



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES (NF68) EN  
CÉLULAS ADENOHIPOFISIARIAS DE RATA CON DISTINTAS  
DEMANDAS FISIOLÓGICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:

AVELINO GUARDADO FLORES



DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL  
2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# DEDICATORIA

A mis abuelos, que en presencia o en memoria están siempre conmigo.

A mis padres, Avelino y Haydeé, por su apoyo constante e incondicional y por su guía en todo momento (en especial los complicados). Son y siempre serán un ejemplo para mí, sin su cariño y consejo no sería el hombre que soy hoy, por eso y todo lo demás, gracias.

A mi hermano Alejandro por ser mi punto de apoyo más constante, estar siempre ahí para escucharme (y aburrirse) con mis “pláticas de biólogos”, para darme algún consejo oportuno y acertado, y de vez en cuando una que otra “patadita” cuando me lo merecía.

A mis tíos, Jorge e Ivonne, por toda su ayuda durante los años que viví con ellos y toda la ayuda después de que dejé de hacerlo. No saben lo mucho que les agradezco su presencia durante esos primeros meses en esta enorme ciudad que me parecía tan intimidante, gracias a ustedes nunca me sentí lejos de casa.

Al resto de mi familia, Guardado, Flores, Solano, que siempre han estado ahí con una sonrisa, un comentario, o alguna broma. Aun cuando no los vea tan a menudo sé que siempre puedo contar con ustedes, que esté en donde esté jamás estaré realmente solo.

## Agradecimientos

A la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, por darme una oportunidad de aprender de ella, por su paciencia y por todo su apoyo y comprensión dentro y fuera del laboratorio. Es mucho lo que he aprendido de ti Tatiana, académica y personalmente; gracias por reforzar esa idea de que no por dedicarnos a la ciencia debemos perder nuestro lado humano.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez, la Dra. Hortensia González, la bióloga Luisa Durán y el químico Nicolás Jiménez por sus valiosas observaciones y comentarios durante la revisión de este trabajo.

A Nicolás Jiménez, Alicia Falcón, Araceli Torres y Jaime García por el invaluable apoyo técnico que me brindaron, apoyo sin el cual este trabajo no sería una realidad.

A mis compañeros del cubil y de fisiología: Luis, José, Diana, Carlos, Eli (alfa y beta), Arturo, Laura, Jorge, Vladimir, Tzitzí, Luisa, Pedro, Omar, Daniel. Por todos los momentos compartidos, el apoyo técnico y personal que siempre me brindaron, pero sobre todo por su amistad y por hacer del laboratorio un lugar de trabajo tan agradable.

A mis amigos y maestros, Felipe, Charls, Juanpa, Arturo Roldán, Ximena, Arturo Mendoza, Horacio Mariana, Chelo, Marisol, Abril, Javier, Mónica, Diego, Itzel, Anet, Erandi, Licha, Ana, Xcitla, Ángel, Aldebarán, Sonia, Nila, Luis, Ramón, Juanfra, Mauricio, Liliana, Dámaris, Miguel, Urick, Paco, Renata, Pablo, José, Toño, Laura, Inés, Caro, Glenda, Sarah, Elena, Anahí, Juan, Linda, Tania, y todos los demás que por cuestiones de espacio (y memoria) no menciono aquí. Todos ustedes, sean de biológicas, de la facultad, de Helios o de la vida en general, merecen que los mencione y agradezca de forma individual, por estar allí con una sonrisa, una cerveza, un oído amigo o un hombro sobre el cual llorar cuando hiciera falta. Todos ustedes son una gran parte de mí y sin su presencia jamás hubiera llegado hasta aquí.

Sin ustedes, todos ustedes, sería una menor persona de la que soy hoy. Agradezco constantemente el privilegio de haberlos conocido y la oportunidad que me dieron todos de haber entrado en sus vidas, y de entrar a la vez en la mía.

# Índice

I.	DEDICATORIA.....	2
II.	AGRADECIMIENTOS.....	3
III.	ÍNDICE.....	4
IV.	RESUMEN.....	6
V.	LISTADO DE ABREVIATURAS.....	7
VI.	INTRODUCCIÓN.....	9
	1. Anatomía de la hipófisis.....	9
	2. Irrigación de la hipófisis.....	12
	3. Regulación de la secreción de hormonas.....	13
	4. Hormonas adenohipofisiarias.....	17
	6.1 ACTH.....	17
	6.2 TSH.....	18
	6.3 LH y FSH.....	18
	6.4 GH.....	19
	6.5 PRL.....	20
	5. Embriología.....	21
	6. Neurofilamentos.....	23
VII.	OBJETIVOS.....	28

• Objetivo general.....	28
• Objetivos particulares.....	28
VIII. HIPÓTESIS.....	29
IX. MÉTODOS.....	29
• Cultivo primario de células.....	29
• Determinación de la fase del ciclo estral.....	30
• Lactación.....	31
• Adrenalectomía.....	31
• Gonadectomía.....	31
• Inmunofluorescencia.....	32
• Digitalización-Adquisición.....	33
X. RESULTADOS.....	35
• Expresión de neurofilamentos en ratas con 7 días de lactación.....	38
• Expresión de neurofilamentos en ratas con 15 días post adrenalectomía...41	
• Expresión de neurofilamentos en ratas con 21 días post castración.....46	
XI. DISCUSIÓN.....	49
XII. REFERENCIAS.....	52

## RESUMEN

La hipófisis desempeña un papel vital en la regulación hormonal del organismo, función que lleva a cabo de forma conjunta con el hipotálamo y que requiere de un sistema complejo de regulación; este sistema integra señales de distintos orígenes, incluyendo factores de liberación e inhibición hipotalámicos, factores hormonales de los órganos blanco, factores neuronales (GABA, dopamina, noradrenalina, etc.), y factores propios de la hipófisis por medio de secreción paracrina y autocrina. En respuesta a estos factores las células secretoras de la hipófisis reaccionan con una serie de cambios, entre los que se encuentran reordenamientos del citoesqueleto que controlan la síntesis y liberación de hormonas, así como cambios en las proporciones de las diferentes poblaciones celulares adenohipofisarias.

Se ha observado que los filamentos intermedios regulan el ordenamiento de otros elementos del citoesqueleto en varios tipos celulares y que sirven como sitio de anclaje para un gran número de enzimas; entre ellos se encuentran los neurofilamentos, proteínas del citoesqueleto neuronal que ayudan en la determinación del calibre axonal e influyen la velocidad de transporte vesicular. Originalmente considerados exclusivos de células neuronales, se ha observado la presencia de neurofilamentos en subpoblaciones de somatotropos, lactotropos, gonadotropos y tirotropos en la adenohipofisis.

A fin de estudiar la posible relación de los neurofilamentos en la regulación de la secreción adenohipofisaria, hemos realizado dobles inmunomarcajes en cultivos celulares de adenohipofisis de ratas machos y hembras de dos meses de edad adrenalectomizadas, castradas, y lactantes, con el propósito de generar una situación de demanda fisiológica para ciertas hormonas al remover un asa de retroalimentación negativa o, en el caso de ratas lactantes, trabajar con una condición que incrementa la estimulación positiva. Se verificó que todas las hembras estuvieran en fase de estro. Se utilizaron anticuerpos IgG monoclonales anti-NF68 y el fragmento F(ab') anti-IgG de ratón conjugado a cianina 5 (Cy5) para los neurofilamentos, e IgG anti- $\beta$ FSH, anti-PRL, anti- $\beta$ TSH, anti-GH, todos en conejo, y el fragmento F(ab') anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para las inmunotinciones. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo con una cámara CCD bajo parámetros fijos para cada condición. El análisis se realizó mediante conteos celulares, identificando el total de células positivas a la hormona correspondiente y al neurofilamento, así como células dobles positivas y dobles negativas, comparando los datos obtenidos en distintas hormonas, tratamientos y sexos.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que las células endócrinas de la adenohipofisis presentan variaciones en sus proporciones poblacionales en respuesta a un incremento en la demanda fisiológica de una hormona dada; del mismo modo muestran aumentos en la proporción de células que presentan el neurofilamento en respuesta a cada condición experimental. Ambos fenómenos muestran un dimorfismo sexual, siendo mayor en el caso de las hembras. En conjunto los resultados llevan a pensar en una posible diferencia funcional entre subpoblaciones celulares (positivas y negativas a neurofilamentos), idea que se investigará con la continuación de este trabajo.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	<b>hormona adenocorticotrópica</b>
<b>ADH</b>	<b>hormona antidiurética o vasopresina</b>
<b>BSA</b>	<b>albúmina sérica bovina</b>
<b>BMP</b>	<b>proteína morfogenética de hueso</b>
<b>CRH</b>	<b>hormona liberadora de la corticotropina</b>
<b>Cy5</b>	<b>cianina 5</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's modified Eagle media</b>
<b>FITC</b>	<b>isotiocianato de fluoresceína</b>
<b>FGF</b>	<b>factor de crecimiento de fibroblastos</b>
<b>FSH</b>	<b>hormona folículo estimulante</b>
<b>GABA</b>	<b>ácido gama amino butírico</b>
<b>GATA-2</b>	<b>proteína de unión GATA 2</b>
<b>GH</b>	<b>hormona de crecimiento</b>
<b>GHRH</b>	<b>hormona liberadora de la hormona de crecimiento</b>
<b>GnRH</b>	<b>hormona liberadora de las gonadotropinas</b>
<b><math>\alpha</math>-GSU</b>	<b>subunidad alfa de glucoproteína</b>
<b>IgG</b>	<b>inmunoglobulina tipo G</b>
<b>LH</b>	<b>hormona luteinizante</b>
<b>LIF</b>	<b>factor inhibidor de la leucemia</b>
<b>MSH</b>	<b>hormona estimulante de los melanocitos</b>
<b>NF</b>	<b>neurofilamento</b>
<b>NF68</b>	<b>neurofilamento de 68kDa</b>



<b>NF-H</b>	<b>neurofilamento de 200kDa</b>
<b>NF-L</b>	<b>neurofilamento de 68kDa</b>
<b>NF-M</b>	<b>neurofilamento de 160kDa</b>
<b>OT</b>	<b>oxitocina</b>
<b>Pit-1</b>	<b>factor de transcripción positivo pituitario-específico 1</b>
<b>PBS</b>	<b>buffer de fosfatos salino</b>
<b>POMC</b>	<b>proopiomelanocortina</b>
<b>PRL</b>	<b>prolactina</b>
<b>Shh</b>	<b>Sonic Hedgehog</b>
<b>T<sub>3</sub></b>	<b>tri-yodo tironina</b>
<b>T<sub>4</sub></b>	<b>tirosina</b>
<b>T<sub>g</sub></b>	<b>Tiroglobulina</b>
<b>T-pit</b>	<b>factor de transcripción de caja-T Tbx19</b>
<b>TRH</b>	<b>hormona liberadora de la tirotropina</b>
<b>TSH</b>	<b>hormona estimulante de la tiroides</b>
<b>Wnt</b>	<b>proteína Wnt</b>
<b>X</b>	<b>hormona del órgano diana</b>
<b>XIH</b>	<b>hormona inhibidora hipotalámica</b>
<b>XRH</b>	<b>hormona liberadora hipotalámica</b>
<b>XSH</b>	<b>hormona estimulante hipofisiaria</b>

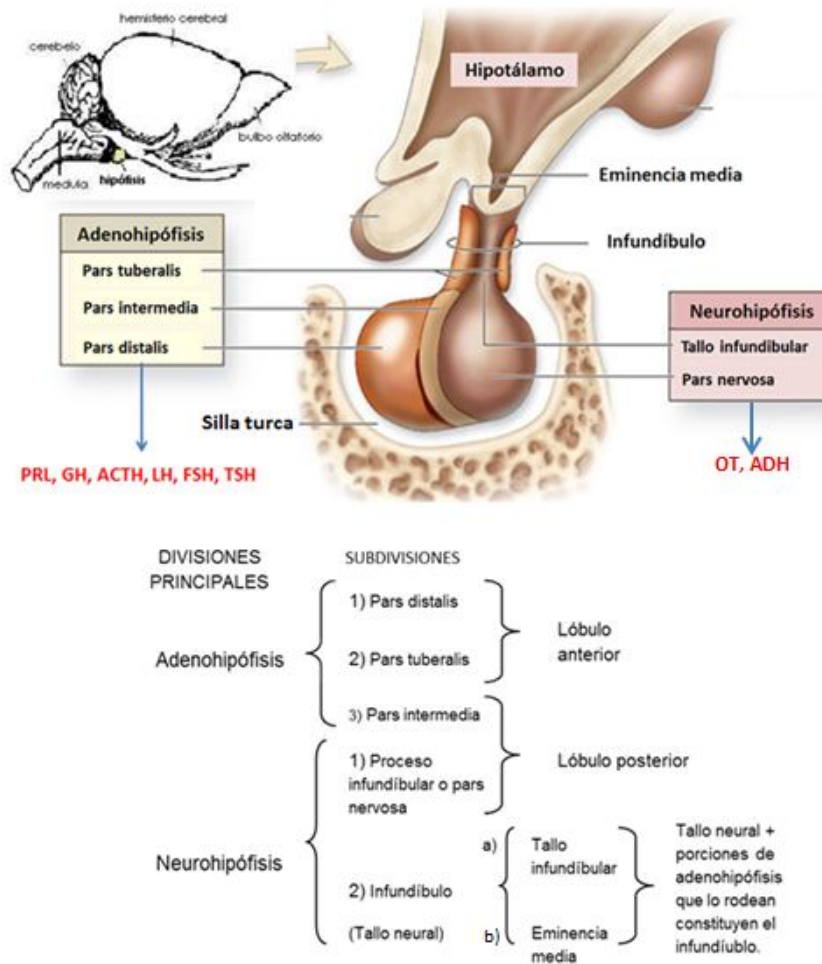
## INTRODUCCIÓN

### ***Anatomía de la hipófisis***

La hipófisis se localiza en la parte ventral de la cavidad craneal en la silla turca, está protegida por el hueso esfenoides y se encuentra unida al hipotálamo por medio del tallo infundíbular, haciendo del eje hipotálamo-hipófisis una unidad física así como funcional<sup>1</sup>. En la mayoría de los organismos vertebrados, la hipófisis se compone de dos lóbulos, uno anterior de secreción endócrina (adenohipófisis) que comprende un 80% de la glándula y uno posterior de secreción neuroendócrina (neurohipófisis) (Figura 1), con una lámina delgada que se presenta entre ambas partes denominada *pars intermedia* y que, según la nomenclatura empleada se considera parte de la adenohipófisis. En mamíferos, el lóbulo intermedio se encuentra fusionado con el lóbulo posterior. La *pars intermedia* posee una alta proporción de células que sintetizan proopiomelanocorticotropina (POMC), precursor de la hormona estimulante de los melanocitos (MSH)<sup>2</sup> entre otras.

El lóbulo posterior o neurohipófisis se forma por el tallo infundíbular, que junto con la eminencia media forman al infundíbulo, y la *pars nervosa*. El tallo es el sitio de paso de las fibras neurosecretoras peptidérgicas que terminan en la *pars nervosa*, la cual se compone principalmente por los axones de neuronas hipotalámicas de los núcleos paraventricular y supraóptico; es en estos núcleos donde se sintetizan las 2 hormonas peptídicas secretadas por la neurohipófisis, la oxitocina (OT) y la vasopresina u hormona antidiurética (ADH)<sup>3</sup>.

El lóbulo anterior o adenohipófisis se divide en *pars tuberalis* y *pars distalis*, la primera comprende sólo una pequeña porción del lóbulo que se extiende hacia el diencefalo para adosarse a él a modo de collar, mientras que la *pars distalis* contiene a la mayor parte del tejido secretor de la glándula<sup>3</sup>.



**Figura 1.** Ubicación y componentes principales de la hipófisis en mamíferos. Modificado de Human Anatomy, McGraw-Hill<sup>4</sup>.

En la adenohipófisis pueden identificarse 5 tipos celulares secretores, denominados según el tipo de hormona que secretan; lactotropos que secretan prolactina (PRL), somatotropos secretores de somatotropina u hormona de crecimiento (GH), corticotropos que secretan adenocorticotropina (ACTH) y derivados de POMC, tiotropos y gonadotropos que secretan hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante y/o folículo estimulante (LH y/o FSH) respectivamente<sup>5, 6</sup>. Por medio de la secreción de estas hormonas, la adenohipófisis puede regular los procesos de crecimiento somático, tasa metabólica, función reproductiva, adaptación al estrés, desarrollo y funcionamiento de las glándulas mamarias, entre otros, afirmando la importancia de la hipófisis en el control del organismo<sup>7</sup> (Tabla 1).

Además de los tipos celulares endócrinos, cerca de un 10% del total de células de la adenohipófisis son células foliculo-estrelladas que no poseen gránulos de secreción hormonal, estas células liberan otros factores (como citocinas o factores de crecimiento) que pueden modular la función endócrina. Las células secretoras de la hipófisis se presentan en una proporción desigual, que varía según la edad, el sexo y la etapa del ciclo reproductivo en la que se encuentre el organismo; los corticotropos representan de 15-20% del total, los tirotropos de 3-5%, los gonadotropos de 10-15%, los somatotropos de 40-50% y los lactotropos de 10-25%<sup>2</sup> (Tabla 1).

Tipo celular	Porcentaje poblacional	Hormona	Función
Melanotropos		Melanotropina (MSH)	Regula la síntesis de melanina en melanocitos y melanóforos.
Corticotropos	15-20%	Corticotropina (ACTH)	Regula la síntesis y la secreción de hormonas en la corteza adrenal. Regula el crecimiento de la corteza adrenal.
Somatotropos	40-50%	Somatotropina (GH)	Estimula el crecimiento y el desarrollo somático postnatal. Regula el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas.
Lactotropos	10-25%	Prolactina (PRL)	Relacionada con la actividad lactogénica, metabolismo de lípidos y efectos en el sistema inmune.
Tirotropos	3-5%	Tirotropina (TSH)	Regula el crecimiento, desarrollo y metabolismo de la glándula tiroides.
Gonadotropos	10-15%	Foliculo estimulante (FSH) Luteinizante (LH)	Relacionadas con los procesos reproductivos y de secreción de hormonas esteroides.

**Tabla 1.** Tabla de los distintos tipos celulares de secreción endócrina de la adenohipófisis con sus porcentajes totales en la glándula, hormonas que sintetizan y su función.

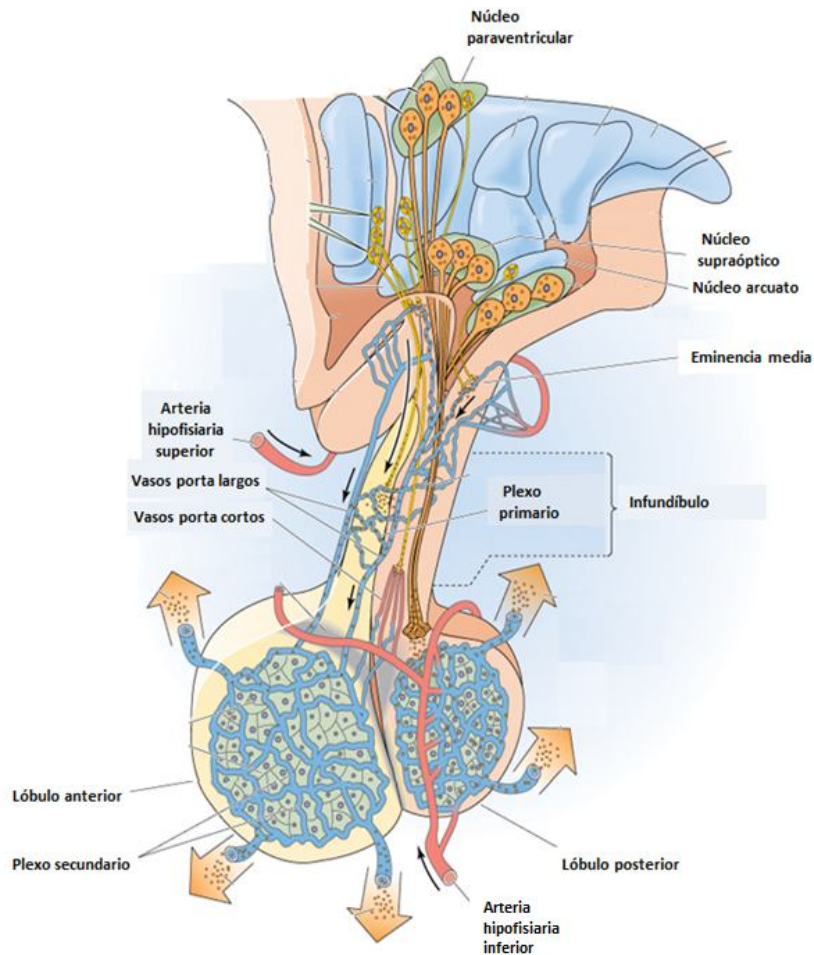
La hipófisis es una glándula de gran importancia en la regulación hormonal del organismo, en conjunto con el hipotálamo regula la función de otras glándulas así como funciones no endócrinas del organismo<sup>7</sup>. Esta actividad se ve regulada por varios factores, principales, como lo son la liberación de hormonas liberadoras o inhibidoras del hipotálamo a través del eje hipotálamo-hipófisis; factores hormonales producidos por los órganos blanco y factores propios de la hipófisis por medio de secreción paracrina y autocrina<sup>1</sup>.

### **Irrigación de la hipófisis**

La glándula hipófisis recibe un suministro sanguíneo muy complejo, con un flujo descendente del hipotálamo al lóbulo anterior, y de ahí al torrente sanguíneo por medio del sistema porta-hipofisiario. Esta disposición de los componentes que irrigan la glándula es sumamente importante en los procesos de regulación y en su función puesto que no está innervada; el flujo descendente de la sangre asegura que los factores reguladores del hipotálamo lleguen al lóbulo anterior y que las hormonas liberadas por este lleguen a sus órganos blanco<sup>8</sup> (Figura 2).

Generalmente el sistema arterial porta-hipofisiario se origina de las carótidas internas o de las arterias comunicantes anteriores del círculo de Willis por medio de las arterias hipofisiarias superiores; estas se encuentran y anastomosan a nivel de la eminencia media donde se capilarizan con mayor énfasis en el extremo superior del tallo infundíbular. Esta disposición de capilares forma el plexo capilar primario del sistema, sitio en el cual se descargan los factores liberadores provenientes de los núcleos arcuato y de las áreas de regulación hipofisiaria del hipotálamo. Los capilares del plexo primario se unen nuevamente para formar vasos porta largos que se extienden a lo largo del tallo hasta llegar a la *pars distalis* del lóbulo anterior de la hipófisis donde se capilarizan para dar lugar al plexo capilar secundario. Son los capilares de este plexo capilar secundario los que se encargan de la irrigación de las células parenquimatosas de la adenohipófisis, estos capilares desembocan en venas cortas que drenan a los senos venosos. Este complejo sistema de suministro sanguíneo asegura que todo el flujo de sangre del lóbulo anterior haya pasado previamente por el sistema nervioso<sup>2</sup> (Figura 2).

El lóbulo posterior de la hipófisis no posee un sistema de irrigación tan particular, es irrigado por arterias hipofisiarias inferiores, que tienen un origen común con las superiores, cuyos capilares envuelven al lóbulo. Es en estos capilares donde terminan los axones del sistema neurosecretor peptidérgico. Existen además pequeños vasos que se dirigen al lóbulo anterior de la glándula que se anastomosan con los capilares de la *pars distalis* formando vasos porta cortos<sup>2</sup>.



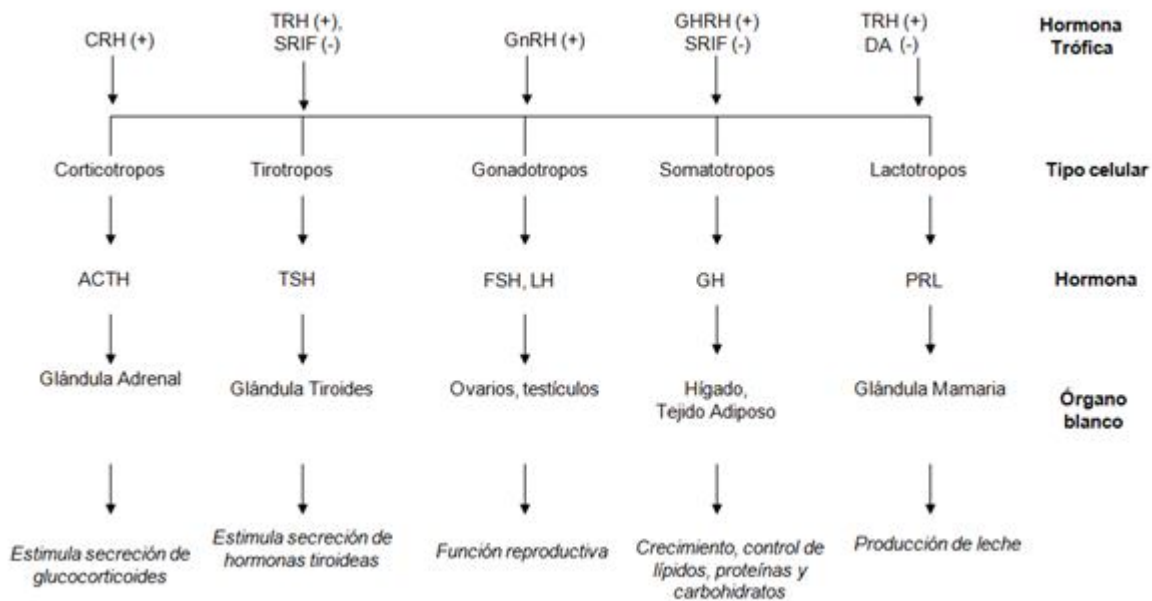
**Figura 2.** Sistema de irrigación porta hipofisiaria, que conecta al hipotálamo con la adenohipófisis. Modificado de Boron, Medical Physiology<sup>9</sup>.

### ***Regulación de la secreción de hormonas***

La actividad de la hipófisis requiere de un sistema de regulación complejo que involucra muchos factores, por medio de hormonas reguladoras liberadas por el hipotálamo en el caso de la adenohipófisis<sup>7</sup> o en el lóbulo posterior por una rica inervación de fibras nerviosas, entre las que pueden encontrarse fibras que contienen dopamina, noradrenalina, GABA, encefalina entre otros neurotransmisores<sup>10</sup>. La liberación de hormonas liberadoras en el hipotálamo responde a señales originadas dentro o fuera del organismo, que pueden estimular o inhibir la secreción de la hipófisis, a fin de producir efectos que permitan al cuerpo adaptarse a los cambios. Estas señales son transmitidas a neuronas hipotalámicas quienes secretan las hormonas liberadoras

hacia los vasos del sistema porta hipofisiario; una vez en la hipófisis estas hormonas liberadoras se unen a receptores específicos en las células de la adenohipófisis mediando la secreción de hormonas hipofisarias que regulan la secreción de células blanco en varias partes del cuerpo. Originalmente se creía que cada hormona liberadora tenía una sola población de células secretoras en la adenohipófisis como blanco, sin embargo se ha observado que la fisiología de la regulación de la glándula es mucho más compleja; la hormona liberadora de la tirotropina por ejemplo, puede estimular también la secreción de prolactina, y la somatostatina es capaz de inhibir a la somatotropina y a la tirotropina por igual<sup>2, 11</sup> (Figura 3). En general, tanto las hormonas de la adenohipófisis como las hormonas de la célula diana regulan negativamente la secreción de hormonas liberadoras en el hipotálamo o en la propia hipófisis, en lo que se conoce como asas de retroalimentación negativa larga y corta respectivamente<sup>7</sup>.

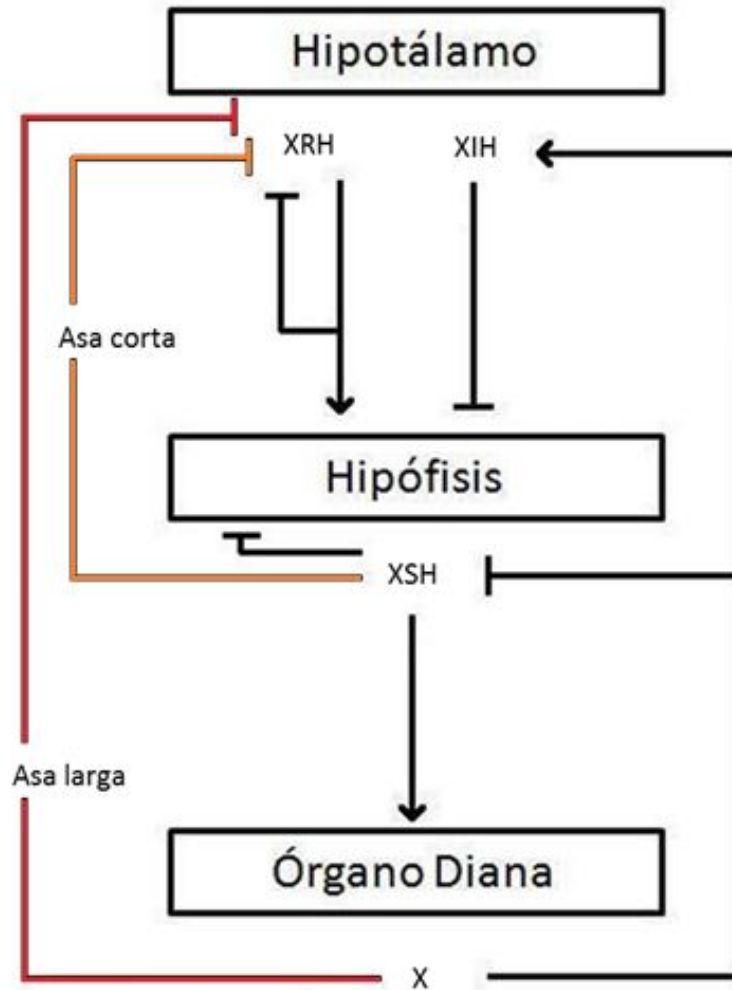
En la tiroides por ejemplo, la secreción de TSH provoca un incremento en los niveles de hormonas tiroideas, tiroxina ( $T_4$ ) y tri-yodotironina ( $T_3$ ); ambas parecen no tener una influencia en la retroalimentación hacia el hipotálamo, cuyo papel es estimular la síntesis y secreción de TSH por los tirotropos, pero si son capaces de suprimir la síntesis de TSH al inhibir la transcripción de su precursor generando así un sitio de retroalimentación negativa del eje hipófisis-tiroides. Puntos similares de retroalimentación negativa se observan también en el caso de la adenocorticotropina, somatotropina y de las gonadotropinas (hormona luteinizante y hormona foliculo estimulante)<sup>6, 7, 12</sup>



**Figura 3.** Tipos celulares de la adenohipófisis y factores de regulación hipotalámica; hormonas reguladoras por tipo celular y función fisiológica de cada tipo. Modificado de Duran, 2008<sup>13</sup>.

La regulación de la hipófisis puede darse a través de asas de retroalimentación negativa conocidas como larga y corta. La regulación “corta” comprende a los mecanismos autocrinos y paracrinos que varían de acuerdo con las necesidades fisiológicas del organismo, es decir que muchas de las células adenohipofisiarias presentan receptores para las hormonas que secretan y/o para factores secretados por otras células adenohipofisiarias. En el asa de retroalimentación larga participan factores, principalmente hormonales, de los órganos blanco que regulan a la glándula hipófisis; por ejemplo la síntesis y secreción de hormonas esteroideas está regulada por LH y FSH, la secreción de estas hormonas en la hipófisis es a su vez afectada por las hormonas sexuales (Figura 4)<sup>13</sup>.





**Figura 4.** Esquema general de la regulación de la hipófisis; se marcan las asas de retroalimentación negativa larga (en rojo) y corta (en naranja) así como las demás relaciones de estimulación e inhibición entre factores hormonales. →: estimulación, ⊥: inhibición, XRH: hormona hipotalámica liberadora, XIH: hormona hipotalámica inhibidora, XSH: hormona adenohipofisiaria estimulante, X: hormona de la glándula diana.

Varios trabajos han reportado que la remoción de un asa de retroalimentación negativa a través de la remoción de glándulas blanco (gónadas adrenales, tiroides) o un aumento en la demanda fisiológica de una de las hormonas (e.g. procesos de lactancia), provoca un incremento en la producción de la hormona liberada por la hipófisis relacionada con ese fenómeno de inhibición, así como un incremento en el número de células que secretan dicha hormona<sup>14-21</sup>.

Cada hormona adenohipofisiaria posee un mecanismo de regulación particular que involucra sistemas de estimulación e inhibición procedentes de distintos sitios en el organismo; asimismo, subpoblaciones de todos los tipos celulares pueden responder a más de un factor regulador hipotalámico (células multiresponsivas) o secretar más de un tipo de hormona adenohipofisiaria (células polihormonales), incrementando la complejidad y plasticidad de la glándula<sup>11</sup>.

## **Hormonas adenohipofisiarias**

Las 6 principales hormonas adenohipofisiarias poseen funciones características y están dirigidas a blancos diferentes, pero poseen similitudes en su regulación; los modelos matemáticos de los perfiles plasmáticos de las hormonas adenohipofisiarias sugieren que esta secreción es pulsátil, probablemente en respuesta a pulsos de hormonas liberadoras secretadas por el hipotálamo<sup>2</sup>.

Estas hormonas pueden ser clasificadas en 3 grupos de acuerdo con su similitud estructural y supuesto origen evolutivo. La prolactina (PRL) y somatotropina (GH) poseen secuencias de aminoácidos similares y están estructuralmente relacionadas con la lactosomatropina de origen placentario, todas ellas pertenecientes a la misma familia de proteínas con un supuesto origen común por duplicación de un gen ancestral. La tirotrópina (TSH), hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) están relacionadas entre sí por ser heterodiméricas y compartir una subunidad alfa común ( $\alpha$ -GSU) con una secuencia primaria idéntica en cada hormona; la subunidad beta es la encargada de otorgar la especificidad biológica de cada hormona, con las subunidades beta de LH y FSH originándose de un gen ancestral común. La adenocorticotropina (ACTH) y  $\alpha$ -melanotropina (MSH) tienen una secuencia de aminoácidos en común, y están codificadas dentro del mismo gen<sup>2,5</sup>.

### *ACTH*

La hormona adenocorticotrópica (ACTH) es una hormona polipéptidica de 39 residuos de aminoácidos derivada del precursor pro-opiomelanocortina (POMC) cuya función es regular el crecimiento de la corteza adrenal y la secreción de hormonas esteroides, principalmente cortisol. Siendo un derivado de POMC, la ACTH posee secuencias de aminoácidos muy similares a las hormonas estimulantes de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -MSH),  $\beta$ -lipotropina, y  $\beta$ -endorfina<sup>2</sup>.

La regulación de ACTH es un proceso complejo, su secreción depende de ritmos circadianos, liberaciones cíclicas y control por retroalimentación, además de responder a una amplia gama de estímulos, como el estrés, la inanición o la pubertad<sup>2</sup>. Sus principales reguladores son la hormona liberadora de corticotropina (CRH), secretada por el hipotálamo, que estimula su secreción y es en parte responsable del ciclo diurno de la hormona, y el cortisol que inhibe su secreción al retroalimentar negativamente las células liberadoras de CRH y los corticotropos<sup>6</sup>.

La CRH es secretada por las células nerviosas del núcleo paraventricular; una vez en la adenohipófisis, se une a receptores acoplados a proteína G en los corticotropos, aumentando el calcio intracelular y con ello la liberación de ACTH<sup>6</sup>.

Otros factores como la arginina, la vasopresina, o citocinas inflamatorias como las interleucinas -1 y -6, y el factor inhibidor de la leucemia (LIF) son capaces de estimular su secreción<sup>11</sup>, de igual forma ACTH es capaz de inhibir su propia secreción en un asa de retroalimentación extra corta sin afectar sus patrones diurnos y pulsátiles<sup>2</sup>.

### *TSH*

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) o tiotropina es una glicoproteína dimérica que se compone de una subunidad  $\alpha$  que es idéntica a la que presentan FSH y LH, y una subunidad  $\beta$  encargada de la acción específica de la hormona. La TSH genera un estímulo fisiológico que desencadena el crecimiento y regula el metabolismo de la tiroides al afectar su capacidad para asimilar yodo, así como regular la síntesis y secreción de tiroxina ( $T_4$ ), tri-yodotironina ( $T_3$ ), y tiroglobulina (Tg)<sup>22</sup>. La secreción de TSH está regulada por dos factores principales, la liberación de hormona liberadora de la tiotropina (TRH), secretada por los núcleos paraventriculares del hipotálamo, que estimula la liberación de la hormona así como la transcripción de sus dos subunidades, y las hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ) que disminuyen su tasa de secreción al suprimir su transcripción<sup>6</sup>. El resultado final de esta regulación es una secreción relativamente estable de TSH pero con cierta pulsátilidad, patrón similar al de su glándula blanco<sup>3</sup>. La secreción de TRH es regulada a su vez por factores autócrinos y parácrinos como las endotelinas, isoleucinas 1 y 6, sustancia P, etc<sup>2, 6</sup>.

### *LH y FSH*

Al igual que la tiotropina, las gonadotropinas (LH y FSH), son glicoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad  $\alpha$  común y una subunidad  $\beta$  única que les confiere su especificidad, estas hormonas son responsables de inducir la secreción de hormonas sexuales

en ambos sexos y con ello regular el desarrollo, crecimiento y maduración sexual del organismo<sup>23</sup>. Ambas son secretadas por un mismo tipo de célula, el gonadotropo, aunque existen pequeñas poblaciones de gonadotropos que sólo secretan una u otra hormona (monohormonales)<sup>2</sup>; en estas células la subunidad  $\alpha$  se sintetiza en exceso en comparación con la subunidad  $\beta$ , por lo que la concentración de una u otra hormona en un gonadotropo depende de la regulación de la síntesis de las subunidades  $\beta$  correspondientes<sup>23</sup>.

Los gonadotropos presentan ciclos de expresión de gonadotropinas en los cuales la relación de síntesis y secreción entre LH y FSH varía. Estas variaciones están asociadas con cambios en los patrones de liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo, su factor regulador principal. Pulsos más frecuentes de GnRH favorecen la transcripción de la subunidad  $\beta$  de LH sobre la de FSH incrementando el ratio de secreción LH-FSH, mientras que pulsos menos frecuentes favorecen la síntesis y secreción de FSH<sup>2, 23</sup>.

De este modo la regulación de LH y FSH es muy compleja comprendiendo estos elementos pulsátiles así como elementos periódicos, diurnos, cíclicos y en etapas particulares de la vida<sup>2</sup>. La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es el principal estimulante de la secreción de ambas hormonas, es sintetizado en las neuronas del núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo las cuales se organizan como un generador de pulsos que libera GnRH cada 30 minutos al sistema porta de roedores. La frecuencia de estos pulsos se ve influenciada por la edad, el género y la fase del ciclo estral<sup>6</sup>. Entre otros factores que son capaces de regular la secreción de gonadotropinas tenemos a la melatonina, la cual puede inhibir la secreción en respuesta a los ciclos de luz-obscuridad, la CRH, la cual puede inhibir la liberación de GnRH en respuesta a un aumento en el estrés, las endorfinas, la oxitocina, la sustancia P y las feromonas pueden regular la secreción de gonadotropinas en situaciones específicas. Los esteroides sexuales, principalmente testosterona en machos y estradiol en hembras, así como la inhibina en el caso particular de la FSH, regulan negativamente la secreción de LH y FSH por retroalimentación inhibiendo la liberación de GnRH en el hipotálamo y de FSH y LH en la hipófisis<sup>2, 6</sup>.

## *GH*

La hormona del crecimiento (GH) o somatotropina, se encarga de estimular el crecimiento y desarrollo somático postnatal y ayuda a mantener una masa muscular y ósea normal en adultos, además de actuar en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas. Su secreción es estimulada por la presencia de hormona liberadora de la hormona de crecimiento

(GHRH) e inhibida por la somatostatina, ambos productos del hipotálamo. La secreción de GH se da en pulsos regulares a lo largo del día, con pulsos de 1 hora en intervalos de 3 a 4 horas en rata<sup>24, 25</sup> y de 10 a 20 pulsos al día en humanos con la descarga más grande durante la primera parte del sueño nocturno<sup>2, 26</sup>. La GHRH es sintetizada por las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo mientras que la somatostatina se sintetiza en el núcleo periventricular<sup>6</sup>; la secreción de GHRH se ve disminuida y la de somatostatina incrementada por la acción de somatomedinas y factores de crecimiento semejantes a la insulina<sup>27</sup>.

La secreción de GH disminuye con la edad, esta disminución es en parte responsable de la pérdida de la reparación y mantenimiento de tejidos asociados con el envejecimiento<sup>28</sup>.

Otros factores son capaces de regular la secreción de GH, la presencia continua de testosterona parece necesaria para mantener niveles basales de GH en ratas macho, los estrógenos elevan los niveles basales de GH en plasma y suprimen los pulsos en ciertas condiciones<sup>23</sup>, TRH en ganado, GnRH en peces, etc<sup>12</sup>.

### *PRL*

La prolactina (PRL) es una hormona protéica cuya función principal es el desarrollo de las glándulas mamarias y la producción de leche, a fin de asegurar la sobrevivencia de las crías en mamíferos; también puede influenciar la función reproductiva y la respuesta inmune. Estudios recientes han proporcionado evidencia sobre el papel de la prolactina en la regulación del peso del cuerpo, desarrollo de islotes pancreáticos, control de la síntesis de insulina, diferenciación de adipocitos y metabolismo lipídico<sup>29</sup> así como en la osmoregulación, efectos en el crecimiento y desarrollo, acciones en estructuras ectodérmicas e integumentarias, o relacionadas con la reproducción en vertebrados<sup>2</sup>.

Durante el embarazo y la lactancia se da un incremento en la proporción de lactotropos en respuesta a los niveles de estrógenos; durante este periodo, la secreción de prolactina se ve incrementada de forma constante, con patrones circadianos que se elevan en la noche. Al igual que otras hormonas hipofisarias, la PRL inhibe su propia secreción por un asa de retroalimentación extra corta, pero a diferencia de los demás tipos celulares, su secreción se encuentra inhibida tónicamente por la liberación de dopamina de las partes posterior, ventromedial y lateral, y de los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo<sup>2</sup>.

Se ha observado que el TRH es capaz de regular la secreción de prolactina en varias especies de vertebrados, como en el caso de peces, anfibios y aves<sup>30</sup>. Los estrógenos también

promueven la liberación y síntesis de PRL; una exposición prolongada a estrógenos incrementa el número de lactotrofos<sup>6</sup>.

### ***Embriología de la Hipófisis***

La hipófisis presenta un origen embrionario mixto, el lóbulo posterior se deriva del neuroectodermo y el anterior e intermedio del ectodermo oral<sup>31, 32</sup>. Estudios recientes han establecido que el desarrollo de la hipófisis se lleva a cabo a través de una serie de pasos secuenciales, que responden a un gradiente de señales extrínsecas e intrínsecas; la presencia de estos gradientes de señalización en etapas tempranas tiene como resultado la creación de patrones distintivos de desarrollo espacial y temporal. Ambos primordios mantienen una estrecha relación fisiológica y funcionan como inductores del desarrollo uno del otro<sup>33, 34</sup>.

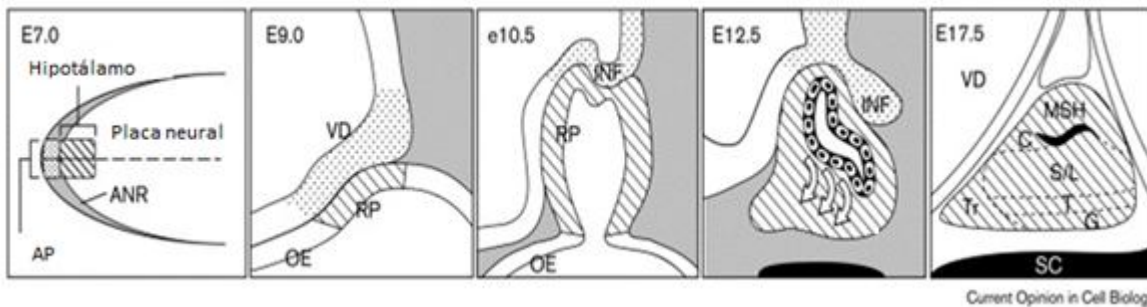
Si bien los detalles morfológicos y la organización de la glándula varían entre grupos distintos de vertebrados, los principios básicos de la morfogénesis y maquinaria molecular involucrados en el desarrollo y función de los linajes celulares diferenciados son muy similares<sup>33</sup>.

Los análisis de mapas de destino realizados en anfibios, aves y mamíferos localizan el origen del lóbulo anterior de la hipófisis en el surco neural anterior, la estructura ectodérmica medial inmediatamente anterior a la placa neural; la parte medial adyacente en la placa neural está destinada a convertirse en el hipotálamo y la neurohipófisis<sup>33</sup>.

En el caso de aves y mamíferos, las áreas involucradas en la formación de la glándula son desplazadas y terminan como parte del ectodermo estomodeal en el techo de la cavidad oral; de esta zona se genera la bolsa de Rathke, una invaginación que es el primordio del lóbulo anterior de la hipófisis. Casi inmediatamente el diencéfalo ventral de mamíferos genera un crecimiento llamado infundíbulo del cual se formará el lóbulo posterior<sup>33</sup>. Los factores producidos por estas dos estructuras son los que generan el gradiente espacial y temporal que guía el desarrollo de la glándula; estos pueden dividirse en señales intrínsecas (como factor morfogenético de hueso, BMP, y proteínas *Wnt*) y extrínsecas (como las proteínas Sonic Hedgehog, Shh, el factor de crecimiento de fibroblastos, FGF, BMP, y proteínas *Wnt*). La presencia, ausencia y concentración de estos factores regulan la proliferación, determinación y supervivencia celular<sup>34</sup>.

A lo largo de la glándula en formación comienzan a aparecer zonas de proliferación que darán lugar a sitios de determinación celular para los diferentes linajes celulares secretores; estos linajes alcanzan la diferenciación terminal secuencialmente, siendo los corticotrofos los

primeros en diferenciarse, seguidos por los tirotrópos, somatotropos y finalmente lactotropos y gonadotropos. Esta diferenciación secuencial responde a un gradiente de señales distintas a las empleadas para la formación de la glándula y que corresponden a linajes celulares particulares; corticotropos y melanotropos dependen de la expresión de citocinas como LIF y T-pit, gradientes de Pit-1/GATA-2 determinan el destino de tirotrópos, gonadotropos, y lactotropos/somatotropos, la diferenciación de estos dos últimos requiere además de una combinación de factores que activen o inhiban al gen de GH para comprometer un linaje a somatotropo o lactotropo (Figura 5)<sup>34</sup>.



**Figura 5.** Esquema del desarrollo embrionario de la hipófisis. Primordio hipofisiario de la cresta neural anterior (ANR). Formación de la bolsa de Rathke (RP) de una invaginación del ectodermo oral (OE) que entra en contacto con la porción del diencefalo ventral (VD) que dará lugar al infundíbulo (INF); la bolsa de Rathke se va cerrando conforme se separa del ectodermo oral. Al día 17.5 están presentes todos los tipos celulares endócrinos, melanotropos (MSH), corticotropos (C), somatotropos y lactotropos (S/L), tirotrópos (T) y gonadotropos (G), en un arreglo espacial determinado. También se muestran tirotrópos rostrales (Tr) y el cartílago esfenoidal (SC). Modificado de Pasen y Rosenfeld, 1999<sup>32</sup>.

Se ha encontrado evidencia que apoya la idea de un origen neuroectodérmico para al menos una subpoblación de células en la adenohipófisis. Esta evidencia se ha obtenido usando distintos modelos y técnicas; Takor y Pearse observando cortes de embriones de pollo en diferentes estados de desarrollo determinaron que ambos lóbulos de la hipófisis tienen su origen de la parte ventral de la placa neural. Eagleson y colaboradores concluyeron por medio de microcirugía y técnicas inmunocitoquímicas que, al menos en *X. laevis*, los corticotropos se originan de la placa neural; asimismo El Amraoui y Dubois extendieron los estudios en embriones de pollo realizados por Takor y Pearse y encontraron que la parte anterior de la placa neural tiene una predeterminación a formar parte de la adenohipófisis<sup>35, 36, 37, 38</sup>.

Tomando en cuenta este origen embrionario, se ha observado que algunas de las células de la adenohipófisis presentan marcadores neuronales, como neurofilamentos de 68kDa (NF68), de 200kDa (NF200) y MAP-2; la función de los cuales aún no se ha definido.

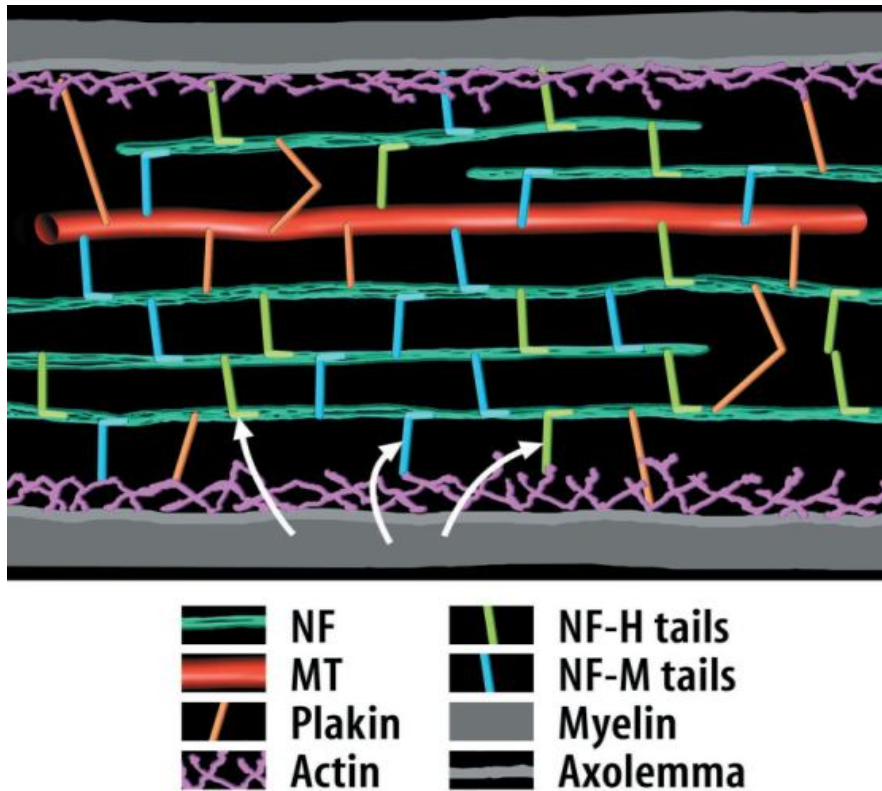
### **Neurofilamentos**

El origen embrionario de las células puede verse reflejado en la presencia de marcadores celulares específicos como los filamentos intermedios<sup>9, 39</sup>. Los filamentos intermedios son un grupo de elementos del citoesqueleto con un diámetro aproximado de 10nm, intermedio entre los filamentos de actina y los microtúbulos, estos filamentos se encuentran en la mayoría de los vertebrados, nemátodos y moluscos e intervienen en varios procesos celulares como el contacto célula-célula, movimiento y posición de organelos y del núcleo, eventos mitóticos y posiblemente en el transporte y exocitosis de gránulos de secreción<sup>40, 41</sup>. En vertebrados se pueden distinguir 4 clases de filamentos intermedios de acuerdo con los polipéptidos que los componen: a) nucleares, compuestos por lamininas que forman el entramado de la lamina nuclear, b) semejantes a vimentinas, formados por vimentinas, desminas o proteínas gliales fibrilares que se encuentran en células del mesénquima (endotelios, fibroblastos, etc.), células musculares, y células gliales respectivamente, c) epiteliales, constituidos por queratinas, un grupo muy variado de polipéptidos presentes en células epiteliales, y d) neurofilamentos, formados por la co-polimerización de polipéptidos diferentes que se expresan principalmente en las neuronas.

Los neurofilamentos (NFs) comprenden una familia de tres tipos de proteínas nombradas según su peso molecular, NF-L (60-70kDa), NF-M (130-170kDa) y NF-H (180-200kDa), que (en conjunto) representan al principal grupo de filamentos intermedios en las neuronas adultas, siendo los constituyentes principales del citoesqueleto axonal<sup>42</sup>.

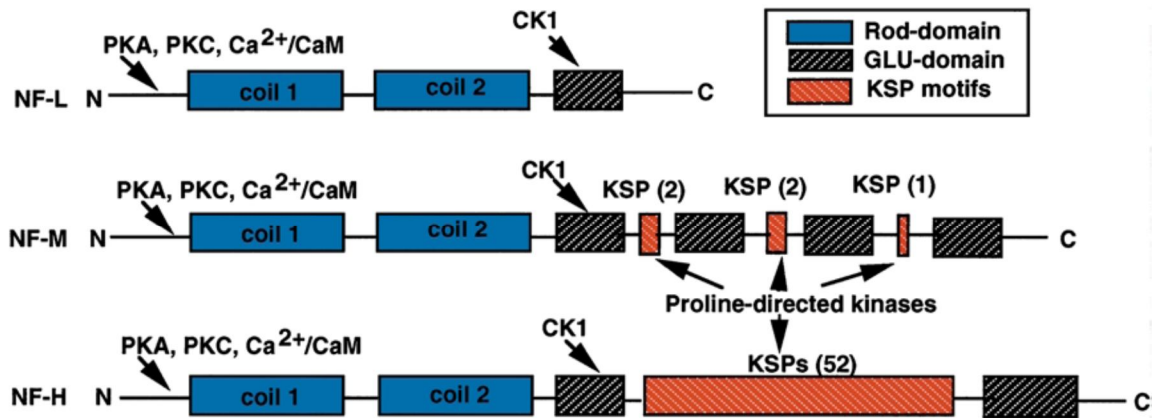
Cada subunidad de neurofilamento comprende un dominio central  $\alpha$ -helicoidal de 310 a 352 aminoácidos que se encuentra flanqueado por un dominio globular en el N-terminal y dominios no  $\alpha$ -helicoidales de fosforilación en el C-terminal, un rasgo en común con otros miembros de la familia de los filamentos intermedios. Son estos dominios C-terminal los más variables, siendo los de NF-M y NF-H los más largos, formando brazos laterales responsables de generar puentes entre neurofilamentos y entre neurofilamentos y otros componentes del citoesqueleto (como microtúbulos, kinesina y dineína) (Figura 6). Se piensa que el dominio globular del N-terminal, en particular el de NF-L, es el encargado del ensamblaje de las distintas subunidades del neurofilamento<sup>42, 43, 44</sup>.





**Figura 6.** Esquema de la relación de los neurofilamentos con otros componentes del citoesqueleto neuronal; en verde se representan los neurofilamentos (NF) con los brazos laterales de NF-H y NF-M, filamentos en morado representan a los filamentos de actina y en rojo se representan los microtúbulos. Proteínas accesorias de unión entre elementos del citoesqueleto como la plaquina se muestran en naranja<sup>45</sup>.

Los neurofilamentos son fosfoproteínas que se fosforilan en motivos repetitivos de lys-ser-pro (KSP) en los dominios de brazo lateral de NF-M y NF-H, y en serinas y treoninas a lo largo del dominio globular en NF-L; estas fosforilaciones regulan la función de cada subunidad<sup>43</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** Secuencia de los dominios en las distintas proteínas de la familia de los neurofilamentos. Las cajas azules representan los dominios helicoidales centrales, las naranjas los motivos de fosforilación KSP (lys-ser-pro); las flechas marcan sitios de unión a ciertas proteínas, como cinasas (PKA, PKC, etc.) o quelantes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ )<sup>43</sup>.

Los filamentos se forman por heteropolímeros de unidades NF-L y otra de las proteínas de neurofilamento NF-M o NF-H, con una estequiometría de 4:2:1; estas dos últimas subunidades son responsables de generar arreglos alineados con espacios interfilamentarios uniformes. Recientemente se ha propuesto la presencia de un cuarto tipo de subunidad llamada  $\alpha$ -internexina (con una relación estequiométrica de 4:2:2:1, NF-L:  $\alpha$ -internexina: NF-M: NF-H) que podría jugar un papel en la formación del neurofilamento maduro del sistema nervioso central<sup>44</sup>.

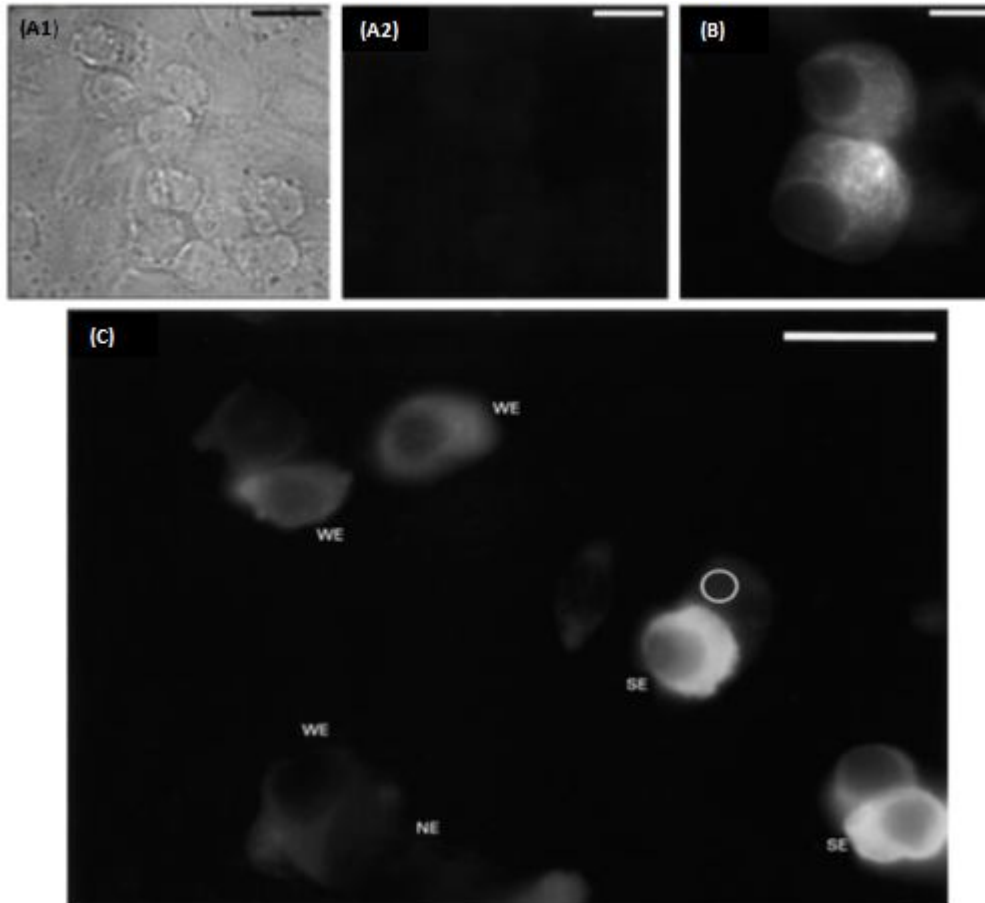
Los NFs determinan el calibre axonal influenciando la velocidad del transporte vesicular y la conducción del potencial de acción. Asimismo se ha considerado a los NFs como posibles elementos del transporte por “motor lento” en neuronas, gracias a su capacidad de asociarse con motores moleculares como kinesina y dineína. Esta asociación depende de las subunidades de alto y mediano peso molecular (NF-H y NF-M)<sup>44</sup>.

Se ha propuesto que los elementos del citoesqueleto están involucrados en el control de secreción al intervenir en los procesos de movimiento vesicular<sup>40, 41, 46</sup>; ejemplos de esto se han encontrado para la secreción de prolactina en adenohipófisis de rata en donde se ha visto que el citoesqueleto de actina puede intervenir en la segregación y movimiento de vesículas corticales<sup>46</sup>. Quintanar y su grupo en 2001 propusieron que es posible que los neurofilamentos regulen la secreción de gránulos al ligarlos y luego promover su extrusión por medio de cambios conformacionales<sup>40</sup>. Sin embargo nada de esto se ha demostrado en la glándula hipofisiaria.

Se han empleado a los filamentos intermedios como marcadores celulares a fin de determinar el origen embrionario neural de algunos tipos de células, incluidas las células adenohipofisarias. Bajo este enfoque se han obtenido conclusiones contradictorias con respecto al posible origen neuroectodérmico de la adenohipófisis; tanto Ogawa<sup>39</sup> como Tooze<sup>47</sup> encontraron evidencia a favor de esta idea usando neurofilamentos como marcadores neuronales, mientras que Trojanowski<sup>48</sup>, Halliday<sup>49</sup> y Bäck<sup>10</sup> fueron incapaces de detectar a los neurofilamentos en las células de la adenohipófisis. Las discrepancias en estos resultados podrían ser consecuencia de diferencias en las condiciones experimentales, sensibilidad de los ensayos realizados o factores no controlados como el modelo de estudio (pollo, rata, humano, etc), la edad y sexo de los animales, etc.

Recientemente Fiordeliso y Hernández Cruz<sup>50, 51, 52</sup> por medio de estudios inmunocitoquímicos, concluyeron que una subpoblación dentro de las poblaciones de lactotropos, somatotropos, tirotropos y gonadotropos de la adenohipófisis de rata y ratón adultos expresan neurofilamentos de 68kDa, y que la expresión de estos es sexualmente dimórfica (mayor en hembras adultas que en machos de cualquier edad), y que varía con respecto al ciclo estral y en respuesta a estrógenos (Figura 8).

Si bien se tiene evidencia de la presencia de neurofilamentos en células secretoras adenohipofisarias, no se conoce la función de estos. Pensando en la función de estos en células neuronales, creemos que los neurofilamentos podrían estar involucrados en la regulación de la respuesta de una parte de las células endócrinas de la adenohipófisis ante cambios en la demanda fisiológica de alguna de sus hormonas. De esta forma los neurofilamentos aportarían un nivel extra en la plasticidad de la glándula al modular cambios en la proporción celular de las poblaciones secretoras adenohipofisarias y/o la síntesis y secreción de sus productos hormonales.



**Figura 8.** Imagen de microscopía de fluorescencia del neurofilamento de 68kDa (NF68). Inmunofluorescencia de NF68 de las células de ovario de hámster chino (CHO), empleadas como control negativo. (A1) Micrografía de fase de contraste. (A2) Imagen de epifluorescencia del mismo campo mostrando la ausencia de inmunoreactividad de las células CHO. (B) Imagen de epifluorescencia del cultivo de neuronas simpáticas de rata, usadas como control positivo. (C) Cultivo primario de células de hipófisis, se obtuvieron de una rata hembra de 60 días. Se muestran ejemplos de células sin expresión (NE), baja expresión (WE) y alta expresión (SE)<sup>50</sup>.

El diseño del modelo experimental empleado se basó en la idea de que la remoción de un determinado órgano blanco de la hipófisis (glándula adrenal, ovarios, testículos), genera la eliminación de un asa de retroalimentación negativa y esto produce una condición particular de aumento en la demanda fisiológica de síntesis y secreción de la hormona hipofisaria que es principalmente regulada por esta retroalimentación (corticotropina, gonadotropinas). Así mismo, algunas condiciones fisiológicas generan esta misma demanda al aumentar la retroalimentación positiva y disminuir la negativa, tal es el caso de la lactación que produce un incremento en la secreción de prolactina. Cuando estos procesos suceden, puede observarse un aumento en el número de células positivas a una hormona dada, en comparación con los controles. Estas

diferencias en el número de cada tipo celular endocrino, pueden observarse también en menor grado en las diferentes fases de los ciclos reproductivos como el ciclo estral, y entre hembras y machos.

Este incremento en el número de células positivas a cada hormona puede darse por procesos diferentes como la actividad mitótica de células progenitoras o por fenómenos de transdiferenciación de un tipo celular a otro<sup>14-21</sup>.

Partiendo de estas ideas y de la importancia y complejidad de la regulación de la actividad hipofisiaria, la intención de este trabajo es estudiar como los neurofilamentos pueden estar relacionados en los cambios de plasticidad que se dan en la glándula hipófisis cuando el organismo tiene un cambio en su requerimiento fisiológico. Esto al eliminar un asa de retroalimentación negativa por medio de operaciones que remuevan las glándulas diana (orquidectomías, adrenalectomías bilaterales) de las distintas hormonas hipofisiarias (FSH/LH, ACTH), o con el uso de animales en lactación en donde se tiene una demanda incrementada por prolactina y por ende una disminución en la regulación negativa; todo con el fin de producir un estado de requerimiento hormonal característico. Se planteo utilizar al neurofilamento de 68kDa como base del estudio debido a que es la subunidad encargada del ensamblaje del filamento, estando presente en mayor proporción que los filamentos de mediano y alto peso molecular (NF-M y NF-H respectivamente).

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar si existe un cambio en la expresión de marcadores neuronales (NF 68kDa) en subpoblaciones de células adenohipofisiarias en respuesta a cambios en las condiciones fisiológicas del animal

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar el efecto de la lactancia sobre la expresión de neurofilamentos de 68kDa en ratas hembra de dos meses de edad
- Estudiar el efecto de la gonadectomía sobre la expresión de neurofilamentos de 68kDa en ratas macho de dos meses de edad
- Estudiar el efecto de la adrenalectomía sobre la expresión de neurofilamentos de 68kDa en ratas macho y hembra de dos meses de edad

## HIPÓTESIS

La expresión del neurofilamento de 68kDa se verá afectada en respuesta a la remoción de un asa de retroalimentación negativa, incrementándose dicha expresión en aquellas poblaciones celulares cuya secreción se está promoviendo. Este incremento en expresión del neurofilamento de 68kDa jugará un papel en la plasticidad de la glándula hipófisis modulando cambios en la proporción celular de las poblaciones endócrinas adenohipofisarias y/o la síntesis y secreción de sus productos hormonales.

## METODOS

A fin de cumplir con los objetivos de este trabajo se determinaron 4 condiciones experimentales: a) lactantes (ratas hembra con crías en período de lactancia), b) castrados (ratas macho castradas 21 días antes del experimento), c) adrenalectomías (hembras y machos adrenalectomizados 15 días antes del experimento), y d) 2 grupos control con ratas macho y hembra con 60 días de edad. Se realizaron cultivos primarios y ensayos de inmunofluorescencia de células adenohipofisarias para cada grupo, realizándose su posterior análisis e interpretación.

### *Cultivo primario de células adenohipofisarias de rata*

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar de 2 meses de edad y 200g de peso, siguiendo un protocolo institucionalmente aceptado para el manejo de animales de laboratorio. Las ratas se mantuvieron en condiciones de bioterio en un ciclo de 12/12 horas luz-oscuridad con acceso a agua y alimentos *ad libitum*. Cada cultivo se realizó con las glándulas hipófisis de 3 ratas. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (20mg/kg, intraperitoneal), ya sedados los animales se decapitaron para realizar los cultivos, las glándulas hipofisarias de ratas macho y hembra provenientes de las distintas condiciones experimentales se extrajeron en condiciones asépticas y se transfirieron a DMEM frío (Dulbecco' Modified Eagle Media, GIBCO BRL; Rockville MD), adicionado con 0.75 mg/mL de albúmina sérica bovina (DMEM-BSA; BSA fracción V, GIBCO BRL). Las células obtenidas de machos y hembras se procesaron por separado. Se procuró que todas las ratas hembras estuvieran en la misma fase del ciclo estral (estro).

Durante la extracción de la glándula se separó el lóbulo anterior de los lóbulos posterior e intermedio a fin de evitar contaminación por parte de estos lóbulos. El lóbulo anterior se disecó bajo un microscopio estereoscópico con un par de pinzas oftálmicas y se transfirieron los fragmentos a un tubo Falcon de 15 ml con aproximadamente 2 mL de medio DMEM-BSA. Una vez sedimentados los pedazos de adenohipófisis (sin *pars intermedia*) se retiró el medio con una pipeta Pasteur estéril, y se digirieron por incubación en una solución de 2 mg/mL de tripsina (Worthington Biochem Co.; Lakewood NJ) en 5mL de medio DMEM enzima (DMEM adicionado con 10,000 u/mL de penicilina-estreptomicina GIBCO BRL) filtrado con un filtro estéril de 0.22  $\mu\text{m}$  durante 20 minutos, y luego por otra de 0.71 mg/mL de colagenasa tipo I (Worthington Biochem Co.) en 7mL de medio DMEM enzima filtrado con un filtro estéril de 0.22  $\mu\text{m}$  durante 3 minutos en una incubadora con agitación. Después de cada incubación se disgregó el tejido delicadamente con una pipeta Pasteur siliconizada y pulida al fuego. Se centrifugó a las células durante 10 minutos a 1200 rpm; posteriormente se hicieron 2 lavados con DMEM-BSA para remover las enzimas del medio, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón obtenido en medio DMEM-BSA. Después de otra disociación mecánica utilizando una pipeta Pasteur siliconizada y pulida al fuego, se centrifugó otros 10 minutos a 1200 rpm.

El sobrenadante se desechó y se resuspendió el botón en medio DMEM cultivo (medio DMEM complementado con 10% suero de caballo GIBCO BRL, 2% suero fetal bovino GIBCO BRL, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina Sigma y 10,000 U/mL de penicilina-estreptomicina GIBCO BRL). Las células se sembraron a una densidad de  $10^4$  a  $10^5$  células por pozo, en cubreobjetos de vidrio redondo (Thomas Scientific; Swedesboro NJ) estériles y previamente tratados con poli-L-lisina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma), colocados en una caja de cultivo de 12 pozos (Costar; Cambridge MA). Después de 30 minutos para permitir la adhesión de las células al sustrato, se agregó 1 mL de medio DMEM cultivo y las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera humedecida y con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### *Determinación de la fase del ciclo estral*

La síntesis y secreción de diversas hormonas (como las hipofisiarias y las sexuales) varía entre diferentes etapas del ciclo estral de la rata; a fin de disminuir las variables entre individuos en los experimentos con ratas hembra, se procuró que todas se encontrarán en fase estro dentro del ciclo estral. El ciclo estral en rata se divide en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro, con cambios en las células del epitelio vaginal característicos de cada fase; basándose en estos

cambios, la determinación de la fase del ciclo puede hacerse fácilmente realizando un frotis vaginal.

Previo a la decapitación de las ratas, se realizó el ensayo de frotis vaginal y solo se trabajó con aquellas ratas que estuvieran en estro.

### *Lactación*

A fin de analizar el efecto de un incremento en la necesidad de prolactina en el organismo, se eligieron hembras primíparas que estuvieran en el séptimo día de lactancia. Previo al día del experimento se permitió a la madre permanecer con todas sus crías para conservar el estímulo de succión; al séptimo día se separó a la madre de sus crías y se sometió a la madre al procedimiento descrito para la preparación de cultivos de células adenohipofisarias.

### *Adrenalectomía*

A fin de eliminar el efecto inhibitor del cortisol, se realizaron adrenalectomías tanto en machos como en hembras, en condiciones antisépticas y utilizando anestesia general con pentobarbital (20mg/kg intraperitoneal). Se colocaron a las ratas ventralmente y se realizó una pequeña incisión (1-2cm) inmediatamente después de la caja torácica, a través de esta incisión se separó el tejido conectivo y se hicieron dos incisiones más para acceder a la cavidad peritoneal y extirpar la glándula adrenal de cada lado, asegurando no dejar ningún fragmento de la glándula en la cavidad. Las ratas adrenalectomizadas se mantuvieron en recuperación en el bioterio bajo las mismas condiciones de las ratas control, con la única variante de que se les administró por vía oral una solución salina 0.9% *ad libitum* a fin de prevenir la pérdida de sodio ocasionada por la remoción de las glándulas. Quince días después de las operaciones, las ratas fueron sometidas al procedimiento descrito para la preparación de cultivos de células adenohipofisarias.

### *Gonadectomía*

A fin de establecer la condición fisiológica particular en machos, eliminando el asa de retroalimentación negativa, se realizaron gonadectomías en condiciones antisépticas y con anestesia general con pentobarbital (20 mg/kg intraperitoneal). Los controles de esta operación, ratas "sham", se realizaron exponiendo las gónadas sin extirpación. Una vez realizada la operación, las ratas se mantuvieron en recuperación en jaulas calentadas (aproximadamente a 30°C) para evitar hipotermia; los animales recuperados se trataron por cinco días con 0.01



mg/kg de una solución 10% de Fluorfenicol (Nuflor, Shering Plough; Kenilworth, NJ), y se examinaron para detectar posibles infecciones. Las ratas gonadectomizadas se mantuvieron en el bioterio bajo las mismas condiciones de las ratas control. 21 días después de la operación, las ratas se sometieron al procedimiento ya descrito anteriormente para preparar los cultivos.

### *Inmunofluorescencia*

Para poder determinar la proporción de células adenohipofisarias de cada tipo celular que expresan neurofilamentos de 68kDa, se realizaron dobles inmunotinciones utilizando anticuerpos contra las hormonas secretadas por cada tipo celular y contra el filamento de 68 kDa. Los fluoróforos seleccionados para este estudio fueron isotiocianato de fluoresceína (FITC) y cianina 5 (Cy5) los cuales poseen espectros de excitación y emisión lo suficientemente separados para minimizar la fluorescencia por cruce de espectros.

Los cubreobjetos conteniendo los cultivos de células adenohipofisarias se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos salino 0.01M (PBS), a fin de remover cualquier residuo del medio de cultivo y células no adheridas, las células adheridas a los cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% diluido en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se lavaron 3 veces más los cubreobjetos con PBS y se incubaron con una solución de bloqueo y permeabilidad (2% BSA (w/v) y 0.1% (v/v) Triton X 100 en PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron y se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal anti-NF68 (IgG monoclonal anti-NF68; clon NR4, DAKO; Carpintería CA) diluido 1:100 en solución de bloqueo y permeabilidad (200  $\mu$ L/cubreobjeto) durante la noche a 4°C; después de 3 lavados con PBS se incubaron los cubreobjetos durante dos horas a temperatura ambiente con el fragmento F(ab') de anti IgG de ratón conjugado con cianina 5 (Cy5; Zymed) diluido 1:100 en solución de bloqueo y permeabilidad (80  $\mu$ L/cubreobjetos), para la detección de los neurofilamentos de 68 kDa. Posteriormente se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS y se incubaron con un segundo anticuerpo primario anti-hormona: anti-PRL, anti-GH, anti-ACTH, anti- $\beta$ FSH, anti-  $\beta$ LH y anti-  $\beta$ TSH (Biogenesis Lan; Poole UK) todos de conejo y diluidos 1:100 en solución de bloqueo y permeabilidad (80  $\mu$ L/cubreobjetos) durante cuatro a cinco horas a temperatura ambiente, luego de 3 lavados más se incubaron los cubreobjetos con el fragmento F(ab') de anti IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Cedarlane Lab; Ontario, Canada) diluido 1:100 con solución de bloqueo y permeabilidad (80  $\mu$ L/cubreobjetos) por dos horas a temperatura ambiente; se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS y se montaron en portaobjetos de vidrio con medio de montar para fluorescencia DAKO que contiene 15mM de NaN<sub>3</sub>.

Para obtener dobles inmunomarcajes confiables se realizaron varios controles. El control negativo de anticuerpos primarios se realizó de dos modos:

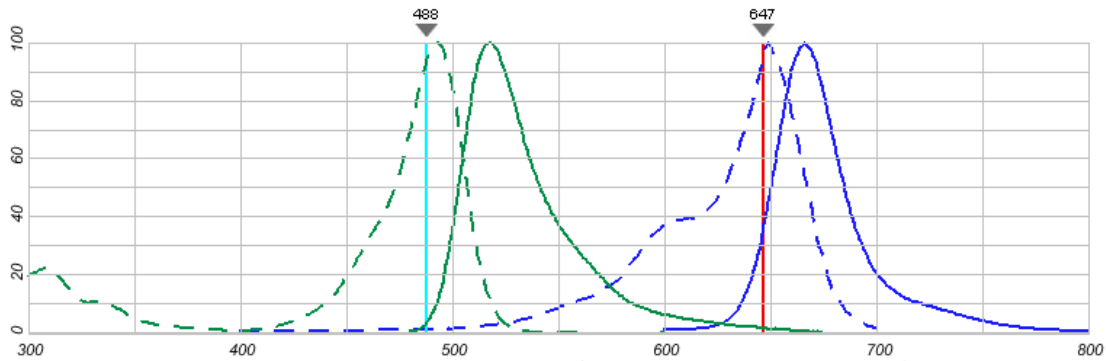
- a) incubando por dos horas un anticuerpo primario anti-hormona en presencia de un exceso de su hormona específica (100 µg/mL), y luego haciendo reaccionar el anticuerpo pre-incubado y el anticuerpo secundario correspondiente con los cultivos preparados.
- b) en el segundo modo se adicione el anticuerpo primario al cultivo. En ninguno de estos casos se detectó fluorescencia.

El control negativo para los anticuerpos secundarios se realizó de distintas formas:

- a) adicionando únicamente cada uno de los anticuerpos secundarios a las muestras
- b) incubando los cultivos con el anticuerpo primario a una hormona dada y luego haciendo reaccionar con el anticuerpo secundario anti-NF 68
- c) incubando las muestras con el anticuerpo primario a una hormona dada, al anticuerpo secundario correspondiente a la hormona (fragmento F(ab') de conejo) y el anticuerpo secundario específico para los neurofilamentos de 68 kDa. En ningún caso se detectó fluorescencia.

#### *Digitalización-Adquisición*

Se adquirieron imágenes de todas las muestras de un mismo experimento con un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI 6000B (Leica microsystems) equipado con una lámpara de arco de mercurio de alta presión de 100W (Leica microsystems). Las imágenes se capturaron con una cámara CCD monocromática Leica DFC 350Fx de escaneo por interlineado progresivo, y empleando objetivos de inmersión en aceite (20X: infinito/-/C, HC PL APO, 0.7NA IMM CORR CS, OIL GLYC 0.17-W-O; 60X: infinito/0.17/E, HCX PL APO, 1.4-0.6 NA OIL CS). Los parámetros de excitación y emisión se emplearon del siguiente modo: excitación 488, emisión 522 para las imágenes del marcaje con FITC, y excitación 647, emisión 680 para las imágenes del marcaje con Cy5 (Figura 9). Los espectros se obtuvieron utilizando los filtros L5 (excitación: BP 480/+ 40, emisión: BP 527/ +30) y Y5 (excitación: BP 620/+ 60, emisión BP 700/+ 75) incluidos en la rueda de filtros del microscopio.



**Figura 9.** Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos empleados; 488nm de excitación y 522nm de emisión para FITC (en verde) y 647nm de excitación y 680nm de emisión para Cy5 (en azul).

El “binning” (agrupamiento) y el campo de fluorescencia se mantuvieron constantes para todos los experimentos (2X2 y campo total respectivamente), mientras que la intensidad, ganancia y exposición se establecieron por muestra basándose en la intensidad de las células más brillantes para cada marcaje (hormona y neurofilamento). Se tomaron de forma consecutiva y posteriormente se sobrepusieron con la ayuda del programa Leica AF 6000 (Leica microsystems), las imágenes con espectros de excitación diferentes junto con una imagen en contraste de fases. El análisis y procesamiento se realizó con el programa Image J utilizando una aplicación para contar las células.

En cada experimento se adquirieron imágenes para inmunomarcado de cada hormona, adquiriendo imágenes de la región central del cubreobjetos (región en donde se encontraba la mayor concentración de células). El análisis se realizó contando todas las células en el campo visual (en contraste de fases), y posteriormente contando las células positivas a neurofilamentos y a cada hormona, así como las células dobles positivas (a hormona y NF68) en cada muestra (en epifluorescencia). Los resultados reportados se expresan como el porcentaje de células positivas a cada hormona (el total de células positivas a una hormona junto con el total de células identificadas como dobles positivas) en relación con el total de células contadas, y como el porcentaje de células dobles positivas (hormona y NF68) en relación con el total de células identificadas como positivas para una hormona dada. Las primeras se definen como  $\%H = ((A+B) \cdot 100) / C$  y las segundas como  $\%DP = (A \cdot 100) / (A+B)$ , donde %H corresponde al porcentaje de células positivas a una hormona, %DP al porcentaje de células dobles positivas, A es el total de células contadas como dobles positivas (positivas a la

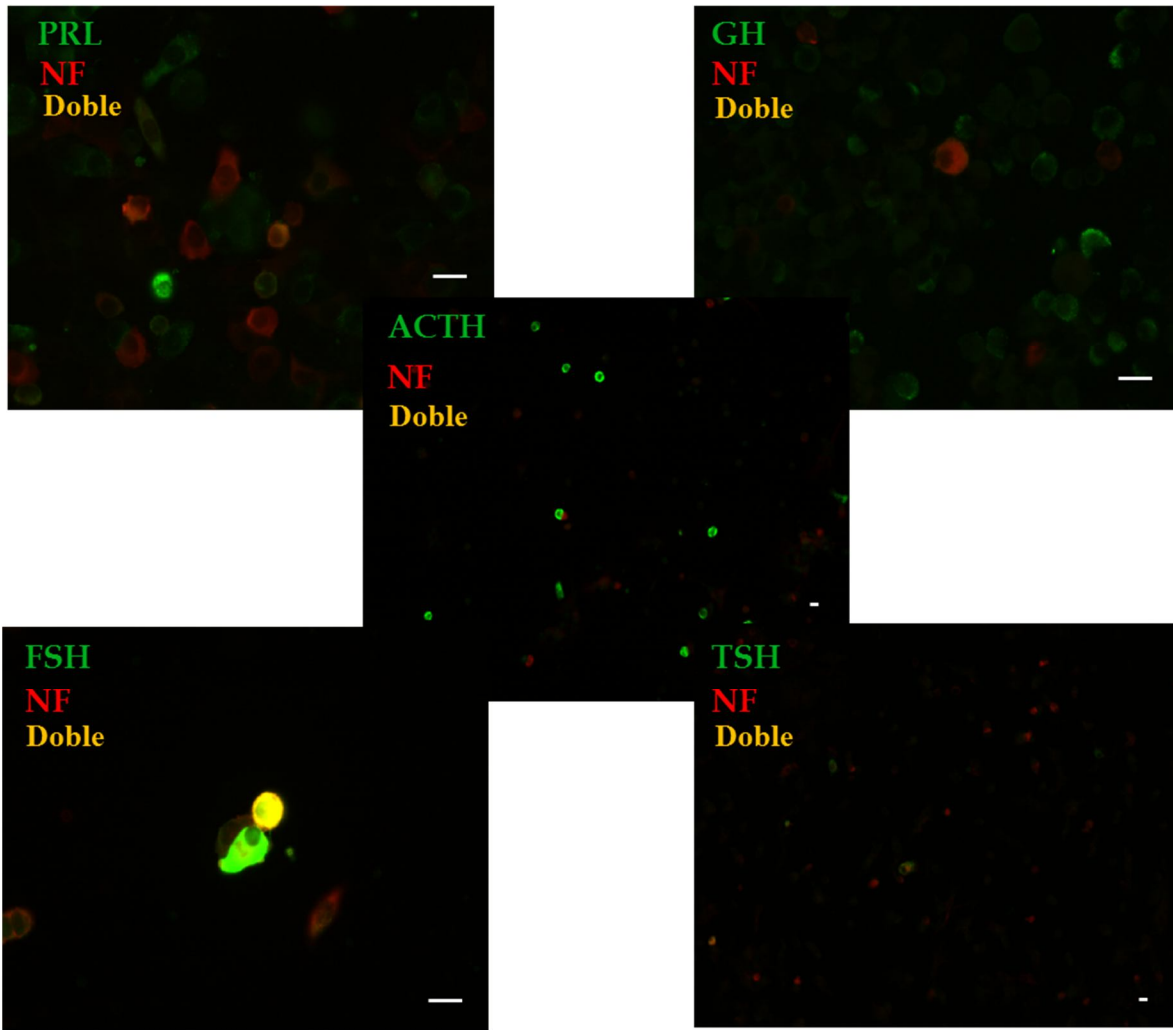
hormona y a NF68) en la muestra, B es el total de células contadas como positivas a la hormona en la muestra, y C es el número total de células contadas (positivas a hormona, a neurofilamento, dobles positivas, y células no marcadas).

Usando este esquema, un incremento en el número de células positivas a la hormona representa un incremento en la proporción del tipo celular que secreta esa hormona y un incremento en el número de células dobles positivas representa un aumento en la proporción de células dentro de una población celular que expresaron NF68.

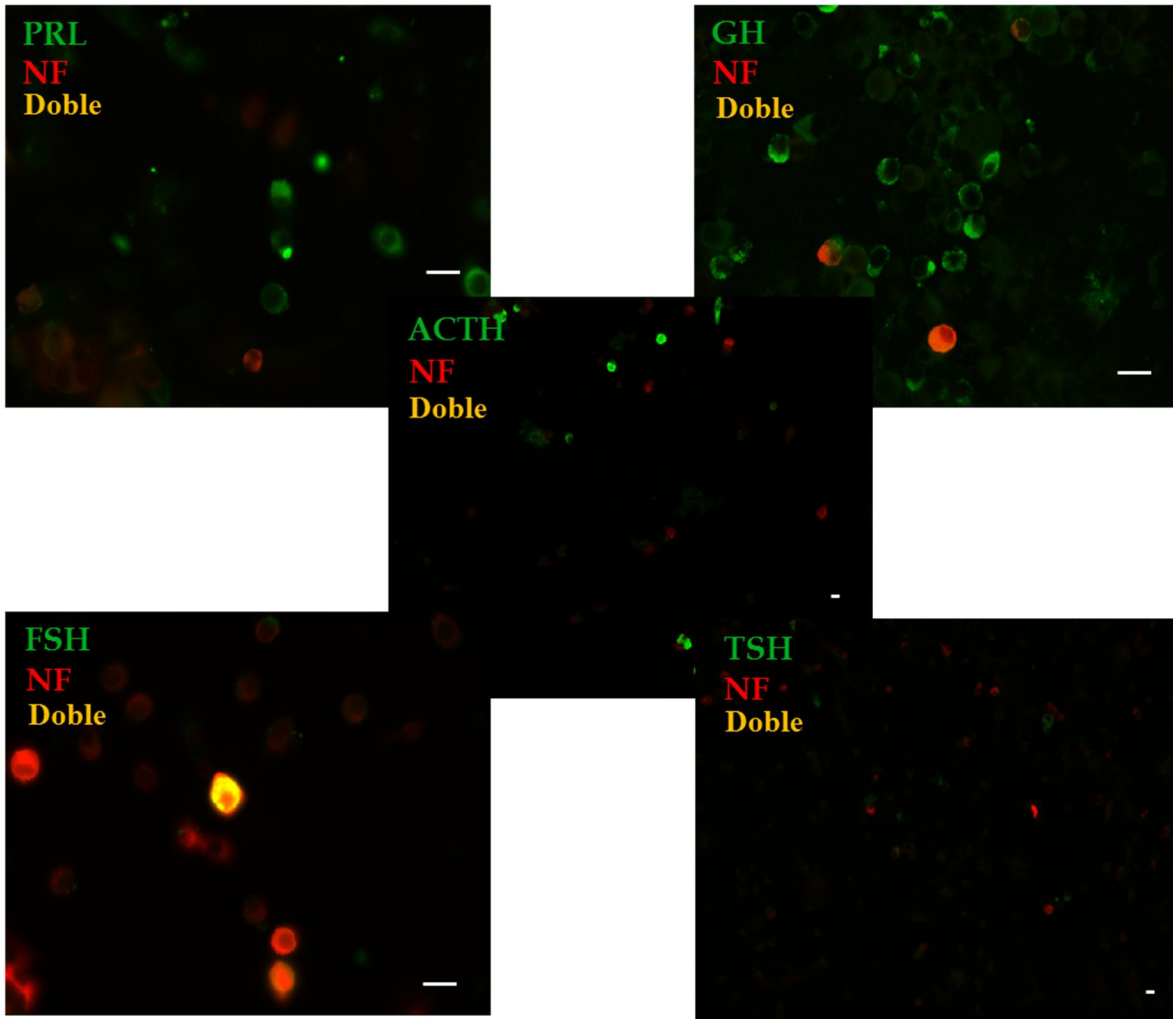
## **RESULTADOS**

Los conteos celulares obtenidos para las inmunofluorescencias (hormona y NF68) permitieron validar el modelo experimental empleado por medio de la cuantificación del porcentaje de células positivas a cada tipo hormonal y mostraron las condiciones en las cuales se observó un aumento en el porcentaje de dobles positivas (y por ende un aumento en la expresión general del neurofilamento) para cada tipo celular.

Como se muestra en las imágenes representativas de las figuras 10 y 11, en los controles, se pudieron observar células positivas al neurofilamento de 68kDa en todos los cultivos celulares y poblaciones de celulares secretoras, con excepción de los corticotropos. Como se describirá en adelante, la proporción de células que expresaron el neurofilamento varió entre los distintos tipos de células endócrinas y según la condición experimental.

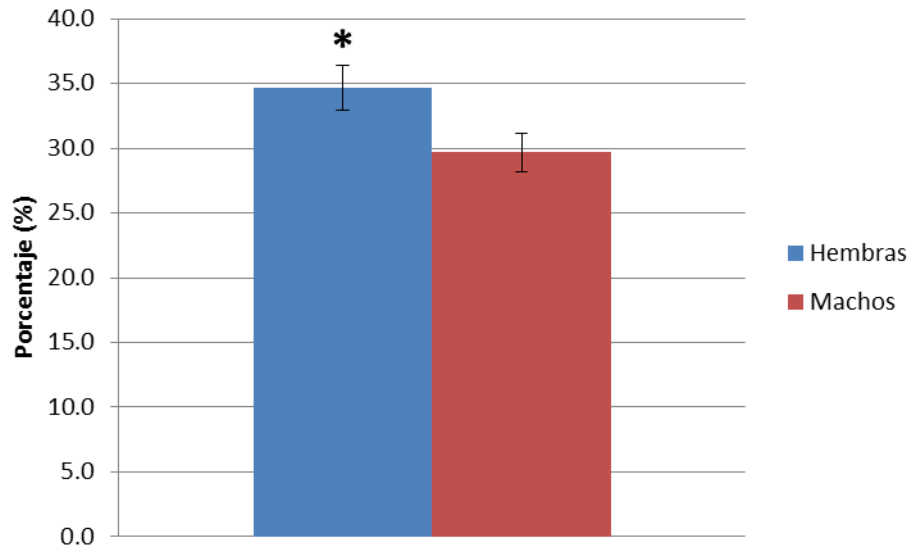


**Figura 10.** Imágenes representativas de fluorescencia de células adenohipofisarias, en cultivos primarios control, obtenidas de ratas hembra de dos meses de edad. La escala representa 20 micras. En verde las células positivas a un tipo hormonal, en rojo las positivas a neurofilamentos 68kDa y en amarillo las doble positivas.



**Figura 11.** Imágenes representativas de fluorescencia de células adenohipofisarias, en cultivos primarios control, obtenidas de ratas macho de dos meses de edad. La escala representa 20 micras. En verde las células positivas al tipo hormonal indicado en cada panel, en rojo las positivas a neurofilamentos 68kDa y en amarillo las doble positivas.

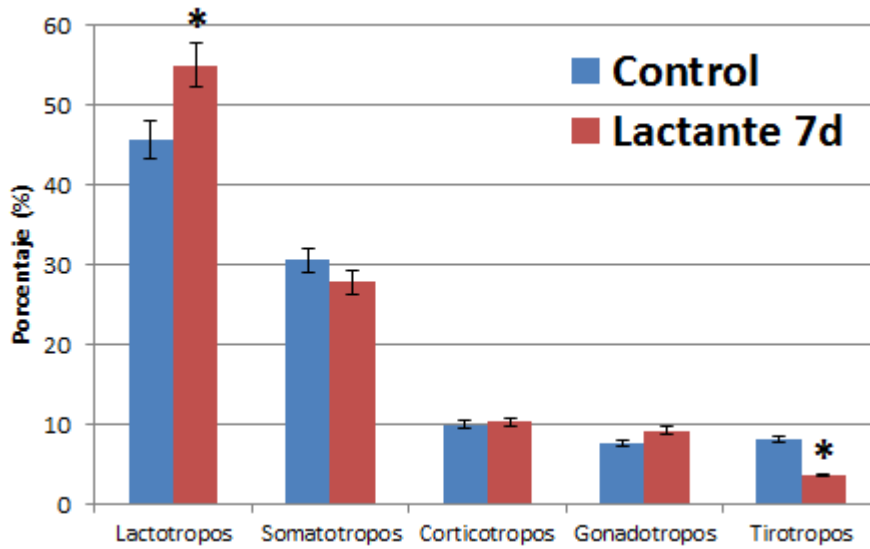
En condiciones control, se observó que las células adenohipofisarias de rata hembra, presentan un 4.9% más de expresión de neurofilamentos que las células de rata macho, siendo para las hembras de 34.6% y 29.7% para macho (Gráfica 1) Esto concuerda con lo reportado y es evidencia de la expresión sexualmente dimórfica de los neurofilamentos.



**Gráfica 1.** Proporción promedio de células adenohipofisarias positivas a neurofilamento en ratas hembra y macho adultas en condiciones control.

### ***Expresión de neurofilamentos en ratas con 7 días de lactación***

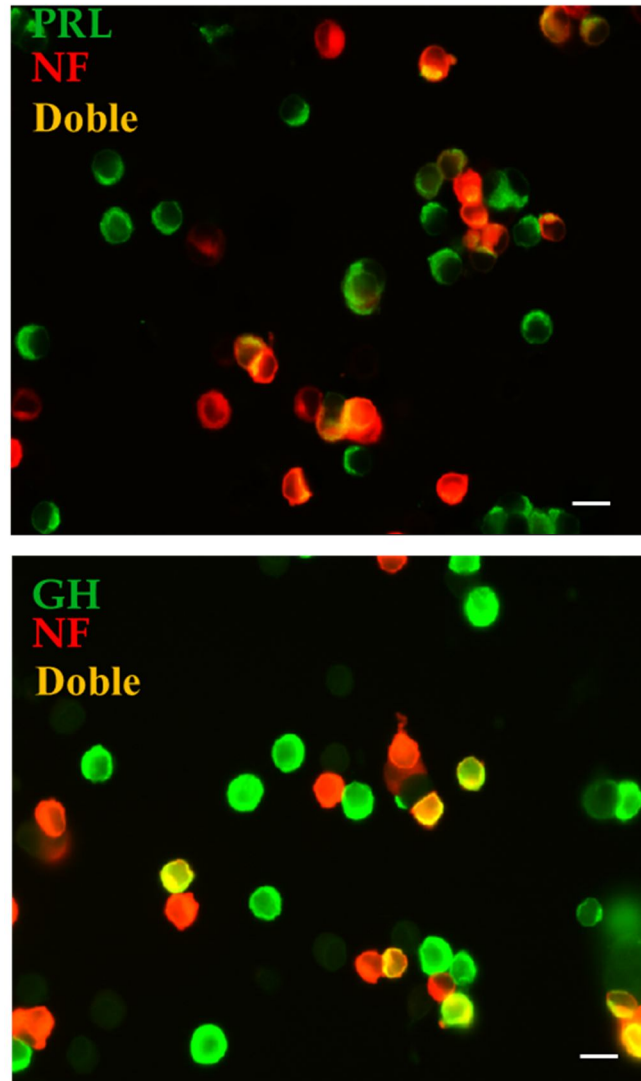
Se ha reportado que durante la lactancia la población de lactotrofos en la hipófisis de la madre incrementa en respuesta a la demanda de prolactina del organismo<sup>15</sup>. En la Gráfica 2, se muestra el resultado que en este trabajo se obtuvo, para el porcentaje de células de cada tipo hormonal, los conteos celulares revelan un incremento significativo (9.3%) en el número de lactotrofos y una disminución significativa de 4.4% en el número de tirotrofos. En ninguno de los otros grupos hubo cambios significativos (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Gráfica del porcentaje de células positivas a cada hormona adenohipofisiaria en ratas hembra de dos meses de edad lactantes comparado con el de ratas hembra control de la misma edad. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ .)  $n=3$ , \*: significancia.

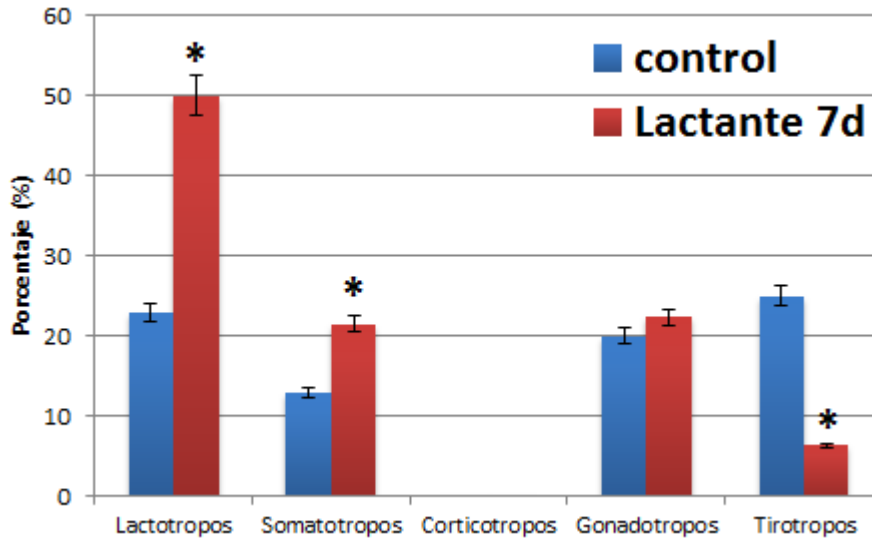
En el caso de hembras lactantes, pudo observarse un claro aumento en el número de células lactotropos y somatotropos positivos al neurofilamento (Gráfica 3). En las imágenes (Figura 12), de fluorescencia pueden observarse lactotropos y somatotropos en los cuales se observó un incremento en el número de células que presentan neurofilamento.





**Figura 12.** Imágenes representativas de fluorescencia de células adenohipofisarias en cultivos primarios de ratas hembra lactantes. Se observa un incremento en la proporción de neurofilamentos y de dobles positivas para PRL y GH. La escala representa 20 micras. En verde las células positivas al tipo hormonal indicado en cada panel, en rojo las positivas a neurofilamentos 68kDa y en amarillo las doble positivas.

En la Gráfica 3, se puede observar el aumento significativo ( $P < 0.05\%$ ) que se produce en el número de lactotropos y somatotropos positivos al neurofilamento. Éste representa el 27% para los lactotropos y 8.5%, somatotropos. Se observa además, una disminución del 18.7% en el número de tiotropos dobles positivos. En la misma gráfica, se puede observar la ausencia de expresión de neurofilamentos en los adenocorticotropos.

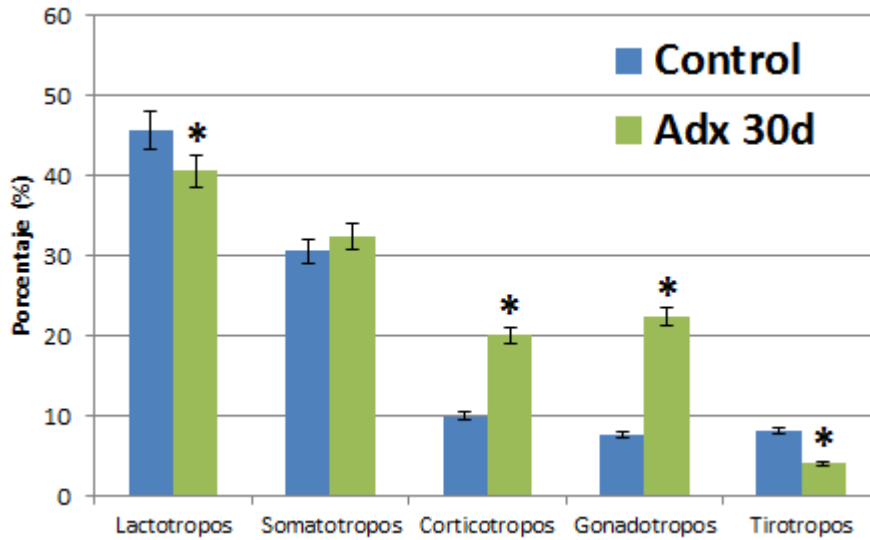


**Gráfica 3.** Gráfica del porcentaje de células positivas a NF68 y a cada hormona adenohipofisiaria (dobles positivas) en ratas hembra de dos meses de edad lactantes comparado con el de ratas hembra control de la misma edad. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ ).  $n=3$ , \*: significancia.

### ***Expresión de neurofilamentos en ratas con 15 días Adrenalectomía***

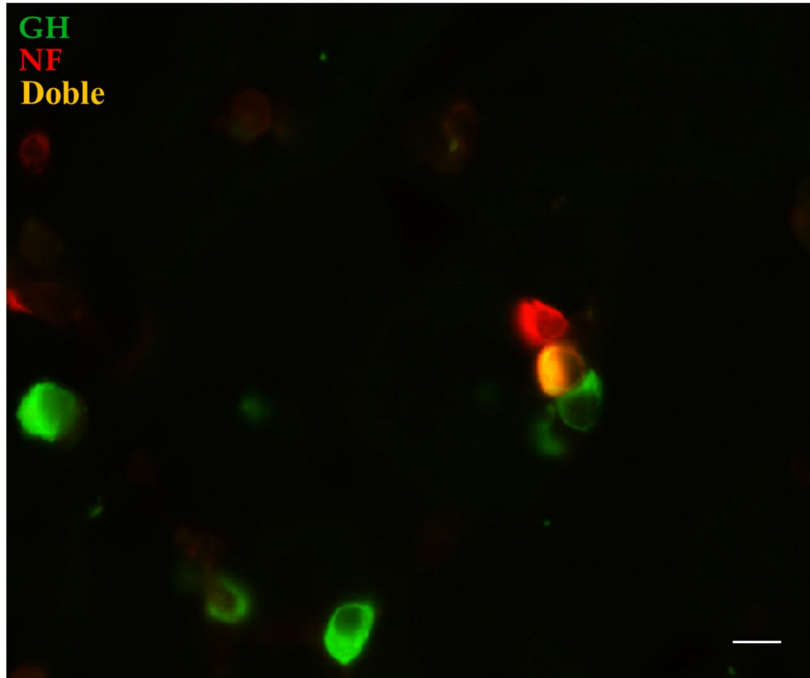
La remoción bilateral de las glándulas adrenales conlleva a una mayor secreción de ACTH por los adenocorticotropos; reportes realizados empleando esta cirugía, han aportado evidencia del aumento en el número de corticotropos adenohipofisarios como consecuencia de la extirpación <sup>14, 17, 19</sup>.

En la Gráfica 4, se muestra el porcentaje de células de cada tipo hormonal en cultivos primarios de ratas hembra adrenalectomizadas, se observan aumentos significativos ( $P < 0.05\%$ ) de 10.1% en adenocorticotropos y 14.8% en gonadotropos, y decrementos significativos ( $P < 0.05\%$ ) de 5.1% en lactotropos y 4% en tirotropos.

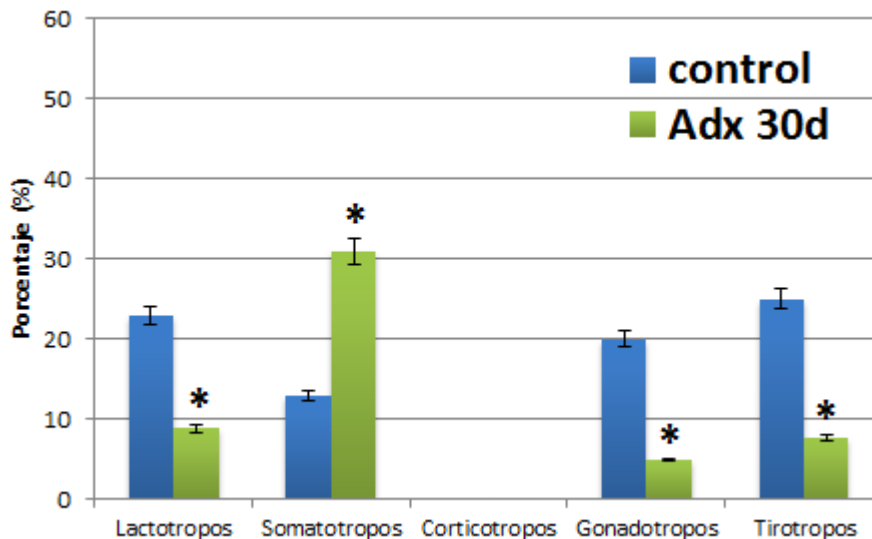


**Gráfica 4.** Gráfica del porcentaje de células positivas a cada hormona adenohipofisaria en ratas hembra de dos meses de edad adrenalectomizadas. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ )  $n=3$ , \*: significancia.

Anteriormente Fiordeliso et al. reportaron la ausencia de expresión de neurofilamentos en los corticotropos<sup>50, 51</sup>; estos resultados confirman dichos reportes y además demuestran que a pesar del aumento en la demanda fisiológica de este tipo celular, los adenocorticotropos siguen sin expresar NF68. Sin embargo, en los cultivos primarios de ratas hembra adrenalectomizadas se observó un aumento significativo ( $P < 0.05\%$ ) en la expresión del neurofilamento en somatotropos; en la Figura 13 se presenta una imagen representativa de fluorescencia de somatotropos positivos al neurofilamento cuyo incremento en células dobles positivas fue del 17.9% (más del doble, Gráfica 5). Como puede verse en la Gráfica 5 se registro además una disminución de la expresión de NF68 en todas las demás poblaciones endócrinas: 14.2% en lactotropos, 15.1% en gonadotropos y 17.3% en tirotropos.

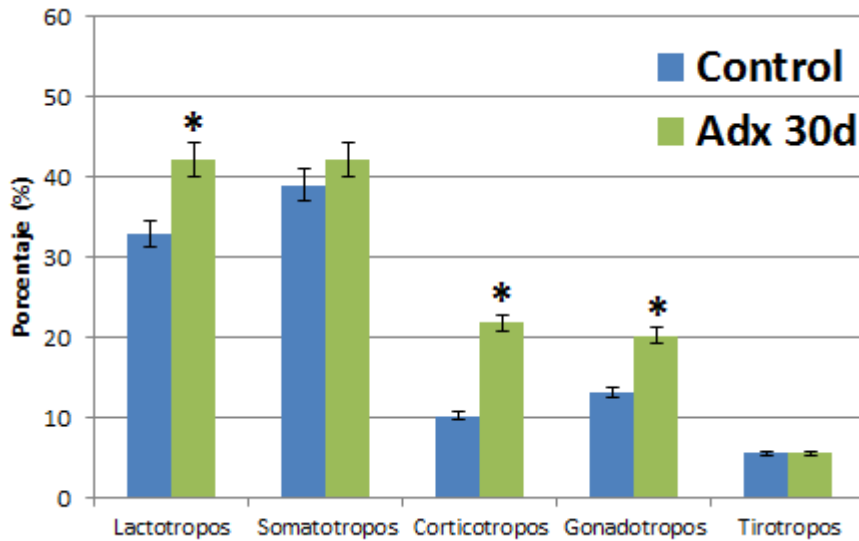


**Figura 13.** Imagen representativa de cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembra de dos meses de edad adrenalectomizadas. Se observa un incremento en la proporción de neurofilamentos y de dobles positivas para GH. La escala representa 20 micras. En verde las células positivas a somatotropina, en rojo las positivas a neurofilamentos 68kDa y en amarillo las doble positivas.



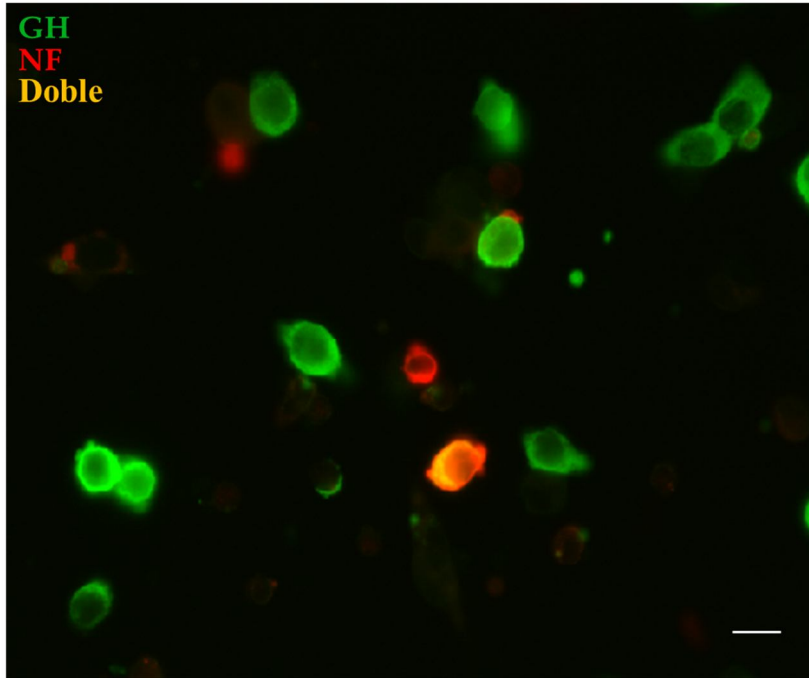
**Gráfica 5.** Gráfica del porcentaje de células positivas al neurofilamento y a cada hormona adenohipofisaria (dobles positivas) en ratas hembra de dos meses de edad adrenalectomizadas. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ ).  $n=3$ , \*: significancia.

En el caso de el porcentaje de células de cada tipo hormonal en cultivos primarios de ratas macho bilateralmente adrenalectomizadas se observó un incremento significativo en el número de corticotropos, lactotropos y gonadotropos, de 11.6%, 9.1% y 7% respectivamente (Gráfica 6).



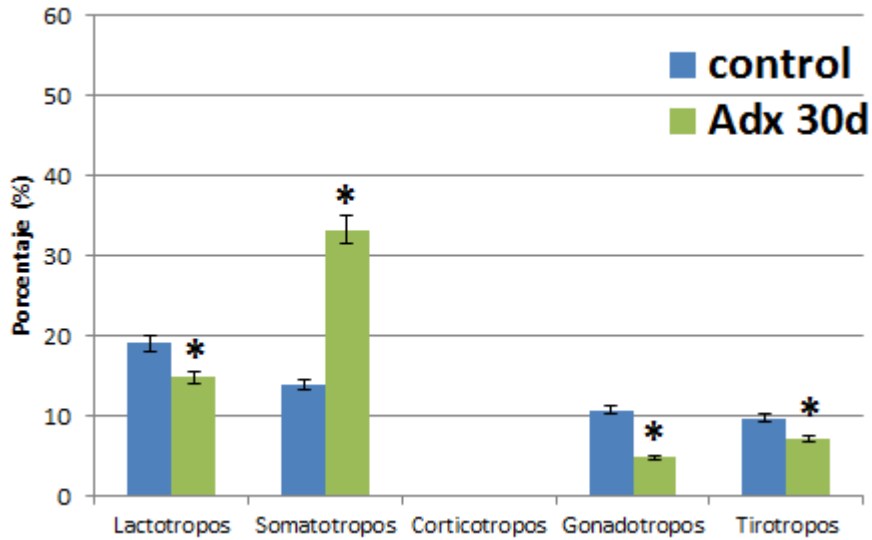
**Gráfica 6.** Gráfica del porcentaje de células positivas a cada hormona adenohipofisiaria en ratas macho de dos meses de edad adrenalectomizadas Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ .)  $n=3$ , \*: significancia.

Al igual que en las ratas hembra adrenalectomizadas, en la Figura 14 se puede observar una imagen representativa que muestra el tipo celular donde se obtuvo un incremento en la expresión de neurofilamentos en respuesta a la adrenalectomía.



**Figura 14.** Imagen representativa de fluorescencia de cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas macho de dos meses de edad adrenalectomizados. La escala representa 20 micras. En verde las células positivas a somatotropina, en rojo las positivas a neurofilamentos 68kDa y en amarillo las doble positivas.

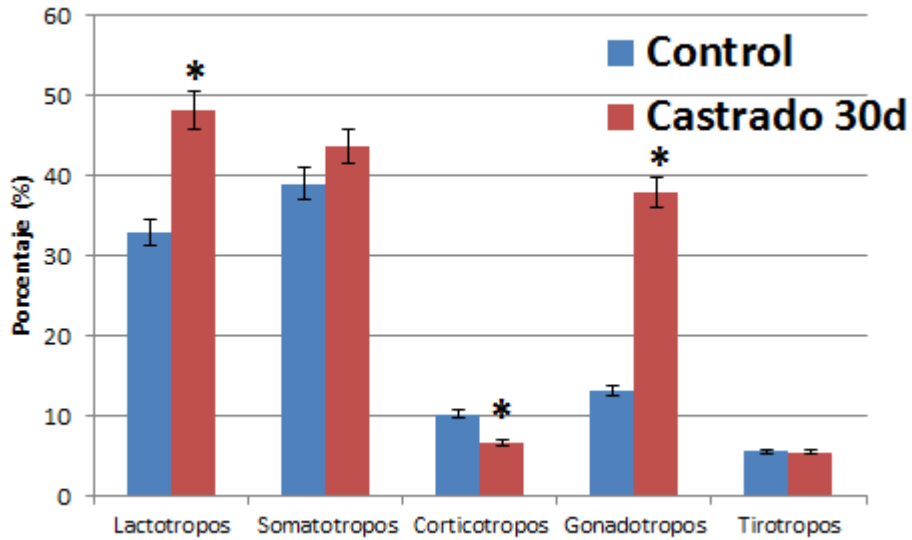
En las ratas macho adrenalectomizadas, pudo observarse un aumento significativo de células doblepositivas para los somatotropos (19.4%), en los demás tipos endócrinos hipofisarios su expresión disminuyó, mostrando así, una baja en el porcentaje de células dobles positivas de 4.2% para los lactotropos, 5.9% en gonadotropos y 2.6% en tirotropos (Gráfica 7).



**Gráfica 7.** Gráfica del porcentaje de células positivas al neurofilamento y a cada hormona adenohipofisiaria en ratas macho de dos meses de edad adrenalectomizadas. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ ).  $n=3$ , \*: significancia.

### ***Expresión de neurofilamentos en ratas con 21 días Castración***

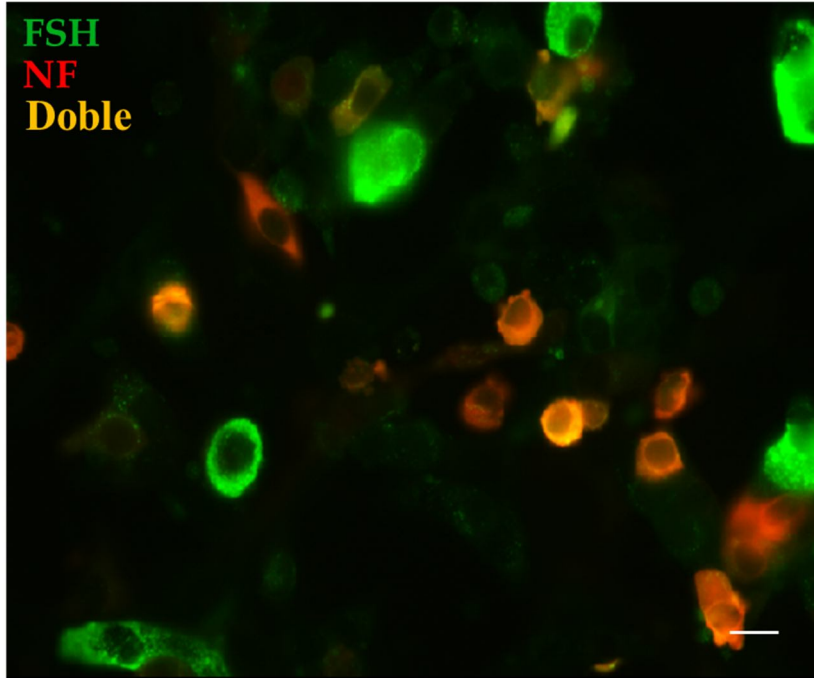
La orquidectomía bilateral sigue el mismo principio que las otras cirugías realizadas, se ha reportado que después de la castración la población de gonadotropos en la adenohipófisis incrementa su número y secreción<sup>14</sup>. Así, en este trabajo se reportan aumentos significativos tanto en el porcentaje de gonadotropos como de lactotropos (26.8% y 15.1% respectivamente; Gráfica 8), y una disminución de 3.3% en el número de corticotropos.



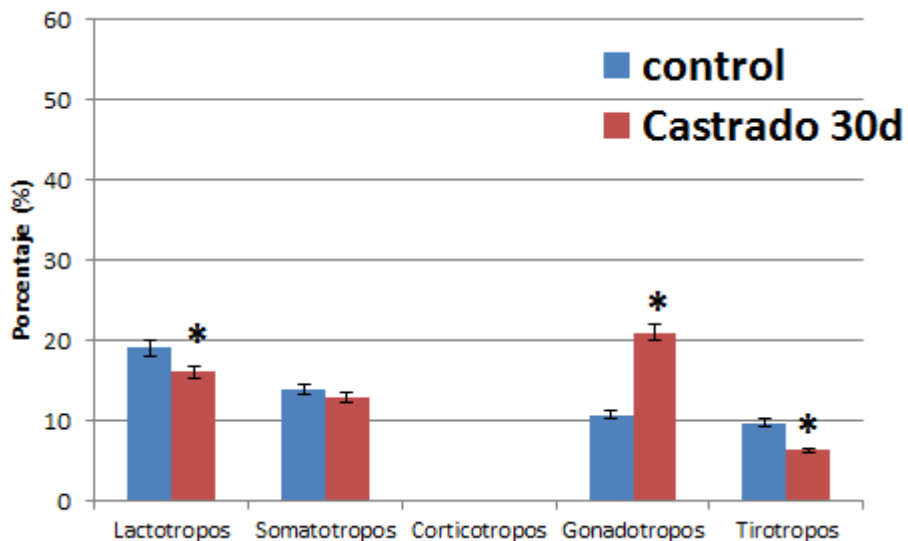
**Gráfica 8.** Gráfica del porcentaje de células positivas a cada hormona adenohipofisiaria en ratas macho de dos meses de edad castradas. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ .)  $n=3$ , \*: significancia.

En la Figura 15 se muestra una imagen representativa donde se puede observar que los gonadotropos incrementan su expresión del neurofilamento como resultado de la castración. Solamente los gonadotropos presentaron un aumento en el porcentaje de células doble positivas, de 10.3%. Las poblaciones de lactotropos y tirotropos tuvieron disminuciones leves pero significativas, de 3% y 3.4% respectivamente, en sus porcentajes de células dobles positivas. Estos resultados se presentan en la gráfica 9.





**Figura 15.** Imagen representativa de cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas macho de dos meses de edad castrados. Se observa un incremento en la proporción de neurofilamentos y de gonadotropos dobles positivos. La escala representa 20 micras. En verde las células positivas a un tipo hormonal, en rojo las positivas a neurofilamentos 68kDa y en amarillo las doble positivas.



**Gráfica 9.** Gráfica del porcentaje de células positivas al neurofilamento y a cada hormona adenohipofisaria en ratas macho de dos meses de edad castradas. Prueba xi cuadrada ( $P < 0.05\%$ .)  $n=3$ , \*: significancia.

Con el fin de facilitar las comparaciones entre los resultados obtenidos para machos y hembras, así como entre las diferentes condiciones experimentales (cirugías) los conteos celulares se resumen en la Tabla 2.

	HEMBRAS			MACHOS		
	Porcentaje de células positivas a cada hormona					
	Control	Lactantes 7d	Adx 30d	Control	Castrados 30d	Adx 30d
PRL	45.7	<b>55</b>	<b>40.6</b>	33	<b>48.1</b>	<b>42.1</b>
GH	30.6	27.8	32.4	39	43.7	42.1
ACTH	10	10.3	<b>20.1</b>	10.2	<b>6.7</b>	<b>21.8</b>
FSH/LH	7.6	9.2	<b>22.4</b>	13.2	<b>38</b>	<b>20.2</b>
TSH	8.1	<b>3.7</b>	<b>4.1</b>	5.6	5.5	5.6
	Porcentaje de células dobles positivas					
	Control	Lactantes 7d	Adx 30d	Control	Castrados 30d	Adx 30d
PRL	23	<b>50</b>	<b>8.8</b>	19.1	<b>16.1</b>	<b>14.9</b>
GH	13	<b>21.5</b>	<b>30.9</b>	13.9	<b>12.8</b>	33.3
ACTH	0	0	0	0	0	0
FSH/LH	20	22.3	<b>4.9</b>	10.7	<b>21</b>	<b>4.8</b>
TSH	25	<b>6.3</b>	<b>7.7</b>	9.7	<b>6.3</b>	<b>7.1</b>

**Tabla 2.** Resumen de los datos obtenidos a partir de los conteos celulares para células positivas a cada hormona adenohipofisiaria y a células dobles positivas por condición experimental en machos y hembras. Los resultados se muestran en porcentaje de células. Aquellos porcentajes que mostraron cambios significativos se muestran en rojo.

## DISCUSIÓN

Los resultados de los inmunomarcajes demuestran que la presencia de neurofilamentos es una condición afín a todos los tipos secretores adenohipofisarios con la excepción de los corticotropos, y que además, esta expresión es versátil y dependiente de una regulación hormonal compleja.

Como se observó en este trabajo y en reportes anteriores<sup>50, 51</sup>, los adenocorticotropos no expresan NF68 en ninguna condición experimental. Éstas células provenientes del linaje de la proopiomelanocortina tienen una expresión deficiente del receptor alfa a estrógenos (ER $\alpha$ ) y casi ninguna acción directa del estrógeno en su función fisiológica<sup>51</sup>. El hecho de que exista un incremento en el número de células inmunoreactivas a ACTH pero no en el número de corticotropos positivos al neurofilamento en ratas adrenalectomizadas, apoya la idea de que los corticotropos son incapaces de expresar estas proteínas. Es factible por ello que la acción del receptor alfa y beta de estrógenos esté involucrada en la regulación de la función de los neurofilamentos en las subpoblaciones endócrinas que los presenten.

Más aun, en neuronas se ha descrito que los neurofilamentos son capaces de unir subunidades de canales de calcio dependientes de voltaje y otros canales iónicos, y se ha propuesto que podrían regular su función. Fiordeliso y colaboradores en el 2007 reportaron una correlación positiva entre la expresión de la subunidad  $\alpha 1A$  de los canales de calcio dependientes de voltaje y la expresión de NF68, ambos podrían estar regulados por estrógenos y presentan dimorfismo sexual y variaciones de expresión durante el ciclo estral. En el mismo estudio se sugirió que los canales de calcio de tipo P/Q, que presentan la subunidad  $\alpha 1A$ , participan en la generación de potenciales de acción en lactotrofos, somatotrofos, gonadotrofos y tirotrofos, necesarios para la secreción. Así, las células doble positivas (subunidad  $\alpha 1A$  y NF68) tendrían una mayor capacidad de respuesta de calcio intracelular y con ello posiblemente una mayor secreción hormonal.

Este trabajo, confirma el incremento en el número de células de un tipo celular determinado después de la remoción de órganos blanco como se ha reportado con anterioridad<sup>45-52</sup>. Sin embargo, la tasa de división de las células secretoras de la adenohipófisis no es lo suficientemente alta para explicar el aumento observado. Por lo que se deben considerar varios factores como posibles responsables de dicho incremento; dentro de ellos, los más estudiados son los procesos de transdiferenciación de un tipo celular a otro y la “maduración” de las células endócrinas a partir de una población de células no-hormonales<sup>14-21</sup>. En este caso, podemos inferir que la disminución de una población endócrina da elementos para creer que se esta llevando a cabo un proceso de transdiferenciación (datos no publicados), tal es el caso de la disminución de tirotrofos y el aumento de lactotrofos en las ratas lactantes. Sin embargo, dentro de las poblaciones solo positivas a la hormona, se observan pocos casos de disminución poblacional y en especial en machos, en los cuales este posible efecto de la transdiferenciación en los cambios de porcentaje de células positivas a la hormona casi no puede notarse; las variaciones en este caso suponemos son, prácticamente en su totalidad, producto de la actividad mitótica o “maduración” de células progenitoras no hormonales. En conjunto, estos resultados sugieren que existe una diferencia esencial en la forma de responder de las poblaciones endócrinas adenohipofisiarias a las distintas demandas fisiológicas en hembras y machos, afectando la plasticidad de la glándula en ambos sexos.

Resulta interesante analizar que estas subpoblaciones de células secretoras involucradas en eventos de remodelación ya sea por transdiferenciación o progenitoras no hormonales, posean neurofilamentos; particularmente considerando que los filamentos intermedios se han reportado como elementos capaces de unirse al llamado nucleoesqueleto y así regular la expresión de algunos genes<sup>53</sup>. Cuando se comparan los cambios en los porcentajes de células dobles positivas (hormona y NF68) en una las diferentes condiciones, se puede ver que es en esta subpoblación de células donde se observan mayores cambios; por ejemplo en las células de animales adrenalectomizados, el porcentaje de somatotrofos positivos a NF68 aumenta y el de lactotrofos y gonadotrofos disminuye, mientras que en los animales castrados, los gonadotrofos que expresan NF68 aumentan y disminuyen los lactotrofos y somatotrofos y durante la lactancia aumentan los lactotrofos y somatotrofos positivos a NF68 mientras que los tirotrofos disminuyen. Estos resultados dan clara muestra de que la población de células endócrinas que expresan neurofilamentos presenta una mayor plasticidad.

Los resultados de este trabajo nos permitieron confirmar que se produce un incremento en la proporción de células dobles positivas en respuesta a las condiciones experimentales. Esta plasticidad celular, presenta como se había supuesto una relación, en dependencia de la demanda fisiológica. Así, el tipo celular que presentó un incremento en la expresión del neurofilamento dependió del tipo de condición fisiológica; viéndose un incremento en la expresión del neurofilamento en lactotrofos en las hembras lactantes, en gonadotrofos en machos castrados, y en somatotrofos en el caso de ratas adrenalectomizadas para ambos sexos

La función de los neurofilamentos se ha descrito bastante en células nerviosas, en donde éstos intervienen en la determinación del calibre axonal, regulando la estructuración del citoesqueleto de las largas prolongaciones axónicas, lo que directamente afecta la velocidad de transporte<sup>44</sup>. Es fácil pensar en la necesidad de un arreglo celular estable en células de gran tamaño como lo son las neuronas cuando se toma en cuenta la distancia que puede llegar a tener sus axones. Si bien una célula secretora adenohipofisiaria no posee el mismo tamaño que una célula nerviosa, el complejo sistema de señales de regulación al que está expuesta si se beneficia de elementos que le permitan hacer reacomodos de su citoesqueleto. En este sentido, los neurofilamentos pueden servir como organizadores de los filamentos de actina y de la red de microtúbulos, estabilizando o facilitando la despolimerización de estos, procesos necesarios para ambas fases de la exocitosis<sup>54</sup>. Esta capacidad de unir y alterar la dinámica de los microtúbulos y filamentos de actina ya ha sido reportada en neuronas y podría ser uno de los mecanismos de su acción en la adenohipófisis, ya sea permitiendo la liberación de vesículas “precargadas” en la región cortical cercana a la membrana y la recarga de vesículas en esta zona, o favoreciendo la síntesis de las hormonas y la estabilidad de mensajeros por medio de uniones al nucleoesqueleto<sup>53, 54</sup>.

La plasticidad observada en ésta subpoblación celular endócrina, podría indicar una diferencia funcional entre ambas subpoblaciones (positivas y negativas a NF) en tirotrofos, lactotrofos, somatotrofos y gonadotrofos. Los resultados de este trabajo no aportan evidencia directa a esta distinción de función, pero si marcan una base sobre la cual realizar nuevos experimentos para caracterizar la función de estas subpoblaciones. La continuación de este trabajo se enfocará en responder esta pregunta, para lo cual se realizarán ensayos hemolíticos de placa a fin de cuantificar la secreción hormonal, registros de fluctuaciones de calcio intracelular para caracterizar la respuesta funcional de estas células, así como inmunomarcajes en rebanadas para tratar de determinar si existe una distribución específica de las células positivas a neurofilamento en la glándula.

## REFERENCIAS

1. Hiriart, M. El hipotálamo endocrino y la hipófisis. *Fisiología médica* (Drucker, R., ed). 2005. El Manual Moderno, S.A. de C.V, México 527-544.
2. Shlomo, M. *The Pituitary*. 3<sup>rd</sup> Ed. 2011. Academic Press, USA 735pp
3. Moguevsky, J., and Schiaffini, O. *Hipófisis. Control de su secreción*. 1972. López Obreros Editores, Argentina 260pp.
4. McKinley, M.; O'Loughlin, V. *Human anatomy*. 3<sup>rd</sup> Ed. 2012. McGraw Hill, USA p609
5. Hadley, M.E. *Endocrinology*. 4<sup>th</sup> Ed. 1996. Prentice Hall, USA 518pp
6. Stojilkovic, S., *et al.* **Ion Channels and Signaling in the Pituitary Gland**. *Endocr Rev*, 2010. 31(6):845-915
7. Norman, A.W., Litwack, G. *Hormones*. 2<sup>nd</sup> Ed. 1997. Academic Press, USA 558pp
8. Lafont, C., *et al.* **Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(9), 4465-4470
9. Boron, W., Boulpaep, E. *Medical Physiology* 2<sup>nd</sup> Ed. 2011. Elsevier, USA 1337pp
10. Bäck, N., *et al.* **Distribution of neurofilament proteins and peripherin in the rat pituitary gland**. *Neurosci Res*, 1995. 22(3):267-275
11. Nuñez, L., *et al.* **Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism**. *J Physiol*, 2003. 549(3), 835-843

12. Scanes, C., *et al.* **Subpopulations of somatotropes with differing intracellular calcium concentration responses to secretagogues.** *Neuroendocrinology*, 2007. 85(4):221-231
13. Durán P, María Luisa. (2008). Estudio de los patrones de Ca<sup>2+</sup> intracelular generados por el estímulo de GnRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado e inyectado con estradiol, in *Facultad de Ciencias*, Universidad Nacional Autónoma de México, México p43
14. Nolan, L., *et al.* **Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment.** *J Neuroendocrinol*, 1998. 10(3):207-215
15. Yin, P.; Arita, J. **Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle.** *Neuroendocrinology*, 2000. 72(2):72-79
16. Levy, A. **Physiological implications of pituitary trophic activity.** *J Endocrinol*, 2002. 174(2): 147-155
17. Nolan, L.; Thomas, CK.; Levy, A. **Enhanced anterior pituitary mitotic response to adrenalectomy after multiple glucocorticoid exposures.** *Eur J Endocrinol*, 2003. 149(2): 153-160
18. Nolan, L.; Thomas, CK.; Levy, A. **Permissive effects of thyroid hormones on rat anterior pituitary mitotic activity.** *J Endocrinol*, 2004. 180(1): 35-43
19. Nolan, L.; Levy, A. **A population of non-luteinizing hormone/non-adenocorticotrophic hormone-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy.** *J Endocrinol*, 2006. 18(9): 655-661

20. Vankelecom, H. **Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell.** *Semin Cell Dev Biol*, 2007. 18(4): 559-570
21. Nolan, L.; Levy, A. **Prolonged oestrogen treatment does not correlate with a sustained increase in anterior pituitary mitotic index in ovariectomized Wistar rats.** *J Endocrinol*, 2009. 200(3): 301-309
22. Molinaro, E., *et al.* **Recombinant human TSH (rhTSH) in 2009: new perspectives in diagnosis and therapy.** *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2009. 53(5):490-502
23. Ciccone, N., Kaiser, U. **The biology of gonadotroph regulation.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009. 16(4): 321-327
24. Jansson, JO., Edén, S., Isaksson, O. **Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion.** *Endocr Rev*, 1985. 6(2): 128-50
25. Kwiecian, R., *et al.* **Growth hormone-releasing hormone triggers pacemaker activity and persistent  $Ca^{2+}$  oscillations in rat somatotropes.** *J Physiol*, 1997. 499(3), 613-623
26. Edén, S. **Age- and sex- related differences in episodic growth hormone secretion in the rat.** *Endocrinology*, 1979. 105(2): 555-560
27. Tomic, M., *et al.* **Characterization of a plasma membrane calcium oscillator in rat pituitary somatotrophs.** *J Biol Chem*, 1999. 274(50): 35693-35702
28. Alonso, G., *et al.* **Selective alteration at the growth- hormone- releasing- hormone nerve terminals during aging in GHRH-green fluorescent protein in mice.** *Aging Cell*, 2007. 6(2): 197-207
29. Ben-Jonathan, N., *et al.* **What can we learn from rodents about prolactin in humans?** *Endocr Rev*, 2008. 29(1), 1-41

30. Galas, L., *et al.* **TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates.** *Gen Comp Endocrinol*, 2009. 164(1): 40-50
31. Sheng, H., Westphal, H. **Early steps in pituitary organogenesis.** *Trends Genet*, 1999. 15(6): 236-240
32. Pasen, J., Rosenfeld, M. **Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination.** *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(6):669-677
33. Zhu, X., Gleiberman, A., Rosenfeld, M. **Molecular Physiology of Pituitary Development Signaling and Transcriptional Networks.** *Physiol Rev*, 2007. 87(3): 933-963
34. Scully, K., *et al.* **Pituitary Development: Regulatory Codes in Mammalian Organogenesis.** *Science*, 2002. 295(5563): 2231-2235
35. Takor, T., Pearse, A. **Neuroectodermal origin of hypothalamo-hypophyseal complex: the role of the ventral neural ridge.** *J. Embryol. Exp. Morphol*, 1975. 34(2): 311-325
36. Eagleson, G., Jenks, B., Van Overbeeke, A. **The pituitary adrenocorticotropes originate from neural ridge tissue in *Xenopus laevis*.** *J. Embryol. Exp. Morphol*, 1986. 95: 1-14
37. ElAmraoui, A., Dubois, P.M. **Experimental evidence for the early commitment of the presumptive adenohypophysis.** *Neuroendocrinology*, 1993. 58(6): 609-615
38. Dubois, P.M., ElAmraoui, A. **Embryology of the Pituitary Gland.** *Trends Endocrinol Metab*, 1995. 6(1):1-7
39. Ogawa, A., *et al.* **Intermediate filament expression in non-neoplastic pituitary cells.** *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990. 58(5):331-340



40. Quintanar, J., Salinas, E. **Neurofilament expression in cultures rat adenohypophysial cells.** *Cell Physiol Biochem*, 2001. 11(1):27-32
41. Salinas, E., Quintanar, J. **Neurofilaments in thyrotrophs of hypothyroid rats: An immunohistochemical study.** *Endocr Pathol*, 2000. 11(2):195-200
42. Shea, T., Chan, W. (2008) **Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation.** *Eur J Neurosci*, 2008. 27(8): 1893-1901
43. Yates, D., *et al.* **Neurofilament subunit (NFL) head domain phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments.** *Eur J Cell Biol*, 2009. 88(4):193-202
44. Barry, D., *et al.* **New movements in neurofilament transport, turnover and disease.** *Exp Cell Res*, 2007. 313(10): 2110-2120
45. Lariviere, R. C., Julien. **Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease.** *J Neurobiol*, 2004. 58(1): 131-148.
46. Carbajal, M. E., Vitale, M. **The Cortical Actin Cytoskeleton of Lactotropes as an Intracellular Target for the Control of Prolactin Secretion.** *Endocrinology*, 1997. 138(12):5374-5383
47. Tooze, J., *et al.* **Morphological and biochemical evidence showing neuronal properties in AtT-20 cells and their growth cones.** *Eur J Cell Biol*, 1989. 49(2):259-273
48. Trojanowski, J.Q., *et al.* **The developmental expression of neurofilament and glial filament proteins in the human pituitary gland: An immunohistochemical study with monoclonal antibodies.** *Brain Res*, 1984. 315(2): 229-239
49. Halliday, W.C., *et al.* **Intermediate filaments in the human pituitary gland: an immunohistochemical study.** *Can J Neurol Sci*, 1990. 17(2): 131-136
50. Fiordeliso, T., Hernández-Cruz, A. **Oestrogen Regulates Neurofilament Expression in a Subset of Anterior Pituitary Cells of the Adult Female Rat.** *J Neuroendocrinol*, 2002. 14(5): 411-424
51. Fiordeliso, T., Millán-Aldaco, D., Hernández-Cruz, A. **Cells of Proopiomelanocortin Lineage from the Rodent Anterior Pituitary Lack Sexually**

**Dimorphic Expression of Neurofilaments.** *Neuroendocrinology*, 2006. 83(5-6): 360-370

52. Fiordeliso, T., *et al.* **Immunoreactivity to Neurofilaments in the Rodent Anterior Pituitary is Associated with the Expression of  $\alpha$ 1A Protein Subunits of Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels.** *J Neuroendocrinol*, 2007. 19(11): 870-881

53. Dahl, KN.; Kalinowski, A. **Nucleoskeleton mechanics at a glance.** *J Cell Sci*, 2011. 124(5):675-678

54. Julien, JP.; Mushynski, WE. **Neurofilaments in health and disease.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1998. 61:1-23