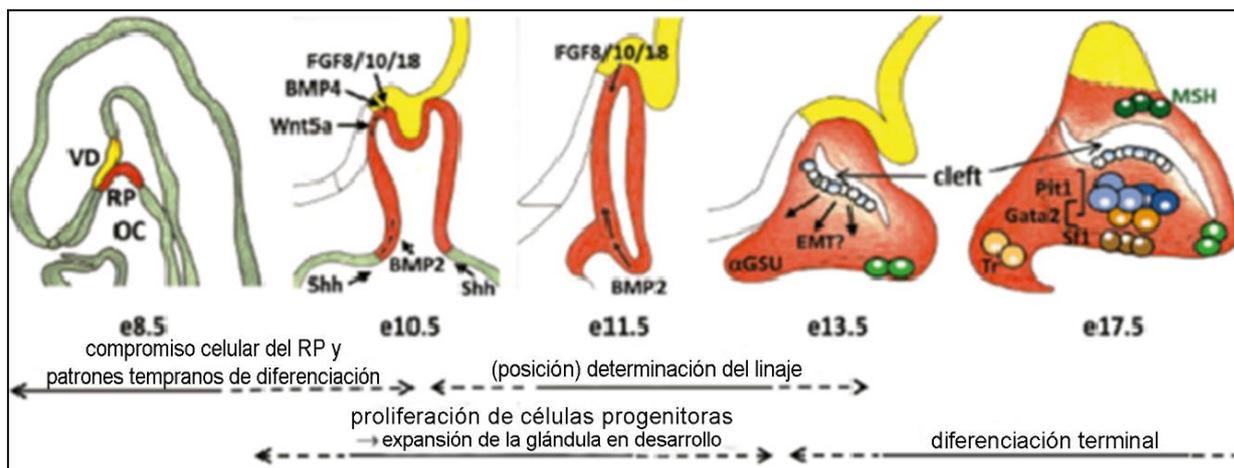


Figura 5. Representación esquemática del desarrollo embrionario hipofisario. Secciones sagitales de la hipófisis de roedor donde se esboza el desarrollo de la hipófisis, el cual comienza (e8,5) cuando la bolsa de Rathke (RP) se aleja del techo de la cavidad oral (OC), mientras que la parte posterior del diencefalo ventral (VD) se extiende hacia abajo para formar el infundíbulo -PN (amarillo)- contacta íntimamente con el RP. Shh, que se expresa inicialmente en todo el ectodermo oral comienza a ser excluido de la RP. BMP4, FGF8/10/18 y Wnt5a señales que emanan del VD y son esenciales para iniciar la formación y compromiso celular del RP. A partir de e11,5, la bolsa comienza a expandirse y por e12,5 se separa de la vía oral del ectodermo. Células progenitoras-proliferativas están presentes en la ZM alrededor de la hendidura. Las células progenitoras podrían migrar como resultado de transición-epitelio-mesenquimal (EMT). En e17,5, se establecen varios gradientes de factores de transcripción (Pit1, GATA2 y Sf1) que dirigen la diferenciación final de los diferentes tipos celulares. Tr, punta rostral de tirotropas. Modificado de Vankelecom y col. 2012 [71].

Células de la ZM candidatas a ser SC en la hipófisis adulta

Un argumento topográfico a menudo utilizado para justificar la presencia de SC en esta zona es que su localización es una reminiscencia de la ubicación de las células *stem*/progenitoras descritas durante el desarrollo embrionario de la glándula (Figura 6). Este antecedente es coincidente con lo que se describe para el nicho de SC en las capas endimarias alrededor de los ventrículos del cerebro [72]. Un motivo adicional es que las células inmunoreactivas para las hormonas adenohipofisarias se encuentran en estrecha proximidad a la ZM, sugiriendo que las células marginales podrían generar células endocrinas. Aunque sólo se han reportado evidencias indirectas de dicho proceso, se ha hipotetizado que las células marginales podrían ser células de apoyo o bien regular el proceso de diferenciación, en lugar de ser predecesores directos.

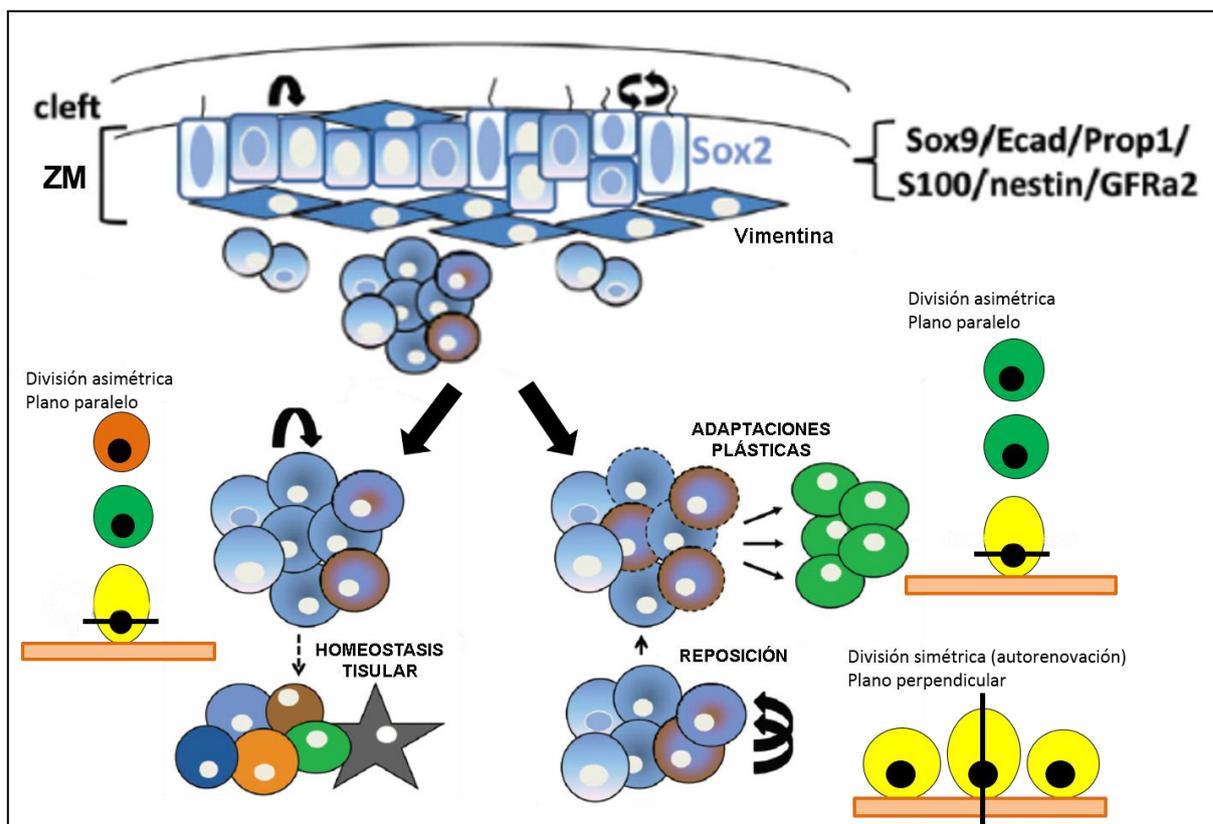


Figura 6. Representación propuesta para el nicho de células stem/progenitoras en la glándula hipofisaria posnatal. La ZM se propone como nicho "primario" de estas células. La capa de células que limitan con la hendidura alberga SC, así como células progenitoras, en diferentes estados de diferenciación. Sólo en raras ocasiones, las células marginales se dividen, ya sea de forma simétrica para producir dos células madre, o asimétricamente para generar una célula progenitora que se dirigirá al AP. Para la renovación basal del tejido (inferior izquierda), las células progenitoras generarían nuevas células productoras de hormonas. En caso de una mayor demanda hormonal (adaptaciones plásticas), las células progenitoras se diferenciarían rápidamente en células hormonales necesarias, resultando en una reducción transitoria del pool de células madre que se repone por mitosis (flechas dobles). Modificado de Vankelecom y col. 2012 [71].

Otro fundamento para proponer a las células de la ZM como SC se relaciona a los hallazgos obtenidos del trasplante ectópico de hemihipófisis de rata en el área subcapsular del riñón, resultando en necrosis de las células granulares, con actividad mitótica de las células marginales [73]. Las células granulares se encuentran en estrecha asociación con las células marginales, lo que sugiere un papel progenitor de éstas. Sin embargo, nuevamente, surge el interrogante si las células marginales podrían funcionar como células progenitoras o células de apoyo para el desarrollo de nuevas células endocrinas.

Sobre la base de todos estos hallazgos, la ZM (Figura 7) presenta más de un argumento cierto propuesto para ser considerada como el reservorio de SC (nicho) en la hipófisis postnatal [74, 75].

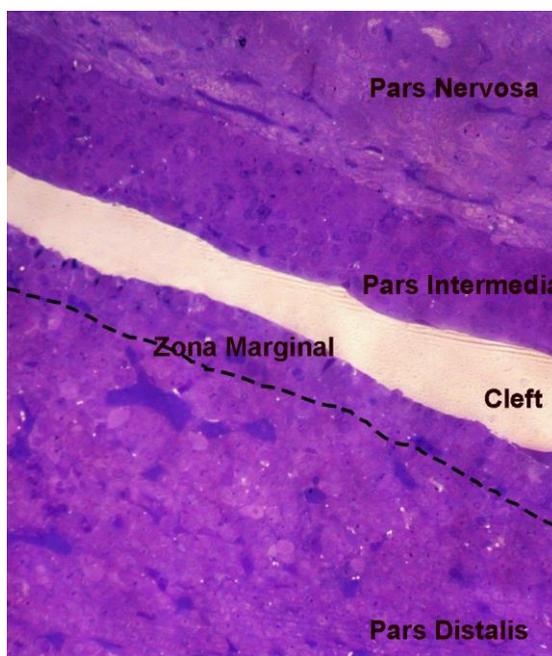


Figura 7. Microscopía óptica de alta resolución de sección de glándula hipófisis de ratona adulta coloreada con azul de toluidina. Obsérvese la localización de células marginales bordeando el *cleft*. Magnificación original 400x.

Marcadores de pluripotencialidad de SC de hipófisis

Como se reportara en otros órganos, es imprescindible referir la presencia de marcadores de pluripotencialidad de SC en adenohipófisis. Garcia-Lavandeira y col. [76] propusieron al receptor alfa 2 (GFRa2) de la familia de factores neurotróficos derivados de la línea celular glial (GDNF) como marcador específico de SC en la hipófisis adulta de roedores y humanos. Este receptor pertenece a una familia de proteínas no integrales de membrana ancladas extracelularmente por un residuo glicosil-fosfatidil-inositol. Al unirse a su principal ligando neurturina, se induce la activación de su co-receptor, Ret, que al poseer dominios tirosin-quinasa funciona como la subunidad transductora de la señal. En el

desarrollo de neuronas, GDNF se caracterizó originalmente como un factor de crecimiento que promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral. Posteriormente, se demostró que tenía un potente efecto de supervivencia en las neuronas motoras y otras subpoblaciones neuronales en el sistema nervioso central y periférico. Además de su papel como un factor de supervivencia, GDNF es también esencial para la proliferación, migración y diferenciación de células neuronales [77].

En la hipófisis adulta ha sido descrito una población de células inmunopositivas para GFRa2, restringidas a una sola capa de la ZM, representando menos del 1% de la totalidad de la población de células de glándula pituitaria [76]. **Adicionalmente, más del 90% de estas células co-expresan GFRa2 con los marcadores Sox2 y Sox9. Esta particularidad sugiere la existencia de diferentes poblaciones celulares de fenotipo progenitor/células amplificadoras transitorias** [68]. Otro punto de importancia en la investigación de marcadores de pluripotencialidad es la expresión en la mayoría de las células GFRa2+ de los marcadores E-cadherina y PROP1, siendo éste un importante factor de transcripción hipofisario involucrado en la activación del factor de transcripción Pit-1, que interviene en la diferenciación terminal de los tipos celulares: lactotropas, tirotropas y somatotropas [78] (Figura 8). Sin embargo, a pesar de estas evidencias, el rol preciso de GFRa2 en la hipófisis del adulto aún sigue siendo objeto de estudio. Se ha reportado que el mismo no es detectable cuando las células expresan marcadores de diferenciación terminal como hormonas, lo que sugiere un rol transitorio durante el proceso de diferenciación. Resulta particularmente interesante establecer el perfil de expresión de GFRa2 para poder vincularlo en los procesos de diferenciación de las ASC o en los procesos de especificación celular durante el desarrollo hipofisario en la embriogénesis.

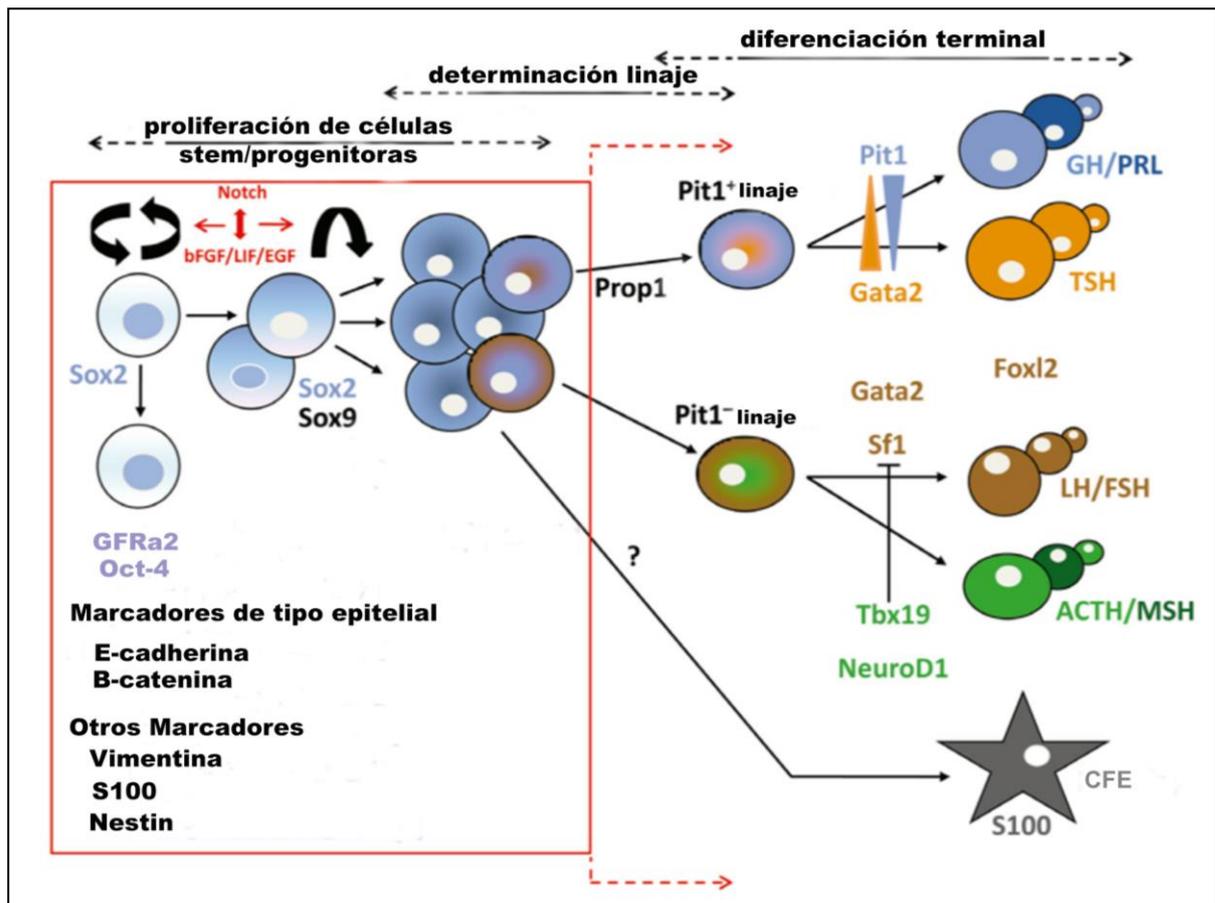


Figura 8. Diagrama del proceso de diferenciación a partir de células *stem/progenitoras* para originar células endocrinas de la hipófisis posnatal: factores y vías que controlan este proceso. Las CSH hipotéticamente, pueden auto-renovarse para producir nuevas CS/P que proliferan expandiéndose a una población de células amplificadoras transitorias. Dentro de este grupo de células se activan programas de diferenciación similares al embrionario. La actividad nuclear de Sox2 (indicado por el azul en el núcleo) mantiene estas células multipotentes reprimiendo la expresión de genes que inducirán diferenciación. La translocación del núcleo (núcleo blanco) activa rápidamente el proceso de diferenciación, activando Sox9, que se expresaría y/o gestionaría la etapa de células progenitoras. Múltiples factores (como Hesx1, Pitx1/2, LHX3/4, Isl1, Otx2, Six1/4/6, Pax6, Prop1), junto con la señalización de Shh, Wnt, y Notch, reiteran la red interactiva embrionaria para gobernar la proliferación y la supervivencia de las CS/P, así como la determinación de los tipos de células en una secuencia gradual y regulada temporalmente. La diferenciación final requiere de la expresión de factores de determinación como Pit1, Tbx19, SF1 y GATA2. También se forman las CFE maduras, caracterizadas por la expresión de S100. Modificado de Vankelecom y col. 2012 [71].

Evidencias de ASC en la hipófisis

Células propuestas como candidatas de SC en la hipófisis

Como se explicó anteriormente, se ha demostrado la existencia de SC en un gran número de tejidos adultos, habiéndose también propuesto diferentes tipos celulares

adenohipofisarios como posibles candidatos para *SC*. Sin embargo, su identificación y caracterización en esta glándula todavía no ha sido aclarado.

Los primeros estudios realizados para identificar células primordiales en hipófisis fueron realizados teniendo como base la capacidad tintorial de las poblaciones que componen la adenohipófisis. Así se clasificaron cuatro tipos celulares: células cromóforas como posibles *SC*, células acidófilas y basófilas, productoras de hormonas y células intermedias que presentaban afinidad tintorial por colorantes acidófilos y basófilos. Sin embargo, no se obtuvieron evidencias concluyentes acerca de la identidad de las *SC*, debido a limitaciones en la metodología utilizada [79].

Estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales posteriores, llevados a cabo tanto en hipófisis humanas tumorales como no tumorales, permitieron identificar que las células folículo estrelladas (CFE), pueden transformarse en células endocrinas mediante una retrodiferenciación [80]. En adenomas productores de prolactina se observaron formación de folículos con CFE positivas para S-100 y GFAP; además, de otros folículos que exhibieron un epitelio inmunonegativo para las mencionadas proteínas. La expresión de estos dos marcadores se limitaba a la fase inicial de la formación de CFE, sugiriendo que podrían ser un tipo de células madre adultas pluripotentes. Sin embargo, en este estudio no se analizó ningún marcador específico asociado a la pluripotencialidad de las *SC*, por lo cual no se demostraron evidencias ciertas de que las CFE serían *SC* en hipófisis adulta.

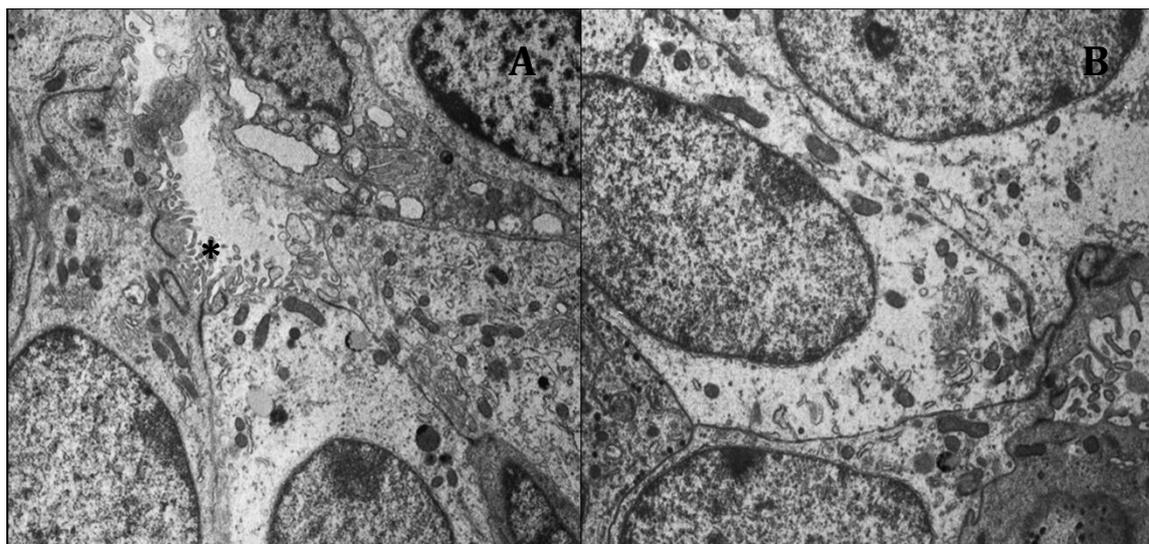


Figura 9. Morfología ultraestructural de las CFE. A) Se observa que las células foliculares poseen una forma irregular y constituyen pequeñas agrupaciones como islotes alrededor de un pseudo-lumen en el que se visualizan microvellosidades (asterisco). B) Las CFE exhiben características ultraestructurales similares a las células marginales como presencia de microfilamentos y agranularidad, escaso retículo endoplasmático rugoso (RER) y abundantes ribosomas libres. Magnificación original 10000x.

En diferentes tejidos adultos se ha reportado que las SC expresan transportadores de membrana que bombean hacia el espacio extracelular los colorantes vitales como el AMCA, sustancia fluorescente que se acumula en las CFE [81]. Otro transportador descrito, es la enzima convertidora de angiotensina (ACE) la cual se expresa en las SC hematopoyéticas humanas y mesenquimales. En 2005, Lepore y col. describieron una población de células formadoras de colonias (PCFCs) en hipófisis de ratón, inmunopositivas para transportadores de membrana tales como: AMCA, ACE y Sca-1 [82]. Las células PCFC son capaces de crecer *in vitro* como colonias adherentes, con una limitada capacidad de diferenciación a células productoras de GH y de PRL. Estos datos permitieron sugerir que las células PCFC, presentaban características de CFE y de SC, sin demostrárseles capacidad de auto-renovación ni pluripotencialidad. Tampoco se evidenció que fueran capaces de diferenciarse a otro tipo de células hipofisarias

secretoras diferentes de las somatotropas y las lactotropas, así como a otros linajes celulares y además, no se analizó la expresión de otros marcadores específicos de SC.

La presencia de SC en hipófisis también fue estudiada utilizando el marcador Hoechst, mediante citometría de flujo. Se seleccionaron las células por su baja marcación con este colorante vital, ya que expresan en su membrana plasmática el *ATP-binding cassette (ABC) multidrug transporters ABCG2 (Bcrp1)*. Esta población celular ha sido denominada como “*side population*” (SP). Mediante PCR cuantitativa se comprobó que las mismas son positivas para los marcadores de SC: Sca-1, Oct4, Nanog, Nestin, CD133 y Bmi-1, los que también se expresan en SC adultas hematopoyéticas. A su vez, se han demostrado factores que son esenciales para el desarrollo temprano de la hipófisis y que están involucrados en la regulación de las SC correspondiendo a componentes de las vías de señalización de Notch, Wnt y Shh. Además, se demostró que la SP enriquecida con Sca-1 al ser cultivada formó esferoides que conservaban las mismas características de las células SP aisladas inicialmente, siendo capaces de replicarse durante dos generaciones [63, 83]. Estos resultados proponen a la SP como posibles SC de la hipófisis. Sin embargo, falta por corroborar su capacidad de auto-renovación ilimitada y el carácter pluripotente propio de este tipo celular.

Posteriormente, se describió la expresión de Sox2, en células de ZM y en grupos dispersos en el AP de hipófisis de ratón, mediante la técnica de inmunofluorescencia [68]. Las células Sox2+ fueron aisladas y cultivadas como estructuras esferoidales positivas para E-cadherina y negativas para S-100 y Sox9. Sin embargo, al inducir la diferenciación de estas estructuras con medios de cultivo específicos se observó expresión nuclear de S-100 y Sox9, demostrando además la capacidad de diferenciarse a los diferentes linajes de células

endocrinas. Este trabajo sugiere que las células Sox2+/Sox9+ tienen características de células amplificadoras transitorias, mientras que aquellas Sox2+/Sox9- podrían ser células de fenotipo *stem*/progenitor. Estos hallazgos resultan un avance en el campo del conocimiento de las células madre adenohipofisarias, pero aún deben realizarse otros ensayos para purificar las dos poblaciones de células Sox2+ y estudiar en más detalle sus características de SC y/o progenitora.

En otra línea de investigación se demostró la presencia en ZM de una población celular que expresa Nestin mediante la utilización de un ratón transgénico GFP-*nestin* [69]. Los estudios realizados *in vitro* sobre este tipo celular permitieron concluir que las células Nestin+ tienen capacidad de auto-renovación y que tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* pueden diferenciarse hacia los diversos tipos celulares hipofisarios. Sin embargo, surgen controversias metodológicas en este modelo al analizar las células GFP+, por la falta de controles como el de la expresión endógena del gen de Nestin, asumiendo que todas las células GFP+ eran Nestin+.

Pese a las evidencias expuestas, aún se desconoce cómo todos estos fenotipos celulares se relacionan entre sí, o en qué medida se superponen. Además, a pesar de esta cantidad considerable de datos, ninguno presenta inequívocamente evidencias directas de que las células candidatas muestren un genotipo y fenotipo de células madre y si exhiben características esenciales de SC, tales como la capacidad de auto-renovación y de diferenciación en las diversas células hormonales y de otra capa embrionaria distinta a la de la glándula.

Renovación celular en la hipófisis adulta

Recordando el rol crítico que desempeña la glándula hipofisaria en procesos fisiológicos vitales, resulta de importancia una remodelación cuantitativa y funcional dinámica y altamente precisa de los diversos tipos celulares productores de hormonas. Variaciones en la composición celular hipofisaria, en forma conjunta con adaptaciones en su actividad secretora, han sido reportadas durante el crecimiento, la pubertad y el ciclo reproductivo [51, 52, 84].

Uno de los principales estimuladores del crecimiento de la glándula hipofisaria es el estradiol (E2). Durante el ciclo estral, específicamente en la tarde del estro, el E2 ha sido propuesto como responsable del incremento en el número de células mitóticas adenohipofisarias (figura 10-A) [85]. Además, al término de la preñez y durante de la lactancia se ha observado un incremento en la población de células lactotropas, sugiriendo que el E2 ejercería efectos tróficos en esta población celular (Figura 10 B-C)[52]. Teniendo en cuenta estas evidencias, hipotetizamos que el E2 en la glándula hipofisaria adulta, podría actuar como un agente sensibilizador de las CSH induciendo a esta población celular a responder a diferentes estímulos del microambiente (nicho) en determinadas condiciones. Esta hormona se ha postulado como un agente regulador en la diferenciación de *ESC*, ya que ha sido demostrada su capacidad morfogénica en un cultivo de *ESC* al diferenciarlas a células neuronales [86]. Además, en cultivos de glándula mamaria se ha reportado que el E2 disminuye el número de *SC*, manifestándose también en una menor expresión de marcadores de fenotipo *stem* como Oct-4, Sox2 y Nanog [87].

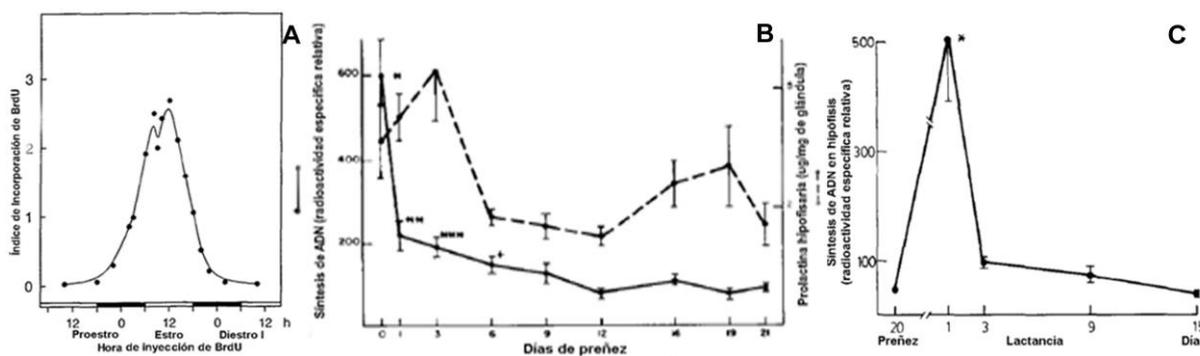


Figura 10. Proliferación celular adenohipofisaria evaluada durante las fases del ciclo estral (A) y durante la preñez y lactancia (B y C). Gráficos extraídos de Hashi y col.1995 [85] y Jahn y col.1984 [88] con modificaciones.

La remodelación de las poblaciones celulares en la hipófisis también ocurre en el caso de un déficit endocrino súbito, provocado por una caída en la retroalimentación negativa de las hormonas periféricas. Por ejemplo, la adrenalectomía aumenta rápidamente la actividad mitótica en el AP e induce un incremento rápido y transitorio en el número absoluto de células corticotropas [48, 89].

A diferencia del dinamismo descrito en estos estados de adaptación, la renovación celular diaria en la hipófisis adulta es baja [90, 91]. Las células que constituyen el AP adulto de rata se sustituyen cada 6-10 semanas, lo que corresponde a un volumen diario de renovación de alrededor de 50.000 células [48, 58], rango de renovación basal similar a la reportada para otros tejidos como tráquea, corazón y pulmón [92-94].

Hasta el presente, los mecanismos que subyacen al origen de nuevas células productoras de hormonas en la glándula hipofisaria no están totalmente esclarecidos. Datos aislados han informado que la remodelación en las células endocrinas podría ocurrir a través de la mitosis de células pre-existentes, así como de la transdiferenciación de las células hormonales [59, 60]. Sin embargo, algunos de estos modelos propuestos anteriormente

han sido seriamente cuestionados. Por ejemplo, la rápida expansión de células corticotropas después de la adrenalectomía puede ser explicada en parte por la mitosis de las células diferenciadas existentes y además, por diferenciación de un grupo de células pre-existente hormona-negativas [53, 57]. En el caso de las gonadotrofinas, la misma población de células no hormonales parece responder a la gonadectomía mostrando una mayor actividad mitótica [58]. Mecanismos similares a los descritos para células corticotropas y gonadotropas han sido reportados para la proliferación de células lactotropas como el observado durante diferentes estados reproductivos como ciclo estral, la gestación y lactancia [56]. En base a estas evidencias, hay una serie de reportes que hipotetizan que durante las adaptaciones plásticas y en la renovación celular basal hipofisaria, nuevas células endocrinas podrían generarse a partir de la diferenciación de células no hormonales, proponiéndolas como una población de *SC*.

Como es conocido, un número restringido de órganos adultos son capaces de restaurar el tejido después de una injuria física o química [95-97]. En varias de estas respuestas regenerativas, las *SC* parecen participar, como se ha observado durante la regeneración del tejido muscular después de un daño físico o la inyección de una toxina: por ejemplo, las *SC* del músculo (células satélites) comienzan a proliferar y formar mioblastos, que además se fusionan para generar nuevos miotubos [98]. En otros órganos, la participación de las *SC* en la regeneración es menos clara o si es que se halla presente solo ocurriría bajo ciertas condiciones fisiopatológicas (*SC* facultativas) [99]. La regeneración hepática es, en la mayoría de los casos, impulsada por una extensa proliferación de hepatocitos diferenciados, pero cuando estas células se ven comprometidas en la respuesta proliferativa debido a enfermedad o injuria química, las *SC* entran en juego y conducen la

respuesta regenerativa [100]. En el páncreas, las células Beta son capaces de multiplicarse para la restauración del tejido, pero las células ductales progenitoras parecen estar involucradas en circunstancias más graves de daño tisular [101]. Sin embargo, en situaciones que involucran marcado deterioro del tejido, el reclutamiento y diferenciación de las SC, no es capaz de suplir la regeneración tisular completamente, como ocurre por ejemplo en las enfermedades neurodegenerativas [102] y el infarto agudo de miocardio [103].

Hasta hace muy poco tiempo, se desconocía si la glándula hipofisaria adulta tenía el potencial de regenerar células dañadas durante una injuria celular. En un estudio reciente, se ha desarrollado un ratón transgénico Cre/lox en el cual se pueden generar daños hipofisarios a través de la ablación condicional de células endocrinas [96, 104]. En un primer modelo, las células somatotropas fueron objeto de ablación por la inyección de la toxina de la difteria. La ablación de las células somatotropas provocó una respuesta inmediata de células Sox2+. Las SC expandidas en número, comenzaron a proliferar y además presentaron co-localización con la hormona GH, efecto no observado en las glándulas control. Estos datos indican una activación del compartimento de SC que puede ser dirigido a la restauración de las células GH+. Después de 4-5 meses después de la ablación, las somatotropas se regeneraron de manera significativa (~50%) [96]. En otro estudio reciente, usando inestabilidad cromosómica inducida por Cre se generó la muerte por apoptosis de células corticotropas en división. Sin embargo, no se detectaron cambios en los marcadores de SC ni en la regeneración de las corticotropas destruidas. En contraste con los modelos de lesión aguda, el agotamiento de células ACTH+ se desarrolló durante 8,5 meses y se mantuvo limitado al 50% como consecuencia de la penetrancia

incompleta del transgen POMC-Cre. Probablemente este modelo de injuria celular no fue lo suficientemente potente y repentino para provocar una de respuesta de las SC. Por otra parte, el lento agotamiento de las células ACTH+ puede ser compensado continuamente de tal manera que el equilibrio entre la población de corticotropas y las células progenitoras no se vea perturbado. Por último, el 50% restante de estas células puede ser suficiente para mantener la homeostasis de la glándula y por lo tanto, no ser necesaria su regeneración [105]. En estos modelos de ratones transgénicos, debe tenerse en cuenta que la muerte celular inducida no puede ser considerada como un modelo fisiológico normal para mantener la homeostasis de la glándula hipofisaria adulta.

Considerando las evidencias expuestas, nuevamente surge el interrogante si en situaciones fisiológicas de elevado recambio celular de la glándula hipofisaria, el nicho de SC contribuiría en la generación de poblaciones celulares en diferentes estadios de diferenciación para suplir el requerimiento de nuevas células endocrinas maduras. Exactamente cómo y cuándo ocurriría este mecanismo tampoco está claro. Los eventos específicos y los factores involucrados en el remodelamiento funcional durante estadios reproductivos se desconocen. La gestación y lactancia representan modelos fisiológicos adecuados para analizar la participación de la población de SC. En un intento de elucidar este mecanismo, se propone identificar y caracterizar a las SC en la glándula hipofisaria a nivel ultraestructural en combinación con técnicas de biología molecular para evaluar posibles cambios en los marcadores asociados a un fenotipo de SC en la ZM y el AP en los modelos de estudio propuestos. Dilucidar estos aspectos permitirá ampliar el conocimiento sobre la contribución del nicho de SC al mantenimiento de la homeostasis

de la hipófisis durante las adaptaciones fisiológicas que ocurren en diferentes estados reproductivos.

Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la contribución de las células *stem*/progenitoras en la renovación de la población de células adenohipofisarias en estados fisiológicos reproductivos.

Objetivos Específicos:

- 1- Identificar y caracterizar la población de *SC* en hipófisis de ratas adultas.
- 2- Aislar y cultivar las *SC* para analizar sus características de células indiferenciadas a partir de hipófisis de ratas adultas.
- 3-Evaluar posibles cambios en los marcadores de la población de *SC* y células progenitoras durante el ciclo estral, en la preñez y lactancia.
- 4- Estudiar potenciales fluctuaciones en la dinámica de proliferación celular en la ZM y AP de hipófisis en la preñez y lactancia.

Materiales y Métodos

Animales y diseño experimental

Ratas hembras de la cepa Wistar vírgenes de 3 meses de edad fueron examinadas por la técnica citológica del frotis vaginal y asignadas en la fase estro o diestro II. Sólo las ratas que completaron las fases de estro en más de dos ciclos se incluyeron en este estudio. Luego, las ratas se aparearon con machos fértiles testeados y se dividieron en los siguientes grupos:

A- Grupo ciclo estral: se utilizaron ratas a las cuales se les realizaron extendidos citológicos del flujo vaginal para determinar las fases proestro, estro, diestro I y diestro II del ciclo estral. Se incluyeron los animales en los cuales se les constató un ciclo de 4 días y repitiéndose el ciclo 2 veces consecutivas. Se utilizaron en el estudio las fases estro y diestro II. Las ratas que se encontraron en la fase estro se sacrificaron a las 17.00 h de ese día, hora que coincide con el pico estrogénico [88]. Durante el diestro II no se registran variaciones de los niveles estrogénicos durante el día; las ratas de este grupo se decapitaron a las 10.00 h [106].

B- Grupo gestación: incluye a los subgrupos:

- Ratas en fase estro con espermatozoides en su frotis vaginal, denominado cópula (COP)
- Ratas con cinco (d5G) y quince días (d15G) de gestación después de la cópula
- Ratas a término de la gestación (AT, 23 ± 2 días)

C- Grupo Lactancia: ratas preñadas fueron transferidas a jaulas individuales hasta el día del parto. Al nacer, el número de crías se ajustó a ocho, luego las madres fueron sacrificadas al inicio (d1L o lactancia temprana) o después de cuatro días de lactancia (d4L o lactancia activa).

Todas las ratas fueron criadas y alojadas en el bioterio del Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba, bajo temperatura ($21\pm 3^{\circ}\text{C}$) y condiciones de iluminación (14:10 h ciclo luz-oscuridad) controladas, tuvieron libre acceso a los alimentos comerciales de roedores y agua corriente de red. Los animales se mantuvieron de acuerdo con las normativas de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (1996) y los experimentos fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Córdoba.

Las ratas fueron decapitadas y las hipófisis fueron removidas luego de los 10 s siguientes, evitando cualquier estrés por estímulos externos de acuerdo a Las Guías Internacionales de Entrenamiento y Manejo de Animales de Laboratorio, publicadas por la Federación Universitaria para el cuidado de animales y el Comité de Cuidado de Animales.

Caracterización de la ZM por microscopía óptica de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión

Las células de la ZM se estudiaron en hemihipófisis de ratas adultas, después de haber sido fijadas por inmersión en solución de Karnovsky: 4% (v/v) de glutaraldehído, 4% (p/v) de formaldehído en buffer cacodilato 0,1 M. Los fragmentos hipofisarios fueron post-fijados con tetróxido de osmio al 1% (Sigma, St. Louis, MO), se deshidrataron en acetonas de graduación creciente y se incluyeron en la resina Epon/Araldita (Electron Microscopy, Hatfield, PA). Para el análisis por microscopía óptica de alta resolución (MOAR), se obtuvieron secciones semifinas (200 μm) con ultramicrotomo (Power Tome XL, Boeckler Instruments, USA), se tiñeron con azul de toluidina al 1% en tetraborato de sodio y se observó la morfología de las células de la ZM usando un microscopio óptico

(Leitz-Laborlux 12). Para el análisis ultraestructural se obtuvieron secciones finas (60-90 μm) las que fueron contrastadas con acetato de uranilo/citrato de plomo y examinadas en el microscopio electrónico Zeiss-Leo 906-E, siendo fotografiadas con una cámara Megaview II.

Inmunocitoquímica ultraestructural

Para inmunocitoquímica ultraestructural (ICQU), las glándulas hipofisarias se cortaron en 2 trozos pequeños en orientación coronal. Luego, estas glándulas se fijaron durante 4 h en una solución de: 4% (p/v) de formaldehído con 0,75% (v/v) de glutaraldehído en buffer de cacodilato 0,1 M. Los tejidos fijados posteriormente fueron deshidratados en una serie de concentraciones crecientes de etanol. A continuación, se realizó la inclusión en la resina LR White (Electron Microscopy, Hatfield, PA), dentro de cápsulas de gelatina cerradas para evitar el contacto de la resina con el oxígeno. Las secciones ultrafinas se cortaron y montaron en grillas de níquel. El método de la ICQU usado fue descrito previamente [107]. Las secciones se incubaron con los anticuerpos contra Vimentina (ratón, 1/100 Novocastra, Leica Biosystems, Buffalo, IL), β -catenina (conejo, 1/200 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS), GFRA2 (conejo, 1/100 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS), Sox2 (conejo, 1/50 Millipore, Billerica, MA), Sox9 (ratón, 1/100 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS) y Oct-4 (conejo, 1/50 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS). Luego, los cortes se expusieron a los anticuerpos de cabra anti-ratón o anti-IgG de conejo marcado con un complejo de oro de 15 nm (1/30, Electron Microscopy, Hatfield, PA). Las grillas se tiñeron con acetato de uranilo acuoso (Sigma, St. Louis, MO) y se examinaron usando un microscopio electrónico Zeiss LEO 906-E, realizándose la captura de las imágenes con el uso de una cámara Megaview II.

El análisis morfométrico de la ICQU se realizó en micrografías electrónicas obtenidas a partir de secciones coronales de dos áreas diferentes de la ZM separadas entre sí por 50 μm en todos los grupos experimentales. Además, para evitar el recuento de la misma célula, se analizó un solo corte de cada muestra montado sobre una grilla de 200 mesh y se tomaron 100 micrografías electrónicas al azar de cada sección con una magnificación de 16700x, cubriendo 100-200 células por animal. En las micrografías obtenidas se trazó y midió el perímetro de toda la célula y el núcleo de las células positivas para cada marcador mediante el programa informático ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, EE.UU). Usando este programa de análisis, también se realizó un recuento de las partículas de oro coloidal en los compartimientos citoplasmático y nuclear, referenciándose el número de estas a un área de 10 μm^2 . El método morfométrico aplicado fue el descrito por F. D'amico & E. Skarmoutsou [108].

Como control negativo se reemplazó la incubación del antisuero primario con PBS-BSA al 5% y adicionalmente se realizaron pre-incubaciones con sueros normales según correspondiera la especie en la que fueron obtenidos los anticuerpos primarios utilizados. Luego, se obtuvieron microfotografías de los controles negativos con el propósito de analizar el “*background*” de posibles uniones inespecíficas generadas por el anticuerpo secundario, fijándose 5 partículas de oro coloidal como punto de corte a partir del cual se considera positiva la inmunomarca del antígeno en estudio (Figura 11).

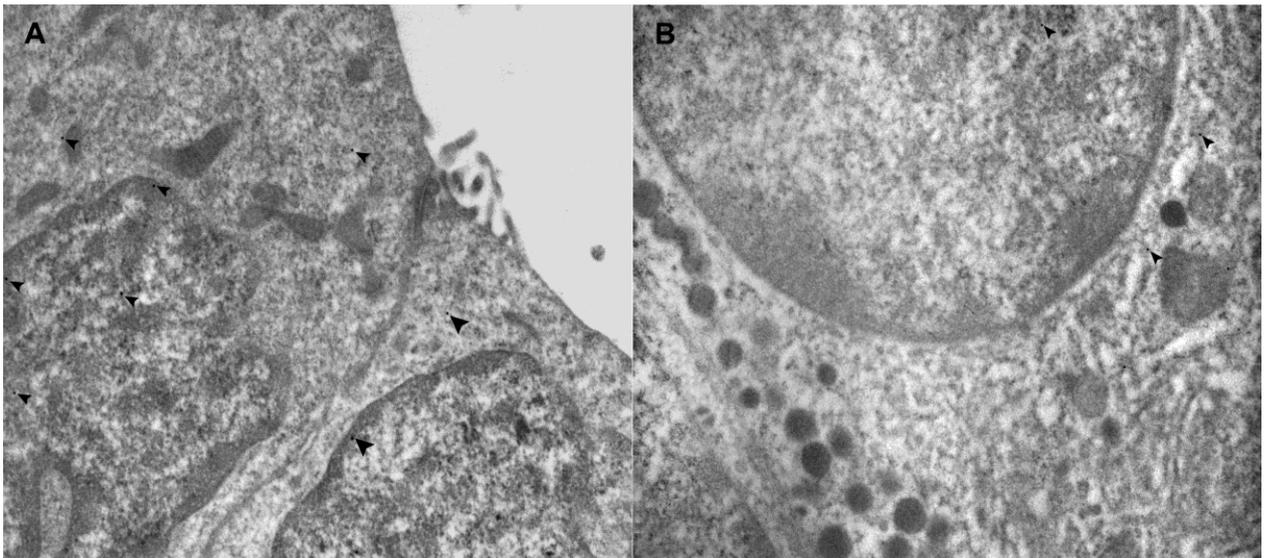


Figura 11. Microfotografías representativas de controles negativos. A) Las microfotografías muestran escasas partículas de oro en los diferentes compartimentos subcelulares utilizando PBS-BSA 5% o sueros normales específicos en reemplazo del anticuerpo primario y una dilución apropiada de anticuerpo secundario en células de la ZM. B) Para asegurar la especificidad en los criterios de positividad determinados, se evaluó además el porcentaje de partículas de oro coloidal que se visualizaron en los gránulos de secreción de células endocrinas en el AP, ya que, al no expresar los marcadores CS/P, sirven como control de uniones inespecíficas de oro coloidal. Las partículas de oro de 15 nm se indican mediante puntas de flechas y círculos. Magnificación original 16700x.

Inmunofluorescencia en tejido hipofisario

Muestras fijadas en frío

Las hipófisis de los diferentes grupos experimentales en estudio se colocaron en Crioplast (Biopack, Buenos Aires, Argentina) contenido en un criomolde (Sakura 4557), se sumergieron en nitrógeno líquido unos minutos hasta la solidificación del medio de inclusión y se conservaron a -80°C . Para las inmunodeterminaciones se obtuvieron secciones en criostato de $10\ \mu\text{m}$ de espesor aproximadamente. Por último, los cortes se adhirieron a portaobjetos tratados con xilano a TA, cuya superficie atrae electrostáticamente las secciones de tejido congeladas.

A continuación, las muestras fueron fijadas en metanol absoluto por 5 min, lavadas con PBS y posteriormente incubadas con 5% de PBS-BSA por 1 h para bloquear las uniones no específicas. Para la detección de los marcadores asociados a fenotipo SC y progenitor se utilizaron los siguientes anticuerpos:

-anti-GFRa2 (conejo, 1/100 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS)

-anti-Sox2 (ratón, 1/200 Millipore, Billerica, MA)

-anti-Oct-4 (conejo, 1/500 Cell Signaling technology, Inc., Danvers, MA)

-anti-Sox9 (ratón, 1/200 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS)

Las muestras fueron incubadas a 4 °C toda la noche en cámara húmeda con los antisueros primarios específicos, luego lavadas con PBS y expuestas con un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 594 (1/1000; Invitrogen, Carlsbad, EE.UU) o anti-ratón Alexa Fluor 488 (100 µg/ml, Invitrogen, Eugene, OR) por 1 h a TA y montados con fluoromount conteniendo DAPI.

Para el análisis de la co-expresión de GFRa2/Sox2, Oct-4/Sox2, GFRa2/Vimentina y GFRa2/Nestin (ratón, 1/100 Millipore, Billerica, MA) se realizó una doble inmunodetección en días consecutivos con el objetivo de evitar posibles marcas inespecíficas dadas por el anticuerpo secundario. Durante el primer día, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo obtenido en conejo a 4 °C toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario marcado con Alexa 594 (1/1000) por 1 h a TA.

El segundo día, las muestras fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo anti-ratón a 4 °C toda la noche, luego lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario Alexa

Fluor 488 (100 µg/ml). Para validar la especificidad de las inmunodetecciones, se realizaron controles negativos aplicando el mismo protocolo pero sustituyendo el anticuerpo primario con PBS-BSA 5%, seguido por la incubación de los diferentes anticuerpos secundarios.

Muestras incluidas en parafina

El material incluido en parafina se empleó para realizar inmunomarcaciones con los anticuerpos anti-Sox9 (ratón, 1/200) y anti-BrdU (ratón, 1/100 GE, Bioscience Healthcare, UK). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los descritos para la técnica anteriormente mencionada.

A continuación se detalla la técnica de inmunofluorescencia aplicada:

-Desparafinado e hidratación

Xilol	3 pasajes de 5 min c/u
Alcohol	5 min
PBS	5 min

-Lavado con PBS

-Tratamiento para disminuir la autofluorescencia del tejido

Etanol/Amoníaco 0,25 % por 1 h

-Las muestras destinadas a evaluar proliferación fueron tratadas con HCl 1N por 20 min

-Bloqueo de uniones no específicas

PBS-BSA 5 % a TA por 30 min

-Incubación con anticuerpo primario

1 h a TA y posteriormente toda la noche a 4 °C

-Lavado con PBS

-Incubación con anticuerpo secundario

-DAPI y montaje con fluormount

Para demostrar la especificidad de la reacción, las secciones fueron incubadas con PBS-BSA 5 % en reemplazo de los anticuerpos primarios.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido confocal con láser de barrido FluoView FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) o con el microscopio de epifluorescencia Axioplan (Carl Zeiss, Jena, Alemania) pertenecientes al laboratorio de microscopía óptica del CIQUIBIC, Facultad de Cs. Químicas, UNC. Para microscopía confocal, se utilizó un láser de ion-Ar a 488 nm para la excitación de fluorescencia verde y uno a 543 nm para la excitación de fluorescencia roja. Para el microscopio de epifluorescencia se empleó una lámpara de mercurio Osram 50 W. Se recolectaron imágenes de una serie de secciones utilizando un objetivo de 20, 40, 60 X y el análisis de las mismas fue realizado utilizando el software ImageJ 1.47v.

Captación de BrdU en las células del AP y ZM

El reactivo 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; Sigma, St. Louis, MO), que se incorpora en el ADN en lugar de timidina en las células en la fase S del ciclo celular, se disolvió en PBS (50 mg/ml) y se inyectó intraperitonealmente a una dosis de 50 mg/g de peso de la rata 12 h antes de la decapitación.

Cuatro glándulas por grupo experimental fueron fijadas en formaldehído al 4%, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol e incluidas en parafina. Se obtuvieron secciones de 3-5 μm de espesor, se desparafinaron, rehidrataron y se lavaron en PBS; para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena fueron tratadas con H_2O_2 al 3% durante 15 min, después de lo cual se aplicó 5% de PBS-BSA durante 1 h para bloquear

uniones no específicas del anticuerpo secundario. Las secciones se incubaron a 4 °C durante toda la noche en una solución que contiene el antisuero primario anti-BrdU (ratón, 1/100); a continuación, los portaobjetos se lavaron con PBS y se expusieron a un anticuerpo secundario marcado con biotina contra IgG de ratón a TA durante 30 min y para el complejo ABC durante 30 min (Vector Labs, Burlingame, CA). Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en una solución que contiene 3-3' diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, MO) en 0,1 M de tampón Tris, pH 7,2 con 0,03% de H₂O₂, se contratiñeron con hematoxilina, deshidrataron y montaron con medio líquido DPX (Sigma, St. Louis, MO). Los controles negativos de la inmunomarcación fueron realizados en paralelo siguiendo los mismos pasos descritos, pero omitiendo el anticuerpo primario anti BrdU.

El análisis morfométrico fue realizado en secciones coronales de las hipófisis incluyendo ZM y AP, analizándose 3 niveles de cada glándula separados por 50 µm. Células BrdU inmunoreactivas en el núcleo se observaron con un microscopio óptico a un aumento de X 400, para la ZM se analizaron el total de células que comprenden las dos capas y una cantidad de 5000 células se estudiaron en el AP.

Citometría de flujo

Las hipófisis fueron removidas y colocadas en medio de cultivo esencial mínimo (SMEM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, las glándulas fueron cortadas en pequeños fragmentos y se incubaron con 0,4 % de tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en SMEM durante 20 min. La actividad enzimática de la tripsina fue inhibida utilizando medio con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). A continuación, la dispersión celular fue lavada 3 veces con SMEM y centrifugada después

de cada lavado por 3 min a 1000 rpm. Luego, las células fueron dispersadas mecánicamente con pipetas Pasteur de calibre decreciente para obtener una suspensión celular homogénea. En cada cultivo primario se obtuvo un rendimiento celular de $\approx 1,5-2 \times 10^6$ células por glándula, siendo la viabilidad celular superior al 90% analizada por la exclusión de azul de tripán, observándose en todos los cultivos. Finalmente, la suspensión celular final se ajustó a 1×10^6 células/ml de medio SMEM.

Las células fueron centrifugadas a 1000 rpm por 5 min con buffer conteniendo PBS, 1% de azida sódica y 2% suero fetal bovino, con la doble función de proteger las células y bloquear uniones inespecíficas. Luego las células dispersadas fueron incubadas con: anti-GFRa2 (conejo, 1/100 de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS), anti-Sox2 (conejo, 1/200 Millipore, Billerica, MA), anti-Sox9 (ratón, 1/200 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TXS) y anti-Oct-4 (conejo, 1/500 Cell Signaling technology, Inc., Danvers, MA) o con un control de isotipo apropiado, durante toda la noche a 4 °C, lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 (1/1000, Invitrogen, Eugene, Oregon) o FITC (1/300, Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a 4 °C. A continuación, las células fueron fijadas (CITOFIX, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) por 20 min a 4 °C y posteriormente permeabilizadas con Perm/Wash (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Como control de isotipo, las células se incubaron con suero normal de especie apropiada en lugar de los antisueros primarios. Finalmente, las células fueron lavadas, resuspendidas en PBS filtrado y analizadas (1×10^5 eventos/tratamiento experimental) con un citómetro de flujo FACS Aria II (Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ) perteneciente al CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, UNC). El análisis de los datos fue realizado utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland Inc., OR)

Microdissección de captura láser y aislamiento del ARNm de ZM y AP hipofisario

Las glándulas hipofisarias de ratas correspondientes a los grupos Gestación y Lactancia se sumergieron en solución de tampón con Tris 0,1 M, sales de zinc (5 g ZnCl₂, 6 g ZnAc₂·2 H₂O, y 0,1 g CaAc₂) y 30% de sacarosa, luego se congelaron en medio Crioplast. Se obtuvieron secciones de 15 μm usando un criostato (Shandon Cryotome® SME), transfirieron a una membrana de naftalato de polietileno, fijaron en etanol al 70 % a -20 °C y se deshidrataron sobre sílice activado. Las regiones de interés: ZM y AP fueron morfológicamente identificadas y capturadas mediante microscopía de disección láser (Figura 12) (Leica® LDM6000). Se recogieron las zonas disecadas en 20 μl de buffer de lisis y el ARN total se aisló utilizando un Mini Kit de Aislamiento de ARN, ilustra RNAspin (GE, Bioscience Healthcare, UK), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

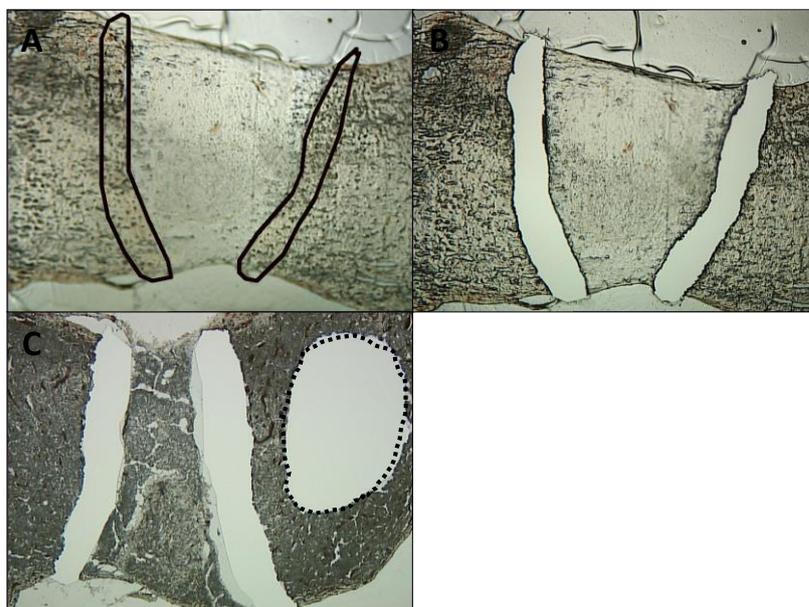


Figura 12. Definición de las regiones anatómicas de la hipófisis para el análisis de microdissección láser. A) Regiones definidas para las muestras de la zona marginal. B) Zonas seleccionadas cortadas por el láser correspondientes a la ZM. C) La línea de puntos indica la zona seleccionada para la muestra del AP.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la incubación de 11 µl de RNA total extraído de las regiones ZM y AP con 9 µl de mezcla de reacción que contenía: 4 µl tampón FS (5x), 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de random hexamers (50-250 ng), 1 µl M-MLV transcriptasa reversa (200 U/µl), 0,5 µl de RNasa out (40 U/µl) y DTT 1,5 µl (0,1 M). La reacción de transcripción reversa se realizó en el 5332 Eppendorf Mastercycler utilizando el siguiente ciclo de temperaturas: 10 min a 70 ° C, 1 min en hielo, 10 min a 25 ° C, 1 h a 37 ° C, y 15 min a 70 ° C.

Análisis de la expresión génica por qPCR

El análisis de PCR en tiempo real (qPCR) se realizó en el sistema de detección 7500 ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando la Master Mix SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los *primers* creados para cada gen de estudio se detallan en la tabla 1. Se calcularon los cambios relativos en la expresión de cada gen utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ normalizando con el gen de β -actina. Para cada par de cebadores, las curvas de disociación resultaron en un solo pico, lo que indica que sólo una especie de ADNc se amplificó y sus eficiencias de amplificación se calcularon utilizando las curvas de calibración generadas por diluciones en serie de ADNc obtenidos a partir de embriones a las 10 semanas de gestación. Todos los *primers* fueron sintetizados por GBT Oligos Genbiotech (Buenos Aires, Argentina).

Tabla 1. Oligonucleótidos y tamaños esperados amplificación en la qPCR de los marcadores analizados.

Marcador	Secuencia nucleotídica	Número de acceso al Genbank (posición del fragmento amplificado)
Oct-4	F:5'ACACCTGGCTTCAGCTTCG3' R:5'CAGAGTCTCCACGCCAACTT3'	NM_001009178 (89-448)
Sox2	F:5'CTCTGTGGTCAAGTCCGAGG3' R:5'CTCTTTTGCACCCCTCCCAA3'	NM_001109181 (1092-1379)
GFRa2	F:5'TCAGGGACTTCACGGAAAAC3' R:5'AGATGTGCAGGTGGTGATGA3'	NM_012750 (1136-1332)
Sox9	F:5'TGAAGATGACCGACGAGCAG3' R:5'GTGTGGCTTGTCTTGCTGG3'	XM_003750950 (406-676)
Prop1	F:5'AGTCAGCCTTTGGGAGGAAC3' R:5'TAGTGACCGCTCTTGCTTCC3'	NM_153627 (248-368)
Pit-1	F:5'GGAGAGCACAGCAAACCTTC3' R:5'ATGGCTACCACAGGCAAGTC3'	L01506 (748-980)
β -actina	F:5'ACCCACACTGTGCCCATCTA3' R:5'CGGAACCGCTCATTGCC3'	NM_031144 (556-845)

F: forward primer, R: reverse primer.

Para evaluar la especificidad de la microdissección en los cortes de la ZM, utilizamos la expresión de marcadores *stem* conocidos, GFRa2, Oct4 y Sox2. Como se muestra en la figura 13, estos marcadores se incrementaron significativamente en la ZM vs. AP de hipófisis de ratas adultas, lo que indica el enriquecimiento de SC en la ZM. A su vez, para verificar el enriquecimiento de las células endocrinas en las muestras de AP, decidimos evaluar los niveles de expresión de un marcador conocido de células diferenciadas, el gen de PRL. El análisis de la expresión de PRL en las dos zonas de interés por qPCR mostró que las muestras de la zona de AP son altamente enriquecidas en el ARNm de PRL. Teniendo en consideración que el método de disección láser es manual, podríamos explicar los bajos niveles de ARNm de PRL observados en las muestras de ZM, por arrastre de pocas células del AP. Este bajo grado de contaminación de células de diferentes zonas también fue reportado por otros autores que utilizaron esta técnica en hipófisis adultas [109].

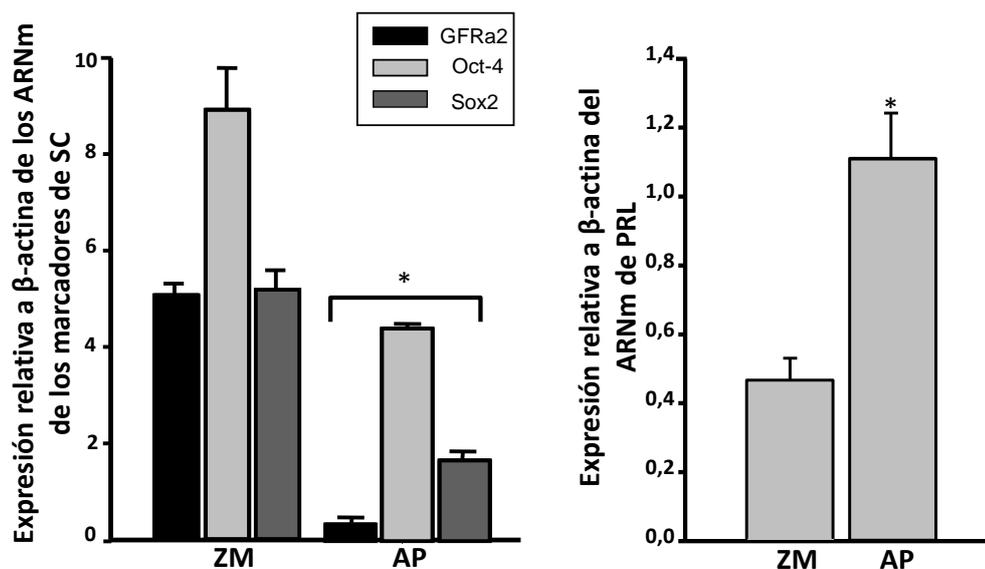


Figura 13. Los niveles de ARNm de los marcadores de SC y PRL fueron relativamente cuantificados a los de β -actina. Los resultados de los niveles de ARNm de los marcadores de SC y PRL del grupo AP se compararon con los del grupo ZM. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba t-test. * $p < 0,05$.

Con el fin de seleccionar el gen normalizador más apropiado en nuestro estudio, se evaluó la expresión de β -actina, GAPDH, 18S y L19 en las muestras de ZM y AP de hipófisis de ratas de los grupos COP y a término de la gestación, ya que se consideraron para estudios posteriores como grupos control para el análisis estadístico.

Los valores obtenidos a partir de la expresión de β -actina en las muestras de interés, ZM y AP de los grupos COP y AT, se compararon estadísticamente con la expresión de GAPDH, 18S y los genes L19 por el test de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn. Así, los resultados obtenidos mostraron que la expresión de β -actina no cambió respecto a la expresión del 18S ($p = 0,9725$) y L19 ($p = 0,6793$) en las zonas de interés de los grupos de estudio. Sin embargo, se detectó una variación significativa con el gen GAPDH ($p = 0,0599$) en las condiciones evaluadas (figura 14). En conclusión, se verificó

con este estudio que no hubo diferencias significativas de la expresión del gen β -actina en las zonas de interés, lo que permitió seleccionarlo como gen de referencia para el ensayo.

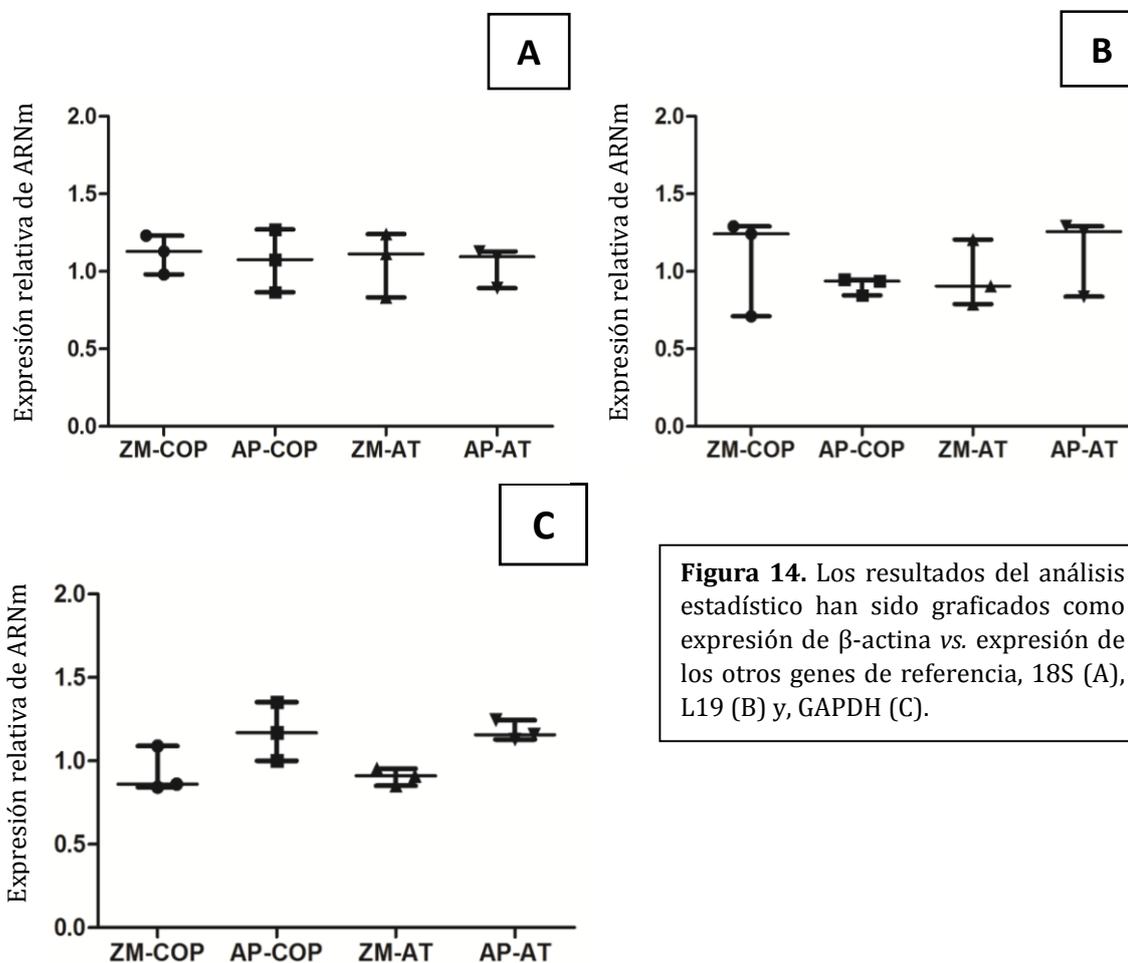


Figura 14. Los resultados del análisis estadístico han sido graficados como expresión de β -actina vs. expresión de los otros genes de referencia, 18S (A), L19 (B) y, GAPDH (C).

Cultivo de hipófisis adultas para la obtención de esferoides en suspensión

Para la puesta a punto del ensayo de formación de esferas se utilizaron hipófisis de ratas adultas que fueron colocadas en medio SMEM [110]. Posteriormente, las glándulas fueron cortadas en pequeños fragmentos y se incubaron con 0,25 % de tripsina en SMEM durante 3 min. La actividad enzimática de la tripsina fue inhibida utilizando medio con 10% de suero fetal bovino. A continuación, la dispersión celular fue resuspendida con SMEM,

centrifugada por 3 min a 1000 rpm y cultivada en un medio al que llamamos de *selección*, compuesto por: 50 % “*Dulbecco’s Modified Eagles’s Medium*” (DMEM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50 % Ham F12 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 % SFB, 2 mM glutamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 200 U/ml penicilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 200 U/ml estreptomina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 48 h para favorecer la adherencia a la placa de cultivo de células endoteliales y que no son CS/P. Cumplidas las 48 h se recogió el sobrenadante y se dejó decantar las pituesferas y posibles agregados celulares. Transcurrido ese tiempo, se realizó un cambio de medio por el que denominamos “*stem*”, el que incluye: 50 % DMEM, 50 % Ham F12, factores de crecimiento: EGF (20 ng/ml, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y FGF (20 ng/ml, Biolegend, San Diego, CA), 1 X B-27 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), 200 U/ml penicilina, 200 U/ml estreptomina, 1 % fungizona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El B-27 es un suplemento comercial que favorece la amplificación de las esferas y no induce diferenciación. Este paso de decantación y cambio de medio se realizó cada 48 h. Luego de 5 pasajes se obtuvieron estructuras en suspensión (esferoides) denominadas pituesferas enriquecidas en SC.

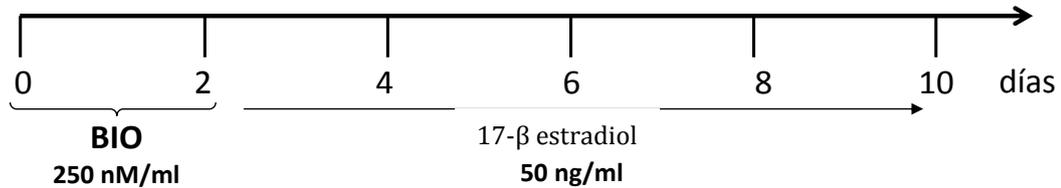
Ensayo de diferenciación de los esferoides a células endocrinas y de linaje neuronal

Protocolo de diferenciación a células endocrinas

Los esferoides obtenidos luego de 5 pasajes se decantaron por 1 h y efectuándose un cambio de medio de cultivo por *medio de diferenciación*, compuesto por: DMEM/Ham F12 1:1, 5 mg/ml BSA, 200 U/ml penicilina, 200 U/ml estreptomina y 2 mM glutamina. A

continuación, se realizó un recuento de esferas en cámara de Neubauer, a fin de lograr una cantidad de 10 esferas/pocillo/300 μ l de medio de diferenciación.

Luego, se hicieron cambios de medio suplementándose de acuerdo al siguiente esquema:



En paralelo se realizaron controles con esferoides mantenidos en cultivo con medio base o medio base con BIO ((2'Z,3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxime) o medio base con 17- β estradiol durante el tiempo establecido para este ensayo (figura 15).

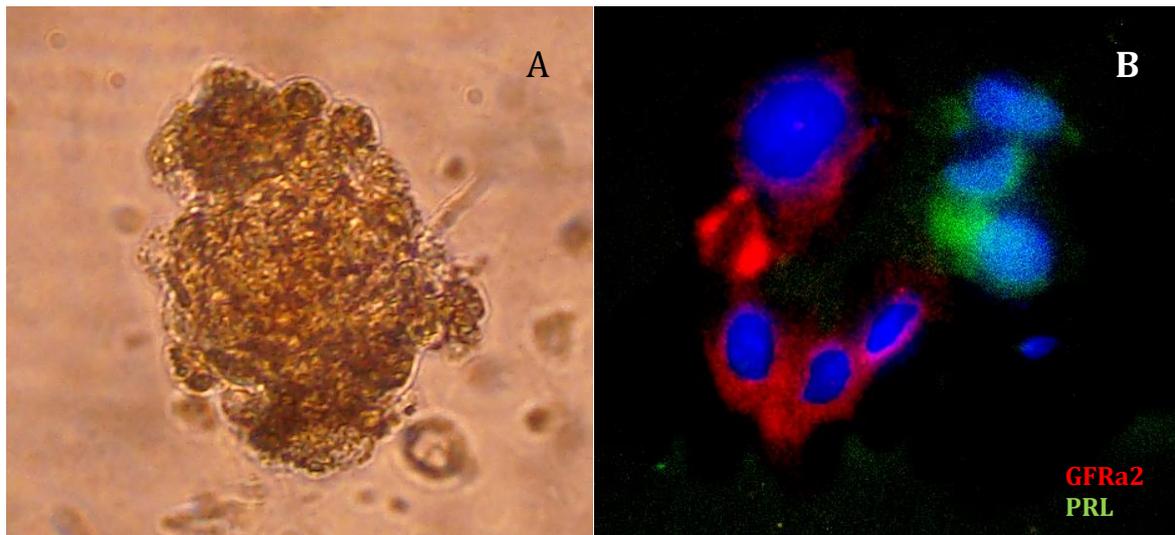


Figura 15. A) Esferoide con cierto grado de desorganización obtenido luego de 10 días de incubación con medio base y E2. Magnificación Original: 200x. B) Células de un esferoide que expresan GFRa2 y PRL, luego de 10 días de cultivo con medio base y 17- β estradiol.

Transcurrido el tiempo estipulado para este ensayo, las esferas fueron decantadas, fijadas con formaldehído al 4% por 1 h y finalmente, incluidas en sucrosa al 30 % y conservadas en heladera a 4 °C para realizar estudios posteriores.

Protocolo de diferenciación a linaje neuronal

Los esferoides obtenidos luego de 5 pasajes se decantaron por 1 h y se efectuó un cambio de medio por *medio de diferenciación*: DMEM/ Ham F12 1:1, 15% de suero fetal de caballo, 2,5 % de suero fetal bovino y 2 mM glutamina.

Posteriormente, se realizó un recuento de esferas en cámara de Neubauer, de manera de realizar diluciones para lograr una cantidad de 10 esferas/pocillo/300 μ l de medio de diferenciación. Luego, se hicieron cambios de medio cada 48 h, completando un tiempo de 10 días. En paralelo se realizaron controles con esferoides mantenidos en medio base sin suero (figura 16) durante el tiempo establecido para este protocolo.



Figura 16. Fotografía representativa de un esferoide estimulado solo con medio base. Nótese que se encuentra adherido a la placa pero sin signos de diferenciación y con características de estar comprometida su viabilidad celular (áreas oscuras).

Transcurrido el tiempo estipulado para este ensayo, los esferoides adheridos a cubreobjetos de vidrio (13 mm) fueron fijados con formaldehído al 4 % por 1 h y

finalmente, lavados con PBS y conservados en heladera a 4 °C para ser utilizadas en ensayos posteriores.

Protocolo de auto-renovación

Transcurridos los 5 pasajes, se obtuvieron esferoides en suspensión que fueron decantados, resuspendidos en PBS e incubados en 1 ml de Accutase (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) por 40 min a TA. Luego, se realizó con vigorosidad “*up and down*” con pipeta automática p1000, se centrifugó y la suspensión fue resuspendida en medio SMEM. Posteriormente, se procedió a realizar un recuento celular en cámara de Neubauer, de manera de realizar diluciones seriadas y llegar a una concentración de 200 células/100 μ l y 100 células/50 μ l. Finalmente, las células fueron resuspendidas en medio “*stem*” y se plaquearon las diluciones antes mencionadas en una placa de 96 wells sin tratamiento de adherencia. Se renovó el medio *stem* cada 48 h, completando un esquema de 7 días y se realizó el recuento de esferoides secundarios en microscopio invertido Axiovert 135.

Inmunofluorescencia en los esferoides

Los esferoides incluidos en sucrosa al 30 % se cortaron en el ultracriomicrotomo (Power Tome XL, Boeckler Instruments, USA) en secciones de unas 200 μ m de espesor. Estos cortes se adhirieron a portaobjetos tratados con xileno que se encontraban a TA. Las muestras se fijaron en metanol absoluto por 5 min, fueron lavadas en PBS e incubadas con PBS-BSA al 5% por 1 h a TA. Para la detección de los marcadores asociados a fenotipo *stem*, progenitor y de células diferenciadas se utilizaron como antisueros primarios los siguientes anticuerpos: anti-GFRa2 (conejo, 1/100), anti-Sox2 (ratón, 1/200), anti-Sox9 (ratón, 1/200), anti-Oct-4 (conejo, 1/500), anti-PRL (conejo, 1/3000 National Hormone

and Pituitary Program, del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK)), anti-Tuj1 (ratón, 1/2000 Sigma, St. Louis, MO) y anti-GFAP (conejo, 1/50 Promega Madison, WI). Las muestras fueron incubadas a 4 °C toda la noche en cámara húmeda, luego lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 594 (1/2000) o anti-ratón Alexa Fluor 488 (200 µg/ml) por 1 h a TA y montadas con fluoromount conteniendo DAPI. Para validar la especificidad de las inmunodetecciones, se realizaron controles aplicando el mismo protocolo pero sustituyendo el anticuerpo primario con PBS-BSA 5%, seguido por la incubación de los correspondientes anticuerpos secundarios.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido confocal con láser de barrido FluoView FV1000 o con el microscopio de epifluorescencia Axioplan pertenecientes al laboratorio de microscopía óptica del CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. En caso del microscopio confocal, se utilizó un láser de ion-Ar a 488 nm para la excitación de la fluorescencia verde y uno a 543 nm para la excitación de fluorescencia roja y para el microscopio de epifluorescencia se utilizó para la excitación de los fluoróforos una lámpara de mercurio Osram 50 W. Se recolectaron imágenes de una serie de secciones utilizando un objetivo de 20, 40, 60 X y el análisis de estas imágenes se realizó con el software ImageJ 1.47v.

Para el análisis de la co-expresión de Oct-4/Sox2 se realizó una doble inmunodetección de ambos antígenos en días consecutivos de manera de evitar posibles marcas inespecíficas dadas por el anticuerpo secundario. El primer día, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo de especie conejo a 4 °C toda la noche en cámara húmeda, lavados con PBS y seguido por la incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo

Alexa 594 (1/2000) por 1 h a TA. A continuación, el segundo día las muestras fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo de especie ratón a 4 °C toda la noche y luego lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Fluor 488 (200 µg/ml).

Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó mediante un análisis de varianza seguido del post-test de Tukey o T-test (SPSS Inc. SPSS Statistics para Windows, versión 17.0. Chicago). Los resultados se muestran como la media \pm SEM y los datos se obtuvieron a partir de ensayos por triplicado en tres experimentos independientes. El nivel de significación elegido fue $p < 0,05$.

Resultados

Estudios previos del grupo de investigación sobre la plasticidad celular hipofisaria

Trabajos realizados previamente en el Centro de Microscopía Electrónica han descripto cambios morfológicos y morfométricos que manifiestan las células adenohipofisarias en respuesta a estímulos específicos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [111, 112]. En particular, durante la lactancia se observó un incremento significativo del número de células lactotropas, representando alrededor del 50% de la población total de la hipófisis en el día 4 de lactancia activa. Al remover el estímulo de la succión, este porcentaje disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores similares a los observados en hipófisis de ratas antes de la gestación (30%) [113]. Otro aspecto motivo de estudio ha sido el proceso de transdiferenciación como posible mecanismo de neogénesis celular hipofisaria. Al respecto, Pasolli y col. demostraron que las células mamosomatotropas son un tipo celular inusual en la hipófisis de ratas adultas intactas, ovariectomizadas y orquiectomizadas (0,1-0,2% de la población celular total en el parénquima hipofisario), razón por la cual resulta controversial el rol propuesto para este tipo celular como células de “transición” en la presuntiva interconversión de células PRL+ a GH+ y/o viceversa [114].

Continuando con esta línea de investigación y considerando los reportes bibliográficos de los últimos años sobre la existencia de *ASC* en la glándula hipofisaria, en el presente trabajo nos centramos en el estudio del nicho de las CS/P en hipófisis de ratas adultas, su identificación con marcadores específicos y contribución en la renovación celular hipofisaria durante el ciclo estral, gestación y lactancia activa.

1^{er}**Objetivo
Específico****Identificar la población de CS/P
en la glándula hipofisaria de ratas adultas.**

➤ **Estudio topográfico de la ZM**

En primera instancia, nos propusimos localizar topográficamente la ZM, al ser propuesta como nicho de *SC* en hipófisis de ratas adultas y estudiar la morfología de las células que la componen mediante MOAR, para identificar con mayor resolución las *SC*. Como se muestra en la Figura 17, la ZM se halla conformada por dos capas de células no secretoras, una de ellas se encuentra delineando la hendidura o *cleft* y la otra, situada por debajo, en continuidad con la pars distalis.

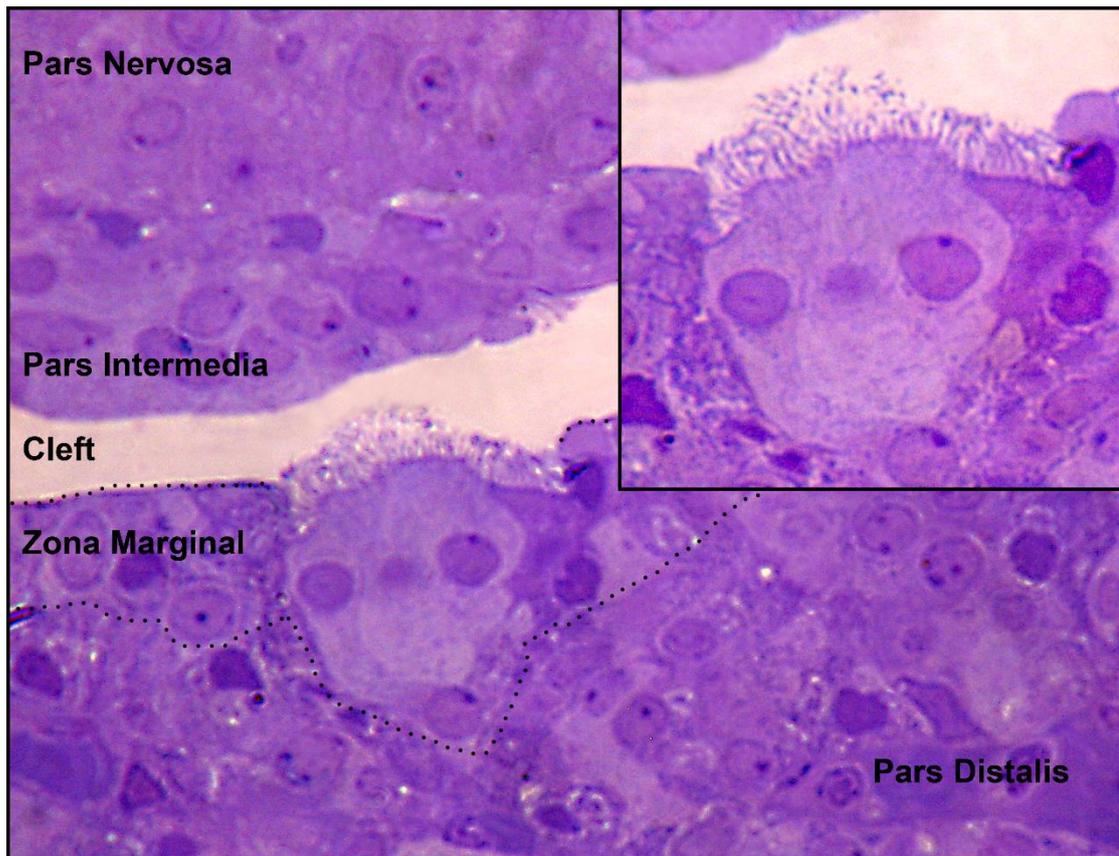


Figura 17. Microfotografía de glándula hipofisiaria de ratona adulta hembra incluida en resinas epóxicas y coloreada con azul de toluidina. Se identifican las diversas zonas de la glándula, resaltando la localización de zona marginal (indicada por línea de puntos), la cual limita con la hendidura. Magnificación original 400x. *Inset:* Obsérvese en detalle las extensiones apicales de células situadas en la primera capa de la ZM. Magnificación original 1000x.

➤ **Estudio a nivel ultraestructural de las células que componen la ZM**

Mediante microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron, por primera vez, evidencias sobre la composición y morfología de las células presentes en la ZM. Aquellas que forman la primera capa de la ZM tuvieron, en general, un aspecto cuboide, presentaron una relación núcleo/citoplasma incrementada con respecto a las células del AP, ausencia de gránulos secretorios y en algunas de ellas se observaron prolongaciones apicales en la membrana plasmática, del tipo de cilios y microvellosidades. Estas células con diferenciación apical de membrana, están orientadas hacia el *cleft* (Figura 18). La

presencia de cilios en algunas células de la primera capa de la ZM en la hipófisis adulta sugiere que podrían retener el cilium primario presente en las células embrionarias [115].

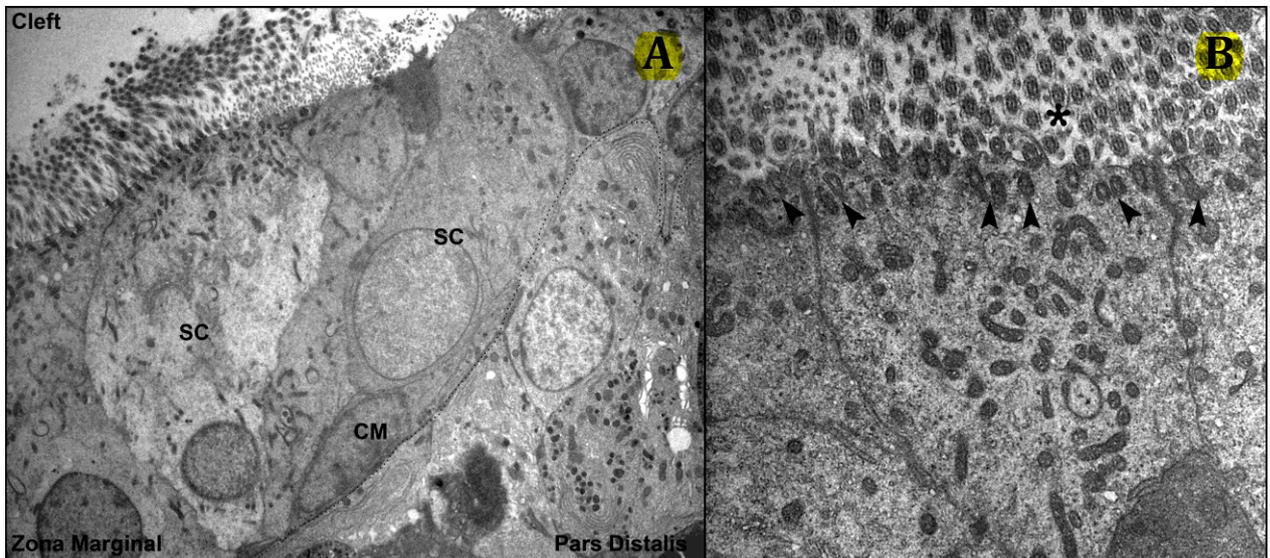


Figura 18. Micrografía electrónica de la zona marginal en la glándula hipofisaria. A) SC de la ZM con cilios y microvellosidades. Además se aprecian CM fusiformes. ZM se halla delimitada por línea de puntos. CM: células mesenquimales. Magnificación original 2100x. B) Célula madre ciliada que presenta cuerpos basales (puntas de flechas) y axonemas (asterisco). Nótese la abundante cantidad de mitocondrias que presenta este tipo celular. Magnificación original 6000x. SC: stem cell.

➤ Identificación de células con fenotipo stem y progenitor en la ZM

Luego de confirmar que las células de la ZM poseen características ultraestructurales similares a las que presentan las SC en otros órganos, nos propusimos dilucidar si las mismas expresan marcadores asociados al fenotipo stem/progenitor. En consecuencia, surge el interrogante, ¿Cuáles son los marcadores más adecuados para identificar esta población de CS/P adultas en la hipófisis?

Para responder a esta incógnita, se ha postulado que durante el proceso de reclutamiento y diferenciación propuesto para las SC hipofisarias participarían diferentes marcadores asociados a cada una de estos eventos. Las células reclutadas serían las SC propiamente

dichas las que deberían expresar marcadores como Sox2 y Oct-4, ambos factores de transcripción reconocidos como proteínas fundamentales en la preservación del genoma pluripotente de las SC. Cabe recordar que se ha propuesto al receptor de membrana, GFRA2, co-factor del receptor Ret, como marcador específico de SC hipofisarias [116]. A su vez, estas células también podrían expresar marcadores de tipo endotelial como β -catenina y E-cadherina, jugando ambas proteínas un rol fundamental en la adhesión celular y además estarían involucradas en cascadas de señalización que conllevan al proceso de diferenciación.

Si se considera la presencia de un verdadero nicho de SC en la ZM, algunas células deberían presentar positividad para los marcadores propuestos de células de sostén como, Vimentina y Nestin.

Las SC hipofisarias adultas, ante determinados estímulos, pueden activarse y durante la etapa de expansión representada por células que han adquirido un determinado compromiso celular, expresar el marcador de fenotipo progenitor, Sox9. Finalmente, durante la etapa de diferenciación, una célula destinada a ser lactotropa, por ejemplo, expresará en primer lugar el factor de transcripción PROP1, seguido por la sobreexpresión del factor Pit-1, para convertirse finalmente en una célula PRL+.

En resumen, los marcadores utilizados para el estudio de identificación del nicho en la ZM fueron:

Marcadores seleccionados	
Fenotipo Stem	Oct-4-Sox2-GFRa2
Fenotipo Progenitor	Sox9
Células de Sostén	Nestin-Vimentina
Otros (células endotelial)	β -catenina

La expresión de los marcadores seleccionados para fenotipo *stem*, los factores de transcripción Oct-4 y Sox2, fue analizada por microscopía de epifluorescencia (Figura 19), demostrándose la existencia de células inmunopositivas para estos marcadores situadas en la ZM. Ambos marcadores fueron identificados tanto a nivel citoplasmático como nuclear.

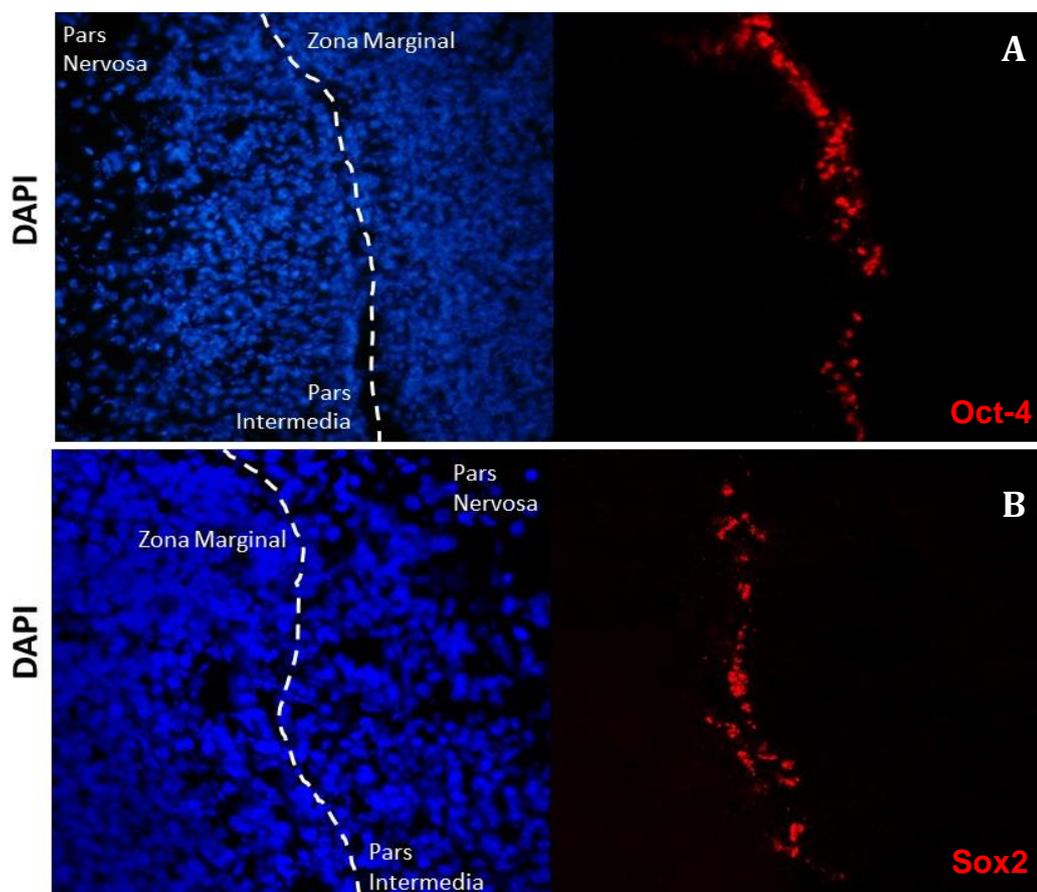


Figura 19. Expresión de marcadores de fenotipo *stem* en células de la zona marginal de hipófisis adulta. Las fotografías revelan los marcadores Oct-4 (A) y Sox2 (B) en células situadas en la ZM (indicada por la línea de puntos). Magnificación original 400x.

También se evidenció la expresión del receptor GFRA2, marcador específico para SC hipofisarias, en células de la ZM y en algunos grupos celulares del AP en hipófisis de ratas hembras adultas (Figura 20). Nótese que estos grupos celulares GFRA2+ se detectaron cercanos al área de la ZM.

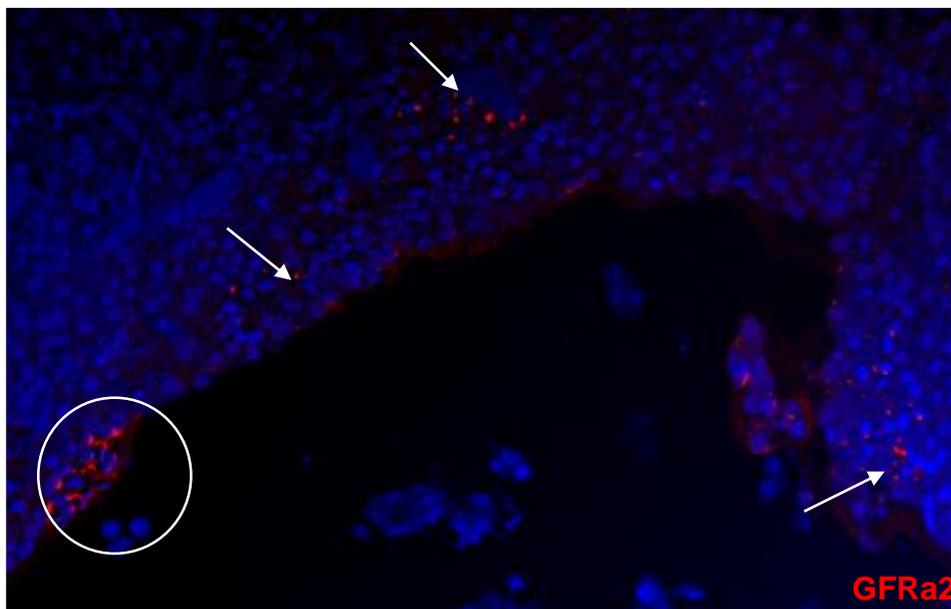


Figura 20. Expresión de GFRA2 en células de la ZM de hipófisis adultas. Se identifican áreas de la ZM (indicada por el círculo) y en AP (indicado por flechas) que exhiben inmunoreactividad para el marcador de SC específico de hipófisis. Magnificación original 200x.

En ZM se observaron además células inmunoreactivas para el factor de transcripción Sox9, marcador de fenotipo progenitor (Figura 21).

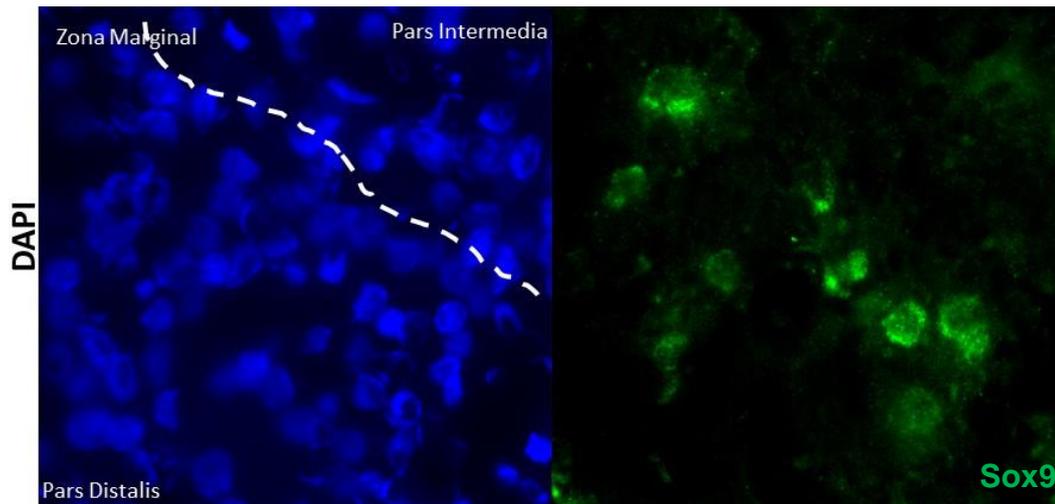


Figura 21. Expresión de Sox9. Se identifican células inmunopositivas para el marcador de fenotipo progenitor en células de la ZM (indicada por línea de puntos) de hipófisis adultas de ratas hembras. Magnificación original 400x.

En estudios recientes, se ha reportado la presencia de células Sox2+ en el AP de hipófisis adultas [117]. Este hallazgo ha sugerido la presencia de subpoblaciones de células progenitoras o células amplificadoras de tránsito, con diferente potencial de proliferación/diferenciación, tal como se describe en otros sistemas [118]. Con estos antecedentes nos propusimos analizar la expresión del marcador de fenotipo *stem*, Sox2 y el de fenotipo progenitor, Sox9, en el AP de hipófisis adultas. Como se evidencia en la Figura 22, se observaron escasas células dispersas con expresión citoplasmática para Sox2; mientras que las células Sox9 inmunopositivas generalmente se presentaron formando pequeños grupos celulares en el AP.

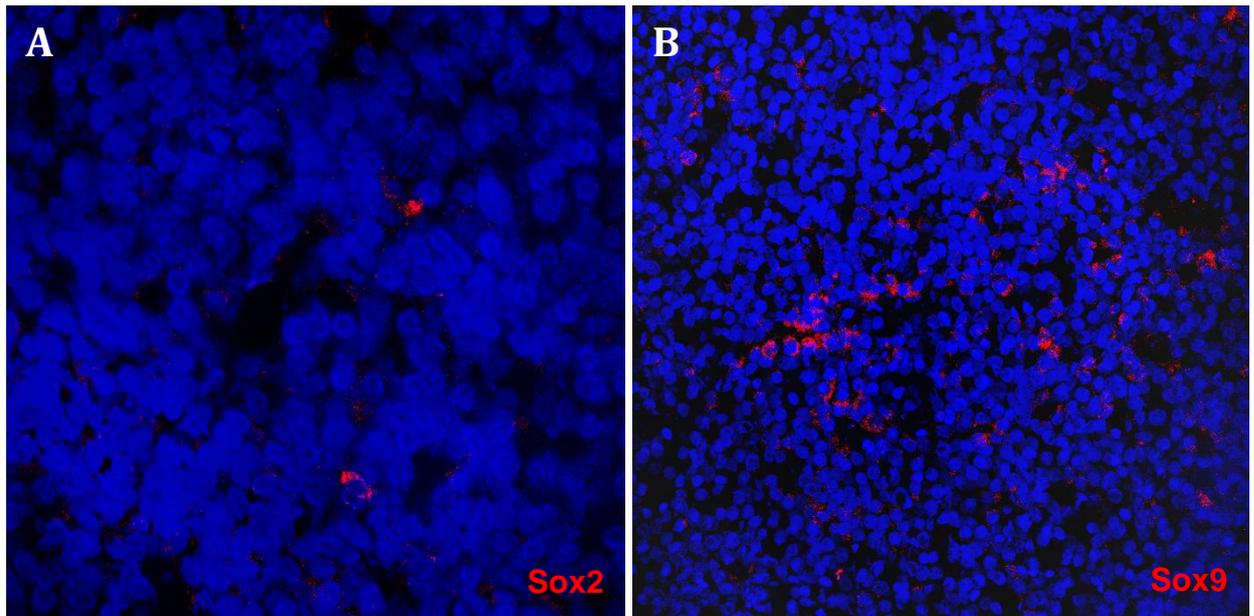


Figura 22. Microfotografías de la expresión de los marcadores Sox2 y Sox9 en adenoparénquima de ratas adultas. Sox2 (A) se identificó en escasas y aisladas células, en tanto Sox9 (B) fue inmunoreactivo en escasos conglomerados celulares. Magnificaciones originales: A: 600x. B: 400x.

En la actualidad aún es motivo de debate la definición de cuando una célula es una verdadera SC: si es aquella que expresa uno o co-expresa dos o más marcadores asociados al estado pluripotente [119]. Para obtener nuevas evidencias y responder esta incógnita, verificamos mediante microscopía confocal, la co-expresión de los marcadores asociados a fenotipo stem: Oct-4/Sox2 y GFRA2/Sox2. (Figura 23). El análisis realizado evidenció algunas células que co-inmunomarcaron para Oct-4/Sox2 (Figura 7) y para GFRA2/Sox2 (Figura 24) en la ZM.

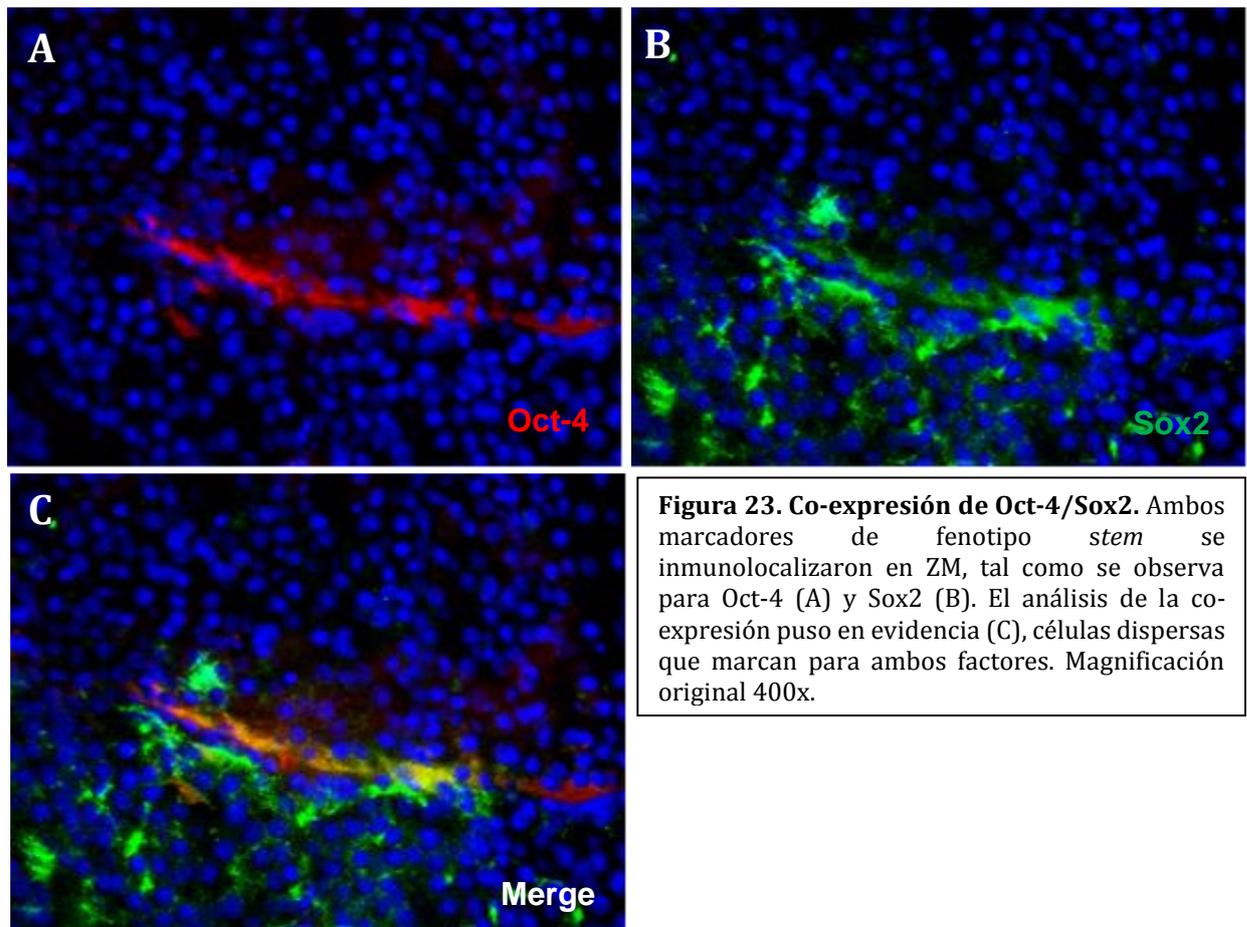


Figura 23. Co-expresión de Oct-4/Sox2. Ambos marcadores de fenotipo *stem* se inmunolocalizaron en ZM, tal como se observa para Oct-4 (A) y Sox2 (B). El análisis de la co-expresión puso en evidencia (C), células dispersas que marcan para ambos factores. Magnificación original 400x.

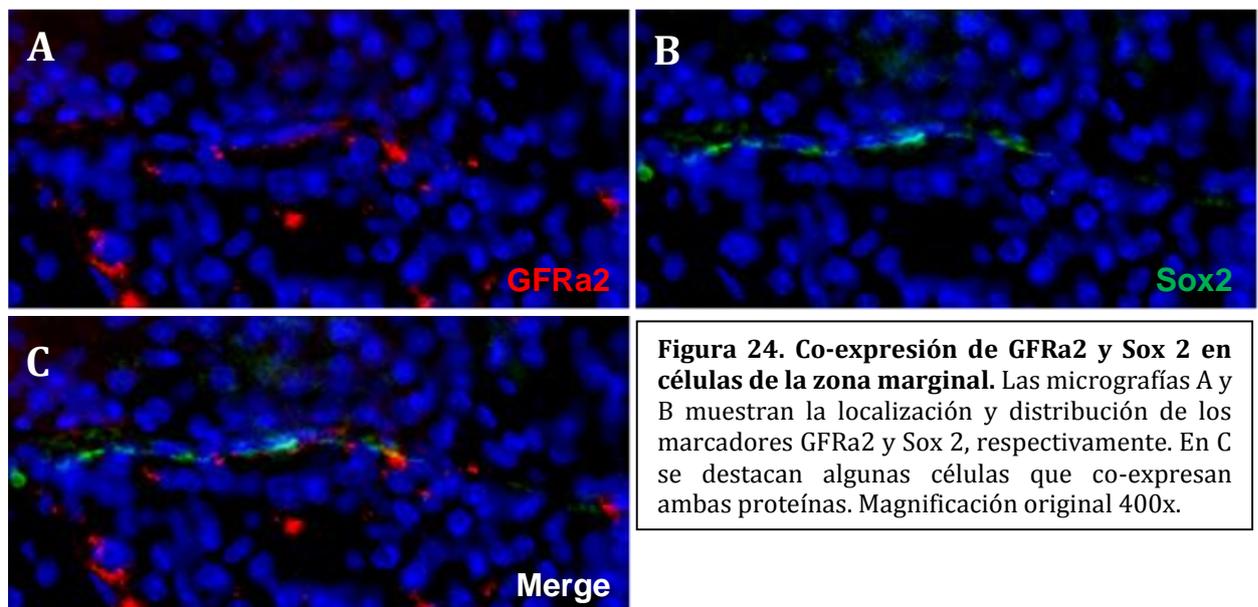


Figura 24. Co-expresión de GFRA2 y Sox 2 en células de la zona marginal. Las micrografías A y B muestran la localización y distribución de los marcadores GFRA2 y Sox 2, respectivamente. En C se destacan algunas células que co-expresan ambas proteínas. Magnificación original 400x.

Resumen de los principales hallazgos obtenidos de la identificación de marcadores de CS/P por IF en ZM:

-La ZM de hipófisis de ratas hembras adultas está constituida por células que expresan los marcadores de SC: GFRA2, Oct-4 y Sox2 y células progenitoras, Sox9 positivas.

-Algunas células de la ZM co-expresan los siguientes marcadores de SC: GFRA2/Sox2 y Oct-4/Sox2, lo cual podría indicar un alto grado de indiferenciación en estas células.

➤ **Localización y distribución subcelular por ICQU de marcadores asociados al fenotipo de las SC en ZM de hipófisis de ratas adultas**

Posteriormente, para dilucidar si las células que expresan los marcadores estudiados comparten las características morfológicas ultraestructurales de células embrionarias evidenciadas en otros nichos de SC, se analizó la expresión de los marcadores asociados a fenotipo *stem*/progenitor en células de la ZM por ICQU. Como se observa en la Figura 25, en general la expresión de GFRA2 y Oct-4 fue intensa en células ubicadas en la región alrededor del *cleft*. En particular, la expresión de GFRA2 presentó una distribución citoplasmática dispersa en células de la primera capa de la ZM. En tanto, Oct-4 fue inmunodetectado en el núcleo y citoplasma de las células. Ambos marcadores se expresaron principalmente en células ciliadas o con microvellosidades. Por otra parte, la expresión de Sox2 y Sox9 se presentó en células de la ZM y además, en células endocrinas del parénquima hipofisario (Figura 26). Una observación interesante fue que Sox2 se inmunolocalizó en el núcleo de células con características de SC de la ZM. Por su parte, la expresión de Sox9 fue más débil en el núcleo y citoplasma de estas células. Estos

resultados confirman la identidad de SC con características morfológicas de células embrionarias en la ZM.

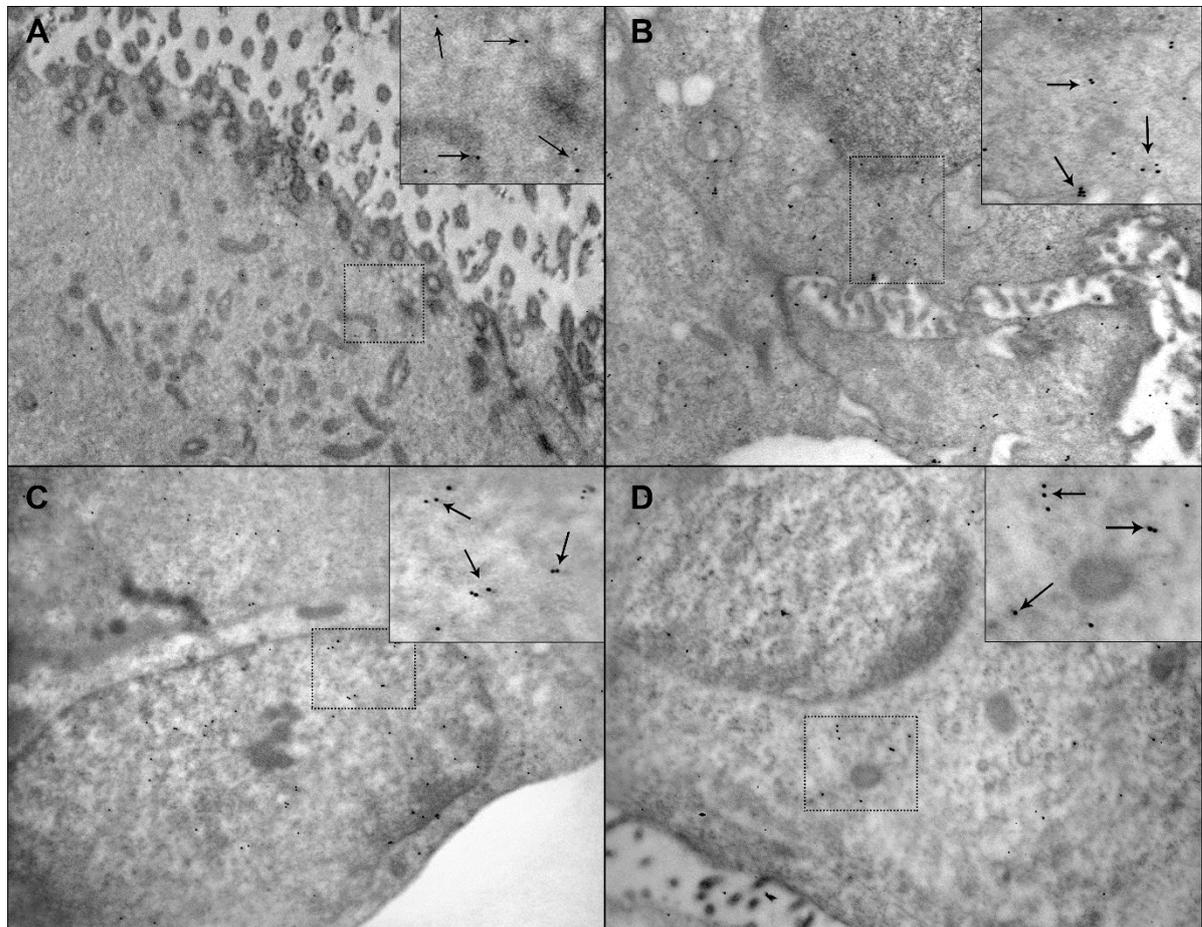


Figura 25. Inmunocitoquímica ultraestructural de marcadores CS/P en la MZ de las glándulas hipofisarias de ratas adultas. A) Micrografía de una célula GFRa2+ localizada en la primera capa de la ZM, con cilios en la membrana apical. El recuadro de puntos muestra la ubicación de la zona del *inset*. *Inset*: Partículas de oro coloidal que marcan inmunoreactividad moderada en el citoplasma cerca de la membrana plasmática. Magnificación original 10000x. B) Inmunocitoquímica ultraestructural para Oct-4. Se aprecian microvellosidades en la membrana apical. *Inset*: Se observa inmunopositividad para el factor a nivel del citoplasma. C) Célula Sox2+ de la ZM exhibiendo una mayor inmunoreactividad nuclear que la observada en la matriz citoplasmática. D) Célula inmunopositiva para Sox9 presente en la ZM que muestra inmunoreactividad citoplasmática. Magnificación original de B, C y D: 16700x.

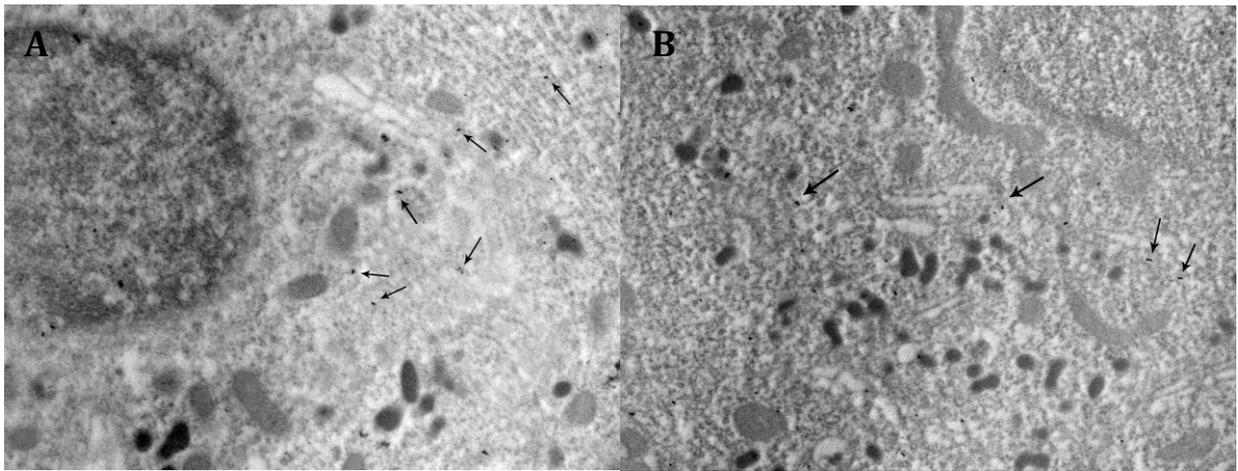


Figura 26. Inmunomarcación ultraestructural de Sox2 y Sox9. A) Célula endócrina del AP exhibiendo inmunoreactividad para Sox2 en citosol y RER. B) Célula endócrina inmunopositiva para Sox9 que muestra partículas de oro coloidal libres y asociadas a RER en el citoplasma. Magnificación original de A y B: 16700x. Flechas: partículas de oro de 15 nm.

➤ Identificación de células de sostén que forman parte del nicho de SC en ZM de hipófisis adultas

Nestin ha sido reportado en diferentes nichos de SC identificando células *stem* mesenquimales en islotes pancreáticos y en médula ósea [120]. Sin embargo, este marcador también ha sido uno de los más utilizados para identificar las SC del SNC en desarrollo, así como en las células madre neuronales obtenidas *in vitro* [121]. Considerando estos hallazgos nos propusimos como objetivo identificar las células que expresan Nestin en el nicho de SC hipofisario.

El análisis por inmunofluorescencia de este marcador permitió evidenciar la presencia de células inmunoreactivas, distribuidas aisladamente tanto en ZM como en los otros lóbulos hipofisarios (pars distalis y nervosa) (Figura 27). En pars distalis se observaron algunas células Nestin+ con prolongaciones citoplasmáticas características de células de fenotipo mesenquimal.

Para dilucidar si células Nestin+ en ZM expresaban GFRA2, marcador específico de SC, se realizaron dobles inmunomarcaciones para identificar los dos factores. Como se observa en la Figura 28, no se detectó co-localización de Nestin con GFRA2 en células de la ZM.

Este hallazgo permite confirmar la presencia de Nestin en células con fenotipo *stem* mesenquimal que forman parte del nicho de SC hipofisario.

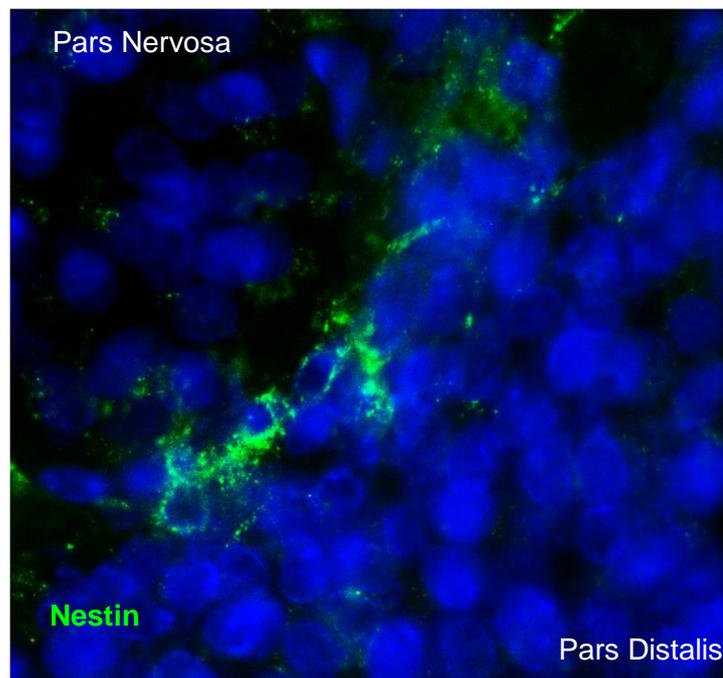


Figura 27. Expresión de Nestin en células de ZM de hipófisis de ratas adultas. Se observan algunas células de la ZM que presentan inmunopositividad citoplasmática para el marcador Nestin. Se localizan otras células en la pars nervosa que presentan positividad para este marcador. Magnificación original 600x.

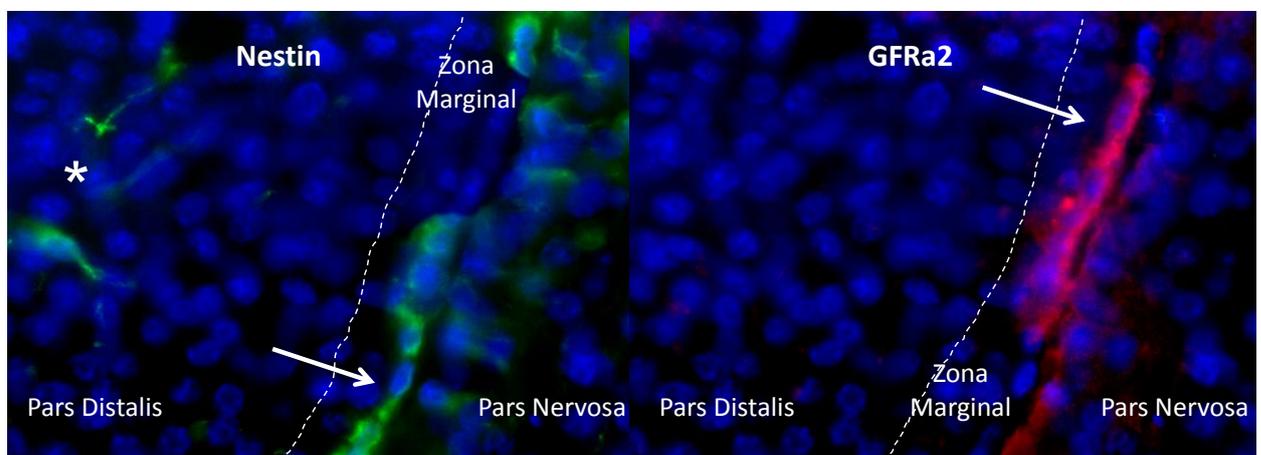


Figura 28. Expresión de Nestin y GFRa2 en células de zona marginal de hipófisis de ratas adultas. Se visualiza la presencia de células inmunopositivas para Nestin y GFRa2 a lo largo de ZM. Nótese que algunas células Nestin+ emiten largas prolongaciones y se localizan también en la pars distalis (asterisco). No se identifica co-expresión de ambos marcadores en ZM. Magnificación original 600x.

Otro de los marcadores utilizados para identificar células mesenquimales del estroma de nichos de SC es el filamento intermedio Vimentina [122, 123]. Como se muestra en las Figuras 29 y 30, el marcador se expresó en la ZM y no presentó co-expresión con GFRa2. Además, se observó positividad para Vimentina en células endoteliales localizadas en los tres lóbulos de la hipófisis como se muestra en la figura 29.

Considerando los hallazgos obtenidos para Vimentina y teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el marcador Nestin, se **concluye que el nicho de SC en ZM, está formado por distintas poblaciones de células madre mesenquimales, las que actuarían como células de sostén de las CS/P.**

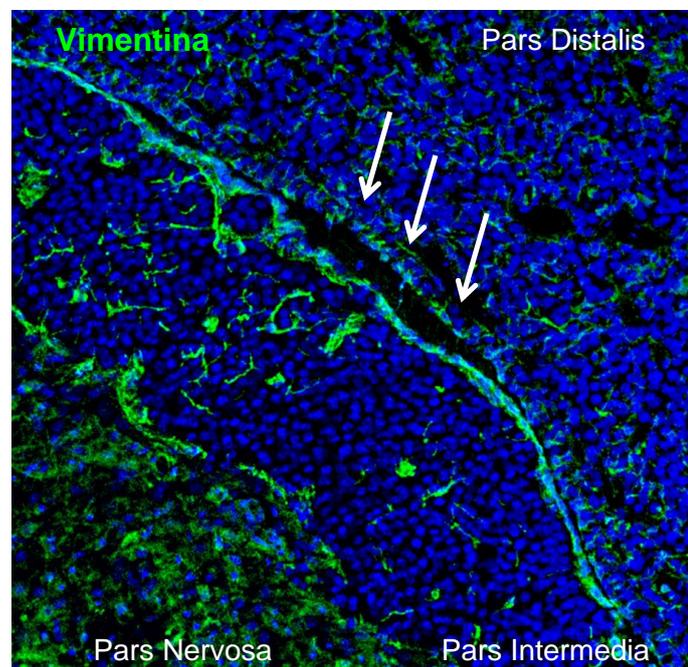


Figura 29. Expresión de Vimentina en hipófisis adultas. Las flechas indican una marcada expresión de Vimentina en algunas células de la ZM. Nótese la presencia del este marcador en pars distalis, intermedia y nervosa. Aumento original 200x.

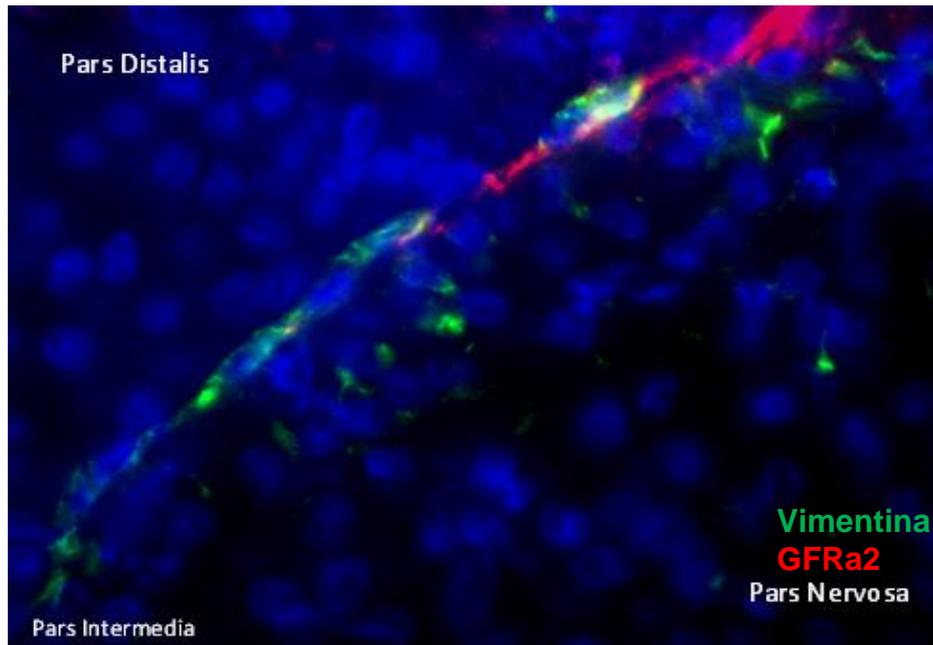


Figura 30. Inmunomarcación de Vimentina y GFRa2 en ZM de hipófisis de rata. Se destacan células de la ZM que presentan inmunopositividad para el marcador Vimentina pero no co-expresión con GFRa2. Magnificación original 600x.

Con el fin de determinar la localización precisa de las células mesenquimales que expresan Vimentina en el nicho de *SC* hipofisarias, se identificaron estas células en ZM por ICQU. La expresión de la misma se observó en el citoplasma de células fusiformes ubicadas por debajo de células con características morfológicas descriptas para *SC* (Figura 31). El estudio a nivel ultraestructural mediante la identificación específica de Vimentina permitió confirmar la identidad de las células mesenquimales de sostén que forman parte del nicho de *SC* hipofisarias.

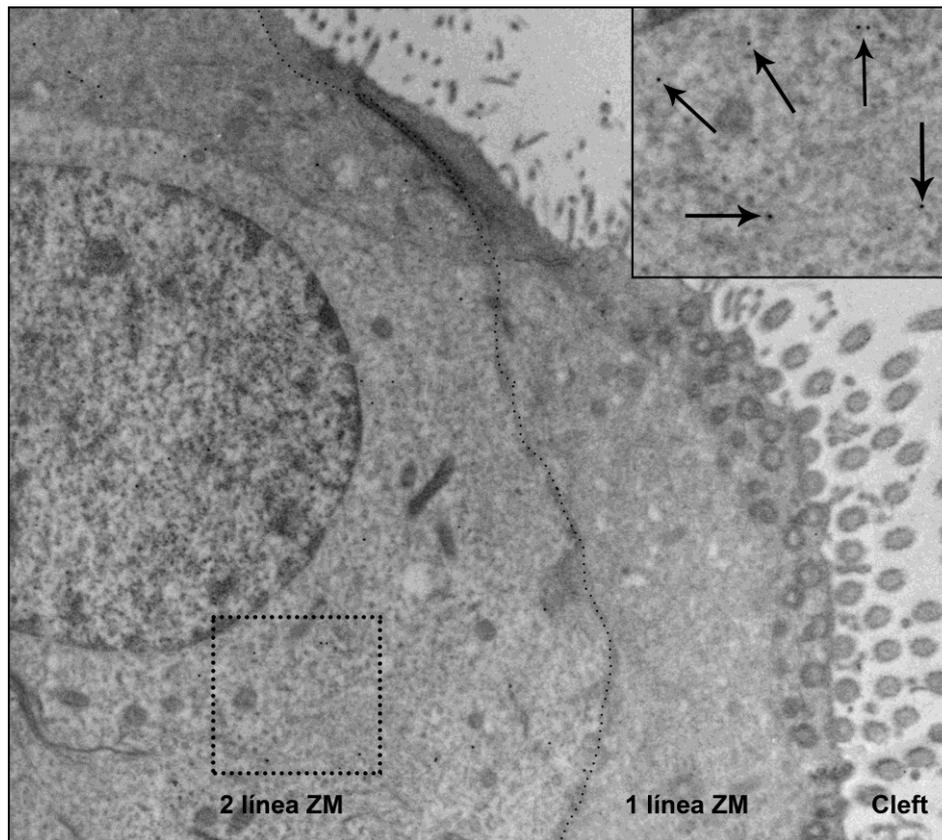


Figura 31. Inmunolocalización ultraestructural de Vimentina en células mesenquimales de zona marginal. Se aprecia una célula positiva para el marcador localizada en la segunda capa de la ZM debajo de una célula ciliada. La línea de puntos indica el límite entre la primera y la segunda capa de células de la ZM y el cuadrado de puntos muestra la ubicación de la zona del *inset*. Magnificación original 7500x. *Inset*: partículas de oro de 15 nm identificadas por flechas. ZM: Zona Marginal.

➤ Localización de β -catenina en células del nicho en ZM de hipófisis de ratas adultas

Por último, para completar la caracterización del nicho de células *stem* hipofisarias, se analizó la expresión del marcador β -catenina. Como ya se especificara con anterioridad, se ha reportado la presencia de β -catenina en las *ESC* y *ASC* en las que cumpliría un rol dual de acuerdo a su localización como proteína de adhesión celular o como segundo mensajero de la vía Wnt. Si bien se ha detectado que las células de la ZM expresan esta proteína [76], no ha sido descrito el tipo celular que lo expresa ni su localización

subcelular. Mediante ICQU observamos la expresión de β -catenina en células de la primera y segunda línea de la ZM, frecuentemente asociada a la membrana plasmática (Figura 32).

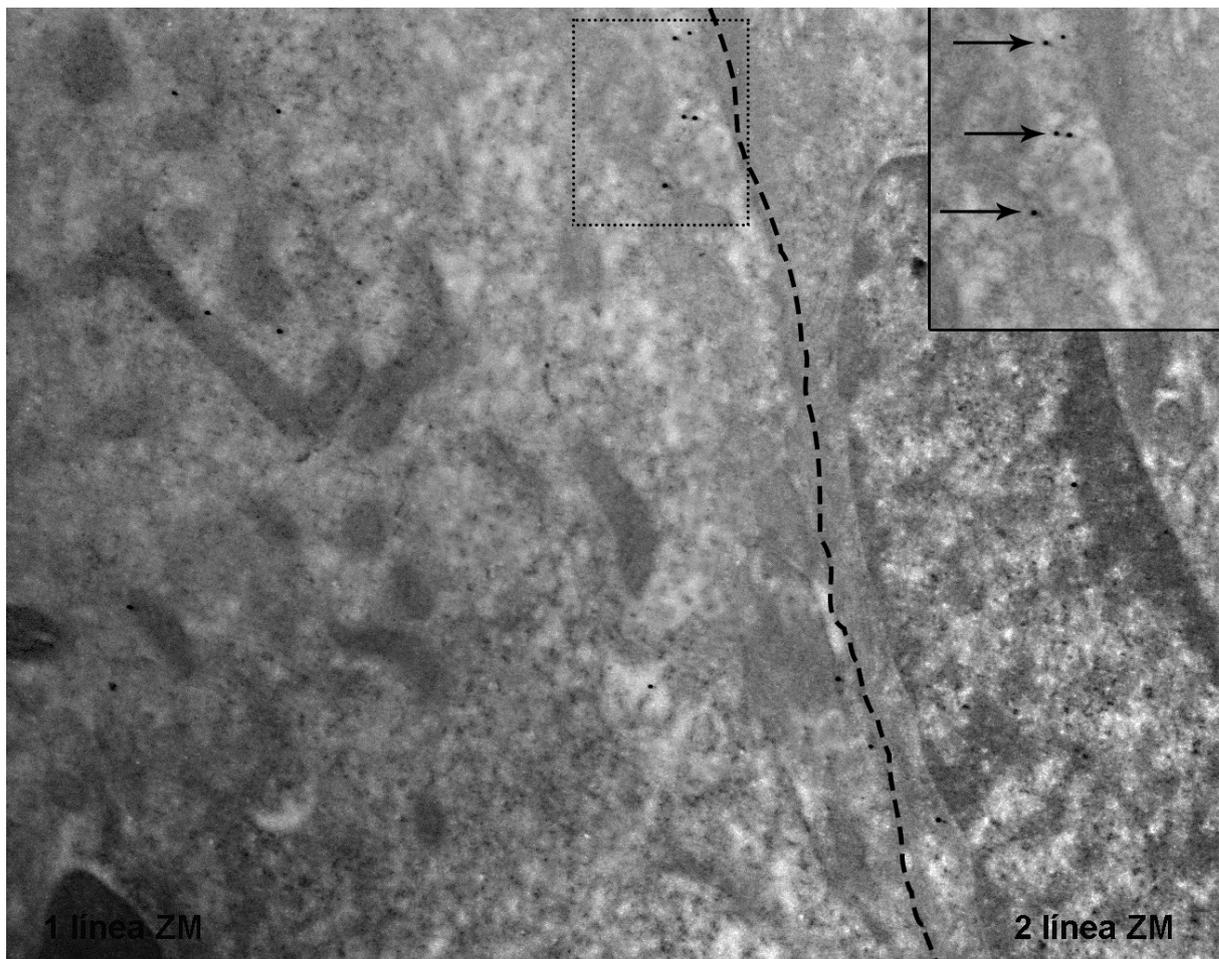


Figura 32. Microfotografía electrónica de la inmunomarcación de β -catenina en glándula hipofisaria de rata adulta. Se identifica una célula positiva para β -catenina localizada en la primera capa de la ZM. La línea de puntos indica el límite entre la primera y la segunda capa de células de ZM y el cuadrado de puntos muestra la ubicación de la zona del *inset*. Magnificación original 7500x. *Inset*: partículas de oro de 15 nm identificadas por flechas ubicadas cerca de la membrana plasmática. ZM: Zona Marginal.

2do**Objetivo
Específico****Determinar la capacidad de células aisladas de hipófisis adultas de formar estructuras esferoidales enriquecidas en CS/P *in vitro*.**

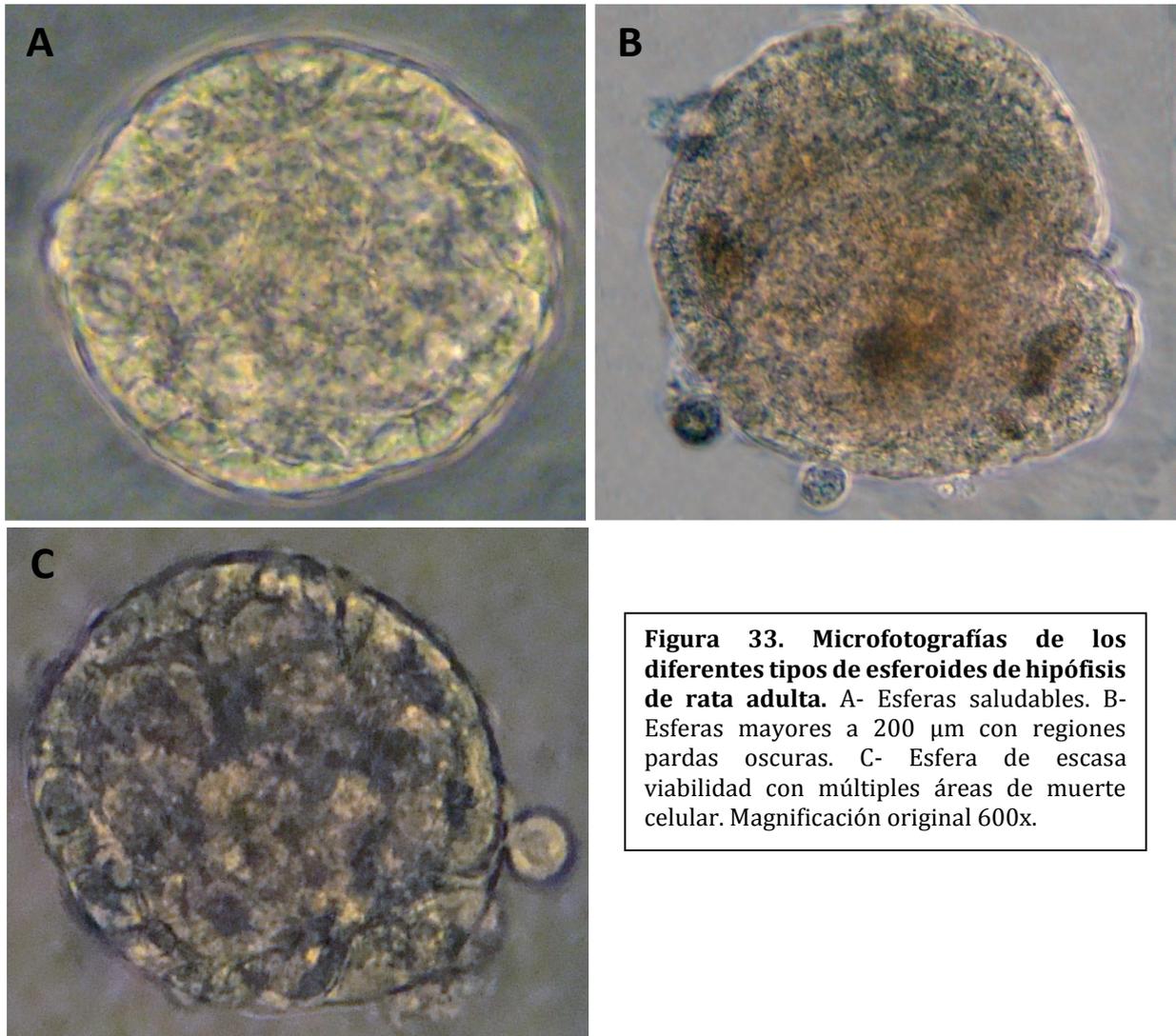
La caracterización e identificación de las células que componen la ZM en hipófisis de un organismo adulto debe complementarse con el ensayo de formación de esferas *in vitro* y confirmar las propiedades específicas de SC. Ha sido demostrado que las ESC forman estructuras de tipo esféricas cuando son cultivadas en cultivos en suspensión y además pueden recapitular la formación de tejidos del endodermo primitivo (cuerpos embrionarios) [124]. En 1992, se publicó el primer reporte sobre la formación de esferoides provenientes de tejido adulto del sistema nervioso central, causando gran conmoción en la comunidad científica ya que se confirmaba la presencia de CS/P en este tejido adulto [6].

El protocolo de formación de esferas utilizado sigue vigente aunque con algunas modificaciones que incluyen la utilización de un medio sin suero con el agregado de factores de crecimiento como FGF y EGF. Sólo las células que responden a estos estímulos mitogénicos son capaces de proliferar y formar estructuras esferoidales, las que pueden utilizarse en una gran variedad de ensayos funcionales [125].

Considerando nuestros hallazgos sobre la existencia de un nicho de CS/P en la ZM hipofisaria, nos propusimos aislar *in vitro* estructuras esferoidales enriquecidas en SC a partir de hipófisis de ratas adultas y analizar sus características de células indiferencias.

➤ **Caracterización morfológica de esferoides obtenidos de hipófisis de ratas adultas**

Los esferoides obtenidos en cultivo se caracterizaron morfológicamente por microscopía de contraste de fase. En la Figura 33-A, se observa un esferoide brillante en toda su estructura, aspecto característico de esfera saludable. Algunas esferas presentaron un tamaño mayor a 200 μm con escasas regiones oscuras, relacionándose a las mismas con áreas de muerte celular (Figura 33-B). Por último, otras esferas en las que se observaron múltiples áreas de muerte celular, se relacionaron con una viabilidad marcadamente comprometida (Figura 33-C).



Con el objetivo de analizar las características morfológicas de los esferoides, los mismos fueron incluidos en resinas epoxi y visualizados por microscopía óptica de alta resolución. De esta manera se observó que los esferoides presentaron una gran heterogeneidad celular, puesta en evidencia por los distintos patrones de afinidad al colorante azul de toluidina (Figura 34-A). En general, los núcleos fueron de gran tamaño, con una alta relación núcleo/citoplasma, cromatina laxa exhibiendo 1 o 2 nucléolos. En el interior de los esferoides se observaron espacios intercelulares que corresponden a lagunas generadas por la expansión celular que presentan estas estructuras. Algunas células de la

periferia exhibieron prolongaciones apicales, mientras que otras exhibieron morfología fusiforme (Figura 34-B y C). Signos evidentes de muerte celular se visualizaron en algunas áreas de la estructura, relacionándose con núcleos y cuerpos apoptóticos. La formación de estos focos de muerte celular en los esferoides podrían deberse a su tamaño (mayor a 200 μm), lo que ocasiona falta de oxígeno y nutrientes en algunas áreas (Figura 34-D).

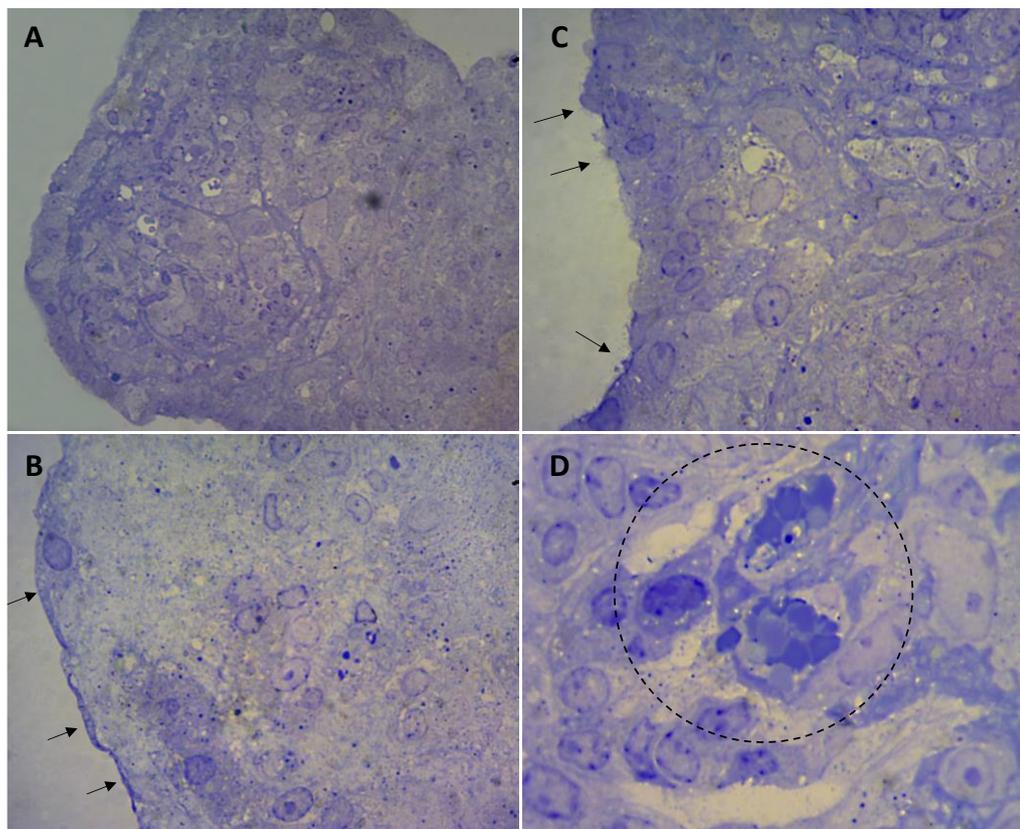


Figura 34. Microfotografías de esferoides, analizados por microscopía óptica de alta resolución. Se evidencian células con una gran diversidad de formas y tamaños (A), algunas de ellas con prolongaciones apicales en la membrana plasmática (B-indicado por flechas), mientras que otras exhiben forma fusiforme (C-indicado por flechas). Por sectores se identifican áreas de muerte celular (D-círculo). Magnificaciones originales A, B y C: 400x; D: 1000x.

➤ **Estudio ultraestructural de las pituesferas obtenidas de hipófisis de ratas adultas**

Se estudiaron las características ultraestructurales de las células que componen los esferoides aislados en cultivo denominados pituesferas. Así, se identificaron células que poseen características subcelulares similares a las observadas en el tejido adulto. En las fotografías de la Figura 35, se visualizan de zona central de la esfera células que presentan una relación núcleo/citoplasma incrementada, núcleos indentados y nucléolos prominentes. A nivel citoplasmático se destaca el escaso desarrollo de RER, abundantes mitocondrias, ausencia de gránulos secretorios y numerosas vesículas de tráfico intracelular. Estos hallazgos son indicativos de una marcada actividad metabólica de estas células en cultivo. La presencia frecuente de vesículas, algunas recubiertas de clatrina y de cuerpos multivesiculares indican un intenso tráfico intracelular. Además, se observaron uniones intercelulares conservadas, como por ejemplo, desmosomas. Las células localizadas en el borde de la esfera presentaron características morfológicas similares a las que se ubican en el centro de estas estructuras, evidenciando algunas de ellas prolongaciones apicales del tipo de microvellosidades. Otras células de la periferia poseen un fenotipo compatible con células de sostén. Los hallazgos obtenidos a nivel ultraestructural indican que los esferoides saludables presentan una destacada actividad metabólica, organización y comunicación intercelular actuando como un organismo dinámico.

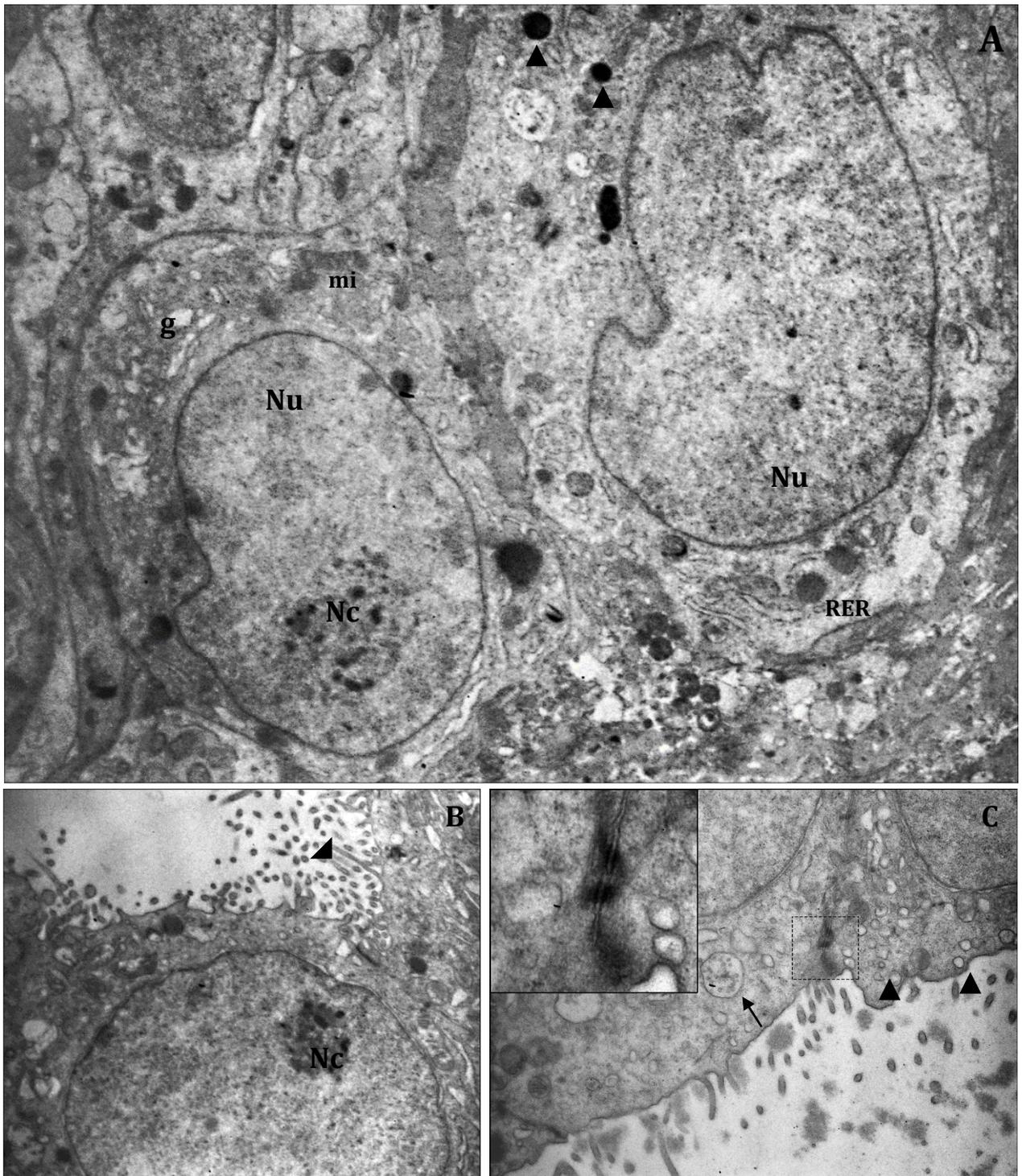
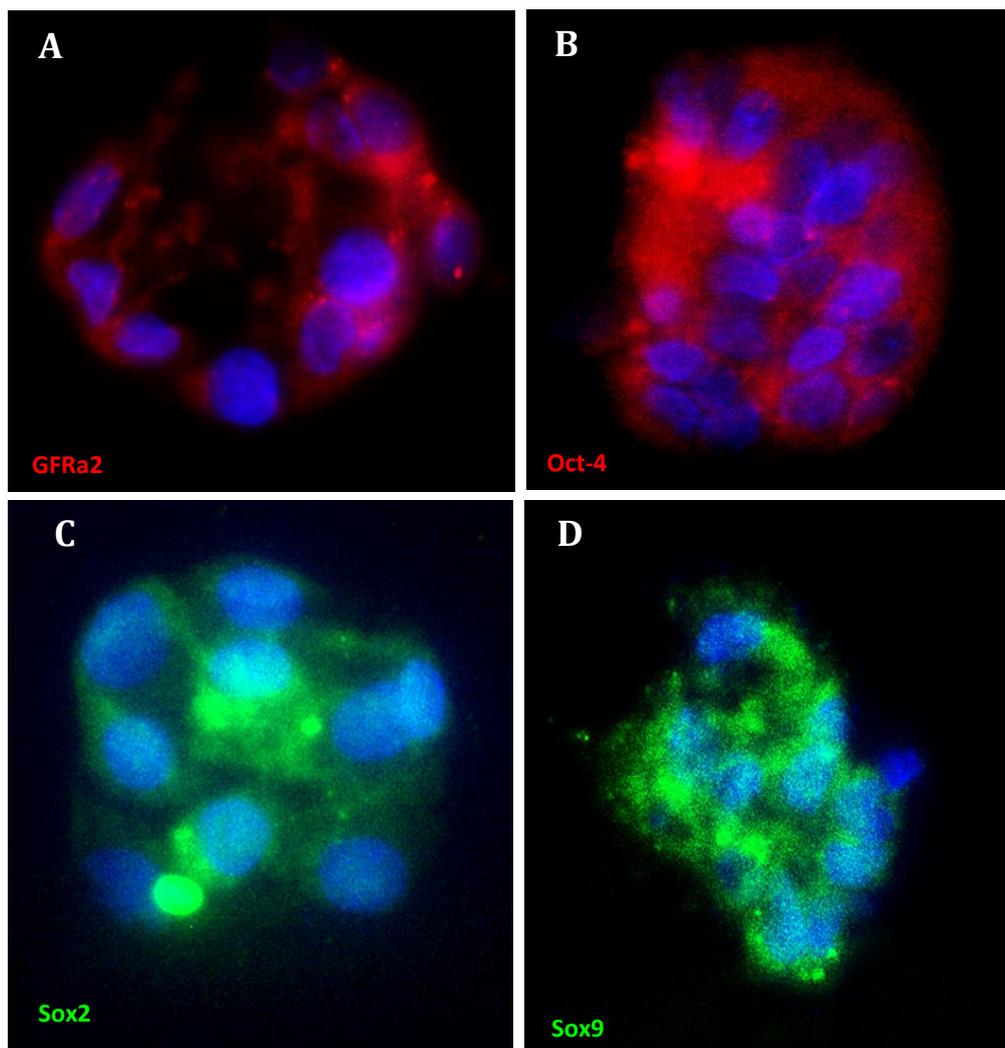


Figura 35. Microfotografías representativas de células que componen los esferoides saludables. A) Se identifican dos células del área central del esferoide con escaso desarrollo del sistema de organelas proteinopoyéticas. B) Célula de la periferia del esferoide, en la que la punta de flecha indica la presencia de microvellosidades. C) Células con vesículas (puntas de flecha) y cuerpos multivesiculares (flecha). *Inset:* Se aprecian uniones intercelulares tipo desmosoma. Nu: núcleo, Nc: nucléolo, mi: mitocondria, RER: retículo endoplasmático rugoso, g: aparato de Golgi. Magnificación original A: 4600x, B: 7700x, C: 10000x, inset: 20000x.

➤ **Identificación de CS/P en los esferoides mediante marcadores específicos**

Para confirmar que las pituesferas son estructuras enriquecidas en CS/P realizamos la identificación con marcadores específicos de CS/P. A través de este análisis se determinó que las células que conforman la esfera presentan positividad para los marcadores GFRa2, Oct-4, Sox2 y Sox9 (Figura 36). Además, se observó que aproximadamente un 90% de esferas presentaron co-expresión de los marcadores Oct-4 y Sox2. Un hallazgo esperable fue la localización nuclear de Oct4, Sox2 y Sox9 en la mayoría de las células del esferoide, lo que es indicativo de una mayor actividad proliferativa del esferoide.



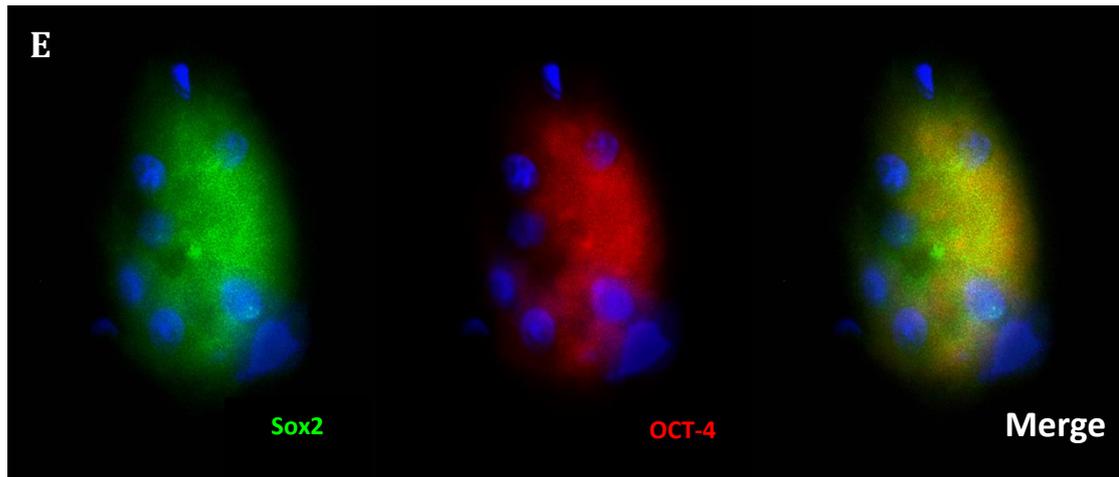


Figura 36. Identificación mediante marcadores específicos de las CS/P que componen los esferoides. Las mismas fueron inmunopositivas para GFRa2 (A), Oct-4 (B), Sox2 (C) y Sox 9 (D). La mayoría de las células de la esfera co-expresan los marcadores Sox2 y Oct-4, lo que sugiere mayor grado de pluripotencia (E). Magnificación original A, B, C y D: 600x.

➤ **Determinación de la capacidad multipotente de las CS/P en los esferoides mediante inducción a diferenciación con medios específicos**

Como fue descrito anteriormente en Introducción, una SC posee la propiedad de dividirse simétrica y asimétricamente, generando mediante este último tipo de división una progenie celular con un mayor grado de diferenciación, denominada células progenitoras.

A continuación, se analizó si los esferoides obtenidos de hipófisis adultas conservan la capacidad de generar células endocrinas y la propiedad de diferenciarse a otros linajes celulares. Para llevar a cabo este ensayo, los esferoides se incubaron por 10 días con medios específicos de diferenciación. Transcurrido este tiempo, se obtuvieron células PRL+ (Figura 37) y células con fenotipo similar al neuronal, identificadas por las proteínas neuronales Tuj-1 y GFAP (Figura 38). Estos resultados confirman que los esferoides

aislados están formados por SC, las que además poseen capacidad de diferenciarse revelando su multipotencialidad.

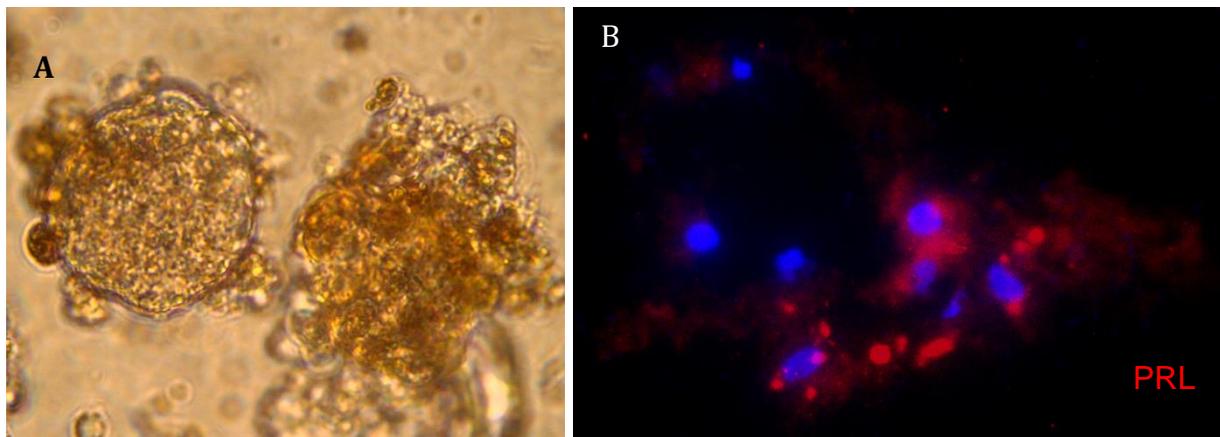


Figura 37. Identificación de las células PRL+ en esferoides luego de inducir diferenciación con medios específicos. A) Fotografía representativa obtenida mediante contraste de fase de esferoides que muestran pérdida de su organización celular luego de 10 días de incubación con medio de diferenciación. Magnificación original 600x. B) Células dispersas que componen el esferoide presentan intensa inmunopositividad para la hormona PRL. Magnificación original: 400x. PRL: prolactina.

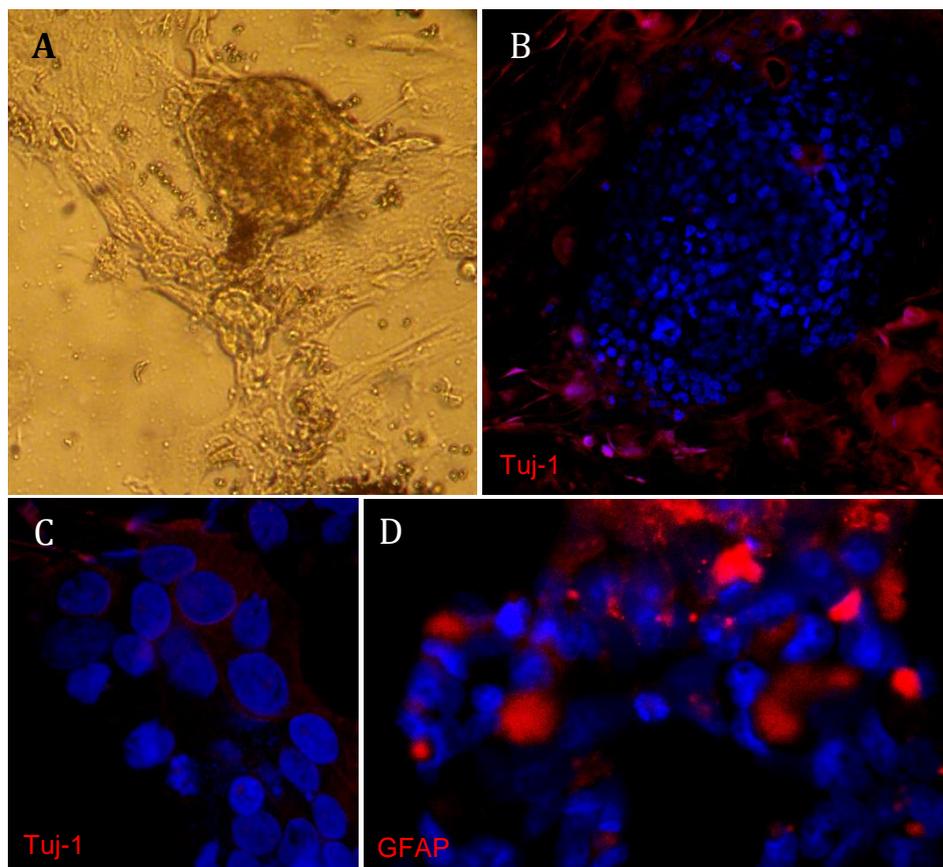


Figura 38. Células que componen los esferoides con inmunopositividad para proteínas de linaje neuronal. A) Esferoide adherido a la placa de Petri formando un núcleo de diferenciación luego de 10 días

de cultivo con medio específico de diferenciación. B) Las células que componen el núcleo de diferenciación presentan inmunopositividad para Tuj-1. C) Células inmunopositivas para Tuj-1 de la periferia del núcleo de diferenciación. D) Células del esferoide presentan positividad para el marcador GFAP y cierto grado de desorganización. Magnificaciones originales A: 600x, B: 200x, C y D: 400x.

➤ Evaluación de la capacidad de auto-renovación de las CS/P en los esferoides

Como ya se mencionó, una de las principales características de las SC es la de auto-renovarse, proceso mediado por la regulación de las divisiones simétricas, generando así células hijas idénticas a la célula de origen. La demostración de esta propiedad analizada *in vitro* es el indicador más importante de “stemness” y también se la considera como un indicador de “neogénesis” de una región, es decir, una representación del número de células *stem* en un nicho particular [126]. Para realizar este análisis se partió de diluciones de suspensiones celulares enriquecidas en SC sembradas en una placa *multiwell*. Luego de 7 días de cultivo se evidenció la formación de pituesferas, confirmando así su generación “*de novo*”. Este hallazgo indica que una única célula es capaz de dar origen a un esferoide de forma activa y que no proceden de acúmulos celulares.

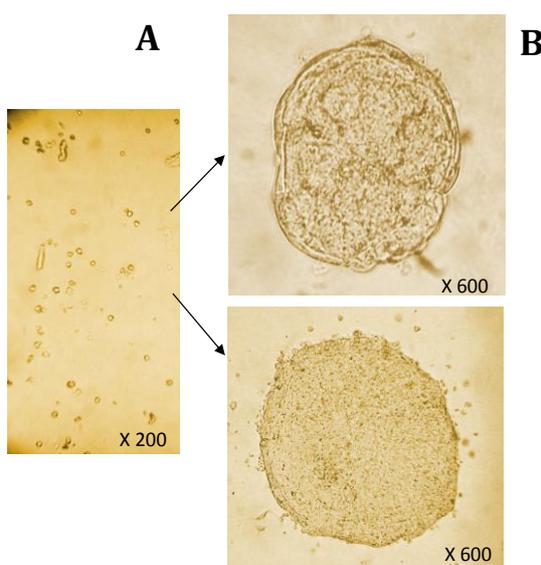


Figura 39. Fotografías representativas del ensayo de auto-renovación. A) Dispersión celular de los esferoides. B) Esferoides secundarios obtenidos luego de 7 días de cultivo. Se observa esferoide con características morfológicas similares al primario (arriba). Esferoide adherido a la placa de cultivo con signos de muerte celular (abajo).

3er

Objetivo
Específico**Evaluar posibles cambios en los marcadores de la población de SC hipofisarias durante el ciclo estral, la preñez y lactancia.**

De acuerdo a los resultados descriptos, obtenidos tanto en ensayos desarrollados *in vivo* como *in vitro*, se confirmó la presencia de un verdadero nicho de SC en hipófisis de ratas hembras adultas. Considerando estos hallazgos surgió el siguiente interrogante: ¿las CS/P contribuyen a las variaciones de la población de células endocrinas que se producen en la hipófisis en respuesta a requerimientos hormonales, como ocurre en las diferentes fases del ciclo estral, preñez y lactancia? Para responder este interrogante, se evaluaron posibles cambios en la expresión de los marcadores específicos de SC en respuesta a fluctuaciones en la población de células adenohipofisarias durante los estados fisiológicos antes mencionados.

➤ **Expresión de marcadores asociados a fenotipo CS/P durante ciclo estral y lactancia**

Análisis de los niveles de ARNm y proteicos de marcadores de fenotipo SC en hipófisis total durante el ciclo estral y la lactancia activa

La expresión de Oct-4 analizada por citometría de flujo mostró un aumento en d4L respecto a DII (6,26% vs. 1,09% Oct-4+, Figura 40-A), mientras que los niveles de ARNm se incrementaron significativamente en E, presentando valores similares en d4L vs. DII (Figura 41-A). En relación a Sox2, se observó una expresión incrementada durante d4L respecto a DII (22% vs. 1,03% Sox2+, Figura 40-B). De igual manera, los niveles de ARNm

aumentaron de manera significativa en d4L y E vs. DII (Figura 41-B). GFRA2, exhibió un incremento tanto en sus niveles proteicos (7,76% vs. 4,83% GFRA2+, Figura 40-C) como los del ARNm en d4L respecto a DII (Figura 41-C).

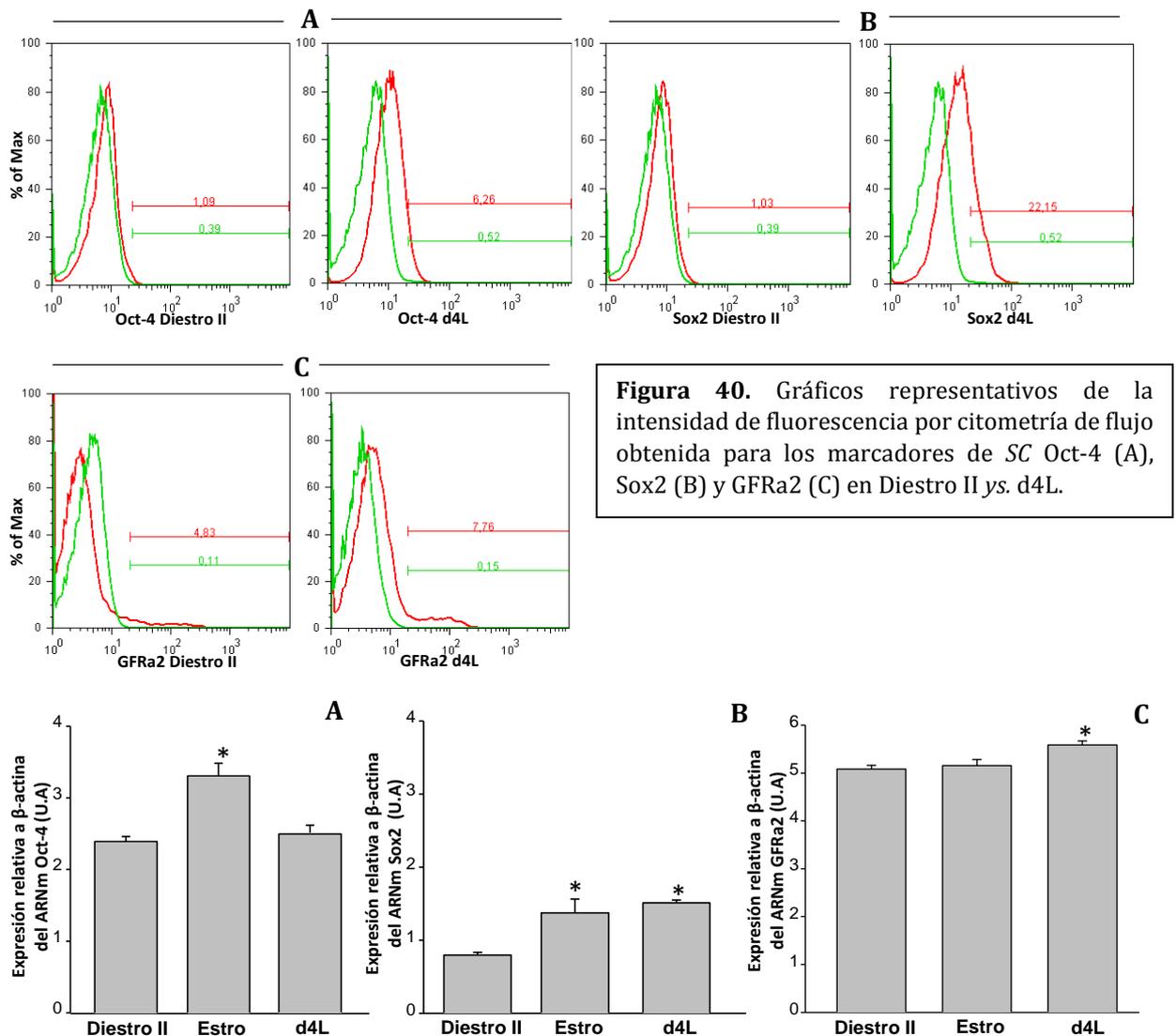


Figura 41. La expresión de ARNm fue cuantificada relativamente al gen de referencia β -actina. Los resultados de los niveles de ARNm de los grupos Estro y d4L se compararon al grupo Diestro II. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de ANOVA-tukey, * $p < 0,05$.

Existe vasta bibliografía relacionada al rol modulador del E2 sobre la actividad funcional de la glándula hipofisaria. Particularmente, en la tarde del proestro y la mañana del estro un aumento en los niveles séricos de esta hormona han sido correlacionados con un

incremento en la proliferación de la población de células lactotropas [85, 88], lo cual nos permitió hipotetizar que el E2 podría actuar sobre las SC hipofisarias como un agente diferenciador a células endocrinas. Para analizar si el E2 participaría en este efecto, se realizó un ensayo de diferenciación de esferoides a células PRL+, adicionando al medio de cultivo el compuesto BIO, el cual favorece la expresión del factor Pit-1 promoviendo una mayor diferenciación y formación de células PRL+, y suplementándose con 50 ng/ml de 17- β estradiol por 10 días. Mediante microscopía de contraste de fase, se observó que la estructura esferoidal comenzaba a desorganizarse hasta perder su forma completamente al día 10 de cultivo. Por IF, se evidenció que en el transcurso del tiempo del cultivo se detectaba un mayor número de las células PRL+ en el esferoide. Estos resultados confirman la participación de E2 en el proceso de diferenciación de las SC hipofisarias hacia un linaje celular diferenciado, células PRL+ (figura 42).

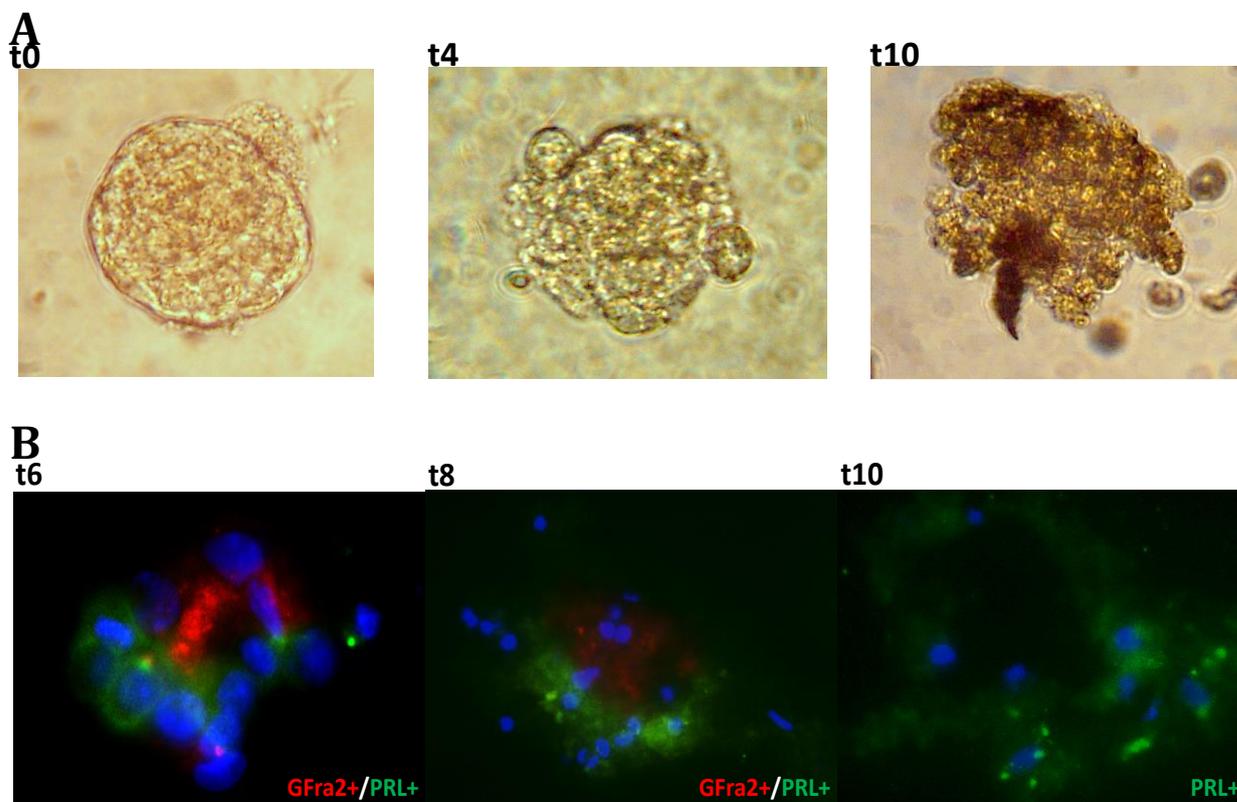


Figura 42. A) Microfotografías de esferoides correspondientes a distintos tiempos del protocolo de diferenciación, t0: tiempo 0, t4 y t10: 4 y 10 días de cultivo suplementados con 17- β estradiol. Se observa una pérdida creciente de la organización en la estructura esferoidal. Magnificación original 400x, B) A los 6 días de cultivo (t6), se aprecia una estructura formada por células que expresan el marcador GFRA2 y algunas células PRL+ en la periferia. Mientras que, a 8 días de cultivo (t8) se observa una gran proporción de células PRL+ dispersas y unas pocas células GFRA2+ y a 10 días de cultivo (t10) todas las células que formaban originariamente un esferoide expresan la hormona. Magnificación original 400x.

Análisis morfométrico de los marcadores asociados a fenotipo CS/P en ZM durante ciclo estral y lactancia activa

Considerando las evidencias descriptas anteriormente, surge un nuevo interrogante ¿los cambios observados en la expresión de los marcadores de fenotipo *stem* se deben a la activación del nicho de SC en la ZM? Para dilucidar esta incógnita se evaluaron los marcadores de SC en la ZM mediante ICQU, que permite identificar la expresión de los mismos en la región de interés. Posteriormente se aplicaron métodos morfométricos para evaluar la expresión de los marcadores de CS/P durante el ciclo estral (DII y E) y d4L, períodos en los que la hipófisis manifiesta cambios en la población de células endocrinas. El análisis de la expresión de Oct-4 mostró un incremento marcado principalmente en d4L tanto en el compartimiento nuclear (CN) como en el citoplasmático (CC) (Figura 43-A). En relación a Sox2, pudo demostrarse una distribución similar en el CN durante los estadios analizados mientras que el CC exhibió un aumento significativo en d4L vs. DII (Figura 43-B). En contraposición, la expresión de GFRA2 disminuyó significativamente en d4L (Figura 43-C). Por último, Sox9 evidenció una mayor expresión en E vs. DII en el CN y CC, mientras que en d4L se determinó un significativo descenso en comparación a DII (Figura 43-D).

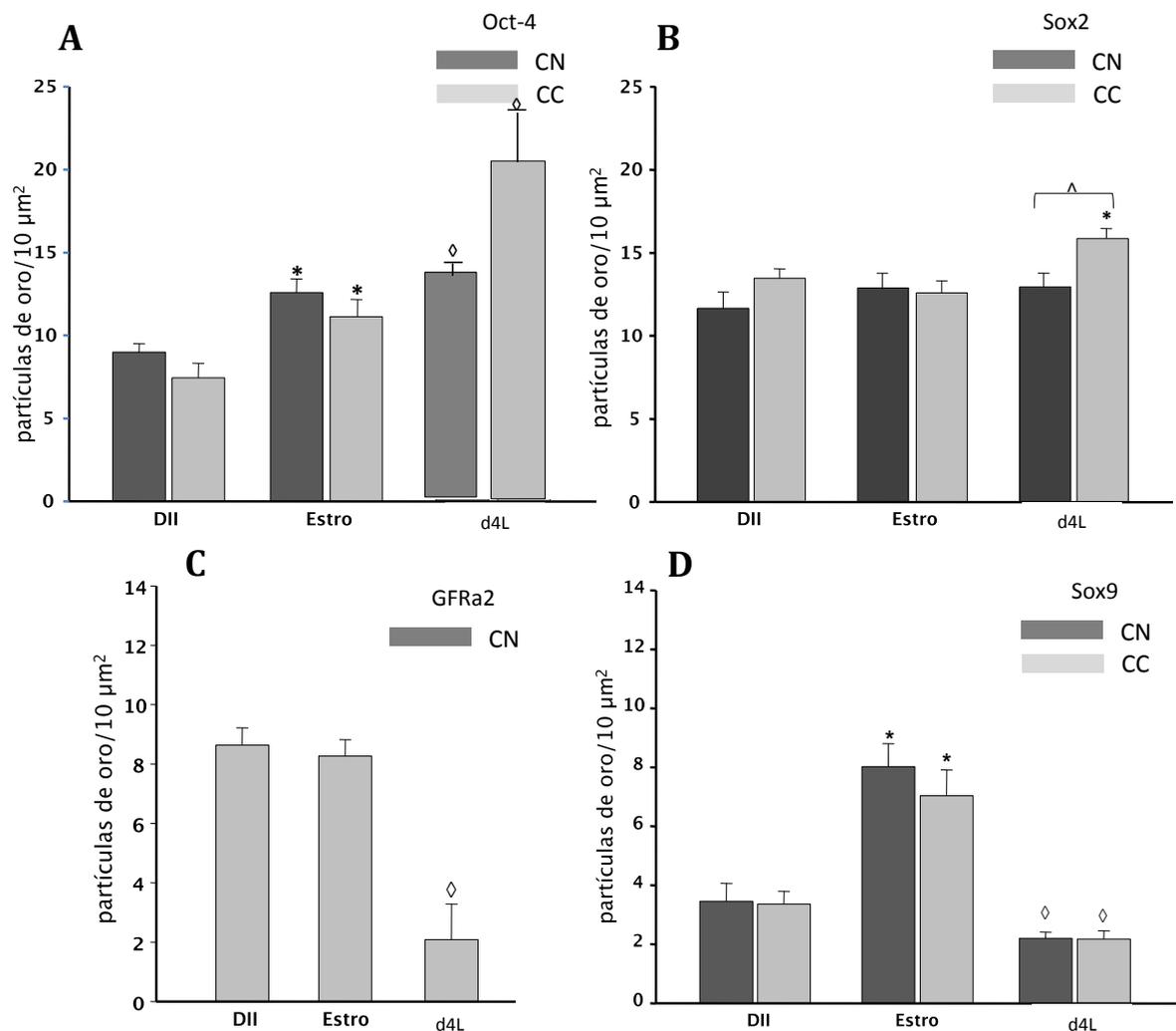


Figura 43. Análisis morfométrico de la expresión de marcadores CS/P en los compartimentos nuclear (CN, barra gris oscuro) y citoplasmático (CC, barra gris claro) de células de la zona marginal.

A) La expresión de Oct-4 mostró un notable incremento en ambas fracciones analizadas tanto en Estro como en día 4 de lactancia (d4L) (* $p < 0,05$ E y d4L vs. DII; ◊ $p < 0,05$ E y d4L vs. DII).

B) El marcador Sox2 presentó un aumento en sus niveles de expresión en el compartimento citoplasmático de d4L (* $p < 0,05$ d4L vs. DII; ^ $p < 0,05$ CC d4L vs. CN d4L).

C) Se destaca una significativa disminución del marcador GFRA2 en citoplasma a los 4 días de lactancia activa (◊ $p < 0,05$ d4L vs. DII).

D) La expresión del marcador Sox9 presentó un aumento en Estro tanto en el núcleo y el citoplasma (* $p < 0,05$ E vs. DII), con una disminución notable en d4L, comparada al ciclo estral (◊ $p < 0,05$ d4L vs. DII). Los resultados se muestran como media \pm SE de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA-Tukey.

A continuación se resumen los resultados obtenidos del análisis morfométrico de los marcadores analizados relacionados con el rol principal de los mismos informados en bibliografía:

- El incremento en la expresión nuclear y citoplasmática de Oct-4 en d4L, se asocia a un rol activo como “guardián” de la pluripotencialidad de las SC hipofisarias.
- El cambio significativo que Sox2 exhibe sólo en el compartimento citoplasmático de células de la ZM del grupo d4L, se relacionaría a un fenotipo más diferenciado en células progenitoras.
- La mayor expresión de Sox9 en la fase E demuestra la existencia de una población de células progenitoras que se diferenciarían en respuesta al estímulo de E2.

El incremento en la expresión de Oct-4 y Sox2 observados en d4L son indicativos de la activación del nicho de SC hipofisarias. Sin embargo, el marcador específico de SC hipofisarias, GFRA2, disminuyó significativamente en lactancia activa. Este hallazgo que nos indujo a pensar que probablemente GFRA2 manifieste cambios en tiempos que anteceden al día 4 de lactancia. Para comprobar esta hipótesis se incluyó el estudio de un nuevo grupo experimental analizando diferentes tiempos de gestación y de lactancia.

➤ **Expresión de marcadores asociados a CS/P durante la gestación y lactancia**

Con el fin de evaluar los marcadores de CS/P: GFRA2, Oct-4, Sox2 y Sox9 en el CN y CC de células de la ZM en gestación y lactancia, se cuantificó por análisis morfométrico a nivel ultraestructural la expresión de los mismos. Esta técnica permitió evaluar

específicamente a las proteínas de interés en las células localizadas en ZM determinando sus posibles fluctuaciones en respuesta a los cambios hormonales durante las etapas analizadas.

GFRa2

La expresión de GFRa2 en el citoplasma de las células de la ZM fue similar en COP y d5G. Sin embargo, hubo una marcada reducción en la mitad de la gestación (d15G) en comparación con COP ($p < 0,05$), detectándose un notable aumento al término de la preñez. Al inicio de la lactancia, la expresión GFRa2 disminuyó significativamente, manteniendo este nivel en d4L (Figura 44-A).

Oct-4 y Sox2

La expresión citoplasmática de Oct-4 en ZM, fue similar en COP y durante la gestación (d5G, d15G). En contraste, este factor a nivel nuclear, mostró una significativa disminución en la mitad de la gestación (d15G) y en AT. Durante lactancia activa (d4L), la expresión nuclear y citoplasmática de Oct-4 evidenció un aumento significativo en comparación con AT, pero no se observaron diferencias entre los CN y CC en lactancia temprana. Sin embargo, en d4L, la inmunomarcación reveló una distribución subcelular diferente, con una mayor expresión en el citoplasma comparado al compartimento nuclear (Figura 44-B).

Sox2 exhibió un patrón de distribución subcelular diferente al de Oct-4, presentando los niveles más altos en el compartimento nuclear en comparación con el citoplasmático en COP y d15G (COP: CC vs. NC, $p < 0,05$ y d15G: CC vs. NC, $p < 0,01$). Durante la lactancia activa,

la expresión de este marcador mostró notables aumentos en los dos compartimentos subcelulares (d4L vs. AT; Figura 44-C).

Sox9

El estudio morfométrico demostró una disminución significativa de Sox9 dentro del compartimiento citoplasmático durante la gestación, en d5G y d15G, en comparación con COP, exhibiendo un marcado descenso en la expresión nuclear de Sox9 en d5G. Sin embargo, este marcador aumentó significativamente a nivel nuclear cuando se compararon AT vs. COP. Durante d1L, la expresión Sox9 presentó un notable aumento, en ambos compartimientos analizados, en comparación con AT, disminuyendo significativamente después de 4 días de lactancia activa (Figura 44-D).

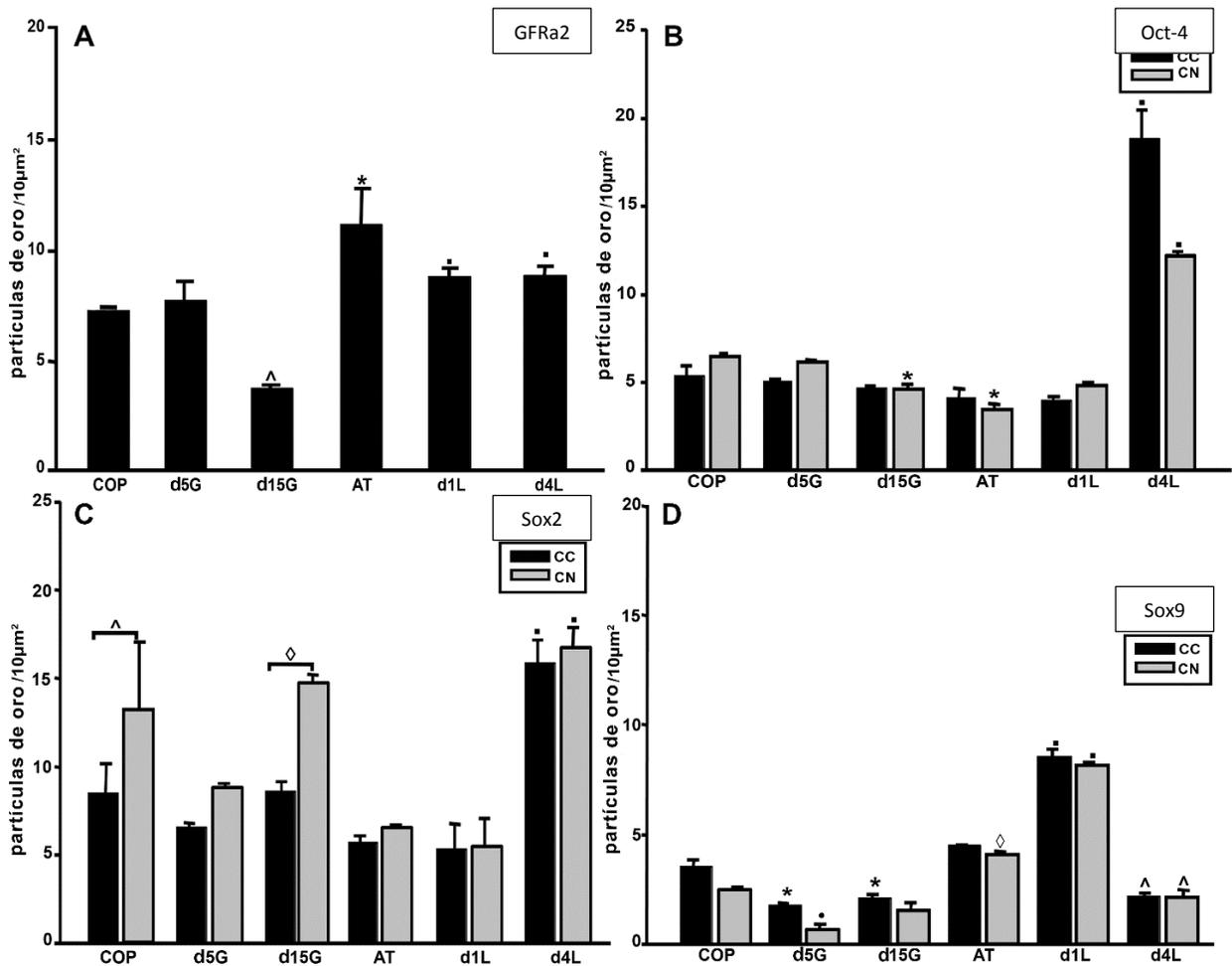


Figura 44. Análisis morfométrico de la expresión marcadores CS/P en los compartimientos citoplasmático (CC) y nuclear (CN) de las células de la ZM en gestación y lactancia.

A) La expresión de GFRA2 mostró un notable aumento a término de la gestación (* $p < 0,05$ AT vs. COP; Δ $p < 0,05$ d15G vs. COP; * $p < 0,05$ d1L y d4L vs. AT).

B) El marcador Oct-4 mostró un aumento en los compartimientos nuclear y citoplasmático en lactancia activa (* $p < 0,01$ d4L vs. AT; NC: * $p < 0,01$ d15G y AT vs. COP).

C) Una distribución diferencial de Sox2 entre los compartimientos nucleares y citoplasmáticos se observa en la COP (Δ $p < 0,05$ N vs. C) y d15G (\diamond $p < 0,01$ N vs. C), mientras que en lactancia activa incrementa en ambos compartimientos subcelulares (* $p < 0,01$ d4L vs. AT).

D) Expresión del marcador Sox9 exhibió un aumento en la lactancia temprana tanto en el núcleo como en el citoplasma (* $p < 0,01$ d1L vs. AT), con una disminución notable observada en d4L (Δ $p < 0,05$ d4L vs. AT; CC: * $p < 0,05$ d5G y d15G vs. COP; CN: \bullet $p < 0,05$ d5G vs. COP; \diamond $p < 0,05$ AT vs. COP).

Los resultados se muestran como medias \pm SE de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA-Tukey.

Con el objetivo de visualizar los principales cambios de los marcadores de CS/P cuantificados por ICQU, se realizó IF de las hipófisis correspondientes.

En la Figura 45-A se observan células de ZM y AP inmunopositivas para GFRa2. En B y C se visualizan células de ZM en hipófisis de ratas en d4L con una intensa expresión de Oct-4 y Sox2. En el panel C, se muestra una sección de AP de ratas en lactancia temprana, observándose un número destacado de células Sox9 positivas.

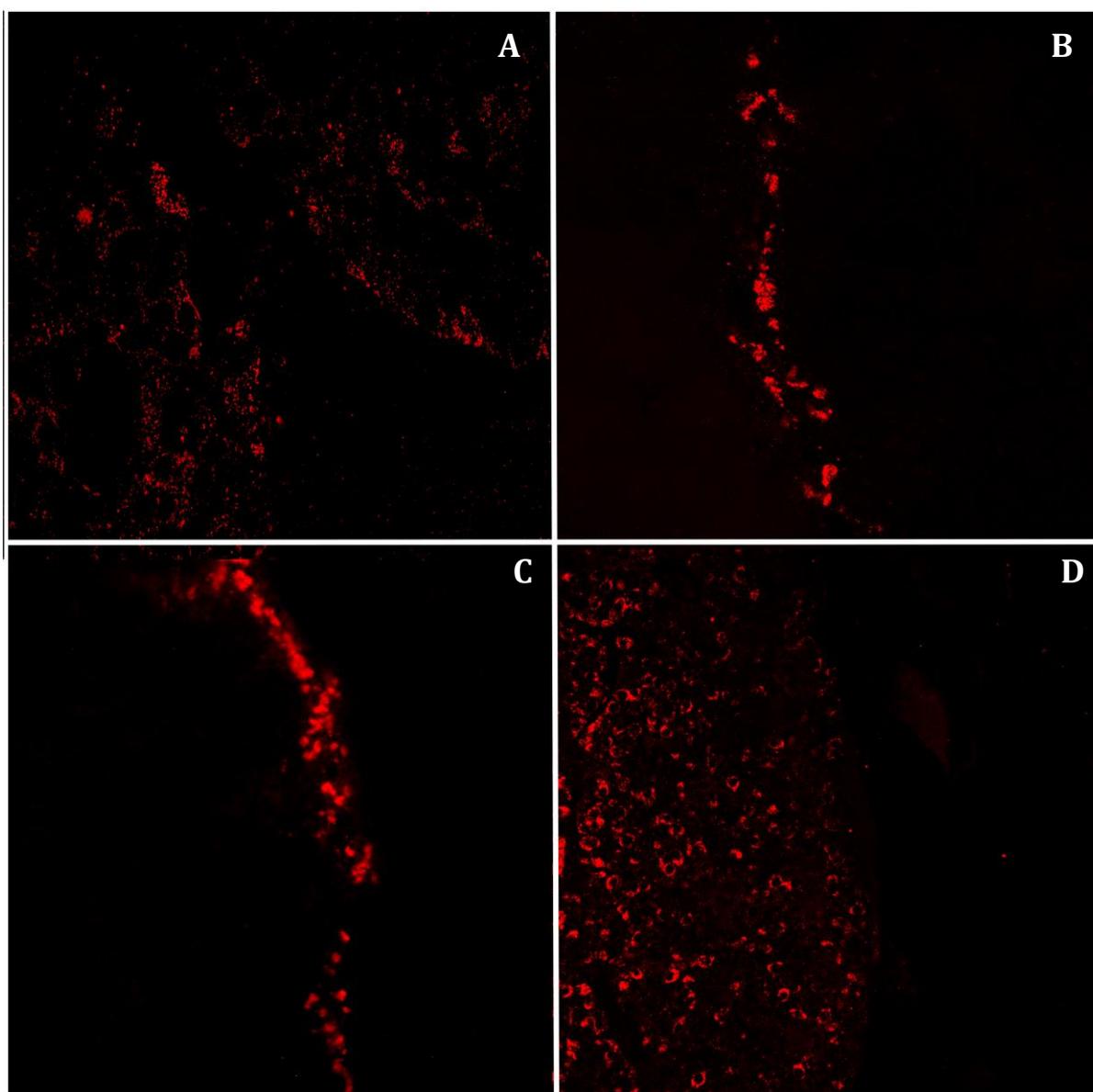


Figura 45. Detección en ZM y AP de células inmunopositivas para marcadores de CS/P. Las células en las regiones de interés expresaron GFRA2 (A), Oct-4 (B), Sox2 (C) y Sox9 (D) en los grupos AT, d4L y d1L, respectivamente. Magnificación original A, B, C y D: 400x.

Principales hallazgos obtenidos del estudio de la expresión de los marcadores de CS/P en ZM durante gestación y lactancia:

- La expresión de GFRA2 presenta un incremento significativo en el grupo AT, lo que estaría asociado a la activación de la población de CS.
- Oct-4 y Sox2 mostraron **variaciones en la distribución subcelular (núcleo-citoplasma) en diferentes tiempos de gestación y lactancia sugiriendo un *shuttling* núcleo-citoplasma que ocurriría al inicio del proceso de diferenciación de las SC.**
- Sox9 muestra un aumento en su expresión en lactancia temprana, relacionándose con la presencia de una población celular progenitora más diferenciada.

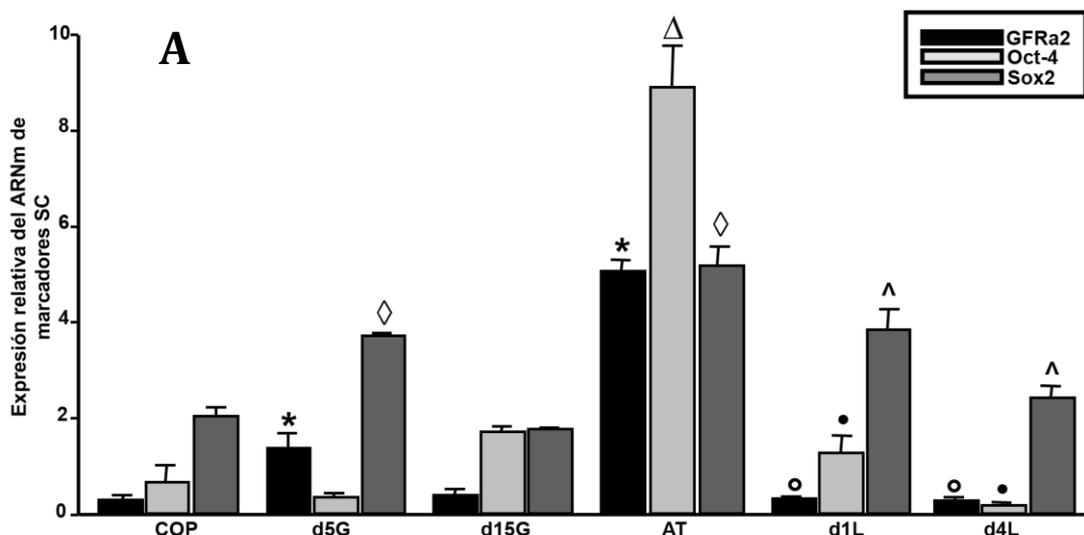
➤ **Cuantificación del ARNm de los marcadores de CS/P y de células diferenciadas en ZM y AP de muestras obtenidas por microdissección láser durante la preñez y lactancia**

El estudio de los niveles proteicos analizado anteriormente, se complementó con la cuantificación de los niveles de ARNm de los marcadores en muestras de ZM y AP. Este análisis diferencial fue posible mediante la técnica de microdissección láser, que permitió aislar las zonas de estudio. Posteriormente, se evaluaron los niveles de ARNm mediante la técnica de PCR en tiempo real de los marcadores de células SC, progenitoras y asociados con células comprometidas a un linaje en ZM y AP.

Expresión de genes asociados a fenotipo stem, progenitor y de células diferenciadas en la ZM

Los niveles de ARNm de los marcadores de SC, GFRa2, Sox2 y Oct-4, exhibieron la expresión más alta en el grupo AT comparado con las etapas previas de gestación. Por otra parte, se observó una disminución significativa en su expresión durante la lactancia (Figura 46-A). El marcador de células progenitoras Sox9, mostró un patrón diferente durante el período gestacional y lactancias, exhibiendo un aumento de dos veces en d15G retomando a los niveles basales en AT. Luego incrementó nuevamente a los 4 días de lactancia activa (Figura 46-B).

La expresión de los marcadores de linaje-comprometido, Prop1 y Pit-1, no mostró variaciones significativas durante la gestación. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de expresión de Prop1 y Pit-1 en AT y lactancia temprana en comparación con su expresión durante la gestación (Figura 46-C).



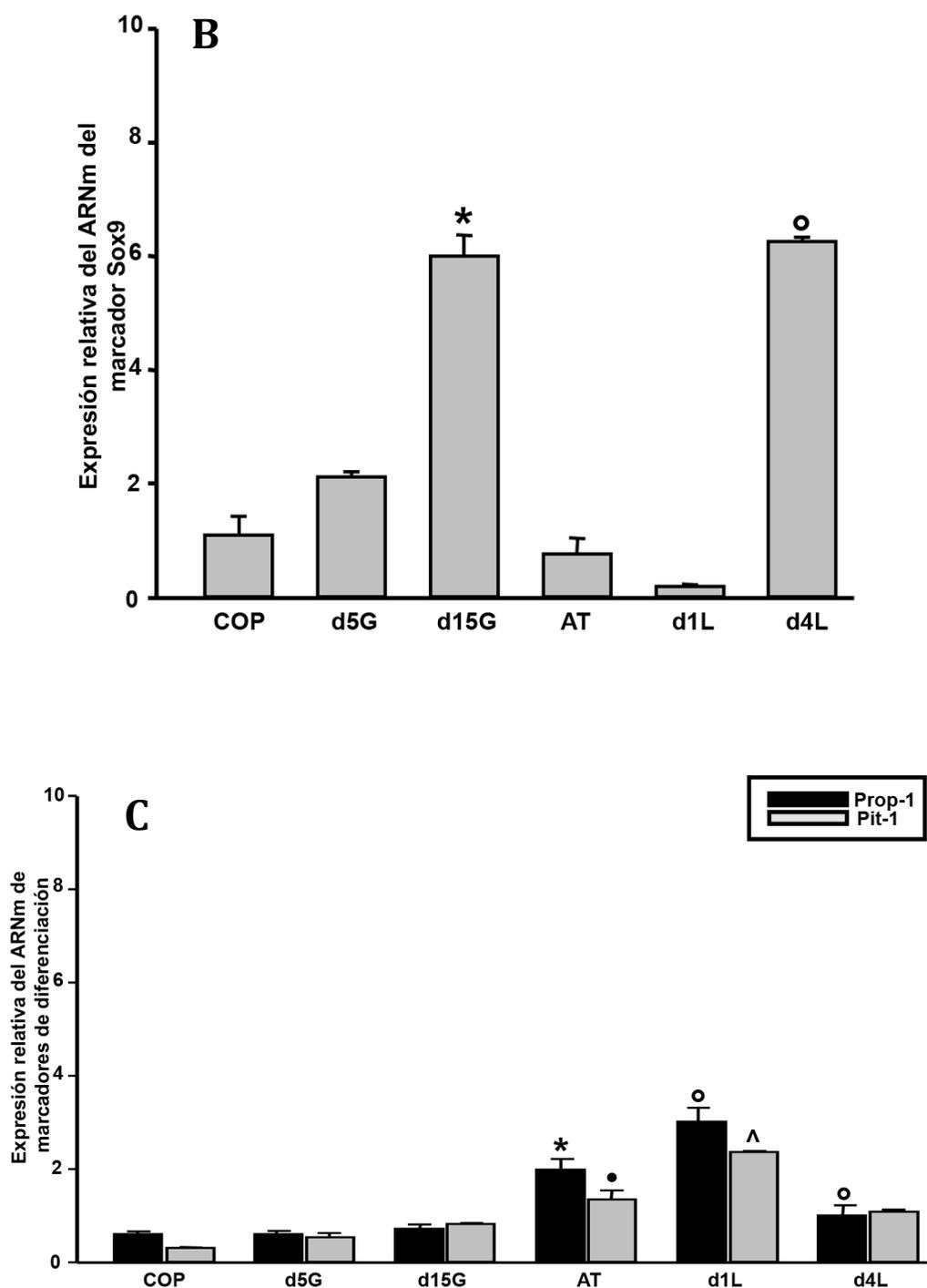


Figura 46. Evaluación relativa de niveles de ARNm de marcadores de CS/progenitoras y de células comprometidas a un linaje en ZM en gestación y lactancia. A) Los niveles de ARNm de GFRa2, Oct-4, Sox2, Sox9, Prop1 y Pit-1 se cuantificaron en ZM: A- GFRa2 (* p<0,05 AT vs. COP), OCT-4 (Δ p<0,05 AT vs. COP) y Sox2 (\diamond p<0,05 AT vs. COP) muestran un aumento en el término de la gestación, pero disminuyen durante lactancia (GFRa2: \circ p<0,05 d1L y d4L vs. AT; Oct-4: \bullet p<0,05 d1L y d4L vs. AT; Sox2: p<0,05 d1L y d4L vs. AT). B- Sox9 aumentó en d15G y d4L (* p<0,05 d15G vs. COP; \circ p<0,05 d4L vs. AT). C- Prop1 y Pit-1 muestran los niveles más altos en AT y lactancia temprana (* p<0,05 AT vs COP; \bullet p<0,05 AT vs. COP; \circ p<0,05 d1L vs. COP; \wedge p<0,05 d1L vs. AT).

Ensayo de auto-renovación de esferas a partir de hipófisis en preñez y lactancia

El ensayo de auto-renovación de esferas es el indicador más importante de “stemness” o del número SC en un nicho particular. Este análisis permitió detectar un aumento en el número de esferoides secundarios obtenidos a partir de hipófisis del grupo AT respecto los otros grupos analizados (Figura 47), lo que indicaría un incremento en el número de SC a término de la gestación.

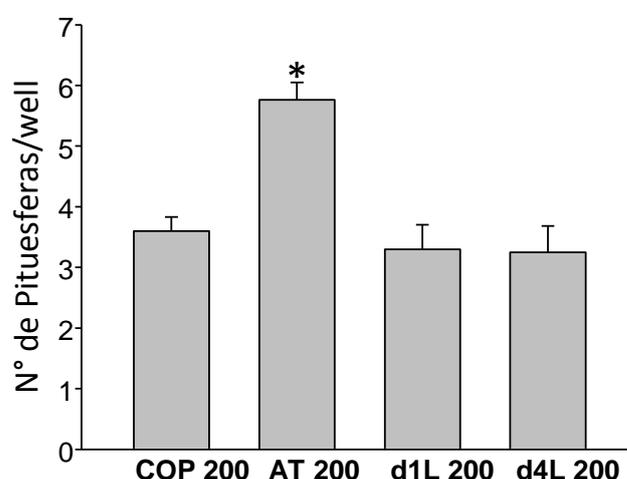
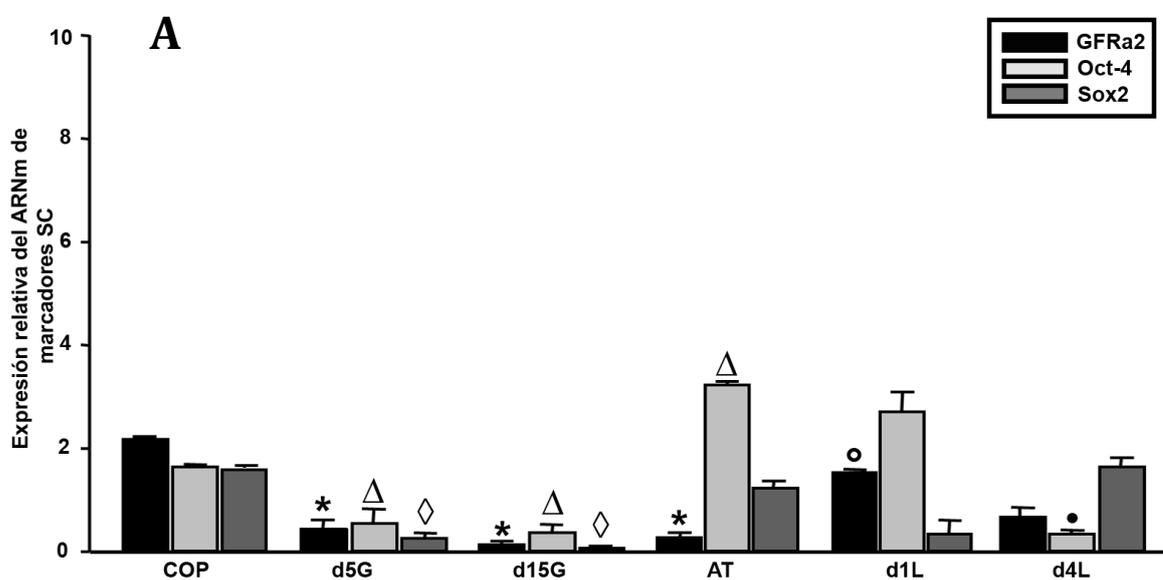


Figura 47. Ensayo de auto-renovación en hipófisis de preñez y lactancia. Se obtuvo un mayor número de esferoides secundarios de hipófisis a término de la gestación respecto los otros grupos evaluados (* $p < 0,05$). Se utilizaron suspensiones de 200 células a partir de esferoides provenientes de 7 hipófisis por cada grupo evaluado. Los resultados se muestran como media \pm SE de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA-Tukey.

Expresión de genes asociados a fenotipo stem, progenitor y células diferenciadas en el AP

Los niveles de ARNm de GFRA2, Oct-4 y de Sox2 mostraron una reducción significativa en d5G y d15G, con respecto a COP. Sin embargo, en AT se observó un aumento del ARNm de Oct-4. El estímulo de la lactancia indujo un incremento notable en los niveles de ARNm de GFRA2, disminuyendo significativamente en los niveles de Sox2 y Oct-4 (Figura 48-A). Por el contrario, los niveles de ARNm de Sox9 no mostraron variaciones considerables durante las etapas de gestación y lactancia (Figura 48-B).

Para el período de gestación, los niveles de ARNm del marcador de linaje-comprometido Prop1 no exhibieron variaciones significativas. Por otro lado, el ARNm de Pit-1 mostró un aumento significativo en d15G y AT. Durante la lactancia temprana, Prop1 y Pit-1 evidenciaron un aumento significativo. Sin embargo, después de 4 días de lactancia activa, los niveles de ARNm de Prop1 disminuyeron, en tanto Pit-1 retornó a los niveles de AT (Figura 48-C).



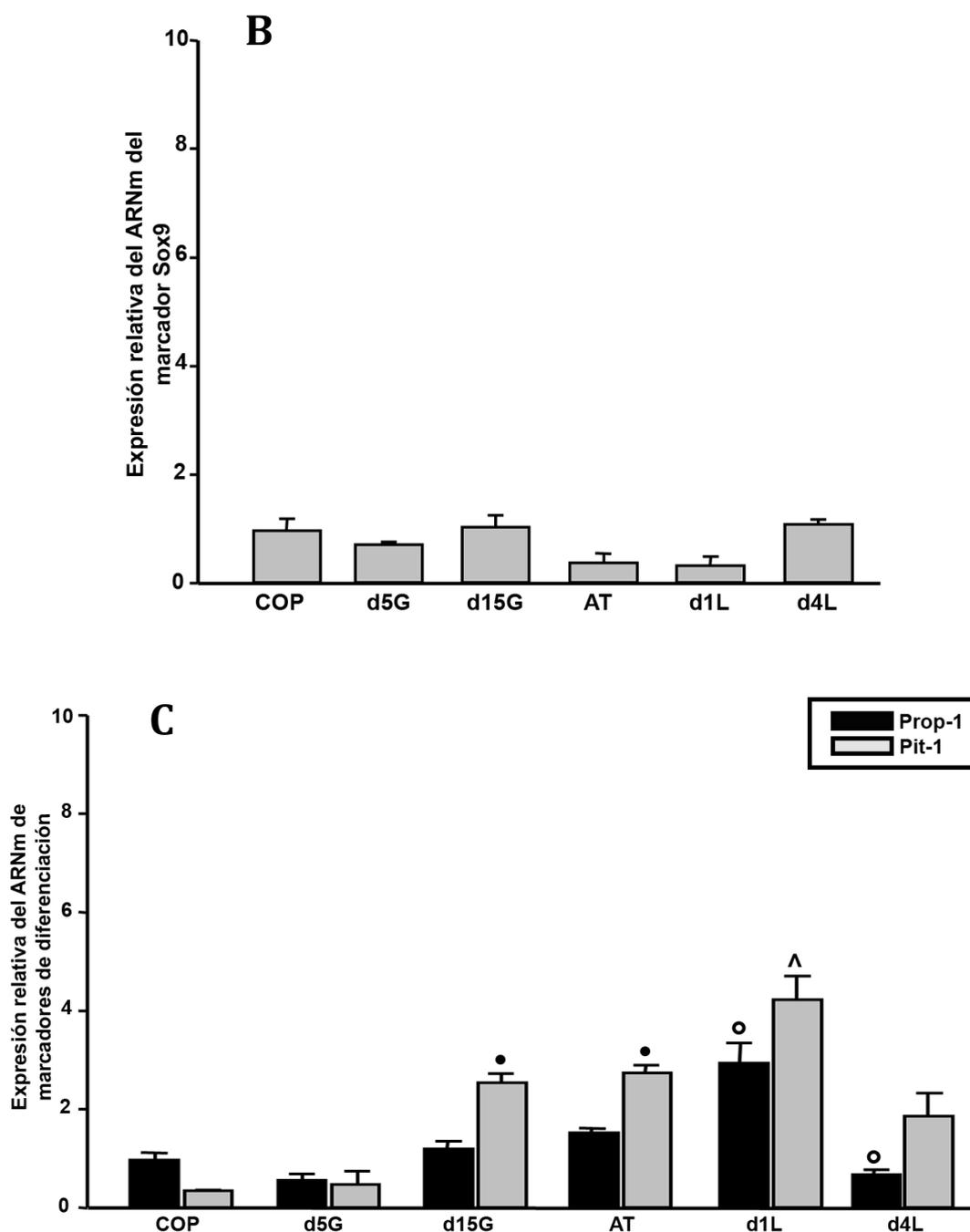


Figura 48. Los niveles de ARNm de GFRA2, Oct-4, Sox2, Sox9, Prop1 y Pit-1 cuantificados en AP. A- Los ARNm de marcadores de SC disminuyen durante la gestación (GFRA2: * $p < 0,05$ d5G, d15G y AT vs COP; Oct-4: $\Delta p < 0,05$ d5G y d15G vs COP; Sox2: $\diamond p < 0,05$ d5G y d15G vs. COP). Sin embargo, en ratas AT, Oct-4 exhibe un aumento respecto a la COP ($\Delta p < 0,05$ AT vs. COP). GFRA2 muestra los niveles más altos en d1L ($\circ p < 0,05$ d1L vs. AT), mientras que Sox2 no evidencia cambios significativos en todos los grupos analizados. B- Sox9 no presenta ninguna variación durante la gestación o la lactancia. C- Los niveles de Pit-1 muestran un aumento desde mediados de la gestación hasta la lactancia temprana ($\bullet p < 0,05$ d15G y AT vs CP; $\wedge p < 0,05$ d1L vs. AT), mientras que Prop1 exhibe un aumento en d1L ($\circ p < 0,05$ d1L vs. AT). La expresión del ARNm de los marcadores se cuantificó en relación al de β -actina. Los resultados se muestran como *fold change* de los niveles de ARNm de los grupos COP y AT. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y se analizaron mediante la prueba de ANOVA-Tukey.

4to

Objetivo
Específico**Estudiar posibles fluctuaciones en la proliferación celular en la ZM y AP de hipófisis en la preñez y lactancia**

➤ **Análisis de la incorporación de BrdU en células localizadas en ZM y AP durante la gestación y lactancia**

Proliferación de células de la ZM

La incorporación de BrdU en células de la ZM mostró una fluctuación dinámica durante la gestación y lactancia, considerando a COP como punto de partida ($4,48 \pm 0,37\%$, figura 49-F).

En d5G y d15G, se observó una disminución de dos veces en el número de las células BrdU+ de la ZM comparada con COP ($p < 0,01$ vs. COP) apreciándose los niveles más altos de proliferación celular en AT ($10,15 \pm 0,49\%$). Al comienzo de la lactancia, d1L, se observó una reducción significativa de células BrdU+ respecto a AT. Luego de 4 días de lactancia activa, disminuyó cinco veces con respecto al d1L ($5,63 \pm 0,21$ y $1,06 \pm 0,10\%$, respectivamente; Figura 49-F). Un aspecto de interés fue observar más células BrdU-inmunopositivas en la primera capa de la ZM que en la segunda (Figura 49A-E).

Proliferación de células en AP

El número de células BrdU+ en el AP fue significativamente mayor en d5G que en COP ($3,20 \pm 0,05$ y $2,29 \pm 0,02\%$, respectivamente). Al término de la gestación se apreciaron valores similares a los observados en COP. En el grupo de lactancia temprana, la

proliferación de células adenohipofisarias evidenció un aumento de 1,5 veces respecto a los valores cuantificados en AT ($3,59 \pm 0,3$ y $2,29 \pm 0,09\%$, respectivamente). Sin embargo, luego de 4 días de lactancia se registraron valores ocho veces menores a los observados en AT ($0,46 \pm 0,07\%$; Figura 50).

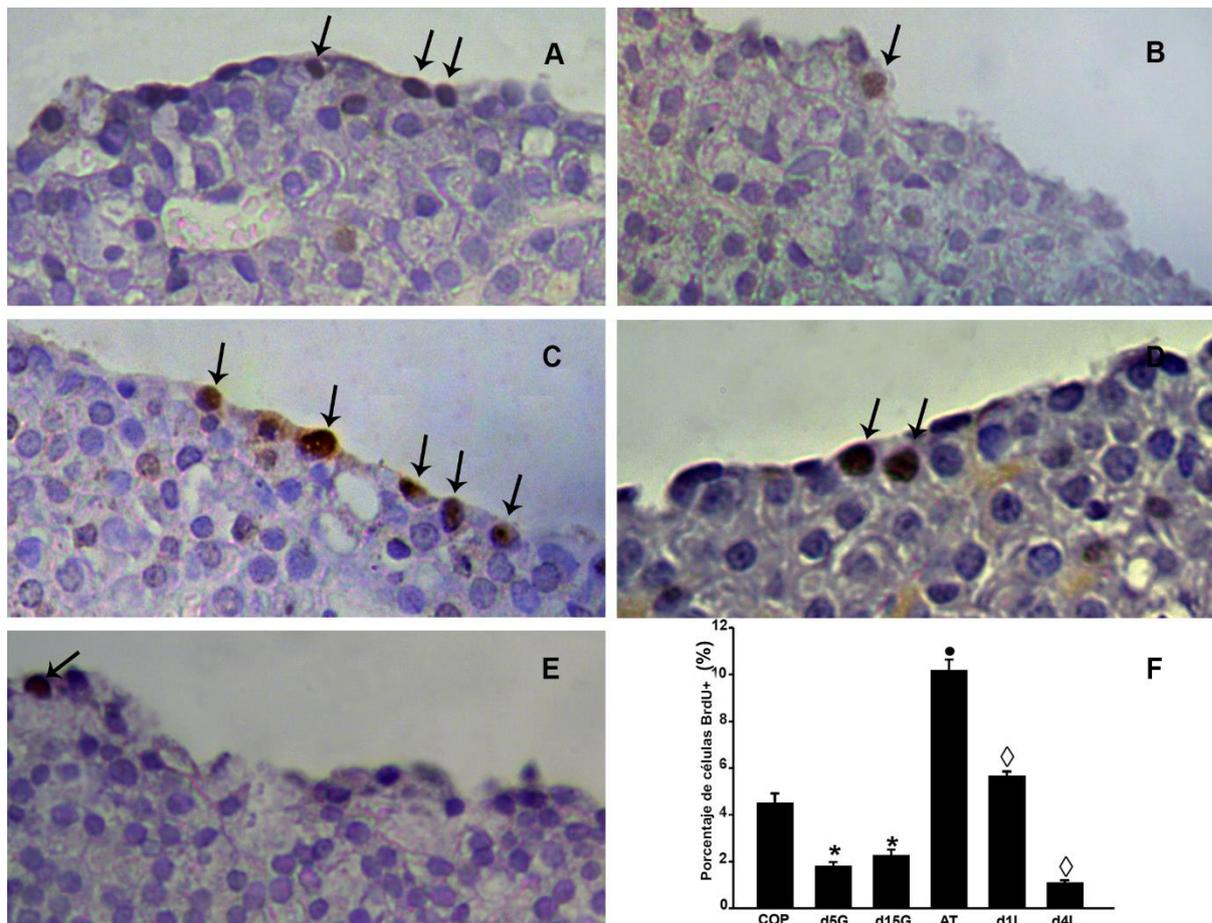


Figura 49. Proliferación de células de la ZM en gestación y lactancia.

Microfotografías representativas de células BrdU+ (flechas) observadas en ZM en ratas hembras en: COP (A); d5G, d15G (B); AT (C); d1L (D) y d4L (E). Se observa inmunopositividad para BrdU en la primera y segunda capa de la ZM. Magnificación original: 400x. F). El recuento de las células BrdU+ demostró un significativo descenso en la incorporación del marcador durante el periodo de gestación (d5G y d15G) (* $p < 0,01$ d5G y d15G vs. COP), destacándose el pico de inmunopositividad en AT (* $p < 0,01$ AT vs. COP). En lactancia, tanto temprana (d1L) como tardía (d4L) se identificó una disminución del número de células inmunoreactivas ($\diamond p < 0,01$ d1L y d4L vs. AT). La tinción de núcleos positivos BrdU se expresa como el porcentaje de los núcleos totales contados a partir de células de las dos capas de la ZM obtenidas para cada rata. Los datos se muestran como media \pm SE de 4 animales por grupo, ANOVA-Tukey.

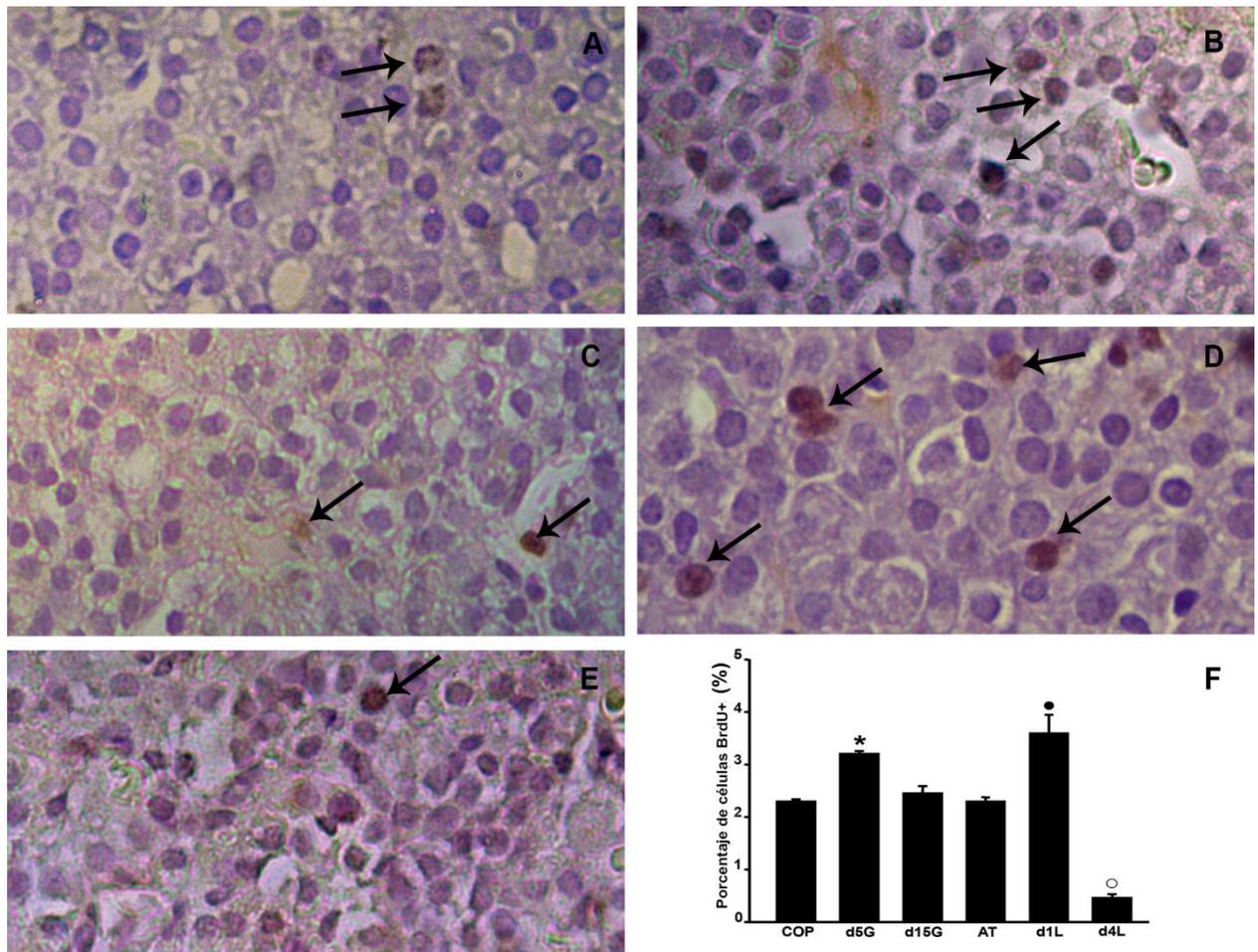


Figura 50. Proliferación celular en AP hipofisario durante gestación y lactancia. Células BrdU+ (flechas) observadas en ratas de los grupos experimentales COP (A); d5G (B); AT (C); d1L (D) y d4L (E). Magnificación original: 400x. F) La incorporación de BrdU incrementó en AP a los 5 días de gestación (* $p < 0,05$ d5G vs. COP), alcanzado valores similares a los del grupo COP en d15G y AT. Se destaca un aumento significativo en lactancia temprana (• $p < 0,05$ d1L vs. AT) y una marcada reducción en d4L (◦ $p < 0,05$ d4L vs. AT) alcanzando valores por debajo de los registrados en COP. La tinción de núcleos BrdU positivos se expresa como el porcentaje de los núcleos totales contados a partir de un total de 5000 células AP, obtenidas de muestras aleatorias para cada rata. Los datos se grafican como media \pm SE de 4 animales por grupo, ANOVA-Tukey.

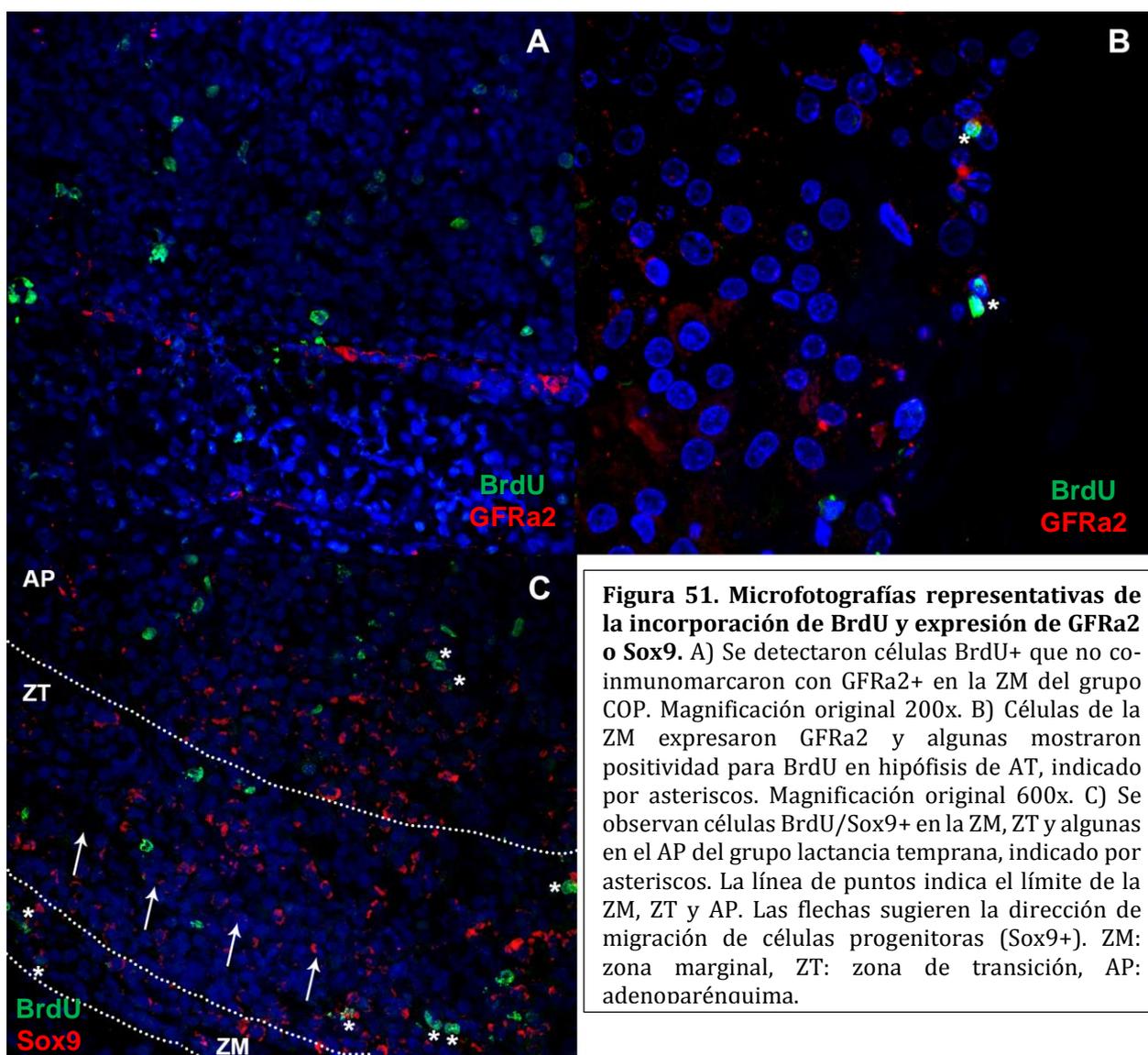
Tomando en consideración los resultados obtenidos, se investigó una posible relación entre las variaciones de los marcadores de SC, GFRA2 y progenitoras, Sox9 y la proliferación de células de la ZM y AP en hipófisis de los grupos AT y d1L.

Para alcanzar este objetivo, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia que permitió analizar la incorporación de BrdU y la expresión de GFRA2, marcador específico de SC

hipofisarias, en la ZM de los grupos COP y AT. Como se muestra en la figura 51-A, no se detectó co-inmunodetección para BrdU/GFRa2 en células de la ZM del grupo COP, mientras que, se detectaron células GFRa2+ que inmunomarcaron con BrdU en la ZM de hipófisis al final de la gestación (Figura 51-B). En el gráfico 52-A, el recuento de células BrdU/GFRa2+ en la ZM a término de la gestación evidenció un incremento de 2 veces respecto al grupo COP ($2,36 \pm 0,72\%$ y $0,29 \pm 0,29\%$, respectivamente).

Además, se estudió la co-inmunodetección de BrdU/Sox9 en las células de la ZM, zona de transición (ZT) y AP del grupo d1L. Algunas de las células que expresaron el marcador Sox9, frecuentemente en el citoplasma, de la ZM y ZT fueron positivas para la incorporación de BrdU (Figura 51-C). Sin embargo, en el AP se detectaron pocas células BrdU/Sox9+ (Figura 51-C). El número de células BrdU+ y que expresaron el marcador Sox9 en el grupo d1L fue significativamente mayor en la ZT respecto los otros grupos analizados ($2,63 \pm 0,43\%$ vs. $1,22 \pm 0,23\%$, ZM y $0,46 \pm 0,14\%$, AP, respectivamente, figura 52-B).

Estos hallazgos sugieren la expansión de SC hipofisarias del nicho de la ZM al final de la gestación, las que al moverse a la región del AP como células progenitoras Sox9+, se diferenciarían hacia un tipo específico de células endocrinas en lactancia temprana.



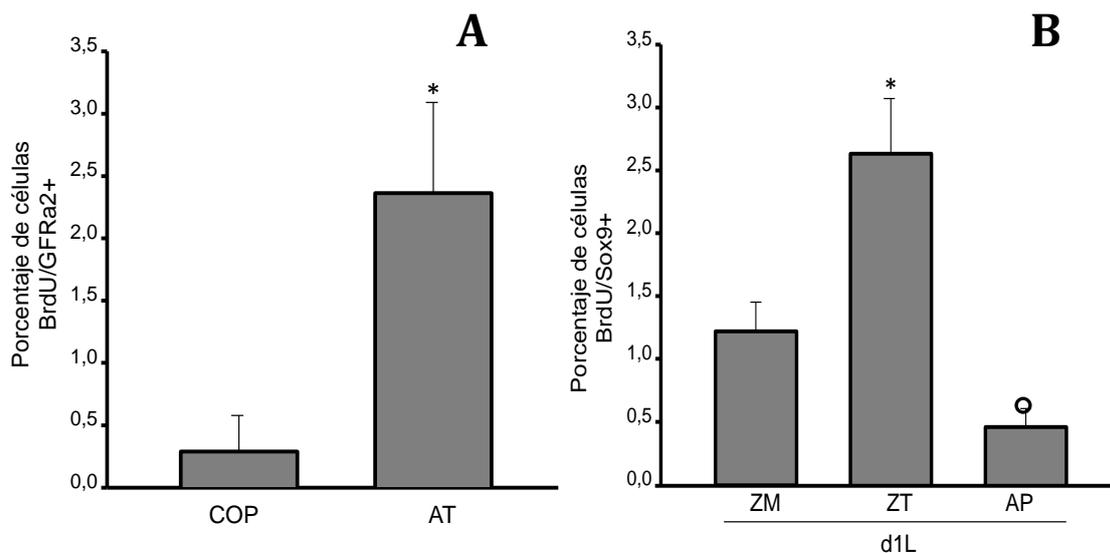


Figura 52. Proliferación celular y expresión de marcadores *stem* y progenitor durante gestación y lactancia. A) Células BrdU/GFRa2+ exhibieron un incremento en la ZM del grupo AT (* $p < 0,05$ AT vs. COP). Los núcleos BrdU positivos se expresan como el porcentaje de núcleos contados en el total de células que componen la primera y segunda capa de la ZM, obtenidas de muestras aleatorias para cada rata. Los datos se muestran como media \pm SE de 3 animales por grupo, T-test. B) Se destaca un aumento significativo de células BrdU/Sox9+ en la ZT en lactancia temprana (* $p < 0,05$ ZT vs. ZM) y una marcada reducción en AP (^o $p < 0,05$ AP vs. ZM y ZT). Los núcleos BrdU y Sox9 positivos se expresan como el porcentaje de núcleos totales contados en la primera y segunda capa para la ZM, en un área de $10 \mu\text{m}^2$ en el caso de la ZT y de un total de 1000 células para el AP, obtenidas de muestras aleatorias para cada rata. Los datos se muestran como media \pm SE de 3 animales por grupo, ANOVA-Tukey.

Discusión

Identificación y caracterización de la población de CS/P en la glándula hipofisaria de ratas adultas

La hipófisis es conocida por ser la principal glándula endocrina capaz de producir diversas hormonas que regulan la homeostasis metabólica en un organismo a lo largo de todo su desarrollo ontogénico. En particular, la adenohipófisis está compuesta por cinco tipos de células endocrinas y las células folículo estrelladas (CFE) [127]. Además de estos tipos celulares, se ha reportado, desde hace aproximadamente 10 años, la existencia de posibles SC en la hipófisis adulta [57], identificándose células con fenotipo stem/progenitor mediante diferentes metodologías aplicadas en ensayos *in vivo* e *in vitro* [63, 68, 76].

Las células madre de tejidos adultos son células con fenotipo embrionario perdurable por lo cual se asocian cada vez más a células postnatales que podrían desplegar programas de diferenciación que acontecen durante el desarrollo embrionario ante ciertas necesidades específicas del tejido en el que residen [128-130]. Así, las ASC y las células progenitoras al diferenciarse, expresarán marcadores asociados a pluripotencialidad como también factores claves tejido específicos. En general, varios marcadores atribuidos a ASC expresados en otros tejidos, se han detectado en la glándula hipofisaria adulta mediante el análisis de su expresión génica y por inmunofluorescencia. Entre ellos, el factor Sox2, ha sido descrito por unanimidad por varias investigaciones, ocupando una posición central en el estudio de las SC en la hipófisis postnatal. Sin embargo, la localización topográfica de las células Sox2+, así como la importancia funcional de este factor de transcripción es aún objeto de estudio.

Al igual que en otros tejidos como el cerebro [129] y el corazón [131], diversos marcadores, solos o en combinación, identifican células de fenotipo *stem*, como también, en diferentes fases de su ciclo de vida, ya sea transitando un estado quiescente, proliferante-progenitor o en una etapa comprometida en el curso de la diferenciación a un tipo celular específico. En base a datos de la bibliografía, [64, 68, 69, 76, 132] es posible proponer un orden jerárquico en las células con fenotipo CS/P identificadas por diferentes marcadores, siendo esto motivo de debate. En este sentido, se ha reportado que células Sox2+/E-cadherina+ comienzan a expresar Sox9 y Nestin durante su transición a la fase progenitor y la expresión posterior de marcadores específicos hipofisarios, como PROP y Pit-1 durante la diferenciación terminal a células hormonales. También, se han analizado otros marcadores como GFRA2, Oct-4, Bmi1, CD133 y β -catenina, sin embargo, el estudio de su localización y función es aún poco claro.

Con el propósito de caracterizar e identificar las SC en la glándula hipofisaria adulta, en el presente trabajo se procedió al estudio de los marcadores de fenotipo *stem*, Oct-4 y Sox2, el específico de SC hipofisarias conocido como GFRA2 y el de células progenitoras, Sox9.

Los resultados obtenidos demostraron que la ZM de hipófisis de ratas adultas, principal nicho de CS/P, está formada por dos capas de células con características ultraestructurales particulares. Una de las capas bordea la hendidura, mientras que la otra está situada por debajo de la primera capa en estrecho contacto. La primera fila de células de la ZM expresó GFRA2 y Oct-4, presentando algunas de estas microvellosidades y cilios en la membrana apical. A su vez, en ambas capas de la ZM, se identificaron algunas células inmunomarcadas para Sox2 y Sox9.

En diferentes tejidos del organismo han sido identificados otros nichos de *ASC* [133, 134], uno muy emparentado por la capa embrionaria de origen de la glándula como es la zona subventricular en el sistema nervioso del adulto. En este nicho, se evidenciaron células con prolongaciones apicales, proponiéndose a las cilias como vestigios del cilium primario [135]. En dichas estructuras se han identificado componentes de la vía de señalización *Shh* por lo que la función de estos cilios sería la de actuar como centro de señalización con el fin de integrar o amplificar señales específicas del ambiente [136]. Cabe remarcar que se consideran como marcadores comunes de las *ASC* a los presentes en las *ESC*, como por ejemplo, *Sox2*, *Oct-4* y *Klf4* o aquellos que se expresan inmediatamente después de la implantación del embrión como *Sox9* [28]. Además de estos factores usuales en las *ASC*, ahora se incluye como factores adicionales a la familia de receptores *GFRA/RET* y sus cuatro ligandos (*GDNF*, *NRTN*, *ARTM*, *PSPN*), habiéndose demostrado su expresión en las *ASC* de testículos y en el blastocisto de preimplantación [18-23]. Recientemente se ha reportado que las células *stem* de médula ósea co-expresan los receptores *GFRA/RET* con los ya mencionados, confirmando de este modo que son factores esenciales para la supervivencia de las *ASC* hematopoyéticas [24]. De esta manera, queda indicado que la expresión de esta familia de receptores y sus ligandos, entre ellos *GFRA2*, es una característica común e intrínseca a todas las *ASC* examinadas hasta el presente.

Es importante destacar el concepto de nicho de las *SC*, ya que constituyen microambientes especializados para el mantenimiento del estado de indiferenciación de las células madre. Estos nichos de *SC* han sido demostrados e identificados en varios tejidos, como médula ósea [137], criptas intestinales [38], zona subventricular en el cerebro [138] y folículos pilosos en la piel [139]. A su vez, numerosos estudios han comprobado que estos nichos

regulan la pluripotencia, auto-renovación, divisiones simétricas-asimétricas y la migración de las SC. La diferenciación estaría mediada por señales en las que participan factores solubles, proteínas de la superficie celular [140] y componentes de la matriz extracelular [141]. Mediante inmunofluorescencia, han sido descritas células Vimentina+ en ZM, evidencia que sugiere la existencia de un nicho de SC en la glándula hipofisaria adulta [63, 68]. En nuestro estudio, por primera vez, hemos identificado a nivel ultraestructural células Vimentina+ localizadas en la segunda capa de la ZM con morfología similar a células que desempeñan funciones de sostén descritas en otros nichos [142], confirmando así la presencia de un verdadero nicho de SC en la hipófisis de ratas hembras adultas. La aplicación de ICQU nos permitió identificar específicamente estas células con fenotipo mesenquimal rodeando a las células con características de SC embrionarias propias de la primera capa de la ZM.

En nuestro modelo experimental también se estudió otro de los marcadores característicos de células de sostén: Nestin, filamento intermedio de las neuronas descrito como marcador de SC en varios tipos de tejidos [121]. El análisis por inmunofluorescencia de este marcador permitió evidenciar la presencia de células inmunoreactivas, distribuidas en ZM, las cuales no co-expresaron con GFRA2. Además, algunas células Nestin+ con prolongaciones citoplasmáticas fueron observadas en la pars distalis y nervosa, con características fenotípicas de células mesenquimales. La localización de células inmunoreactivas para Nestin ha sido relacionada con la distribución de células folículo-estrelladas S-100 positivas, demostrándose un patrón de expresión similar para ambos tipos celulares [76, 143]. Sin embargo, existen controversias sobre el rol de Nestin como marcador de ASC en la glándula, ya que han sido descritas células Nestin+ que no

co-expresan con la proteína S-100 [144]. Otras investigaciones realizadas en hipófisis adultas de ratones transgénicos que expresan GFP bajo un fragmento del promotor de *nestin*, describieron muy escasas células que co-expresaron Nestin y Sox2 [69].

En nuestro estudio, las células positivas para Nestin, no co-expresaron con el marcador específico de *SC* hipofisarias, sugiriendo que este marcador identifica células con fenotipo *stem* mesenquimal que forman parte del nicho de *SC* hipofisarias.

La identidad de las células mesenquimales fue confirmada mediante los marcadores Vimentina y Nestin, los cuales no co-expresaron con los específicos de *SC*, conformando así un grupo de células que se encuentra en estrecho contacto con células de fenotipo *stem/progenitor*. Esta localización topográfica está estrechamente relacionada con funciones de sostén y de preservación del estado pluripotente de las *SC*, como fuera descrito en el nicho de *SC* hematopoyéticas [120].

Diversas investigaciones han vinculado la presencia de marcadores de células endoteliales como E-cadherina y a la β -catenina con las *ESC* o *ASC* [145, 146]. β -catenina es una proteína que interviene en dos procesos distintos, participando en la adhesión celular y como co-activador transcripcional en la vía de señalización Wnt. En el presente estudio se inmunolocalizó a esta proteína en el citoplasma en una zona cercana a la membrana plasmática de células de la ZM. Reportes de la bibliografía relacionan esta localización con el mantenimiento de la adhesión celular, posiblemente regulando la capacidad proliferativa de las *SC* hipofisarias, manteniéndolas en estado quiescente hasta que sea necesaria su diferenciación a los distintos linajes hipofisarios [76].

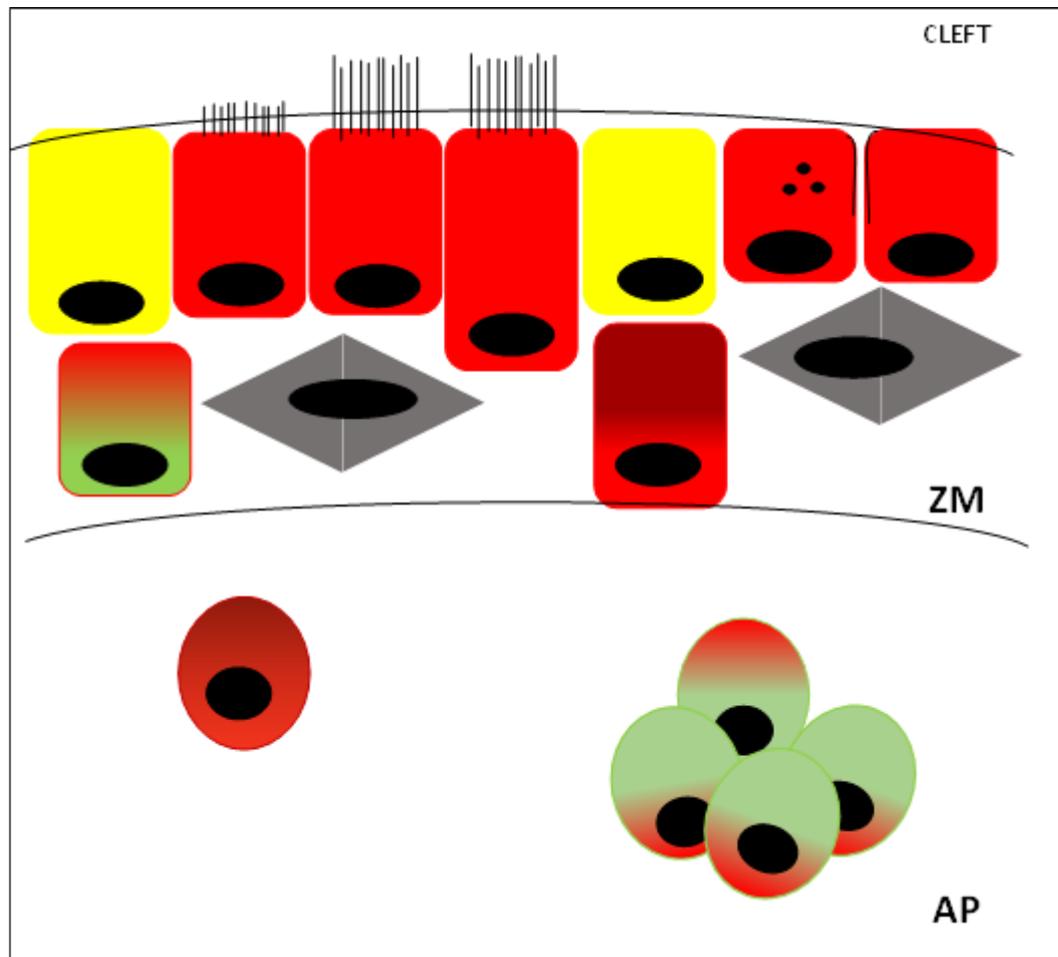


Figura 53. Representación esquemática de la expresión de los marcadores de CS/P en la hipófisis de ratona hembra adulta. Rojo: células positivas para los marcadores de fenotipo stem, GFRa2, Oct-4 y/o Sox2, algunas muestran prolongaciones apicales de la membrana plasmática y expresión de β -catenina en membrana y citoplasma. Amarillo: células que co-expresan marcadores de fenotipo stem. Gris: células de sostén, Nestin+ o Vimentina+. Rojo oscuro (ZM): células que presentan expresión citoplasmática de Sox9. Rojo-Verde (ZM): células Sox2+ en citoplasma. Rojo oscura (AP): células Sox2+ dispersas en citoplasma. Rojo-Verde (AP): grupos celulares dispersos positivos para Sox9 o GFRa2.

Para completar la caracterización de las *ASC* en diversos tejidos es imprescindible realizar diferentes ensayos *in vitro* que permitan confirmar las propiedades intrínsecas de esta población.

Con este objetivo, otro punto de interés fue la obtención de una población enriquecida de *SC* hipofisarias en cultivo a partir de hipófisis adultas para estudiar sus características de células indiferenciadas.

Siguiendo protocolos estandarizados en la bibliografía, se obtuvieron esferoides que fueron identificados con marcadores específicos de *CS/P* tales como: *GFRa2*, *Oct-4*, *Sox2* y *Sox9*, co-expresando algunas células *Oct-4/Sox2*, lo cual sería indicativo de un estado más indiferenciado. La co-expresión de dos o más marcadores de *SC* en una célula, ha sido relacionada con un mayor grado de pluripotencialidad [119].

Mediante ensayos de diferenciación con medios específicos de cultivo, los esferoides originaron células *PRL+*, obteniéndose también células inmunopositivas para los marcadores neurales *GFAP* y *Tuj-1*. Este último hallazgo es concordante con el origen embriológico de la adenohipófisis y el tubo neural encefálico, los cuales derivan de una masa común de células ectodérmicas embrionarias, llamado ectodermo anterior [127]. Otros experimentos desarrollados *in vitro* han permitido obtener desde progenitores neuronales fetales, células secretoras de *GH* y *PRL* [147]. Además, en el campo de la patología tumoral hipofisaria humana se ha descrito en adenomas la presencia de metaplasia neuronal [148]. En conclusión, esta capacidad de formar esferoides en cultivo y el potencial para diferenciarse o transdiferanciarse a células con fenotipo neuronal, es

evidencia de que las SC hipofisarias pueden actuar como progenitores multipotenciales con plasticidad fenotípica para la formación de neuroectodermo.

Como ya fuera mencionado en Introducción, la capacidad de originar una célula igual a la progenitora es una propiedad cardinal de una SC, a través de la cual puede renovarse a sí misma por un periodo prolongado de tiempo. Esta capacidad de las ASC hipofisarias puede demostrarse mediante el ensayo *in vitro* de auto-renovación. Al realizar este experimento debe considerarse que las células progenitoras pueden producir esferas secundarias o incluso terciarias, pero su capacidad de auto-renovación es limitada, como ha sido demostrado a partir de hipocampo adulto [149]. Los resultados obtenidos del ensayo de auto-renovación, realizado a partir de hipófisis de ratas hembras adultas, revelan la generación de esferas secundarias. Por lo tanto, podemos considerar que nuestros hallazgos cumplen con el criterio cardinal de auto-renovación, lo cual sugiere que a partir de una CS/P aislada de la glándula adulta es posible la obtención de estructuras esferoidales organizadas y dinámicas.

Resumiendo, nuestros hallazgos demuestran la existencia de un nicho de SC en la glándula hipofisaria adulta, la que fue corroborada *in vitro* por la formación de esferoides enriquecidos en SC y con capacidad de diferenciación y auto-renovación.

Expresión de marcadores específicos de las SC hipofisarias relacionadas con cambios en la población de células hipofisarias durante la gestación y lactancia

Los diversos tejidos de un organismo adulto poseen diferentes características, no sólo en su estructura y función, sino también en la dinámica de renovación de las células que los constituyen. Por ejemplo, las SC del epitelio y gónadas masculinas ciclan rápidamente,

siendo clásicamente descritos dos mecanismos por los cuales estas células participan en la homeostasis del tejido: renovación celular y regeneración tisular [150]. La población de SC descrita en folículo piloso y testículo se encuentra representada en promedio, por un 50 % de SC y un 50 % de células diferenciadas [32]. En contraposición, en tejidos como hígado [151], riñón [152] y músculo [153], la proliferación de las SC es apenas detectable. Por lo cual, demostrar la existencia de SC en tejidos adultos y su contribución en la neogénesis y recambio celular es aún todo un desafío.

En órganos que presentan una renovación celular mínima, ha sido descrito que las SC se mantienen en un estado de reposo -quiescencia- y que pueden ser activadas por factores celulares intrínsecos, señalización paracrina en el microambiente donde se alojan, características físicas del nicho ó señales “remotas” como las ejercidas por las hormonas [154]. Si bien se ha demostrado que las SC de la glándula mamaria serían el blanco de las hormonas sexuales, este hallazgo no se limita a este órgano [155]. Así, en el presente trabajo, se demostró *in vitro*, que el E2 induce las CS/P adultas a diferenciarse a células lactotropas. Por lo que, *in vivo*, esta hormona podría regular el proceso de auto-renovación de una SC hipofisarias. En células madre hematopoyéticas se ha observado que su proliferación se encuentra sujeta a la regulación positiva por el E2, encontrándose involucrado también en la auto-renovación de las mismas. Como es conocido, en el embarazo aumentan los niveles de E2 incrementando además, el ciclo proliferativo de las SC hematopoyéticas, originando más células progenitoras eritroides de manera de suplir un mayor aporte de oxígeno a los tejidos [156].

A diferencia de algunos órganos que exhiben una incrementada renovación celular diaria, la hipófisis anterior muestra una notable plasticidad en ciertos estadios fisiológicos, como

por ejemplo, el ciclo estral [85, 106], la gestación y lactancia [157, 158], siendo el estrógeno el principal factor que induce el aumento de la población de células lactotropas en los estadios reproductivos antes mencionados [52]. Han sido descritos diversos mecanismos para explicar el elevado recambio celular, entre ellos proliferación de células diferenciadas [106], transdiferenciación bi-direccional de lactotropas a somatotropas [59], muerte celular [159], degeneración masiva [160], proponiéndose actualmente a las SC como posibles responsables de la generación de nuevas células endocrinas en la hipófisis adulta.

Con el propósito de esclarecer la contribución de las SC en la neogénesis celular que acontece durante estadios reproductivos, se propuso evaluar posibles fluctuaciones en los marcadores de las CS/P hipofisarias y relacionarlas con cambios en la proliferación de células de ZM y AP indicativos de expansión del nicho de CS durante la gestación y lactancia.

Uno de los hallazgos destacados en el presente trabajo de investigación, ha sido la detección del marcador de SC hipofisarias, GFRa2, en ZM y en grupos celulares del AP próximos a la ZM. Esta interesante observación hace presuponer que estas células abandonarían el nicho de SC al adquirir un fenotipo progenitor y/o de células amplificadoras transitorias para luego diferenciarse a una célula endocrina en el AP [161]. De acuerdo con esta hipótesis, recientemente, se ha propuesto que grupos dispersos de células Sox2+ observados en el AP podrían ser una consecuencia de la activación de una SC en el nicho de la ZM. Las células Sox2+, al recibir señales de diferenciación, migrarían adquiriendo características fenotípicas similares a las del proceso de transición epitelio-mesenquimática con disrupción de uniones estrechas en las que participa β -catenina

[162]. Además, en otro estudio se reportó la presencia de factores de transcripción tales como, Snail1, Twist1/2 y Zeb1/2 en la fracción enriquecida “*non-Sca^{high}*” del ensayo de *Side Population* [64], convirtiéndose en otra evidencia que sugiere que las SC podrían adquirir destrezas para iniciar una transición epitelio-mesenquimática, migrar y diferenciarse en el AP.

En la actualidad, uno de los interrogantes que se plantea es la participación de GFRA2 en la el proceso de diferenciación de SC para originar finalmente células endocrinas [116]. Con el objetivo de obtener evidencias directas relacionadas con este proceso en situaciones de recambio celular hipofisario incrementado, evaluamos la expresión de este marcador durante los estados reproductivos tales como: ciclo estral, gestación y lactancia. El resultado más notable fue el significativo aumento en los niveles de ARNm y proteína del marcador en la ZM de hipófisis al término de la gestación con respecto a COP, lo que sugeriría que GFRA2 podría estar involucrado en la activación de las SC hipofisarias. En relación con esta observación, un reciente informe describe que la *up-regulación* de los receptores Ret y sus co-receptores GFRA1, GFRA2 y GFRA3 es una vía de señalización clave para la supervivencia de SC hematopoyéticas y el mantenimiento de la pluripotencia, permitiendo distinguir estas células de las progenitoras en el hígado fetal [163].

Otros factores que han sido ampliamente estudiados durante el proceso de diferenciación de una SC a progenitora, son los implicados principalmente en el mantenimiento de la pluripotencia de las SC, los factores de transcripción Oct-4 y Sox2. En nuestro análisis, los niveles de ARNm de estos marcadores presentaron un notable incremento en la ZM al término de la gestación. Sin embargo, los niveles proteicos de ambos factores incrementaron luego de 4 días de lactancia activa. Esta discordancia observada entre la

transcripción y la traducción también fue informada para estos marcadores en células madre embrionarias murinas a diferentes tiempos del proceso de diferenciación [164]. También se ha reportado que durante las reconfiguraciones de ARNm en líneas celulares *stem* embrionarias murinas, no se observaron cambios en los niveles de proteína, lo cual refleja el resultado de una red de regulación intrincada que ocurre durante el proceso de elección del destino celular [165].

Con respecto a los factores de transcripción Oct-4 y Sox2, observamos una mayor inmunolocalización de ambos, en el compartimiento nuclear de células de la ZM de hipófisis de ratas del grupo Gestación. Esta distribución subcelular se relacionaría con la función clásicamente descrita como “guardián” de la pluripotencia en *ESC* y *ASC* ejercida a nivel nuclear. Otro hallazgo fue el cambio de distribución de Sox2 en células de ZM del grupo d4L, observándose una mayor expresión a nivel citoplasmático en comparación al nuclear. Esta localización, podría asociarse con su efecto como regulador positivo de la diferenciación celular, evitando así la acción nuclear de Sox2 sobre ciertos genes, tal como fuera descrito *in vitro* en *ESC* [166]. La exclusión de Sox2 desde el núcleo por el *shuttling* núcleo-citoplasmático, también ha sido demostrada como un mecanismo que induce la diferenciación en otras *SC* [167]. Claramente, el secuestro de un factor de transcripción en el citoplasma representaría una potente maquinaria molecular que afecta la función que posee el marcador. En línea con esta posibilidad, la movilización de Sox2 desde el núcleo al citoplasma, probablemente pueda constituir una respuesta a las señales de diferenciación [96].

En resumen, las variaciones en la localización de Oct-4 y Sox2 en los compartimientos nucleares y citoplasmáticos de células en ZM, observados durante la gestación y la

lactancia, podrían estar relacionados con un estado de múltiples oscilaciones en la expresión de los factores involucrados en el destino celular como ha sido descrito *in vitro* en células progenitoras neuronales [119].

Otro factor de transcripción analizado en el presente trabajo es Sox9, el cual ha sido propuesto como marcador de células de tipo progenitor o multipotentes en la glándula hipofisaria adulta. El análisis de los niveles del ARNm de este factor mostró un aumento en d15G y lactancia activa, mientras que sus niveles de proteína incrementaron en el inicio de la lactancia. Si relacionamos el notable aumento de la expresión de marcadores asociados a SC observados en AT, con los niveles incrementados de Sox9 cuantificados en d1L, podríamos hipotetizar que luego de la activación del nicho de CS/P en AT, se produciría un aumento de células progenitoras, adquiriendo así un estado de transición antes de elegir un destino definitivo.

Con respecto al factor de transcripción PROP1, es conocido que su inactivación durante el desarrollo embrionario de la hipófisis, resulta en la imposibilidad de las células progenitoras para migrar desde la bolsa de Rathke al lóbulo anterior, bloqueando así la diferenciación celular [168]. Sin embargo, su función en el comportamiento de células madre hipofisarias adultas, así, como su regulación son aún desconocidas. Se ha reportado que la expresión del factor PROP1 permite identificar una población de células que se encuentran en una etapa comprometida en el curso de la diferenciación a un tipo celular específico [169]. En nuestro estudio, los niveles de ARNm de este marcador mostraron un significativo aumento en la ZM de los grupos a término de la gestación y lactancia temprana. En particular, PROP1 exhibió un notable incremento en los niveles de ARNm en el grupo d1L en la ZM. Esta evidencia sugiere que PROP1 podría participar en la fase

final del proceso de destino celular en la glándula adulta. En este sentido se lo ha propuesto como chaperona en la migración de células desde la ZM hacia el AP. Existen resultados diversos acerca de la localización de PROP1. Algunos investigadores han detectado su expresión durante el desarrollo embrionario de la hipófisis, pero no fue visualizado en la glándula postnatal [76]. En contraposición, en otro estudio se demostró que PROP1 permaneció altamente expresado en células de la ZM del organismo adulto, mientras que no se detectó en el AP [170, 171]. Tomando en conjunto nuestras observaciones como las de otros autores, existen aún discrepancias sobre el rol de PROP1 como partícipe del proceso de elección de las CS/P en el destino celular.

Un hallazgo interesante observado en los últimos años, es la presencia de células Sox2+ en el lóbulo anterior de hipófisis de roedores, sugiriendo la existencia de dos tipos de nichos de CS/P; uno localizado en ZM y el otro formado por grupos de células Sox2+ dispersas en el AP [116, 161]. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos y factores que regulan los nichos de CS/P y si poseen diferencias funcionales entre ambos.

Para contribuir al esclarecimiento del proceso de diferenciación de las SC en hipófisis de ratas en diferentes estadios de gestación y lactancia, nos propusimos analizar posibles variaciones en los niveles de ARNm de marcadores de CS/P y de células diferenciadas en AP.

Como fuera mencionado, uno de los principales cambios detectados en la ZM fue la *up-regulación* de los genes asociados a SC, lo cual sería indicativo de una estimulación del mecanismo de *self-renewal*, el que se confirmó con un mayor número de esferas observado en AT. Por otra parte, el estudio de los niveles de ARNm de estos marcadores en el AP, mostró un incremento notable del factor Oct-4 en AT; mientras que, el marcador

GFRA2 presentó un aumento en d1L, asociándose estos hallazgos a la presencia de grupos celulares en el AP con un mayor grado de indiferenciación. En conjunto, estas evidencias, sugieren la existencia de una posible movilización de las CS/P presentes en la ZM al AP. En concordancia, varios grupos de investigación han reportado la presencia de factores que podrían estimular y regular la diferenciación y migración de células SC desde la ZM al AP. Así, García-Lavandeira y col. han observado que el ligando del receptor GFRA2, NRTN, se produce exclusivamente en un pequeño número de células dispersas en el lóbulo anterior, excepto en la ZM de hipófisis humanas y de ratas. A partir de estos datos, hipotetizaron que el gradiente dado por NRTN-GFRA2-RET puede actuar como una vía de señalización, convirtiéndose en un regulador del nicho de la ZM, promoviendo la proliferación y/o migración de las SC [76]. Otros reportes han evidenciado las moléculas CXCL12/CXCR4 en las células *stem*/progenitoras hipofisarias, quimioquinas que se encuentran *up-reguladas* en la fracción “*non-Sca1^{high}*” del ensayo de SP [64]. En otros sistemas, se ha demostrado que estas quimioquinas promueven la migración de células *stem* de la cresta neural, neurales y células germinales primordiales [172].

Otro hallazgo importante de nuestro estudio es la detección de niveles diferenciales de ARNm de PROP1 y Pit-1 en la ZM y AP del grupo de lactancia temprana que podría asociarse a una “oleada” de diferenciación. Este resultado podría interpretarse como una recapitulación de los eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario hipofisario. En concordancia, se ha reportado co-localización de PROP1 y Pit-1 en la hipófisis embrionaria de rata, aunque sólo en 1 a 10% de células Pit-1 positivas [170]. En la glándula adulta, otros autores han observado una regulación opuesta de la expresión de los factores Hes1 y PROP1, como ocurre durante la embriogénesis pituitaria, en la fracción

de SC del ensayo de SP [64]. Por otra parte, la vía de señalización Six/Eya/Dach, así como *Ascl1*, factores que juegan un papel importante en el desarrollo embrionario hipofisario [127], muestran una incrementada expresión en la fracción SC de la SP [173]. Si bien estos hallazgos son preliminares y escasos, en conjunto, apoyan la idea de que las ASC al activarse inician programas de diferenciación en la glándula postnatal similares a los que ocurren durante el desarrollo embrionario para generar nuevas células hormonales. El conocimiento de las vías de señalización específicas que actúan en la diferenciación del precursor comprometido a una célula completamente diferenciada requerirá del desarrollo de técnicas adecuadas para el aislamiento y estudio de células amplificadoras transitorias de vida media muy corta.

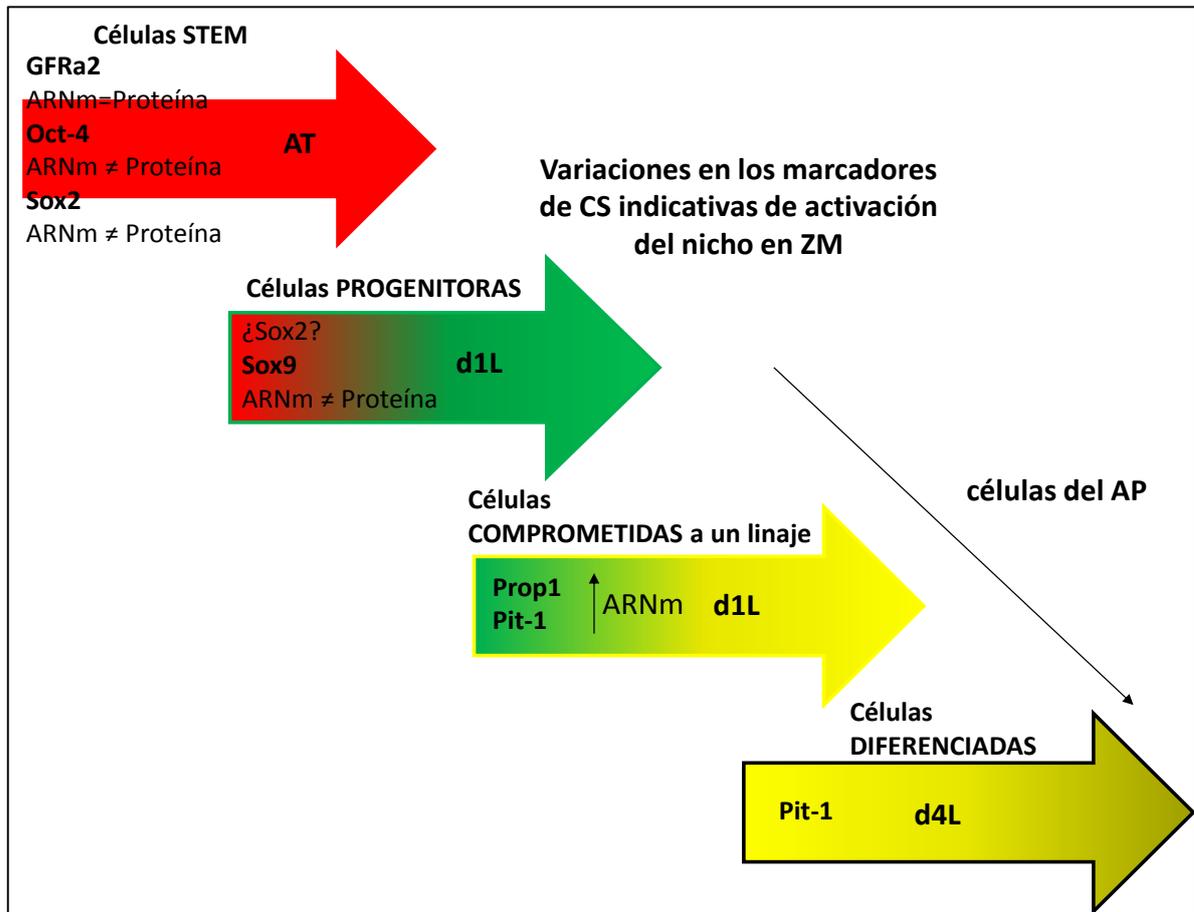


Figura 54. Representación esquemática de los hallazgos obtenidos a nivel proteico y de ARNm para los marcadores de células stem, progenitoras, comprometidas a un linaje y diferenciadas en la ZM y AP durante la gestación y lactancia. AT: A término de la gestación, d1L: lactancia temprana, d4L: lactancia activa.

Retomando el concepto de plasticidad hipofisaria mencionado en secciones anteriores, existen en la bibliografía muchas evidencias que informan variaciones morfométricas de las poblaciones de células adenohipofisarias en respuesta a estímulos hormonales en diferentes estados reproductivos. Sin embargo, no hay estudios que cuantifiquen la proliferación celular en forma diferencial en ZM y AP en condiciones fisiológicas en las que se producen renovación de células endocrinas. Para aportar datos en esta área, realizamos un análisis de incorporación de BrdU en las células de la ZM y AP durante la gestación y lactancia. De este modo pudimos demostrar un notable incremento en la proliferación de células de la ZM al término de la gestación. En AP, se observó un patrón diferente en la proliferación celular la cual incrementó en d1L. En ambas zonas, se cuantificó una disminución en el número de células BrdU+ luego de 4 días de lactancia.

Considerando en forma conjunta los resultados en los que observamos una “*up-regulación*” de los marcadores de SC y el incremento de la proliferación celular en la ZM del grupo AT, es posible postular una activación y expansión del nicho de CS/P en ZM al final de la preñez, conduciendo a la diferenciación celular, al origen de nuevas células progenitoras, en lactancia temprana y a poblaciones de células hormonalmente maduras durante la lactancia activa. Para responder a esta hipótesis, se realizó un recuento de células proliferantes que a su vez presentaron expresión para el marcador de SC hipofisarias, GFRA2, en la ZM de los grupos COP, como condición inicial y a término de la gestación, tiempo en el que se registraron los cambios antes mencionados. Un aumento significativo de células BrdU/GFRA2+ fue observado en la ZM del grupo AT, sugiriendo que las SC hipofisarias que se encontraban en una condición de reposo, son activadas para originar células progenitoras. Estas nuevas células fueron evidenciadas por un número

significativo de células BrdU/Sox9+ en una zona de transición ubicada entre la ZM y el AP en lactancia temprana. Esta región de transición con frecuentes células proliferantes Sox9+, podría presentar un comportamiento germinal, tal como fuera reportado durante la embriogénesis de la glándula [78]. Al igual que en otros tejidos adultos, el compartimento de CS/P puede recapitular procesos de desarrollo tempranos como respuesta a adaptaciones plásticas durante la regeneración y/o renovación celular [25]. En contraposición con estos hallazgos, un artículo recientemente publicado ha informado, que las células Sox2+/Ki67+ no presentaron una mayor proliferación en hipófisis a los 13 y 18 días de gestación ni a los 7 días de lactancia activa. Por el contrario, células Pit-1+/Ki67+, seguían siendo las principales células que proliferan en el lóbulo anterior en los tiempos analizados [174]. La discrepancia en los resultados obtenidos en estas investigaciones, puede ser atribuida a los diferentes tiempos de gestación y lactancia analizados. Además, hay que considerar que la activación y proliferación de una ASC sucede muy rápidamente, lo cual requiere de un seguimiento a tiempos más acotados evaluando además, la expresión de un conjunto de marcadores específicos de CS/P.

En conclusión, en el presente estudio hemos detectado patrones oscilatorios de los niveles de ARNm y proteínas de los marcadores de CS/P, en combinación con un notable incremento en la tasa de proliferación celular en la ZM a término de la gestación e inicio de la lactancia. Estos datos son indicativos de una activación y expansión del nicho de las CS/P con el fin de contribuir a la demanda de nuevas células endocrinas en los estados reproductivos estudiados. Una mejor comprensión de este mecanismo puede proporcionar importantes conocimientos sobre la elección del destino celular de las CS/P y ayudar a desarrollar protocolos de diferenciación más eficientes para obtener células

hormonales totalmente diferenciadas con determinadas características funcionales y ser utilizados en terapias de reemplazo celular.

Conclusiones

“Expansión del nicho de células stem/progenitoras asociada a cambios en la expresión de marcadores específicos en hipófisis durante la gestación y lactancia”

La Zona Marginal de hipófisis de ratas adultas exhibe una población celular específica que expresa marcadores de fenotipo stem/progenitor y de células de sostén, sugiriendo la presencia de un verdadero nicho de SC.

La presencia in vivo de un nicho de células stem/progenitoras en hipófisis de ratas adultas fue confirmada mediante la capacidad de estas células de formar estructuras esferoidales enriquecidas en SC in vitro, las que presentan capacidad multipotente y de generarse de “novo”.

El E2 participa en el proceso de diferenciación de las SC hacia un linaje celular diferenciado, células PRL+.

El nicho de CS/P presente en la ZM participa activamente en la renovación celular hipofisaria para responder a la demanda de nuevas células endocrinas en los estadios reproductivos estudiados.

Bibliografía

1. Ramalho-Santos, M. and H. Willenbring, *On the origin of the term "stem cell"*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 35-8.
2. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
3. Till, J.E., *Radiosensitivity and chromosome numbers in strain L mouse cells in tissue culture*. Radiat Res, 1961. **15**: p. 400-9.
4. Till, J.E. and E.A. McCulloch, *Hemopoietic stem cell differentiation*. Biochim Biophys Acta, 1980. **605**(4): p. 431-59.
5. Till, J.E., E.A. McCulloch, and L. Siminovitch, *A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 29-36.
6. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
7. Luskin, M.B., *Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone*. Neuron, 1993. **11**(1): p. 173-89.
8. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 2074-7.
9. Wright, N.A., *Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(2): p. 117-43.
10. Blanpain, C., et al., *Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche*. Cell, 2004. **118**(5): p. 635-48.
11. Alison, M.R., et al., *Hepatic stem cells: from inside and outside the liver?* Cell Prolif, 2004. **37**(1): p. 1-21.
12. Gronthos, S., et al., *Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(1): p. 47-56.
13. Nuttall, M.E., et al., *Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(3): p. 371-82.
14. Tropepe, V., et al., *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2032-6.
15. Bongso, A. and M. Richards, *History and perspective of stem cell research*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(6): p. 827-42.
16. Anderson, D.J., F.H. Gage, and I.L. Weissman, *Can stem cells cross lineage boundaries?* Nat Med, 2001. **7**(4): p. 393-5.
17. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
18. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
19. Somers, A., et al., *Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette*. Stem Cells, 2010. **28**(10): p. 1728-40.
20. Kyo, S., Y. Maida, and M. Inoue, *Stem cells in endometrium and endometrial cancer: accumulating evidence and unresolved questions*. Cancer Lett, 2011. **308**(2): p. 123-33.
21. Liew, C.G., et al., *Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation*. Ann Med, 2005. **37**(7): p. 521-32.
22. Lin, H., *Cell biology of stem cells: an enigma of asymmetry and self-renewal*. J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 257-60.

23. Niwa, H., *How is pluripotency determined and maintained?* Development, 2007. **134**(4): p. 635-46.
24. Raff, M., *Adult stem cell plasticity: fact or artifact?* Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 1-22.
25. Wabik, A. and P.H. Jones, *Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells.* EMBO J, 2015. **34**(9): p. 1164-79.
26. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.* Cell, 2005. **122**(6): p. 947-56.
27. Pera, M.F. and P.P. Tam, *Extrinsic regulation of pluripotent stem cells.* Nature, 2010. **465**(7299): p. 713-20.
28. Tang, F., et al., *Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis.* Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 468-78.
29. Song, J., et al., *An in vivo model to study and manipulate the hematopoietic stem cell niche.* Blood, 2010. **115**(13): p. 2592-600.
30. Voog, J. and D.L. Jones, *Stem cells and the niche: a dynamic duo.* Cell Stem Cell, 2010. **6**(2): p. 103-15.
31. Lane, S.W., D.A. Williams, and F.M. Watt, *Modulating the stem cell niche for tissue regeneration.* Nat Biotechnol, 2014. **32**(8): p. 795-803.
32. Rompolas, P., et al., *Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration.* Nature, 2012. **487**(7408): p. 496-9.
33. Crowder, S.W., et al., *Material Cues as Potent Regulators of Epigenetics and Stem Cell Function.* Cell Stem Cell, 2016. **18**(1): p. 39-52.
34. Szilvassy, S.J., *The biology of hematopoietic stem cells.* Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 446-60.
35. Shafritz, D.A. and M.D. Dabeva, *Liver stem cells and model systems for liver repopulation.* J Hepatol, 2002. **36**(4): p. 552-64.
36. Bonner-Weir, S., et al., *In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7999-8004.
37. Niemann, C. and F.M. Watt, *Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis.* Trends Cell Biol, 2002. **12**(4): p. 185-92.
38. Barker, N., M. van de Wetering, and H. Clevers, *The intestinal stem cell.* Genes Dev, 2008. **22**(14): p. 1856-64.
39. Harada, H., et al., *Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling.* J Cell Biol, 1999. **147**(1): p. 105-20.
40. Dua, H.S. and A. Azuara-Blanco, *Limbal stem cells of the corneal epithelium.* Surv Ophthalmol, 2000. **44**(5): p. 415-25.
41. Johansson, C.B., et al., *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system.* Cell, 1999. **96**(1): p. 25-34.
42. Charbord, P., *Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts.* Hum Gene Ther, 2010. **21**(9): p. 1045-56.
43. Zheng, H., et al., *PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas.* Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 497-509.
44. Schlechta, B., et al., *Ex-vivo expanded umbilical cord blood stem cells retain capacity for myocardial regeneration.* Circ J, 2010. **74**(1): p. 188-94.
45. Ramiya, V.K., et al., *Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells.* Nat Med, 2000. **6**(3): p. 278-82.
46. D'Amario, D., et al., *Functionally competent cardiac stem cells can be isolated from endomyocardial biopsies of patients with advanced cardiomyopathies.* Circ Res, 2011. **108**(7): p. 857-61.
47. Sasaki, F., *Changes with age in the number and size of anterior pituitary cells in female mice from suckling to adulthood.* J Endocrinol, 1988. **117**(1): p. 5-10.

48. Nolan, L.A., et al., *Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment*. J Neuroendocrinol, 1998. **10**(3): p. 207-15.
49. Scheithauer, B.W., et al., *The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases*. Mayo Clin Proc, 1990. **65**(4): p. 461-74.
50. Stefaneanu, L., et al., *Pituitary lactotrophs and somatotrophs in pregnancy: a correlative in situ hybridization and immunocytochemical study*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1992. **62**(5): p. 291-6.
51. Melmed, S., *Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1603-18.
52. Levy, A., *Physiological implications of pituitary trophic activity*. J Endocrinol, 2002. **174**(2): p. 147-55.
53. Taniguchi, Y., et al., *Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells*. Anat Embryol (Berl), 2002. **206**(1-2): p. 1-11.
54. Asa, S.L. and S. Ezzat, *The pathogenesis of pituitary tumors*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 97-126.
55. Toledano, Y., et al., *Estradiol partially recapitulates murine pituitary cell cycle response to pregnancy*. Endocrinology, 2012. **153**(10): p. 5011-22.
56. Nolan, L.A. and A. Levy, *The trophic effects of oestrogen on male rat anterior pituitary lactotrophs*. J Neuroendocrinol, 2009. **21**(5): p. 457-64.
57. Nolan, L.A. and A. Levy, *A population of non-luteinising hormone/non-adrenocorticotrophic hormone-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy*. J Neuroendocrinol, 2006. **18**(9): p. 655-61.
58. Levy, A., *Stem cells, hormones and pituitary adenomas*. J Neuroendocrinol, 2008. **20**(1): p. 139-40.
59. Porter, T.E., C.D. Wiles, and L.S. Frawley, *Evidence for bidirectional interconversion of mammatropes and somatotropes: rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning*. Endocrinology, 1991. **129**(3): p. 1215-20.
60. Vidal, S., et al., *Reversible transdifferentiation: interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia*. Mod Pathol, 2001. **14**(1): p. 20-8.
61. Childs, G.V., *Development of gonadotropes may involve cyclic transdifferentiation of growth hormone cells*. Arch Physiol Biochem, 2002. **110**(1-2): p. 42-9.
62. Nolan, L.A., et al., *The effects of age and spontaneous adenoma formation on trophic activity in the rat pituitary gland: a comparison with trophic activity in the human pituitary and in human pituitary adenomas*. J Neuroendocrinol, 1999. **11**(5): p. 393-401.
63. Chen, J., et al., *The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics*. Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3985-98.
64. Chen, J., et al., *Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection*. Stem Cells, 2009. **27**(5): p. 1182-95.
65. Perez, P.A., et al., *Inhibitory role of ERbeta on anterior pituitary cell proliferation by controlling the expression of proteins related to cell cycle progression*. Mol Cell Endocrinol, 2015. **415**: p. 100-13.
66. Couly, G.F. and N.M. Le Douarin, *Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon*. Dev Biol, 1985. **110**(2): p. 422-39.
67. Rizzoti, K. and R. Lovell-Badge, *Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke's pouch*. Rev Endocr Metab Disord, 2005. **6**(3): p. 161-72.
68. Fauquier, T., et al., *SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2907-12.
69. Gleiberman, A.S., et al., *Genetic approaches identify adult pituitary stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6332-7.

70. Bilodeau, S., A. Roussel-Gervais, and J. Drouin, *Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(7): p. 1895-908.
71. Vankelecom, H., *Pituitary stem cells drop their mask*. Curr Stem Cell Res Ther, 2012. **7**(1): p. 36-71.
72. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.
73. Gon, G., F. Nakamura, and H. Ishikawa, *Cystlike structures derived from the marginal cells of Rathke's cleft in rat pituitary grafts*. Cell Tissue Res, 1987. **250**(1): p. 29-33.
74. Soji, T., T. Yashiro, and D.C. Herbert, *Granulated 'marginal cell layer' in the rat anterior pituitary gland*. Tissue Cell, 1989. **21**(6): p. 849-56.
75. Yoshimura, F., T. Soji, and Y. Kiguchi, *Relationship between the follicular cells and marginal layer cells of the anterior pituitary*. Endocrinol Jpn, 1977. **24**(3): p. 301-5.
76. Garcia-Lavandeira, M., et al., *A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4815.
77. Paratcha, G. and F. Ledda, *GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons*. Trends Neurosci, 2008. **31**(8): p. 384-91.
78. Kelberman, D., et al., *Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse*. Endocr Rev, 2009. **30**(7): p. 790-829.
79. Yoshimura, F., et al., *Differentiation of isolated chromophobes into acidophils or basophils when transplanted into the hypophysiotrophic area of hypothalamus*. Endocrinol Jpn, 1969. **16**(5): p. 531-40.
80. Horvath, E. and K. Kovacs, *Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell?* Ultrastruct Pathol, 2002. **26**(4): p. 219-28.
81. Otto, C., S. tom Dieck, and K. Bauer, *Dipeptide uptake by adenohipophysial folliculostellate cells*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 1): p. C210-7.
82. Lepore, D.A., et al., *Identification and enrichment of colony-forming cells from the adult murine pituitary*. Exp Cell Res, 2005. **308**(1): p. 166-76.
83. Chen, J., et al., *The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3293-307.
84. McNicol, A.M. and E. Carbajo-Perez, *Aspects of anterior pituitary growth, with special reference to corticotrophs*. Pituitary, 1999. **1**(3-4): p. 257-68.
85. Hashi, A., et al., *Pentobarbital anesthesia during the proestrous afternoon blocks lactotroph proliferation occurring on estrus in female rats*. Endocrinology, 1995. **136**(10): p. 4665-71.
86. Murashov, A.K., et al., *17beta-Estradiol enhances neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 165-8.
87. Simoes, B.M., et al., *Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(1): p. 23-35.
88. Jahn, G.A., J.A. Burdman, and R.P. Deis, *Regulation of pituitary DNA synthesis during different reproductive states in the female rat: role of estrogens and prolactin*. Mol Cell Endocrinol, 1984. **35**(2-3): p. 113-9.
89. Nolan, L.A. and A. Levy, *The effects of testosterone and oestrogen on gonadectomised and intact male rat anterior pituitary mitotic and apoptotic activity*. J Endocrinol, 2006. **188**(3): p. 387-96.
90. Wilson, D.B., *Distribution of 3H-thymidine in the postnatal hypophysis of the C57BL mouse*. Acta Anat (Basel), 1986. **126**(2): p. 121-6.
91. Carbajo-Perez, E. and Y.G. Watanabe, *Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period*. Cell Tissue Res, 1990. **261**(2): p. 333-8.

92. Rando, T.A., *Stem cells, ageing and the quest for immortality*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1080-6.
93. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-76.
94. Rock, J.R., et al., *Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12771-5.
95. Vankelecom, H., *Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(4): p. 559-70.
96. Fu, Q., et al., *The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration*. Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3224-35.
97. Gremeaux, L., et al., *Activated phenotype of the pituitary stem/progenitor cell compartment during the early-postnatal maturation phase of the gland*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(5): p. 801-13.
98. Conboy, I.M. and T.A. Rando, *The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis*. Dev Cell, 2002. **3**(3): p. 397-409.
99. Slack, J.M., *Origin of stem cells in organogenesis*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1498-501.
100. Roskams, T., *Different types of liver progenitor cells and their niches*. J Hepatol, 2006. **45**(1): p. 1-4.
101. Xu, X., et al., *Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas*. Cell, 2008. **132**(2): p. 197-207.
102. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
103. Koudstaal, S., et al., *Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(6): p. 434-43.
104. Luque, R.M., et al., *Metabolic impact of adult-onset, isolated, growth hormone deficiency (AOiGHD) due to destruction of pituitary somatotropes*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15767.
105. Langlais, D., et al., *Adult pituitary cell maintenance: lineage-specific contribution of self-duplication*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(7): p. 1103-12.
106. Yin, P. and J. Arita, *Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle*. Neuroendocrinology, 2000. **72**(2): p. 72-9.
107. Ana L. De Paul, J.H.M., Juan P. Petiti, Silvina Gutiérrez, Amado A. Quintar, Cristina A. Maldonado and Alicia I. Torres *Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes, Applications of Immunocytochemistry*, in *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » "Applications of Immunocytochemistry", D.H. Dehghani, Editor. 2012, InTech. p. 33.
108. D'Amico, F. and E. Skarmoutsou, *Quantifying immunogold labelling in transmission electron microscopy*. J Microsc, 2008. **230**(Pt 1): p. 9-15.
109. Garcia-Lavandeira, M., et al., *Craniopharyngiomas express embryonic stem cell markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as pituitary stem cells but do not coexpress RET/GFRA3 receptors*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(1): p. E80-7.
110. Xu, Q., et al., *Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours*. Br J Cancer, 2009. **101**(2): p. 303-11.
111. Aoki, A., H.A. Pasolli, and A.I. Torres, *Pituitary plasticity as correlate of secretory activity*. Exp Toxicol Pathol, 1994. **46**(6): p. 435-6.
112. Mukdsi, J.H., et al., *Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen*. Histochem Cell Biol, 2004. **121**(6): p. 453-62.
113. Haggi, E.S., et al., *Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation*. J Endocrinol, 1986. **111**(3): p. 367-73.

114. Pasolli, H.A., A.I. Torres, and A. Aoki, *The mammosomatotroph: a transitional cell between growth hormone and prolactin producing cells? An immunocytochemical study.* Histochemistry, 1994. **102**(4): p. 287-96.
115. Lancaster, M.A. and J.G. Gleeson, *The primary cilium as a cellular signaling center: lessons from disease.* Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(3): p. 220-9.
116. Garcia-Lavandeira, M., et al., *Pituitary Cell Turnover: From Adult Stem Cell Recruitment through Differentiation to Death.* Neuroendocrinology, 2015. **101**(3): p. 175-92.
117. Le Tissier, P.R., et al., *Anterior pituitary cell networks.* Front Neuroendocrinol, 2012. **33**(3): p. 252-66.
118. Hsu, Y.C., L. Li, and E. Fuchs, *Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration.* Cell, 2014. **157**(4): p. 935-49.
119. Imayoshi, I., et al., *Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors.* Science, 2013. **342**(6163): p. 1203-8.
120. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche.* Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
121. Gilyarov, A.V., *Nestin in central nervous system cells.* Neurosci Behav Physiol, 2008. **38**(2): p. 165-9.
122. Kasper, M. and U. Karsten, *Coexpression of cytokeratin and vimentin in Rathke's cysts of the human pituitary gland.* Cell Tissue Res, 1988. **253**(2): p. 419-24.
123. Marin, F., et al., *Immunohistochemical localization of intermediate filament and S-100 proteins in several non-endocrine cells of the human pituitary gland.* Arch Histol Cytol, 1989. **52**(3): p. 241-8.
124. Turksen, K., *Embryonic Stem Cell Protocols*, in *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, H. Press, Editor. 2006: Ottawa, Ontario, Canada.
125. Reynolds, B.A. and R.L. Rietze, *Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship.* Nat Methods, 2005. **2**(5): p. 333-6.
126. Pastrana, E., V. Silva-Vargas, and F. Doetsch, *Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells.* Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 486-98.
127. Zhu, X., A.S. Gleiberman, and M.G. Rosenfeld, *Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks.* Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 933-63.
128. Alvarez, C.V., et al., *Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells.* J Mol Endocrinol, 2012. **49**(2): p. R89-111.
129. Alvarez-Buylla, A. and D.A. Lim, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain.* Neuron, 2004. **41**(5): p. 683-6.
130. Jensen, J.N., et al., *Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration.* Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 728-41.
131. Ellison, G.M., et al., *Cardiac stem and progenitor cell identification: different markers for the same cell?* Front Biosci (Schol Ed), 2010. **2**: p. 641-52.
132. Yoshida, S., et al., *Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem / progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary.* J Neuroendocrinol, 2011. **23**(10): p. 933-43.
133. Pera, M.F., *Defining pluripotency.* Nat Methods, 2010. **7**(11): p. 885-7.
134. Kalkan, T. and A. Smith, *Mapping the route from naive pluripotency to lineage specification.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014. **369**(1657).
135. Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11619-24.
136. D'Angelo, A. and B. Franco, *The dynamic cilium in human diseases.* Pathogenetics, 2009. **2**(1): p. 3.

137. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
138. Lin, R. and L. Iacovitti, *Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair*. Brain Res, 2015. **1628**(Pt B): p. 327-42.
139. Solanas, G. and S.A. Benitah, *Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(11): p. 737-48.
140. Gucciardo, E., N. Sugiyama, and K. Lehti, *Eph- and ephrin-dependent mechanisms in tumor and stem cell dynamics*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(19): p. 3685-710.
141. Gattazzo, F., A. Urciuolo, and P. Bonaldo, *Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2506-19.
142. Nomura, T., et al., *EphB signaling controls lineage plasticity of adult neural stem cell niche cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(6): p. 730-43.
143. Gautron, L., V. De-Smedt, and S. Laye, *Age-related changes in nestin immunoreactivity in the rat pituitary gland*. Neuroendocrinology, 2009. **90**(1): p. 19-30.
144. Krylyshkina, O., et al., *Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2376-87.
145. Miyabayashi, T., et al., *Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5668-73.
146. Zhang, J., et al., *Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling*. Dev Cell, 2010. **18**(3): p. 472-9.
147. U, H.S., W. Alilain, and F. Saljooque, *Fetal brain progenitor cells transdifferentiate to fates outside the nervous system*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(11): p. 2645-56.
148. Gossard, F., et al., *In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA*. Neurosci Lett, 1987. **79**(3): p. 251-6.
149. Seaberg, R.M. and D. van der Kooy, *Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1784-93.
150. Cheung, T.H. and T.A. Rando, *Molecular regulation of stem cell quiescence*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 329-40.
151. Magami, Y., et al., *Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver*. Liver, 2002. **22**(5): p. 419-25.
152. Rodins, K., et al., *Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 1075-81.
153. Cheung, T.H., et al., *Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489*. Nature, 2012. **482**(7386): p. 524-8.
154. Janich, P., et al., *The circadian molecular clock creates epidermal stem cell heterogeneity*. Nature, 2011. **480**(7376): p. 209-14.
155. Hassiotou, F., et al., *Expression of the Pluripotency Transcription Factor OCT4 in the Normal and Aberrant Mammary Gland*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 79.
156. Nakada, D., et al., *Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 555-8.
157. Chanson, P., et al., *Normal pituitary hypertrophy as a frequent cause of pituitary incidentaloma: a follow-up study*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(7): p. 3009-15.
158. Dinc, H., et al., *Pituitary dimensions and volume measurements in pregnancy and post partum. MR assessment*. Acta Radiol, 1998. **39**(1): p. 64-9.
159. Jaita, G., et al., *Gonadal steroids modulate Fas-induced apoptosis of lactotropes and somatotropes*. Endocrine, 2011. **39**(1): p. 21-7.
160. Aoki, A., et al., *Disposal of cell debris from surplus lactotrophs of pituitary gland*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1996. **104**(3): p. 256-62.

161. Vankelecom, H. and J. Chen, *Pituitary stem cells: where do we stand?* Mol Cell Endocrinol, 2014. **385**(1-2): p. 2-17.
162. Yoshida, S., T. Kato, and Y. Kato, *Regulatory System for Stem/Progenitor Cell Niches in the Adult Rodent Pituitary*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
163. Fonseca-Pereira, D., et al., *The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function*. Nature, 2014. **514**(7520): p. 98-101.
164. Chang, H.H., et al., *Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 544-7.
165. Lu, R., et al., *Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 358-62.
166. Baltus, G.A., et al., *Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2175-84.
167. Sim, H., A. Argentaro, and V.R. Harley, *Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **19**(6): p. 213-22.
168. Ward, R.D., et al., *Role of PROP1 in pituitary gland growth*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(3): p. 698-710.
169. Yako, H., et al., *Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary just before birth*. Cell Tissue Res, 2013. **354**(3): p. 837-47.
170. Yoshida, S., et al., *PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385**(1): p. 11-5.
171. Yako, H., et al., *Three-dimensional studies of Prop1-expressing cells in the rat pituitary primordium of Rathke's pouch*. Cell Tissue Res, 2011. **346**(3): p. 339-46.
172. Carbajal, K.S., et al., *Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 11068-73.
173. Vankelecom, H. and L. Gremeaux, *Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field*. Gen Comp Endocrinol, 2010. **166**(3): p. 478-88.
174. Zhu, X., et al., *Notch-Dependent Pituitary SOX2(+) Stem Cells Exhibit a Timed Functional Extinction in Regulation of the Postnatal Gland*. Stem Cell Reports, 2015. **5**(6): p. 1196-209.