



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Identificación de redes celulares de lactotropos y
tirotropos ante cambios en la demanda fisiológica en
modelo murino, durante el ciclo estral y lactancia**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ANA ITZEL AQUILES REYES



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Tatiana Fiordeliso Coll
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 2018**



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.

1. Datos del alumno

Aquiles

Reyes

Ana Itzel

5529839449

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311129816

2. Datos del tutor

Dra.

Tatiana

Fiordeliso

Coll

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Mathieu

Christian

Anne

Hautefeuille

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Salinas

Velázquez

Laura

Silvia

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Bargas

Díaz

José

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Jiménez

Medina

José Alfredo

7. Datos de la tesis

Identificación de redes celulares de lactotropos y tirotropos ante cambios en la demanda fisiológica en modelo murino, durante el ciclo estral y lactancia.

59 p.

2018

*I have a deeply regretted that I did not proceed far enough least
to understand something of great leading principles
of mathematics, for men thus endowed
seem to have an extra sense
- Charles Darwin.*

Agradecimientos

Al proyecto CONACyT ANR 273513 así como al proyecto PAPIIT 273513 por el apoyo necesario para realizar este trabajo.

Al Programa de Capacitación en Métodos de Investigación SEP-UNAM-FUNAM 2016, por el financiamiento y la oportunidad de permitirme realizar parte de este trabajo en el CINV de Valparaíso, Chile.

A Tatiana Fiordeliso Coll, por su asesoría, y liderazgo en los proyectos en los que colaboré dentro del laboratorio; por ser una guía, confiar en mí y apoyarme en todo momento y de toda manera.

A Patricio Orio, por haberme permitido estar en su laboratorio en el CINV de Valparaíso, y por compartirme parte de sus conocimientos, apoyo y a pesar del poco tiempo de mi estancia, confiar en mis capacidades.

A José Alfredo Jiménez Medina, por su apoyo como técnico del laboratorio de Neuroendocrinología y su disposición de ayuda, además de ser más que un maestro en mi formación dentro del laboratorio.

A José Bargas Díaz, Mathieu Hautefeuille, Marco Arieli Herrera Valdez y Laura Silvia Salinas Velázquez, por su tiempo y por las correcciones que me brindaron en este trabajo.

A Juan, por ser un compañero y amigo en estos años.

A Daniel, por impulsarme con sus bromas y consejos.

A Yorgui, por escucharme y apoyarme siempre.

A mis padres, por su paciencia.

Tabla de contenido

I. Introducción.....	2
1. Morfofisiología de la unidad hipotálamo-hipófisis.....	2
2. Hipófisis, descripción anatómica.....	3
3. Desarrollo embrionario y formación de la hipófisis.....	4
4. Diferenciación celular.....	5
4.1. Diferenciación de tirotropos y lactotropos.....	6
5. Ejes Hipotálamo-Hipófisis-Órgano blanco.....	6
5.1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	7
5.1.1. Tirotropos.....	8
5.1.2. TSH (hormona estimuladora de tiroides).....	8
5.1.3. Tiroides.....	9
5.1.4. Síntesis de hormonas tiroideas.....	10
5.2. Eje hipotálamo - hipófisis - órgano blanco, lactotropos.....	10
5.2.1. Lactotropos.....	11
5.2.2. DA.....	11
5.2.3. PRL.....	12
5.2.4. Síntesis de PRL.....	12
6. Secreción hormonal hipofisaria.....	13
6.1. Canales iónicos en la hipófisis.....	13
6.2. Secreción en tirotropos.....	13
6.3. Flujo de Ca ²⁺ en Lactotropos.....	14
7. Rol de la hipófisis ante cambios fisiológicos.....	15
7.1. Ciclo estral.....	15
8. Rol endócrino de lactotropos y tirotropos en la lactancia y ciclo reproductivo.....	16
II. Antecedentes	
1. Plasticidad funcional y Mecanismos de regulación.....	18
1.1. Densidad poblacional.....	19
1.2. Multifuncionalidad y transdiferenciación.....	20
2. Redes.....	20
2.1. Redes en la adenohipófisis.....	22
2.2. Complejidad y relevancia.....	24
III. Planteamiento del problema.....	25
IV. Hipótesis.....	25
V. Objetivo general.....	25
VI. Objetivos particulares.....	25

VII. Método.....	26
VIII. Resultados.....	30
IX. Discusión.....	40
X. Conclusión.....	44
XI. Apéndices.....	45
Apéndice 1.....	45
Apéndice 2.....	46
XII. Referencias.....	48

Resumen

La glándula hipófisis es considerada como la glándula maestra ya que junto con el hipotálamo, regulan la fisiología del organismo ante diferentes demandas metabólicas, como las presentes en el ciclo reproductivo y lactancia. Se encuentra conformada por cinco grupos endócrinos secretores de hormonas que a su vez regulan la actividad de órganos y tejidos específicos.

El ciclo reproductivo en hembras mamíferos, se involucra principalmente en la maduración de las gónadas, proceso en el cual se encuentran involucradas diversas hormonas que en su mayoría son reguladas y/o secretadas a través de algunos grupos celulares endócrinos de la hipófisis. En modelo murino dicho ciclo se divide en cinco fases, diestro, proestro, estro, y metaestro, de las cuales estro tiene una demanda hormonal mayor a las anteriores, debido a que es en esta fase en donde se lleva a cabo la ovulación.

Los tirotropos y lactotropos son algunos de los cinco grupos de células endócrinas que se encuentran involucrados tanto en el ciclo reproductivo como en la regulación de otros procesos. Los dos grupos endócrinos están regulados por el factor hipotalámico TRH, permitiéndoles así la liberación de TSH y PRL respectivamente, estando ambas involucradas tanto en el ciclo reproductivo como en la lactancia.

Anteriormente se creía que la principal y única vía de regulación de la hipófisis se encontraba en el hipotálamo a través de los factores hipotalámicos. Sin embargo hoy en día existen reportes de otras vías de regulación que permiten que exista una plasticidad funcional en la hipófisis, una de estas vías es la comunicación celular y por ende la formación de redes endócrinas. Por ello en el presente trabajo se tiene como objeto, obtener y caracterizar la estructura de la red de conexión celular de tirotropos y lactotropos en rebanadas de hipófisis de ratones hembra balb-C lactantes y en las fases diestro, estro y proestro del ciclo estral; mediante imagenología de $[Ca^{2+}]_i$, ya que a través de este método es posible discernir la actividad celular presente ante un estímulo del factor hipotalámico de interés, en este caso TRH a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, 100 nM). La caracterización de las redes se realizó mediante la aplicación de un análisis global y local heurístico que describe la topología global y local de las redes obtenidas, brindando una mejor aproximación a la descripción de la comunicación celular y a los cambios de la misma a lo largo de las fases del ciclo reproductivo así como en la lactancia, encontrando en el análisis global, que en la fase estro es en donde existe mayor comunicación ya que se presentan mayor conexiones tanto entre lactotropos como entre tirotropos. Así mismo, en la lactancia existe un aumento de densidad poblacional de ambas células y de conexiones únicamente entre lactotropos. Por otra parte, los resultados del análisis de la topología local, indican que en las concentraciones más altas 10 y 100 nM de TRH, las células se encuentran mejor comunicadas, en todas las condiciones estudiadas, no en el sentido de cantidad de conexión sino en la eficiencia de la misma ya que es en donde se forman grupos celulares conectados, y en donde absolutamente todas las células están conectadas con otra al menos una vez, lo que da lugar a afirmar que aunque la demanda fisiológica no sea alta para alguna de las condiciones estudiadas, si se presenta un estímulo de mayor concentración hormonal, favorecerá la comunicación de las células.

I. Introducción

1. Morfofisiología de la unidad hipotálamo-hipófisis

Mucho es lo que se sabe actualmente de los mecanismos involucrados en la regulación fisiológica del organismo, uno de ellos participa en la actividad coordinada de secreción hormonal. Dentro de esta regulación fisiológica está considerada la regulación de la homeostasis, descrita como la capacidad que tiene el organismo de mantener y regular sus condiciones internas. Se ha establecido que el sistema neuroendocrino está encargado de esta regulación, y se encuentra conformado por la unidad funcional hipotálamo-hipófisis; donde el hipotálamo, mediante la conexión física del sistema porta hipofisario, hace llegar los factores hipotalámicos expresados en él, que estimulan la secreción hormonal de las células endócrinas de la hipófisis (De Lecea *et al.*, 1998)

A pesar que desde el siglo XVIII se ha logrado describir gran parte de este órgano, la función conjunta de hipotálamo-hipófisis, sigue atrayendo la atención de muchos científicos, ya que aunque el hipotálamo sea parte esencial de la integración funcional, en la hipófisis ocurren otros mecanismos que permiten la presencia de plasticidad en su funcionamiento (Ben-Schlomo & Melmed, 2010; Lechan & Toni, 2016).

El hipotálamo forma parte de menos del 2% del volumen del cerebro, y está anatómicamente posicionado (límite anterior) entre el tercer ventrículo, la lámina terminal, y el globo pálido, (límite posterior), entre el mesencéfalo superior y los cuerpos mamilares inferiores, (límites laterales) definidos por la sustancia inominata, la cápsula interna, el núcleo subtalámico y el pedúnculo cerebral (Ben-Schlomo & Melmed, 2010; Lechan & Toni, 2016). Su conformación está dada por núcleos hipotalámicos, encargados de la regulación funcional de la memoria, emociones y en general, de la homeostasis del organismo. Así mismo, se le puede dividir en cuatro zonas, anterior, posterior, medial y lateral, dentro de las cuales se encuentran los diferentes núcleos. Los núcleos que se encuentran implicados en la regulación de la hipófisis son: el supraóptico, encargado de la producción de hormona ADH (antidiurética); el sexual dimórfico, encargado de la regulación del crecimiento así como también de la reproducción del organismo; núcleo paraventricular, involucrado en la respuesta al estrés, así como también de la producción de Oxitocina y regulación del apetito; y el núcleo de arcuato, secretor de DA, y principal productor de hormonas hipofisiotrópicas, involucrado también con la regulación de la saciedad (Ben-Schlomo & Melmed, 2010).

Las principales señales que se liberan del hipotálamo, son hormonales, las cuales fueron estudiadas y reconocidas como mensajeros químicos desde principios del siglo XX, resultado de investigaciones de John Macleod, en diabetes mellitus (Weatherall, 1990). Estos mensajeros hormonales son conocidos como factores hipotalámicos, y juegan un papel importante en la estimulación e inhibición de la secreción hormonal hipofisaria en respuesta a la demanda fisiológica del organismo (Ben-Schlomo & Melmed, 2010).

La conexión física entre el hipotálamo y la hipófisis está establecida por la inervación de las terminaciones axónicas de cada neurona de los distintos núcleos hipotalámicos y por la irrigación de vasculatura proveniente de la arteria hipofisaria superior que desciende desde el hipotálamo, hasta la hipófisis, en forma de capilares. A esta irrigación se le conoce como sistema porta-hipofisario. A su vez este se encuentra conectado con la inervación neuronal, que descienden desde la eminencia media, ubicada a la altura del infundíbulo (Fig.1b) (Clifton & Steiner, 2009).

La eminencia media tiene dentro de sus funciones principales, favorecer el transporte de las señales hipotalámicas hasta la hipófisis, a través de irrigación vascular. Está constituida principalmente por regiones endodimales, externas e internas. La capa endodimal más interna, contiene uniones estrechas que previenen el intercambio de moléculas grandes, entre el líquido cerebrospinal y el espacio de la matriz extracelular de la eminencia media. Tanto las uniones estrechas como los tanicitos, presentes también en la capa endodimal, se encargan prevenir la

circulación retrógrada de los factores liberados desde el hipotálamo (Fig. 1a) (Rizzoti & Lovell-Badge, 2017).

La zona interna de la eminencia media está formada por axones que provienen del núcleo supraóptico y paraventricular que se prolongan hasta el lóbulo posterior de la hipófisis, mientras que los axones de las neuronas hipofisiotrópicas (incluyendo las de los núcleos periventricular, paraventricular y arcuato) se extienden hacia la zona externa de la eminencia media, donde interactúan con los capilares provenientes de la arteria superior, del sistema porta, siendo estos los que van irrigar y servir de principal vía de transporte de cada factor hipotalámico (Ben-Schlomo & Melmed, 2010).

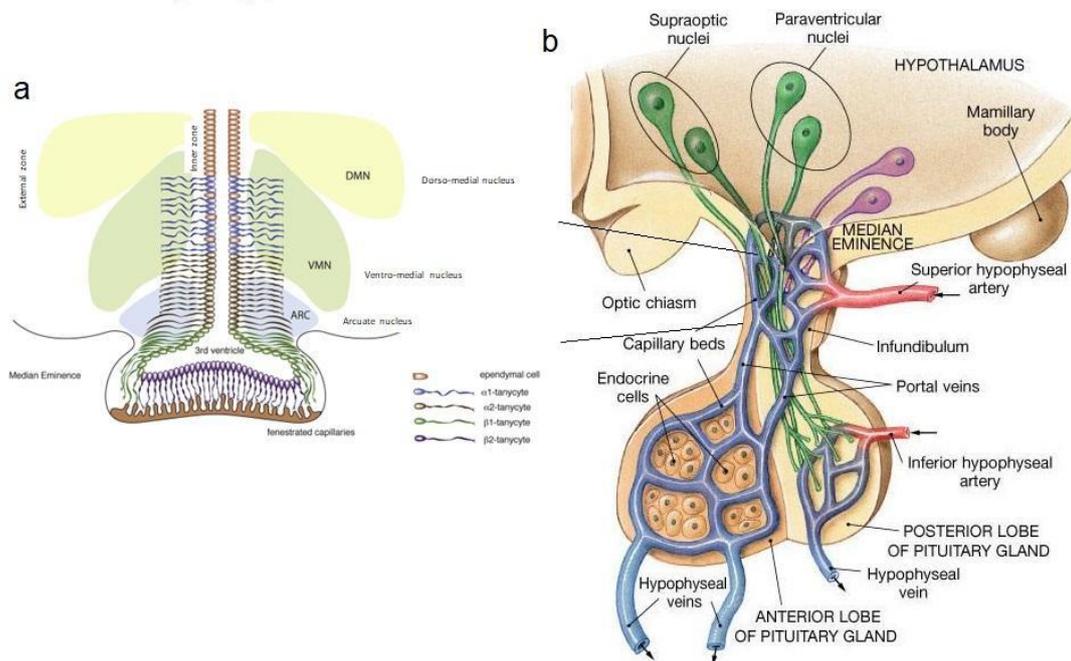


Figura 1. Esquema de la eminencia media, conexión hipotálamo – hipófisis. a) Zonas y composición celular de la eminencia media, tomado de: (Rizzoti & Lovell – Badge 2017). b) Composición celular y estructural de la innervación axónica e irrigación de la hipófisis tomado de: (Cummings, 2004)

Las neuronas que constituyen estos núcleos, son consideradas peptidérgicas ya que los factores hipotalámicos que liberan a través de sus axones, son péptidos. Entre los principales están TRH (por sus siglas en inglés Thyrotropin Releasing Hormone), GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), CRH (Corticotropin Releasing Hormone), GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) y somatostatina. Mientras que otro grupo de neuronas, localizadas en el núcleo supraópticos secretan monoaminas, como dopamina y serotonina, principalmente. Cada grupo celular es estimulado por un factor hipotalámico específico ó neurohormona, de tal manera que las células endócrinas poseen receptores definidos para el factor correspondiente (Ben-Schlomo & Melmed, 2010).

2. Hipófisis - descripción anatómica

La hipófisis es considerada como la glándula maestra debido a que sus funciones repercuten en la regulación fisiológica del organismo (Lupien, *et al.*, 2007). Anatómicamente la hipófisis en mamíferos se encuentra posada sobre el hueso esfenoideas, y debajo del quiasma óptico; está rodeada por una de las meninges cerebrales, la duramadre, por la cual fluye parte del líquido cefalorraquídeo que le proporciona oxigenación y nutrientes necesarios. Se encuentra dividida en tres lóbulos: lóbulo

posterior (neurohipófisis), lóbulo anterior (adenohipófisis) y el intermedio, que se encuentra únicamente en mamíferos roedores (Zhu, 2007).

El lóbulo posterior o neurohipófisis se compone de la pars nervosa (Fig. 2). Se encuentra irrigado otra sección de vasos sanguíneos, provenientes de la arteria inferior hipofisaria (Fig.1b). El lóbulo anterior se encuentra dividida en pars distalis y tuberalis (Fig. 2). Está conformada por cinco grupos celulares endócrinos, capaces de secretar hormonas, y otros grupos no endócrinos. Dentro de los tipos celulares no endócrinos están las células foliculares y las foliculoestrelladas. Caracterizadas estas últimas por tener prolongaciones citoplasmáticas que dan soporte a la glándula, además de que juegan un papel importante en la conectividad celular (Melmed, 2010).

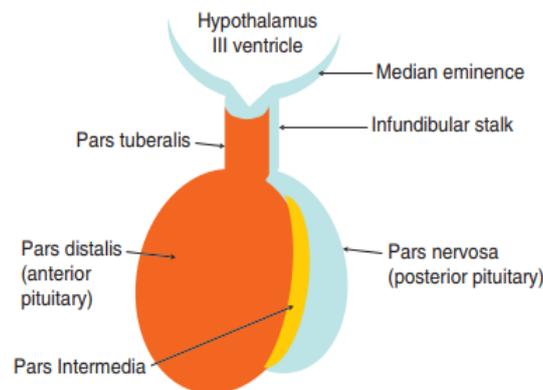


Figura 2. Esquema de hipófisis con las tres divisiones de lóbulos anterior: Pars distalis, intermedia, tuberalis y la pars nervosa o lóbulo posterior. Tomado de (Childs. 2009)

Los grupos celulares endócrinos más abundantes, son los somatotropos, alcanzando una densidad poblacional de aproximadamente 50%. Estos se encargan de la producción de la hormona de crecimiento (GH, growth hormone). Los lactotropos, tienen una densidad de aproximadamente 15%, y secretan principalmente prolactina (PRL, prolactin releasing hormone). Los corticotropos secretan la hormona adrenocorticotropa (ACTH, adrenocorticotropic hormone) y tienen aproximadamente la misma densidad poblacional que los lactotropos. Los gonadotropos, secretores de hormona estimuladora del foliculo y de la hormona luteinizante (FSH y LH, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone) representan apenas un 10% de la población celular. Mientras que el grupo con menor población, aproximadamente 5%, son los tirotropos, que secretan hormona estimuladora de la tiroides (TSH, thyroid-stimulating hormone) (Melmed, 2011).

3. Desarrollo embrionario y formación de la hipófisis

En vertebrados la hipófisis tiene un origen dual. Existen diferencias en el patrón de desarrollo embrionario entre taxas, sin embargo la organización glandular, morfogénesis y la maquinaria molecular involucrada en este, es similar (Zhu, 2007). De los lóbulos que componen a la hipófisis, el anterior y el intermedio se originan del ectodermo, mientras que el lóbulo posterior resulta de una extensión del diencéfalo ventral (Fig.2). La composición del lóbulo intermedio, está dada únicamente por melanotropos, productores de α -melanotropina (Couly *et al.*, 1985).

La invaginación del ectodermo oral, formado de la expansión del neuroepitelio y el desplazamiento de la cresta neural, da origen a la bolsa de Rathke, la cual sigue estando compuesta por células epiteliales que se extienden a la parte trasera de la cavidad oral. El diencéfalo mantiene contacto con el ectodermo durante los primeros días del desarrollo, y se considera esencial para el desarrollo la hipófisis, ya que mediante la expresión de diversos factores de transcripción, se llevará

a cabo su separación física y la formación tanto de la pars nervosa como de la pars distalis de la hipófisis (Fig. 3) (Couly *et al.*, 1987; Sorson *et al.*, 1996).

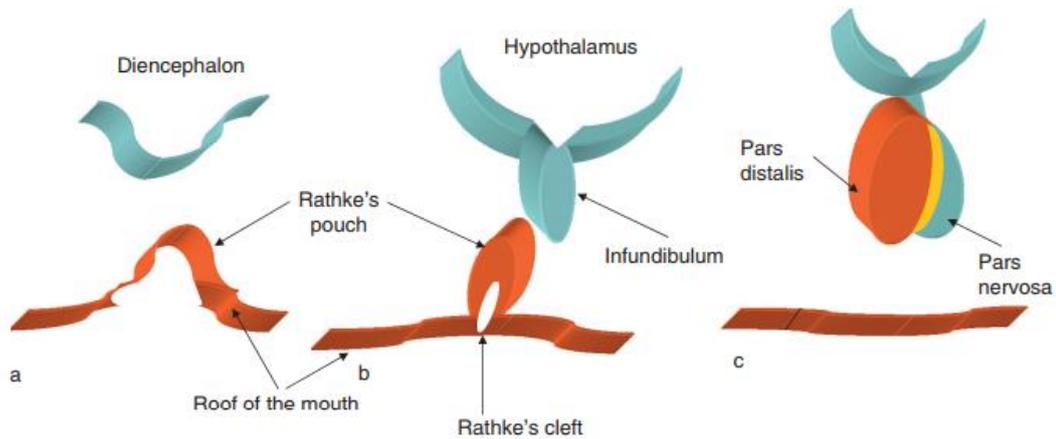


Figura 3. Esquema de desarrollo de la hipófisis. a) La adenohipófisis surge del techo del paladar, y busca su unión con el diencefalo. b) Se forma la bolsa de Rathke del mismo techo del paladar y del diencefalo se forma el infundíbulo. c) Lo que fue la bolsa de Rathke se separa del techo del paladar y se da la unión de ambas estructuras que da lugar a la pars distalis y la pars nervosa de la hipófisis. Modificado de (Childs, 2009)

4. Diferenciación celular

La diferenciación celular empieza aproximadamente en el día 7.5 del desarrollo embrionario, donde los corticotropos son el primer grupo celular que se diferencia en el día 12.5 del desarrollo embrionario, cuando el polipéptido precursor, POMC (proopiomelanocortina), se expresa. Los tirotrapos, somatotropos y lactotropos son los siguientes, surgiendo en diferentes días de desarrollo, E.14.5, 15.5, 16.5, respectivamente (Fig. 4). Pit-1 es el factor de transcripción responsable de dar inicio a esta diferenciación. También, dicho factor es esencial en la transcripción de genes productores de hormonas en estos tipos celulares, como PRL, TSH- β y GHRHR. Finalmente, se diferencian los gonadotropos alrededor del E16.5. (Zhu, 2007).

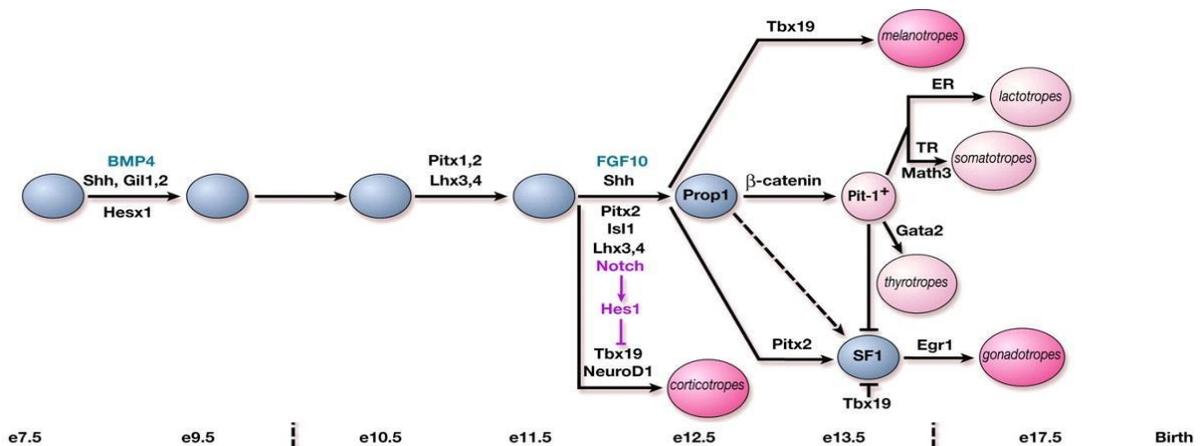


Figura 4. Factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular de los grupos endócrinos de la hipófisis, donde la diferenciación inicia desde el día 7.5, con la señalización de Shh, Gil 1,2. Posteriormente entre el día e11.5 y 12.5 se diferencia el primer grupo endócrino, los corticotropos, bajo la expresión de FGF10 y Pitx2, principalmente. En los días siguientes se diferencian melanotropos por la activación de Tbx19; los tirotrapos bajo la acción de Pit 1+ y Gata 2; y lactotropos, somatotropos surgen en e17.5 bajo expresiones de los correspondientes factores de transcripción señalados arriba. Modificado de (Zhu, 2007)

4.1. Diferenciación celular de tirotropos y lactotropos

La diferenciación de los tirotropos comparte características con la diferenciación de gonadotropos. Sin embargo estos dos linajes aparecen de forma divergente en el desarrollo de la hipófisis, ya que Pit-1 es el principal factor de transcripción que promueve la diferenciación de tirotropos, mientras que SF1 en gonadotropos (Fig. 4). No obstante, se ha demostrado que ambos grupos celulares pueden presentar plasticidad respecto a su diferenciación, ya que los gonadotropos pueden convertirse en tirotropos siempre y cuando Pit-1 se exprese ectópicamente en la zona ventral del epitelio (Dansen JS *et al.*, 1999).

Por otra parte, la expresión del factor Gata2 presente en la diferenciación de ambos grupos celulares, permite la expresión del promotor de TSH- β , mediante la interacción entre Gata2 y Pit-1, diferenciando así a los tirotropos (Dansen JS *et al.*, 1999; Zhu, 2007).

La diferenciación de lactotropos está relacionada con la de somatotropos, debido a que ambos están reguladas por la expresión de Pit-1. En somatotropos, además de la intervención de otros factores de transcripción, la interacción del elemento responsable de la hormona tiroidea (TRE) con Pit-1 y su sitio de unión con el gen activador de GH, permite la especificación de estos. Mientras que la definición de lactotropos se da por la modificación del sitio de unión de Pit-1, a través de la modificación de su estructura, permitiendo la supresión de la unión con el gen activador de GH, dando lugar a los lactotropos. No obstante, también se ha reportado que esta diferenciación puede ser parcial, resultando no sólo lactotropos, y somatotropos de ella, sino una fase intermedia de ambos grupos, mamosomatotropos (Fu *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 1990; Zhu, 2007).

5. Ejes Hipotálamo- Hipófisis-órgano blanco

Los distintos factores hipotalámicos, como se ha descrito anteriormente, son los primeros reguladores de la actividad endócrina de la hipófisis, siendo esta regulación específica para cada grupo celular. Por su parte, la secreción endócrina hipofisaria, libera hormonas que regulan a su vez a distintos, órganos blanco. Es decir, existe entre estos tres niveles de organización, la formación de ejes particulares, que se regulan con factores hipotalámicos específicos, controlando la secreción de hormonas endócrinas características que a su vez llegarán a un órgano blanco y afectara su función. Se han descrito ampliamente al menos 5 ejes hipotálamo -hipofisis: -gónadas, -adrenales, -tiroides, -hígado, -glándulas mamarias. Cada uno juega un rol en la regulación fisiológica del organismo, como puede ser la regulación del ciclo reproductivo, metabolismo, estrés, de temperatura y síntesis de proteínas así como la lactancia (Fig. 5) (Melmed, 2011).

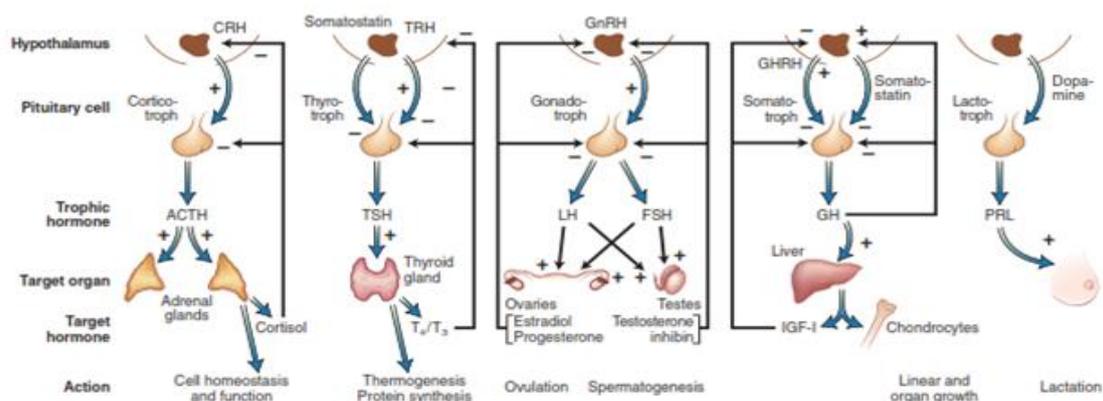


Figura 5. Ejes hipotálamo – hipófisis – órgano blanco. Tomado de (Melmed, S., *et al.*, “Williams’s textbook of endocrinology, Philadelphia: Saunders.” (2011))

5.1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides determina la producción de hormonas tiroideas (THs), siendo TRH el principal factor hipotalámico que estimula la síntesis y secreción de TSH, la cual actúa como estimulador en la biosíntesis de THs. Las principales (THs), son la tiroxina (T4), y la triiodotironina (T3), que a su vez controlan la secreción tanto de TRH como de TSH, mediante una retroalimentación negativa. La reducción de THs en el sistema endócrino aumenta la concentración de TRH y TSH, mientras que la sobreexpresión de estas, tiene el efecto opuesto. Algunas de las funciones fisiológicas que realizan las THs, están involucradas en la regulación del metabolismo, el desarrollo del sistema nervioso, y la termogénesis. Así mismo, pueden llegar a regular el metabolismo de nutrientes en el hígado, y el balance en el flujo sanguíneo. Estas acciones se dan a partir de receptores celulares que reconocen a las THs en cada órgano (Ortiga *et al.*, 2016; Nillni, 2010, Nicoletti *et al.*, 1986).

El proceso por el cual TRH, puede estimular a los tirotropos en la adenohipófisis, y que estos secreten TSH, es a través del reconocimiento de este factor por dos principales receptores membranales TRH-R1 y TRH-R2 (Sun & Gershengorn, 2003). TRH-R1 existe sólo en humano y se expresa en la adenohipófisis principalmente, pero también en algunas regiones del cerebro, del sistema nervioso autónomo y del tallo cerebral. En roedores se expresa con mayor frecuencia el receptor TRH-R2, en regiones responsables de las señales somatosensoriales. Estos receptores poseen siete dominios transmembranales con proteínas G acopladas (Fig.4) (Ben-Schlomo & Melmed, 2010; Sun & Gershengorn, 2003).

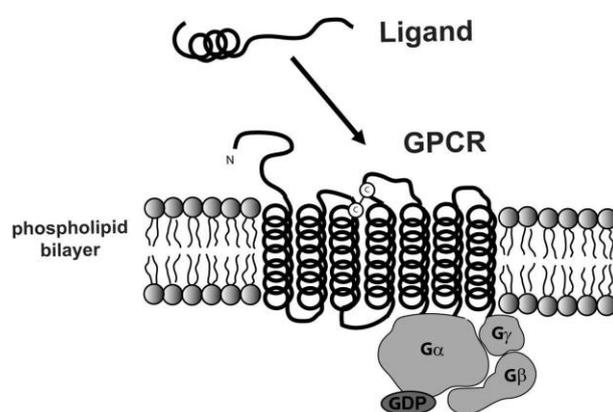


Figura 6. Receptor con siete dominios transmembranales, acoplado a una proteína G, GPCR. Tomado de (Seitenanfang, 2017)

La expresión del receptor TRH-R1 en la hipófisis está mediada por la acción de THs (Sun & Gershengorn, 2003; Weeke, 1975). Sin embargo TRH, no sólo puede inducir un estímulo en los tirotropos, sino también estimular la secreción de PRL en lactotropos, así como la liberación de GH en disfunciones fisiológicas, como acromegalia, disfunción hepática, anorexia nervosa, depresión psicótica y en algunos casos de hipotiroidismo (Jackson & Reichlin, 1977).

Un estímulo de TRH puede durar aproximadamente 30 minutos, siendo capaz de inducir tanto la secreción como la síntesis de TSH en tirotropos. Es decir, un estímulo largo de TRH puede provocar una respuesta bifásica de TSH, donde el primer pico representa la liberación de TSH, y el segundo su síntesis. La secreción de TSH puede incrementar la liberación de T4, hormona producida por la tiroides, principal órgano blanco de la TSH, la cual mediante procesos químicos puede convertirse en su forma activa, T3 (Faglia, 1998; Hartnell *et al.*, 1987). Otros factores regulan la respuesta de TSH a TRH en la adenohipófisis, como la somatostatina, que inhibe la actividad de TRH y su consecuente estímulo de liberación de TSH y PRL, induciendo incluso un hipotiroidismo, si se presentan niveles

altos de la misma. Así mismo, la dopamina puede inhibir la estimulación de TRH, mientras que AMPT (alpha-methyl-p-tyrosine), inhibidor de la síntesis de dopamina, mejora la respuesta a TRH.

Diversos factores pueden regular la actividad de las neuronas de TRH, especialmente las hormonas tiroideas, como T4 en su forma activa, T3 interactuando esta última con los receptores de hormona tiroidea en las neuronas de TRH, reduciendo así la transcripción del gen TRH. No obstante, la T4 por sí sola, puede reducir los niveles de TRH en la circulación del sistema porta hipofisario (Drigo & Bianco, 2011).

5.1.1. Tirotropos

Como se mencionó con anterioridad, los tirotropos son el grupo celular con menor densidad poblacional, secretan TSH glicoproteína - (28 kDa), la cual regula la secreción de T3 y T4, proveniente de las células foliculares de la tiroides, que a su vez, forman parte del asa de retroalimentación negativa para los tirotropos. Son considerados como células basófilas, dentro de la primera clasificación de los grupos celulares endócrinos. Se distinguen de los demás grupos endócrinos, por sus gránulos de secreción pequeños, aprox (100-150 nm de diámetro), además de tener un retículo endoplásmico rugoso dilatado. Respecto a su morfología, se pueden presentar tanto en formas alargadas como en pequeños cúmulos celulares (Childs, 2009).

5.1.2. TSH (hormona estimuladora de tiroides)

La TSH, como se ha descrito, es una glicoproteína producida por los tirotropos; de manera general, la función principal de la TSH es la regulación de la tasa metabólica del organismo. Tanto la TSH como la LH y la FSH, así como la hormona gonadotropina coriónica (hGC), están estructuradas por heterodímeros α y β , unidos por uniones no covalentes. La subunidad β es la que confiere la especificidad y diferencia entre cada hormona, mientras que la subunidad α es una glicoproteína común en éstas hormonas.

El receptor de TSH, junto con los de LH y FSH, son miembros relacionados con la familia de receptores rodopsina/ β -adrenérgica, caracterizándose por tener siete dominios transmembranales. La peculiaridad de cada uno, es la diferente composición de aminoácidos que permiten el reconocimiento de cada unidad β , según sea el caso. Algunos dominios de la subunidad β están altamente conservados entre diferentes especies de vertebrados, o bien, existen modificaciones muy discretas (Ben-Scholmo & Melmed, 2010; Szkudlinski *et al.*, 2002).

Cada subunidad de TSH es codificada por genes separados que se localizan en diferentes cromosomas. Su transcripción está regulada por la estimulación de TRH, siendo este el mayor regulador positivo de la expresión del gen de la subunidad TSH β , a través de la activación de la vía fosfatidilinositol- proteína cinasa C (PI3-K) (Mariotti & Bet-Pecoz, 2016; Melmed, 2010).

Los principales inhibidores de la síntesis de TSH son las THs, ya que en los tirotropos existen receptores de T3, mientras que la acción de regulación de T4 en los mismos, se da mediante la vía intrahipotalámica, donde T4 se convierte en T3.

Diversos estudios han probado que la administración de THs, marca un importante decremento en la expresión de ambas subunidades α y β -TSH, siendo mayor en la última (Mariotti & Bet-Pecoz, 2016).

El proceso de síntesis de TSH, está representado por cinco pasos: transcripción, glicosilación, plegamiento, combinación y almacenamiento.

La transcripción de ambas subunidades, ocurre a partir de precursores de RNAs, por procesos enzimáticos, regulados por diversos factores de transcripción. Cuando dichos precursores

maduran y forman los mRNAs, se localizan en el núcleo de la célula, desde donde posteriormente serán modificados por traslación, asociando ambas subunidades y almacenándolas (Sarapura *et al.*, 2010) (Fig. 7).

La traslación en ribosomas citoplasmáticos de ambas subunidades es independiente. Este proceso continúa en el lumen del retículo endoplasmático, todo mediado por el reconocimiento de aminoácidos, lo que resulta en la formación de 118 aminoácidos correspondientes a la subunidad β y 92 de la α (Takata *et al.*, 1989).

La glicosilación de TSH tiene impacto en la activación de la función protéica. La TSH- β tiene una glicosilación simple en el residuo asparagina, en la posición 23, mientras que TSH- α , se glicosila en dos regiones, en las posiciones 52 y 78 del residuo asparagina (Magner & Weintraub, 1982).

El plegamiento se da enseguida del término de la traslación, y depende de la glicosilación, a través de la formación de uniones disulfuro que estabilizan la estructura terciaria de la proteína. La subsecuente combinación de las subunidades se lleva a cabo en el aparato de Golgi, en donde también se almacenan en gránulos de secreción o vesículas, que son liberadas después de un estímulo de TRH (Kelly, 1985, Magner & Weintraub, 1982).

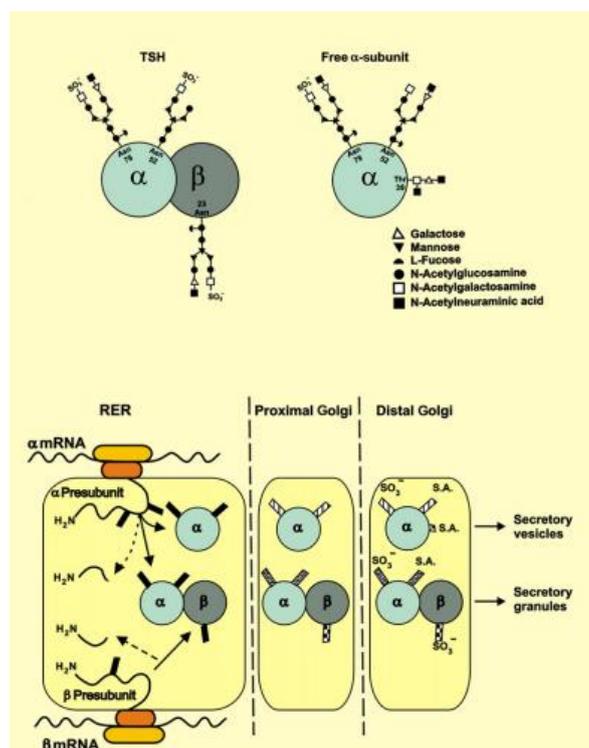


Figura 7. Síntesis, composición glicosílica y procesamiento de unidades de TSH. Modificado de (Melmed, 2010).

5.1.3. Tiroides

La glándula tiroides es una de las más grandes glándulas endócrinas en el cuerpo, pesa entre 15 y 20 g en humanos adultos. Principalmente secreta dos hormonas tiroideas, T4 y T3. Su regulación se encuentra dependiente al sistema hipotálamo-hipófisis. Se encuentra debajo de la laringe y en la parte anterosuperior de la tráquea. Consiste en dos lóbulos laterales conectados entre sí por tejido tiroideo, conocido como istmo. Los lóbulos de la tiroides contienen numerosas estructuras esféricas, llamadas folículos, que son las unidades funcionales de esta glándula. Cada folículo está cubierto con una sustancia pegajosa conocida como coloide, la cual está compuesta por glicoproteínas

llamadas tiroglobulinas, en donde se resguardan parte de las hormonas tiroideas hasta que el organismo las requiera.

La tiroides secreta dos hormonas tiroideas principalmente, T4 y T3 de las dos, la primera es la más abundante. Sin embargo, la T3 es a nivel de acción fisiológica, por esto se le considera como la principal hormona tiroidea. Estas hormonas participan la regulación metabólica, ya que a través de su acción, se estimula la oxidación celular en muchos tejidos, lo que provoca el incremento en el consumo de oxígeno y calor; la termogénesis también es regulada a partir de estas hormonas. Así mismo, estas hormonas son capaces de estimular el metabolismo de carbohidratos, y regular el uso de glucosa, así como su absorción. Los niveles de calcio, agua y la función hepática también están bajo la influencia de las hormonas tiroideas (Kristen, 2000).

5.1.4. Síntesis de hormonas tiroideas

La síntesis de estas hormonas depende de la presencia de yodo y aminoácido tirosina, este último es sintetizado en cantidades suficientes en el cuerpo, por lo que es el sustrato principal que se combina con yodo para formar las hormonas tiroideas. A diferencia de la tirosina, el yodo se obtiene a través de la dieta y también se puede absorber por la piel y pulmones. El paso inicial de su formación es la absorción de yoduro, componente de yodo, por los folículos de la tiroides. Posteriormente los folículos activan bombas de yodo, creando un gradiente de concentración del fluido extracelular al interior de las células foliculares. Una vez dentro de los folículos, el yoduro es oxidado a yodo, por la enzima yoduro peroxidasa. En seguida el yodo se une a la tirosina formando parte del coloide de tiroglobulinas. La unión de estos dos componentes da lugar a la monodiotirosina (MIT) y la diiodotirosina (DIT), las cuales se combinarán formando T3, mientras que la T4 se forma a partir de la unión de dos moléculas de DIT (Kristen, 2000).

La liberación de estas hormonas, involucra un proceso complejo, ya que al estar embebidas en el coloide de tiroglobulinas que recubre los folículos, tienen que ser transportados a lo largo del folículo antes de que puedan entrar al flujo sanguíneo. Ya que las tiroglobulinas no se secretan al flujo sanguíneo, las hormonas tiroideas tienen que romper algunas de estas moléculas, mediante lisosomas, para poder salir (Sherwood, 2015).

5.2.1. Eje hipotálamo - hipófisis - órgano blanco, lactotropos

La TRH es el factor hipotalámico que estimula los lactotropos, además de oxitocina, vasopresina, angiotensina II, y otros péptidos. Como se mencionó antes, la hormona que secretan es la PRL, la cual está involucrada en numerosas funciones fisiológicas como la lactancia, reproducción, sistema inmune, metabolismo, osmorregulación e incluso comportamiento. Como todas las hormonas endócrinas, su secreción varía de acuerdo a la demanda fisiológica el organismo (Guillou *et al.*, 2015).

El TRH-R, se encuentra presente no sólo en tiotropos, sino también en lactotropos, gonadotropos e inclusive somatotropos, lo que significa que dicho factor hipotalámico puede llegar a estimular a cualquiera de estos grupos celulares endócrinos. Sin embargo el que exista un estímulo en estos, no necesariamente garantiza la secreción de la hormona correspondiente, en este caso la PRL (Hinkle *et al.*, 1973).

5.2.2. Lactotropos

Los lactotropos, o también conocidos por células de prolactina, están dentro del grupo de células acidófilas de la hipófisis. Se distinguen por su forma angular o estrellada. Además, tienen una capacidad de proliferación muy característica, especialmente en la etapa de madurez del organismo, presentan actividad eléctrica espontánea, pueden ser estimulados por varios factores hipotalámicos, y pueden existir células con secreción dual (GH y PRL), y alta actividad de secreción y síntesis de hormona (Ben & Liu, 1992).

En roedores, el contenido granular de secreción es de gran tamaño. Estos gránulos presentan formas irregulares. Sin embargo, en humanos los gránulos de secreción son pequeños, y prevalecen las formas irregulares. Poseen un retículo endoplásmico apilado y con estructura laminar. En condiciones normales, los lactotropos pueden representar de un 15 a un 26% de la población total de células endócrinas en la hipófisis. Más aún, la población puede ser mayor en hembras.

En algunos estudios, se ha llevado a cabo la separación celular, donde los lactotropos se separan como un grupo de células pequeñas en el cual un subconjunto está conformado por somatotropos sensibles a estrógenos, que contienen GH y PRL (Childs, 2009).

Ya que los lactotropos carecen de un órgano blanco específico, es decir, la PRL tiene diversas funciones fisiológicas, los lactotropos carecen de un asa de retroalimentación negativa. No obstante, existen reguladores endócrinos que controlan su producción, especialmente secretados desde el hipotálamo (Ben & Liu, 1992).

5.2.3. Dopamina (DA)

EL principal factor de inhibición (PIF) de los lactotropos es la dopamina, una catecolamina (monoamina) con un núcleo catecol. Todos los neurotransmisores catecolaminas comparten una vía de síntesis común, comenzando con la metabolización del aminoácido tirosina, resultando dihidroxifenilalanina (DOPA), que es luego descarboxilada formando finalmente dopamina (Daubner *et al.*, 2011).

Existen varios receptores de dopamina, pero los dos involucrados en la regulación endócrina son, D1 y D2. En lactotropos se expresa D2, acoplado a proteína Gi (Caron *et al.*, 1983). Su disfunción puede provocar la hiperplasia de lactotropos, hiperprolactinemia, el incremento en la producción de lactotropos, así como de su secreción y adenomas lactotrópicos (Asa *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 2000).

Cuando la DA se une al receptor tipo 2 en lactotropos, provoca el decrecimiento de adenilciclase y de cAMP, aumentando el flujo de K⁺ e inhibiendo la producción de IP3, teniendo como consecuencia la disminución de la concentración de [Ca²⁺]_i, y la subsecuente inhibición de secreción (Vallar *et al.*, 1989).

Las neuronas hipotalámicas encargadas de la secreción de DA, están localizadas en el núcleo arcuato y en el periventricular. También participan las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas (TIDA), cuyos axones proyectan hacia la zona externa de la eminencia media, y es considerada como la mayor fuente de dopamina en la adenohipófisis. Aunque los niveles de prolactina en suero sanguíneo son similares en machos y hembras, en condiciones basales, los niveles de DA en la circulación hipofisaria es cinco a siete veces menor en machos (Freeman *et al.*, 2000). Otra función de la DA en la hipófisis es la inhibición de secreción de MSH, de los melanotropos, localizados en el lóbulo intermedio (Lerant *et al.*, 1996).

5.2.4. PRL

Como se ha mencionado con anterioridad, los lactotrofos, producen PRL, que es una hormona polipeptídica formada por 199 aminoácidos. Una comparación de secuencias homólogas del contenido de aminoácidos demuestra que, entre especies, existe un alto grado de variación entre mamíferos y no mamíferos. Otro aspecto de su composición es que la estructura cuaternaria de la proteína es similar a la de GH (Keeler *et al.*, 2003). Una de sus principales funciones de esta hormona, es la activación de producción de leche en hembras. Por otra parte, se ha reportado que el incremento en los niveles de PRL es común cuando existe un tumor (Keeler *et al.*, 2003).

Los receptores de PRL también son expresados en las neuronas dopaminérgicas, funcionando con un mecanismo de regulación negativo. Al incrementar los niveles de PRL, esta fomenta la expresión de tirosin-hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de DA, incrementando su expresión y controlando así, los niveles de producción de PRL. En otras palabras, todos los factores que incrementan la secreción de PRL, también generan la producción de DA y su liberación, esto incluye a los estrógenos, y lactogenos placentarios (Freeman *et al.*, 2000). Los estrógenos incrementan la producción de PRL, mediante la reducción de la expresión de receptores a DA. Contrariamente, los lactogenos placentarios, inhiben la producción de tirosin-hidroxilasa y por lo tanto, la formación de DA (Demarest *et al.*, 1983) (Fig 9).

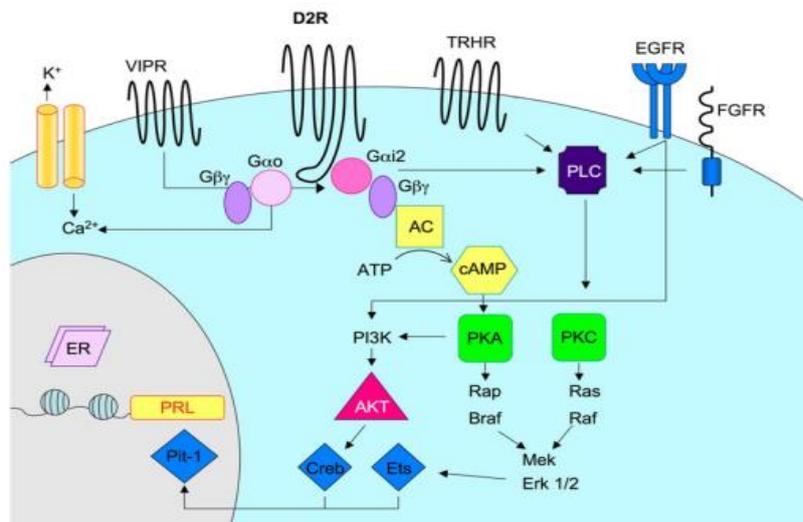


Figura 9. Vía de señalización de la síntesis de PRL por estrógenos e inhibida por DA. Receptores transmembranales en lactotrofos, D2, TRHR, VIPR. Canales de K⁺ y receptores de estrógenos. Modificado de (Melmed, 2010)

5.2.5. Síntesis de PRL

El polipéptido PRL, se encuentra arreglado en una cadena simple de aminoácidos con tres puentes disulfuro, conservados entre los residuos cisteína. El plegamiento de la misma, forma cuatro alfa hélices antiparalelas, similar a la estructura terciaria de GH (Keeler *et al.*, 2003). Sin embargo, el patrón de síntesis de la misma, varía de acuerdo a la demanda fisiológica del organismo.

Las modificaciones post-trasduccionales, como la glicosilación, fosforilación, unión proteolítica, y polimerización, influye directamente en su estabilidad, y en la unión al receptor (Tuazon *et al.*, 2002).

La PRL se fosforila en el aminoácido serina en la posición 194 y 163. Este proceso puede reducir su actividad, aunque existen reportes en los que se muestra que pueden existir isoformas de PRL, fosforiladas y no fosforiladas durante etapas del ciclo estral, y algunas fases reproductivas en macho, sugiriendo que esta modificación tiene un significado funcional (Williams *et al.*, 2007). Además, la

glicosilación de PRL, también se muestra variante, de acuerdo a la alta o baja demanda requerida por el organismo (Sinha, 1995).

6. Secreción hormonal hipofisaria

Hasta ahora se ha abordado el tema de secreción de manera somera, nombrando únicamente las hormonas que se secreta en los distintos grupos celulares, y en específico tirotropos y lactotropos. Pero existe toda una maquinaria de señalización que involucra la activación de canales transmembranales de las células endócrinas, permitiendo que un estímulo de factor hipotalámico de paso a la secreción de hormonas hipofisarias.

6.1. Canales iónicos en la hipófisis

Al ser las células endócrinas células excitables, son capaces de producir un potencial de acción, a través del intercambio de iones transmembranales. Uno de los procesos que este intercambio provoca está involucrado en la exocitosis, mediante el flujo de calcio intracelular [Ca^{2+}]_i, regulado por canales dependientes de voltaje (VGCC) presentes en la membrana plasmática (Van Goor *et al.*, 2001).

Más aún, existen otros canales iónicos característicos de las células excitables, que son expresados en las células endócrinas de la hipófisis. Estos pueden ser: dependientes de voltaje, como los de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ ; canales de Cl^- y transportadores; receptores de IP_3 y Rianodina, y canales controladores STIM (Stojilkovic *et al.*, 2010).

Los VGCC poseen dos funciones principales, la regulación y la producción de actividad eléctrica por el intercambio de iones. Electrofisiológicamente se encuentran divididos en dos grupos: el primero, conocido como los canales activados por alto voltaje, que requieren una despolarización fuerte para poder modificar su estructura y abrirse. Dentro de este grupo se encuentran los canales tipo L-,N-,P/Q- y R. El segundo grupo, se conoce como canales activados por bajo voltaje, y se necesita una corriente de despolarización baja para su apertura, por lo que una despolarización fuerte, puede provocar incluso su inactivación. Dentro de este grupo se ubican los canales del tipo T- (Stojilkovic, 2010).

6.2. Secreción en tirotropos

Como se ha mencionado, los receptores a factores hipotalámicos que poseen las células endócrinas son GPCR's, y su acción trabaja en conjunto con los canales Ca^{2+} dependientes de voltaje. Cuando la TRH se une al TRH-R en la membrana plasmática de los tirotropos, la subunidad α de la proteína Gq/11, se disocia y activa la fosfolipasa C (PLC), resultando la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) y la producción de segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5-trifosfato (InsP₃). Este último genera la movilización de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, mientras que DAG activa la proteína kinasa C (PKC), que fosforila factores de transcripción, activando la transcripción de la subunidad β de TSH y, reduciendo la despolarización membranar a través del flujo de Ca^{2+} . La PKC también se encuentra involucrada en la síntesis de maquinaria de secreción, aunado a su participación en el proceso de exocitosis y el rearrreglo del citoesqueleto, posterior a este proceso (Fig. 10).

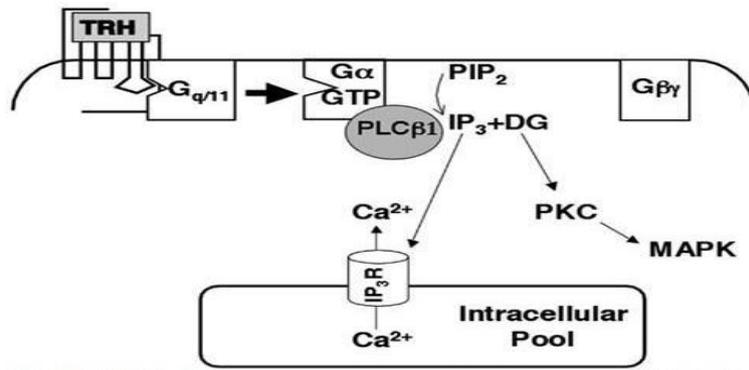


Figura 10. Vía de señalización de TRH generadora de la síntesis y liberación de Ca^{2+} . Modificado de (Hinkle, 2012).

Por otra parte, en el lumen del retículo endoplásmico los niveles de Ca^{2+} se mantienen altos, debido a la actividad de la bomba SERCA ATPasa saco-RE Ca^{2+} , localizada en la membrana del mismo. En ella, también se encuentran canales de Ca^{2+} que regulan su gradiente de concentración. Los receptores de InsP3 presentes en la membrana del retículo endoplásmico, tienen un papel importante en la liberación del Ca^{2+} almacenado en el lumen del mismo, ya que cuando InsP3 se une a éste, permite la salida de Ca^{2+} por la activación de los canales VGCC, lo que genera un aumento en la concentración citoplasmática del mismo ión. Sin embargo, el InsP3R, también puede controlar la salida de calcio, mediante su bloqueo, dicho proceso ocurre justo después de una liberación exhaustiva (Durán & Fiordeliso, 2013; Hinkle, 2012).

Al aumentar las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol, se fomenta la madurez de las vesículas formadas por el aparato de Golgi, que contienen TSH, sintetizado previamente, lo que permite la exocitosis de su contenido (Stojilkovic, 2005).

6.3. Flujo de Ca^{2+} en Lactotrofos

La vía de señalización en lactotrofos se encuentra regulada por la activación de dos receptores principalmente, TRH-R y D2 donde la señalización de TRH-R, es igual a la de tirotrofos, mientras que cuando la DA se acopla al receptor D2, se produce una inhibición del flujo espontáneo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, (VGCI), inhibiendo la actividad de los canales del tipo T y L y la inhibición de la liberación de PRL.

Los receptores de DA están asociados con proteínas G i/o sensibles a toxina pertussis (PTX). Además de provocar la inhibición de la liberación de PRL, se ha reportado también que la DA puede estimular su secreción, en bajas concentraciones, mediante la generación de la hiperpolarización membranal, fomentando el incremento de Ca^{2+} a través de los canales VGCC tipo L principalmente, propiciando así la liberación de PRL (Christensen *et al.*, 2011; *et al.*, 2008; Missale *et al.*, 1998).

Por otra parte, otra de las vías que se ven afectadas, en la activación de D2 es la acción de dos mensajeros intracelulares cAMP y Ca^{2+} , que participan en el control de la fusión vesicular con la membrana plasmática, y su consecuente liberación hormonal. La dopamina, también inhibe la actividad de la adenilciclase (AC), lo cual contribuye a la inhibición de la síntesis de PRL (Fig. 9) (Gonzalez-Iglesias *et al.*, 2008).

7. Rol de la hipófisis ante cambios fisiológicos

Las funciones de la hipófisis son de gran importancia durante los cambios fisiológicos de los organismos, como la regulación del crecimiento, el metabolismo, lactancia, respuesta al estrés y reproducción (Le Tissier *et al.*, 2012). Estos cambios se ven alterados en las distintas etapas de crecimiento, es decir, en mamíferos, los cambios más evidentes son: la pubertad, donde se incrementa el desarrollo gonadal y la actividad de las glándulas adrenales; la madurez, en donde la hormona del crecimiento sigue haciendo su función en cambios anatómicos del esqueleto, al igual que LH y FSH, en el establecimiento de los ciclos reproductivos, así como también se maximiza la actividad tiroidea; en hembras, también se da un cambio importante fisiológico durante el embarazo y lactancia; y por último la senectud (Finch, 1976).

7.1. Ciclo estral

En la mayoría de los mamíferos, al ciclo reproductivo en hembras, se le conoce como ciclo estral. Existen cuatro fases de este ciclo: proestro, estro, diestro 1 (metaestro), diestro 2, teniendo una duración de 4 a 5 días, en roedores. En humanos y en general en primates, se le conoce como ciclo menstrual y tiene una duración de aproximadamente 28 días. La principal regulación del mismo depende del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Cuando la GnRH es liberada del hipotálamo, se estimula y lleva a cabo la secreción de LH y FSH, que viajarán por el torrente sanguíneo hasta llegar a sus respectivos receptores en los ovarios (Caligioni, 2009). Una vez recibidas, los folículos ováricos secretan E2 (estrógenos) que viajan al hipotálamo, generando un nuevo estímulo, esta vez no solamente de GnRH sino también de TRH, por lo que se añan a este proceso los lactotrofos y tirotrofos. La regulación mediada por estrógenos, abarca tanto a la actividad de las neuronas GnRH, como también a la secreción de PRL, ya que esta puede llegar directamente a los lactotrofos y estimular su secreción, como anteriormente se ha descrito (Caligioni, 2009; De Léan *et al.*, 1976).

En cada una de estas fases el ovario, útero y la vagina sufren distintos cambios, involucrados en la preparación de la ovulación. Es decir, durante proestro, las células epiteliales nucleadas, predominan en las citologías vaginales. Esta etapa corresponde al día de pre-ovulación, cuando E2 incrementa y por la noche, como consecuencia, existe un pico de secreción de LH y FSH, que dan partida a la ovulación. En el ovario los folículos crecen rápidamente, debido a estos estímulos hormonales, mientras que el útero se vuelve más vascularizado, y los leucocitos desaparecen de la mucosa. Además las glándulas endometriales se hipertrofian; en la vagina, el epitelio se adelgaza. En estro, los niveles de estrógenos disminuyen, pero existe el primer pico hormonal de prolactina. En el ovario, la ovulación ocurre justo 10 hrs después de entrar en esta fase; el útero gana más vasculatura, y las células epiteliales se desarrollan al máximo. El frotis vaginal se caracteriza por células epiteliales cornificadas anucleadas (Caligioni, 2009).

Al inicio del metaestro, los niveles hormonales que prevalecen son los de progesterona y corresponde al inicio de la fase de activación del cuerpo lúteo, aunado a este pico hormonal, está el incremento de estrógenos nuevamente, que facilita esta activación. En el ovario se encuentran varios cuerpo lúteos formados que secretan esporádicamente y en corto tiempo, pequeños folículos; el útero decrece en tamaño y aumenta su vasculatura; en el frotis vaginal se encuentra una mezcla de los tres tipos celulares, hasta ahora mencionados (Fig. 11c,b). Por último en diestro, todos los niveles hormonales permanecen bajos, a excepción de los de progesterona, correspondiente a la fase lútea terminal. La regresión del cuerpo lúteo se da a partir de la salida de esta fase, y el decaimiento de progesterona. En el ovario, se encuentran pequeños folículos presentes con cuerpos lúteos aún; el útero permanece pequeño y poco vascularizado; el frotis vaginal es predominado por leucocitos (Fig. 11) (Caligioni, 2009; Byers *et al.*, 2012; McLean *et al.*, 2012).

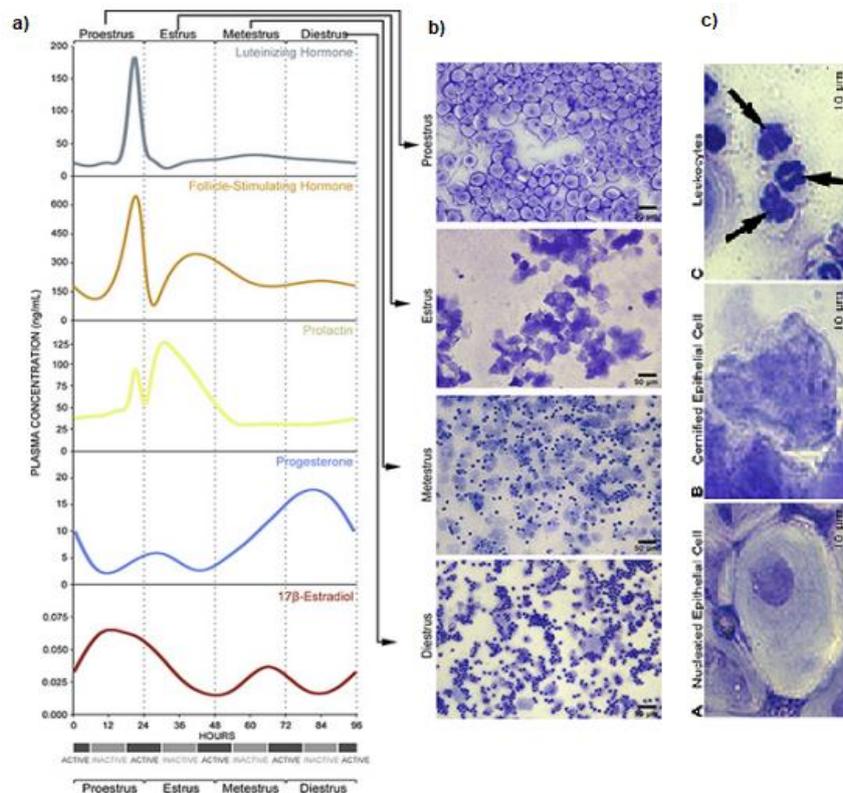


Figura 11. Representación de los cambios citológicos durante las distintas fases del ciclo estral. a) Picos hormonales de (LH, FSH, PRL, progesterona y 17-B estradiol), a lo largo de las fases del ciclo estral. b) Cambios en la población celular de las citologías en cada fase del ciclo estral. c) Representación de los tres tipos celulares que se observan en las citologías vaginales en a). A) Células epiteliales nucleadas presentes en Metaestro y en Proestro; B) Células cornificadas presentes en Metaestro, Estro; C) Leucocitos presentes en Proestro, Metaestro y Diestro. Modificado de (McLean *et al.*, 2012)

8. Rol endócrino de lactotropos y tiotropos en la lactancia y ciclo reproductivo

Algunos estudios sobre la estimulación hormonal en el ciclo reproductivo de modelo murino sugieren que durante el incremento en los niveles de PRL, es decir en las fases proestro y estro, existe una estimulación directa de las neuronas TRH en el hipotálamo, que a su vez generan la liberación de PRL desde el estímulo de lactotropos. Sin embargo, como se mencionó previamente, la TRH puede generar un estímulo tanto en lactotropos como en tiotropos, por lo que también se ha reportado que los cambios en los niveles de TSH en suero sanguíneo, de modelo murino, tienen un ligero cambio a lo largo del ciclo reproductivo, siendo más altos en proestro y estro, consecutivamente. Mientras que en metaestro y diestro estos niveles permanecen bajos (De Léan *et al.*, 1977).

PRL es bien conocida como la principal hormona estimuladora de lactancia en el ciclo reproductivo incluyendo la mamogénesis (desarrollo de las glándulas mamarias), lactogénesis (síntesis de leche), galactopoyesis (frecuencia de la secreción de leche). El mayor estímulo que afecta la secreción de PRL es la succión por lactancia, ya que mediante la contracción de músculos se emite un estímulo electroquímico que favorece su producción, incluso éste puede ser tan eficiente y llevar a cabo la supresión de la acción inhibitoria de DA, en caso de alta demanda de PRL (Sheward *et al.*, 1985).

Sin embargo, también juega un rol importante en la ovulación, teniendo actividad luteotrófica y luteolítica. También se le ha relacionado con el comportamiento reproductivo, involucrando al cuidado parental (Freeman *et al.*, 2000).

En roedores se ha estudiado la actividad de PRL, en el ciclo reproductivo, sobre todo en la función lútea, justo antes de la ovulación. Su acción luteotrófica puede mantener la estructura y función del cuerpo lúteo 6 días después del apareamiento (Freeman *et al.*, 2000). Dicha acción se ve enriquecida por la secreción de progesterona. A su vez, PRL puede incrementar la secreción de progesterona mediante dos vías: potencializando los efectos esteroideogénicos de LH en las células luteales y bloqueando la vía de inactivación de progesterona (Fig.12) (Smith *et al.*, 1976).

Por otra parte, el rol luteolítico de PRL tiene lugar en la inducción de la muerte programada del cuerpo lúteo, a través de la regulación del incremento de linfocitos, especialmente en la etapa de proestro, del ciclo estral (Freeman *et al.*, 2000). Si bien este mecanismo por el cual PRL puede ser luteotrófica como luteolítica, aún permanece incierto.

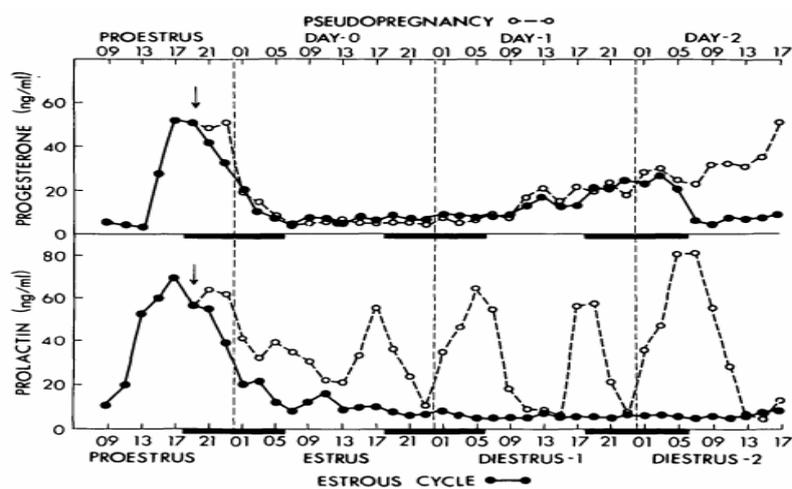


Figura 12. Comparación de los niveles de prolactina y progesterona en suero sanguíneo de ratas estudiadas en dos condiciones: pseudopreñadas y controles, a lo largo del ciclo estral, donde se muestra un pico hormonal simultáneo de prolactina y progesterona. Especialmente en proestro, en ambas condiciones. Modificado de (Smith *et al.*, 1976)

La TSH tiene también su acción en la lactancia, ya que puede beneficiar el estímulo de secreción de PRL, pero no es indispensable, ya que en su ausencia, este proceso puede seguirse efectuando (Sheward *et al.*, 1984).

No obstante, la acción de TSH durante el ciclo estral no está directamente involucrada con la ovulación, pero sí con la regulación fisiológica del organismo en este ciclo. Como se había mencionado, durante este ciclo, existe la liberación de diversas hormonas esteroideas, entre ellas, los estrógenos. Aproximadamente un 10% de las células endócrinas poseen receptores a estrógenos, y entre estos se encuentran los tirotropos. De hecho en (Oishi *et al.*, 1993), se afirma que la capacidad de proliferación celular endócrina, sufre cambios a lo largo del ciclo estral, teniendo mayor cambio tanto lactotropos por gonadotropos. Sin embargo, los tirotropos incrementan su población también en estro, donde existe el mayor pico de secreción de estrógenos, en el ciclo estral (Sekulić, 2003).

II. Antecedentes

1. Plasticidad funcional y Mecanismos de regulación

Los antecedentes de este estudio se destacan por la descripción de cada uno de los mecanismos que regulan la función hipofisaria. Una de ellas es la materia prima de todas las demás, y es la comunicación celular. Existen tres principales vías de información entre las células endócrinas, la autocrina, paracrina y yuxtacrina. La comunicación autocrina, existe mediante la liberación de factores, generalmente péptidos, que son reconocidos por la misma célula que las secretó, de manera autorregulatoria, como la endotelina, vasopresina y angiotensina II, en tirotropos y lactotropos, que regula la propia liberación de TSH y PRL, respectivamente (Schwartz & Cherny, 1992). La comunicación paracrina, se caracteriza por la señalización, ya sea molecular, o iónica, que se da de una célula hospedera a otra célula vecina. Esta vía de comunicación, se limita a las células cercanas, por lo que es considerada una comunicación local (Fig.13a). Algunos de estos factores son péptidos, pero también hay mensajeros químicos, como GABA y glutamato. Dichos mensajeros químicos son capaces de alterar la actividad de $[Ca^{2+}]_i$, por su interacción con los canales (VGCC). Un ejemplo de factores parácrino en tirotropos y lactotropos es, VIP (péptido intestinal vasoactivo), que promueve la secreción de PRL, y GH, o la galanina, que también se secreta a partir del estímulo de TRH, y puede activar a gonadotropos, somatotropos y lactotropos (Alberts *et al.*, 2008; Hodson *et al.*, 2012; Schwartz & Cherny, 1992). Finalmente, la comunicación yuxtacrina (Fig. 13b), la cual requiere de una comunicación cercana membrana con membrana con la célula vecina, para permitir la llegada de los factores yuxtacrinos. Generalmente se le atribuye la acción de receptores membranales como principales vías de transmisión. Uno de los mayores factores yuxtacrinos conocidos en la adenohipófisis es la anexina 1, que se expresa en las células foliculoestrelladas (Hodson *et al.*, 2012).

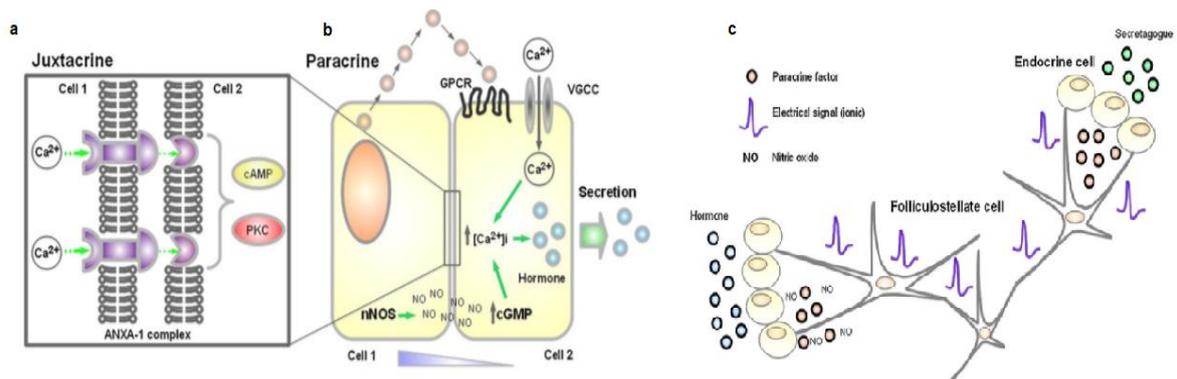


Figura 13. Principales tipos de comunicación en células endócrinas. a) Comunicación yuxtacrina en la cual se comunica a través de canales iónicos de una célula vecina a otra. Se muestra que el principal ión activador es el $[Ca^{2+}]_i$. b) Comunicación parácrina, en donde una célula puede activar a otra célula vecina a través de metabolitos o moléculas secretadas activadoras de GPCR's. c) Comunicación a distancia favorecida por las células foliculoestrelladas que permiten la transmisión de señales eléctricas entre células endócrinas lejanas. En este caso las células endócrinas son capaces de activar a las foliculoestrelladas por factores parácrinos, entre ellos el óxido nítrico. Modificado de (Hodson *et al.*, 2012)

También existen otras vías de comunicación ya sea por uniones gap, o bien, las mismas conexiones de las células foliculoestrelladas, que como se describieron desde el inicio, son las únicas que poseen prolongaciones citoplasmáticas en la adenohipófisis. Las uniones gap, pueden transmitir señales tanto metabólicas como eléctricas entre células. Están compuestas por seis unidades de proteínas conocidas como conexinas. La conductancia a través de estas uniones es dependiente de

cambios en la fosforilación, voltaje e incluso señalización de Ca^{2+} siendo así regulada por diversos factores. Inclusive factores de regulación de $[Ca^{2+}]_i$, pueden ser transmitidos a través de estos poros proteicos, activando la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en otras células (Hodson *et al.*, 2012).

Por otra parte, las células foliculoestrelladas, pertenecientes al grupo celular no endócrino, tienen una densidad poblacional del 10 % en la adenohipófisis, y su rol principal, es brindar soporte a la glándula, además de que son capaces de cambiar su potencial de acción, indicando cambios espontáneos de $[Ca^{2+}]_i$. Debido a que estas células, también se encuentran conectadas entre sí mediante uniones gap, son capaces de propagar una señal eléctrica por grandes distancias. Sin embargo, la acción exacta por la cual esta propagación de señal puede llegar a comunicar células endocrinas distantes, aún es poco clara (Hodson *et al.*, 2012; Hodson *et al.*, 2012).

1.1. Densidad poblacional

Se ha abordado someramente la capacidad de proliferación en las células endócrinas siendo que algunos grupos endocrinos tienen mayor facilidad proliferativa que otros, como son los lactotrofos, somatotrofos y gonadotrofos. Esta acción generalmente está asociada a un estímulo o aumento en la demanda fisiológica. Como lo explica (Oishi *et al.*, 1993; Le Tisier *et al.*, 2012), en modelo murino, las hembras, durante la lactancia aumentan sus densidad poblacional de lactotrofos, y gonadotrofos. Así mismo a lo largo del ciclo estral existe un reajuste de poblaciones endocrinas que favorecen su funcionamiento. Este proceso se encuentra regulado, por la asas de retroalimentación correspondientes a cada eje hipotálamo-hipófisis, pero también puede verse estimulado por las vías de comunicación mencionadas arriba. Otro ejemplo de esto es el aumento de somatotrofos durante uno de los cambios fisiológicos más importantes, la pubertad (Fig. 14).

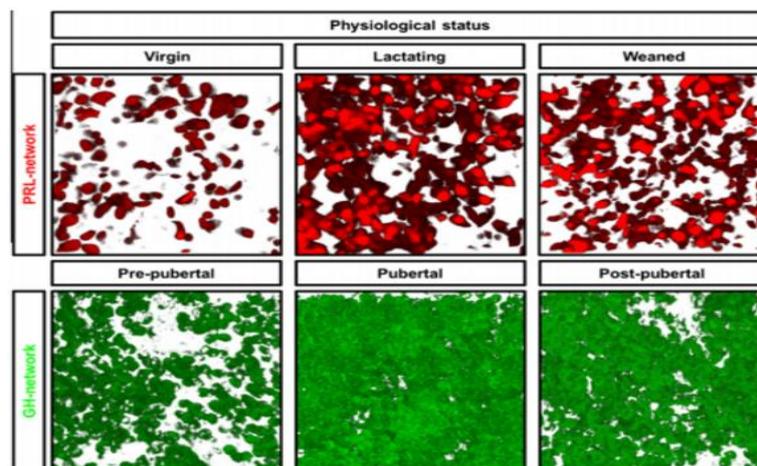


Figura 14. Cambios en la densidad poblacional de lactotrofos (en rojo) y somatotrofos (en verde) en modelo murino. Se observa que en la red de lactotrofos, durante la lactancia la población celular incrementa, y una vez que para comienza a normalizarse. En la red de somatotrofos, el punto de mayor densidad está justo en la pubertad e incluso prevalece un poco pasando esta etapa. Modificado de (Le Tisier *et al.*, 2013).

1.2. Multifuncionalidad y transdiferenciación

Otro mecanismo de regulación endócrina en la hipófisis es la multifunción, lo que quiere decir que las células endócrinas dejan de ser tan específicas en su secreción y activación, teniendo secreción paradójica (secreción hormonal no correspondiente), y multirrespuesta (activándose por factores hipotalámicos no correspondientes).

Se ha reportado que algunas células endócrinas son capaces de liberar y almacenar más de una hormona, y de ser estimuladas por más de un factor hipotalámico, promoviendo así la secreción paradójica, por ejemplo, existen lactotrofos que pueden producir y liberar GH y PRL (Núñez *et al.*, 2003), aunado a la presencia de más de un tipo de receptor a factores hipotalámicos, que permite el estímulo de secreción (Melmed, 2010). Los tirotrofos se han caracterizado como grupo polihormonal, ya que pueden sintetizar, GH, ACTH, e incluso PRL. Este evento se da generalmente cuando existe un impulso fisiológico, un ejemplo de esto es el estrés por frío, generando la producción de ACTH en tirotrofos, o el hipotiroidismo, que puede generar la síntesis y liberación de GH, ambos como un mecanismo de compensación (Villalobos *et al.*, 2004).

Por otro lado, la transdiferenciación en células endócrinas, también es común ante alteraciones fisiológicas. Este proceso implica que algún grupo celular puede ser capaz modificarse y diferenciarse en otro grupo celular endócrino. Estas células, expresan distintos mRNAs que permiten la transcripción de más de una hormona, no necesariamente específica, bajo cierto estímulo. Sin embargo, resulta incierto cómo es que una tipo celular endócrino pasa a ser otro, ya que hasta ahora sólo existen registros de somatotrofos que también reaccionan a TRH y secretan PRL, es decir, somatolactotrofos, o que pueden secretar LH y FSH y ser estimulados por GnRH, somatogonadotrofos. Ambos son considerados como una etapa de transición que involucra la transdiferenciación, eventualmente (Villalobos *et al.*, 2004; Chills, 2002).

2. Redes

Las redes o grafos se pueden definir coloquialmente como un conjunto de objetos que tienen una relación de comunicación u otro tipo de interacción, es decir una conexión, entre sí, por la cual se difunde información, desde un objeto a otro. Estas han sido aplicadas en análisis de distintos sistemas, ya sean sociales, económicos, políticos, y por supuesto biológicos. En sistemas biológicos se han aplicado análisis de redes con distintos enfoques, ya sea en la codificación génica o proteica, en interacciones conductuales, epidemiología, virología, comunicación celular, entre otros. Su aplicación, favorece la descripción de diversos sistemas, como los nombrados anteriormente, ya que permite una aproximación a sus componentes de interacción. Por ejemplo, en los mapas celulares se puede estimar con detalle la lista de interacciones que intervienen en la comunicación célula-célula, mediante las uniones celulares, como las mencionadas en el apartado II.1: uniones GAP, estrechas, adhesinas, entre otras (Barabási, 2016; Le Tissier *et al.*, 2012; Ruohonen, 2003).

El origen de la teoría de grafos o redes, tuvo lugar en 1735 en Königsberg, al este de Prussia, donde Leonhard Euler, matemático suizo, dio una solución a la problemática de esa región, ya que en ese momento se habían construido siete puentes a través del río Pregel, que rodeaba la ciudad. Cinco de estos, se conectaban con la isla Kneiphof, los otros dos, unían otra zona del río. Este arreglo permitió abrir una importante interrogante: ¿Se podía atravesar los siete puentes sin nunca cruzar más de una vez, alguno?

Euler representó cada una de las cuatro áreas separadas por el río, con las letras A-D, enseguida conectó con líneas de acuerdo a las localizaciones de puentes, así construyó un grafo cuyos nodos eran las áreas y las conexiones los puentes. Con una simple observación, desarrolló las vías más cortas en las que se podía atravesar dichas áreas, sin cruzar más de una vez el mismo puente (Fig.

15). Cada vía tuvo un inicio y un fin, además de que no existía ningún nodo sin unión. Así, se usó un grafo, por primera vez, en la solución a un problema con visión matemática, probando dos mensajes importantes: muchos problemas pueden ser más simples si se representan con un grafo; y el segundo, la existencia de vías o caminos no depende de la ingenuidad de encontrarlas, pero ésta es una propiedad de los grafos (Barabási, 2016).

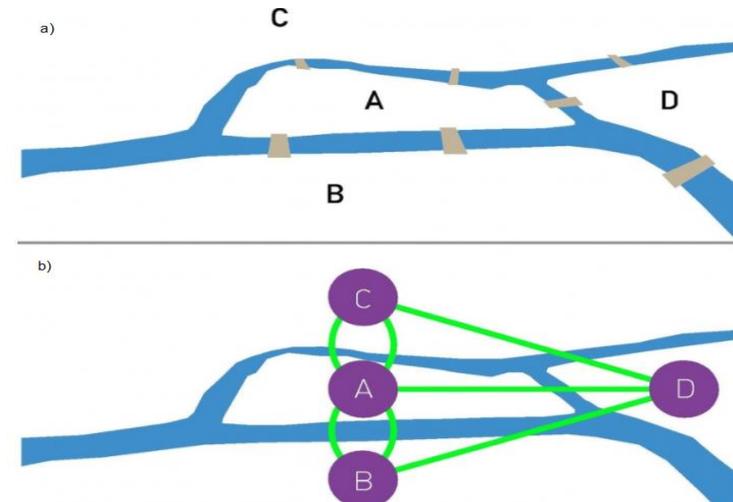


Figura 15. Representación del ejemplo de puentes en la región de Prussia. a) Esquema de las regiones denominadas por las letras A-D, con sus respectivos puentes. b) Esquema descrito por Leonhard Euler en 1735, modificando las regiones en nodos y los puentes en conexiones. Modificado de (Barvási, 2016)

Podemos definir a un grafo G como un sistema de triple orden $(V(G), E(G), \psi_G)$. Donde $V(G)$, corresponde a la cantidad de vértices o nodos que lo conforman, $E(G)$ las conexiones que unen a cada uno de estos nodos, y ψ_G la incidencia de conexión de cada unión. Es decir si e es una unión, y u y v son nodos, $\psi_G(e) = uv$. Ejemplo:

$$G = (V(G), E(G), \psi_G)$$

Donde :

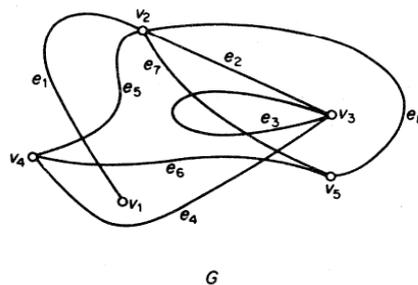
$$V(G) = \{v_1, v_2, v_3, v_4, v_5\}$$

$$E(G) = \{e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6, e_7, e_8\}$$

Y ψ_G está definida por:

$$\psi_G(e_1) = v_1v_2, \psi_G(e_2) = v_2v_3, \psi_G(e_3) = v_3v_3, \psi_G(e_4) = v_3v_4$$

$$\psi_G(e_5) = v_2v_4, \psi_G(e_6) = v_4v_5, \psi_G(e_7) = v_2v_5, \psi_G(e_8) = v_2v_5$$



Las uniones de una red, pueden tener o no dirección, es decir una red que tiene todas sus conexiones con dirección, se le conoce como red direccionada, un ejemplo de ellas, son las redes génicas, donde se sabe que factor de regulación activa o inhibe a un gen (Martin *et al.*, 2016). Por otro lado, las redes cuyas uniones no poseen ninguna dirección, son conocidas como no direccionadas; muchas de ellas pueden estar en las redes neuronales o en general en la comunicación celular (Barabási, 2016; Bondy & Morty, 1976). Existen tres parámetros que describen de forma general las características de las redes. Una es el grado de conexión, en donde se representa el número de uniones que conectan a cada nodo. Formulando esta idea, se denota k_i , siendo i el i ésimo nodo de la red ($k_1 = 2$, $k_2 = 3$, $k_3 = 2$, $k_4 = 1$). En una red no direccionada el número total de uniones, puede expresarse como:

$$L = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N k_i$$

Donde al tomar $\frac{1}{2}$ de la suma de las uniones, elimina el conteo doble de la misma, evitando la sobreestimación de conexiones.

El segundo parámetro es el promedio de conexión, que en redes unidireccionales, es estimado a partir de L :

$$\langle k \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N k_i = \frac{2L}{N} \quad \text{Donde:}$$

$$\langle x \rangle = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_N}{N} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

Al tomar $1/N$ de la suma, se estandariza el promedio a la muestra total tomada de la red de interés. Por último, el parámetro que indica la probabilidad que un nodo elegido aleatoriamente, esté conectado en la red, se conoce como la distribución de conectividad p_k . En una muestra infinita:

$$\sum_{k=1}^{\infty} p_k = 1$$

Para aquellas redes cuya muestra de nodos es finita (N), que es el caso de la mayoría de las redes en la naturaleza, esta probabilidad está dada por:

$$p_k = \frac{N_k}{N}$$

Donde N_k es el número de grado del nodo k , es decir, la cantidad de conexiones que tiene un nodo, sobre el número total de nodos (Barabási, 2016; Ruohoen, 2003).

2.1. Redes en la adenohipofisis

Desde los años 80's, se empezó a analizar muchos sistemas naturales con la teoría de grafos. Sin embargo, en los sistemas biológicos, se aplicó por primera vez en las neurociencias, y a la fecha se siguen haciendo análisis de redes neuronales, con el fin de entender la complejidad del funcionamiento cerebral, así como el nivel de plasticidad neuronal que implica (Barabási, 2016).

Actualmente se sabe que el sistema de la hipófisis tiene una estructura tridimensional, en la cual interactúan todos sus componentes celulares, lo que permite ampliar la perspectiva de estudio y de conocimiento sobre la regulación que en ella se lleva a cabo. Desde el 2010, varios estudios han afirmado la presencia de redes endócrinas en la hipófisis (Fig. 16), principalmente en grupos celulares como lactotrofos, y somatotrofos (Fauquier *et al.*, 2001; Hodson *et al.*, 2010; Hodson *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2010; Schaeffer *et al.*, 2011), teniendo en consideración las vías de comunicación celular que existen (Fig. 13) además de la facilidad que brinda la comunicación de los grupos endócrinos con las células foliculoestrelladas. Por esto, las redes endócrinas han sido consideradas como otro tipo de regulación de la glándula, enriqueciendo su nivel de plasticidad. Ya que fortalece la explicación de la presencia de los picos hormonales, o aumento de secreción, que se observan en diferentes etapas fisiológicas, como en el ciclo reproductivo Fig.(11 y 12). Es decir la presencia de dichos aumentos de secreción, no están dados por la secreción de sólo un conjunto de células en la hipófisis, sino que se encuentran comunicadas e inclusive en muchos casos, en coordinación, lo cual favorece la presencia de los mismos (Bonfont *et al.*, 2005). La mayoría de estos estudios, están hechos mediante un análisis global heurístico, es decir, se describen los tres parámetros de redes arriba mencionados y descritos. Por ejemplo, en el estudio de (Hodson *et al.*, 2010) se describe de forma general la función celular endócrina, y el tipo de redes que se pueden caracterizar si se aplica un análisis heurístico global, como redes aleatorias, de libre escala y de simple escala (Fig.16) (Apéndice 1). No obstante la descripción de las redes, resulta compleja. Afortunadamente, ahora existen otros métodos que ayudan a su descripción desde su morfología, mediante la aplicación de topología aunado al análisis heurístico cotidiano, arrojando parámetros comparativos en la estructura *in situ* de la red. A este tipo de análisis se le conoce como heurístico local, o small world networks (Pržulj, 2007).

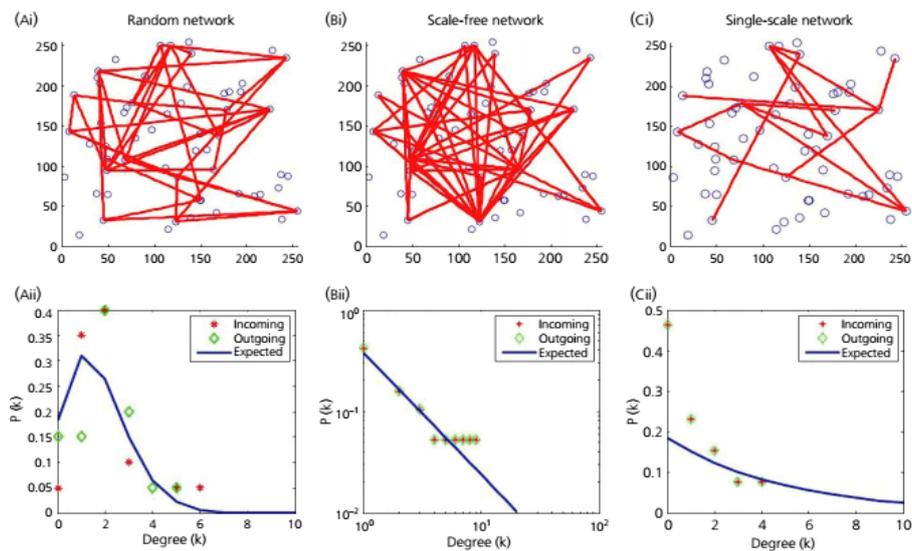


Figura 16. Caracterización de las redes, según su probabilidad de conexión. Ai y Aii) Corresponden a una red aleatoria, donde la tendencia de la probabilidad es una función Poisson. Bi y Bii) Red de libre escala, en donde su función de probabilidad es una función exponencial. Ci y Cii) Red de simple escala, cuya función de probabilidad es casi lineal. Modificado de: Hodson *et al.*, 2010.

2.2. Complejidad y relevancia

La necesidad de la ampliación del conocimiento que respalde la descripción de la naturaleza fomenta que la aplicación del estudio de redes se haga interdisciplinario, participando ciencias de la computación, matemáticas, y biología.

Muchas de las redes aplicadas en sistemas biológicos, como en epidemiología, son de suma importancia en la detección temprana de patologías. Así mismo, las redes de transcripción génica han permitido un avance de la genética y biotecnología, puesto que arrojan una visión más extensa de las vías que regulan la expresión génica. Y por supuesto las redes neuronales siguen siendo tan rebuscadas e investigadas, por el acercamiento que brinda al funcionamiento del cerebro, inclusive, muchos estudios al respecto, han aplicado nuevas herramientas para descifrar dicho funcionamiento, como la inteligencia artificial (Barabási, 2016; Cross, 2017; Pržulj, 2007).

De acuerdo con (Pržulj, 2004), la descripción de las redes se puede hacer mediante la comparación de los parámetros obtenidos mediante dos métodos: el análisis heurístico global, que consiste en el conteo de las conexiones que existen en la red, es decir en la descripción de una distribución de conectividad (Fig. 16), la densidad promedio de los nodos vecinos, o el coeficiente de agrupamiento, o bien, calculando la longitud promedio de las vías más cortas de conexión entre pares de nodos; y el análisis heurístico local, que implica el análisis de conexión entre supgrupos de la red, graphlets (Fig.17). La comparación de estas métricas podría ayudar a la descripción de las redes, ya que resulta sencillo determinar cuándo dos redes son distintas con el método heurístico global. (Pržulj, 2007).

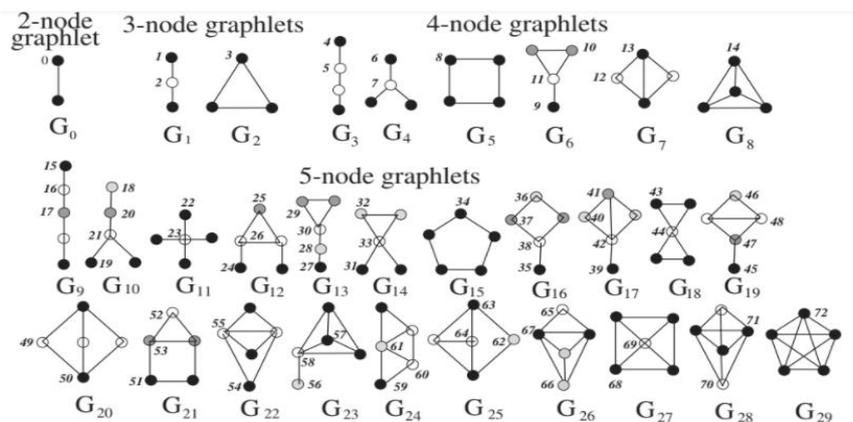


Figura 17. Representación de las diversas subformas en las que una red de distinto grado (G₁, G₂, G₃, G_i), puede conectarse. (Pržulj, 2007)

III. Planteamiento del problema

Como se ha reportado la adenohipófisis posee diferentes vías de regulación que favorecen su plasticidad funcional, siendo una de ellas la formación de redes endócrinas. Ya que uno de los principales cambios fisiológicos que se presenta en los organismos es durante el ciclo reproductivo, se ha tomado al ciclo estral y a la lactancia como condiciones principales que pueden modificar el funcionamiento de la glándula, específicamente en la actividad y organización de los grupos endócrinos, en este caso tirotrópos y lactotrópos. Anteriormente se han descrito redes de somatotrópos y lactotrópos en diferentes condiciones fisiológicas. No obstante el método de experimentación que se ha aplicado para su estudio, es en su mayoría a partir de cultivos celulares. Por ello en el presente trabajo se plantea usar registros en rebanadas de hipófisis, como se han estudiado recientemente en redes endócrinas, manteniendo así la comunicación celular, ya que como se ha descrito en los párrafos introductorios, la hipófisis es un sistema tridimensional, que depende de la comunicación celular endócrina y no endócrina, siendo así el cultivo celular una limitante del funcionamiento natural de la glándula.

Por otra parte el método de análisis que se ha aplicado para la descripción de estas redes, ha permanecido en la explicación de la topología global de la red (análisis global heurístico), por lo que en este caso se ha considerado la topología local (análisis local heurístico) de las mismas, ampliando el campo de caracterización de estas redes, y de las diferencias que se presentan ante los cambios fisiológicos del ciclo reproductivo.

IV. Hipótesis

Dado que se ha reportado que tipos celulares endocrinos, como somatotrópos y lactotrópos, pueden generar redes de conexión como un mecanismo de plasticidad funcional en la hipófisis ante diferentes condiciones fisiológicas; se esperaría que ante la variante demanda hormonal durante el ciclo estral y la lactancia, se modifique la estructura de la red de conexión celular de tirotrópos y lactotrópos.

V. Objetivo general

Obtener y caracterizar la estructura de la red de conexión celular de tirotrópos y lactotrópos en rebanadas de hipófisis de ratones hembra balb-C lactantes y en las fases diestro, estro y proestro del ciclo estral; mediante imagenología de $[Ca^{2+}]_i$.

VI. Objetivos particulares

- Identificar los tipos celulares a través de la diferenciación en la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$, en rebanadas de hipófisis de ratones hembra balb-C.
- Estudiar las proporciones de ambos grupos celulares a lo largo de cada condición (estro, diestro, proestro y lactante).
- Comparar los valores de área bajo la curva, que se obtuvo en cada concentración de TRH para todas las condiciones.

- Comparar las proporciones de los grupos celulares que tuvieron respuesta en cada concentración, para todas las condiciones.
- Aplicar un análisis de redes celulares a partir de las respuestas de cada grupo celular de interés, ante TRH.
- Caracterizar la estructura de las redes mediante la comparación de métricas correspondientes a un análisis local heurístico.

VII. Método

Animales

Se empleó una $n = 5$, obtenida a partir de una prueba de potencia, de ratones hembra por condición, en la etapa de madurez sexual de la cepa balb-C. Se mantuvieron bajo condiciones de bioterio con agua y alimento *ad libitum*, en periodos 12/12 de luz y oscuridad, bajo los procedimientos que dicta la NOM 062-zoo-1999 de técnicas de reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Las condiciones empleadas, fueron las siguientes fases del ciclo estral: diestro, proestro, estro y a los 7 días después de parir. La determinación del ciclo estral se realizó mediante frotis vaginal.

Diseción de la glándula

El sacrificio de los animales, fue por decapitación, previa anestesia (Pentobarbital sódico - (10-30 mg/kg, ip). Se disectó la glándula hipófisis y enseguida se colocó en ACSF (artificial cerebral soil fluid) (118 mM NaCl, 3.004 mM KCl, 2.501 mM CaCl₂, 25.207 mM MgCl₂, 2.499 mM NaHCO₃ y 11 mM glucosa, 1.087 mM). Posteriormente, se embebió en agar 3%, y se realizaron rebanadas de 130 μ m, en frío y por vibración.

Imagenología de [Ca²⁺]_i

Cada rebanada se incubó con 22 μ M del sensor intensiométrico de calcio acetoximetil de Fluo 4-AM (Invitrogen; Eugene Or, USA) en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St Louis MO, USA), con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Louis MO, USA) en 1 mL de ACSF, durante 30 min, en incubación, a 37°C en una atmósfera humidificada (5% CO₂, 95% O₂). Una vez incubada con Fluo 4-AM, se colocó en una cámara de registro plexiglás, con una capa de poly-L-lisina (30%) (Sigma, St Louis MO, USA). Dicha cámara se conectó a un sistema de perfusión, por el cual pasó cada tratamiento de interés, en la secuencia que se muestra en la (Fig. 18)

El registro de actividad de [Ca²⁺]_i se llevó a cabo en un microscopio estereoscópico de fluorescencia conectado a una cámara CCD, con la que se capturaron 600 imágenes, cada una de 200 ms, por registro efectuado, adquiridas con el programa MicroManager, versión 1.4.20. El registro de actividad basal se llevó a cabo únicamente con la perfusión de ACSF, mientras que en el de actividad celular a las diferentes concentraciones de TRH, se estimuló 20 s después de iniciar la captura de las imágenes, durante 30 s, seguido de la perfusión de ACSF, nuevamente. El estímulo de 100 μ M TRH + 2 μ M DA, se realizó de la misma manera, difiriendo en el intervalo de estímulo, en el que se dejaron 15 s de c/u, uno seguido del otro. Por último, se respetó el mismo intervalo de estímulo para el último tratamiento con alto potasio (KCl 140 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 2 mM).

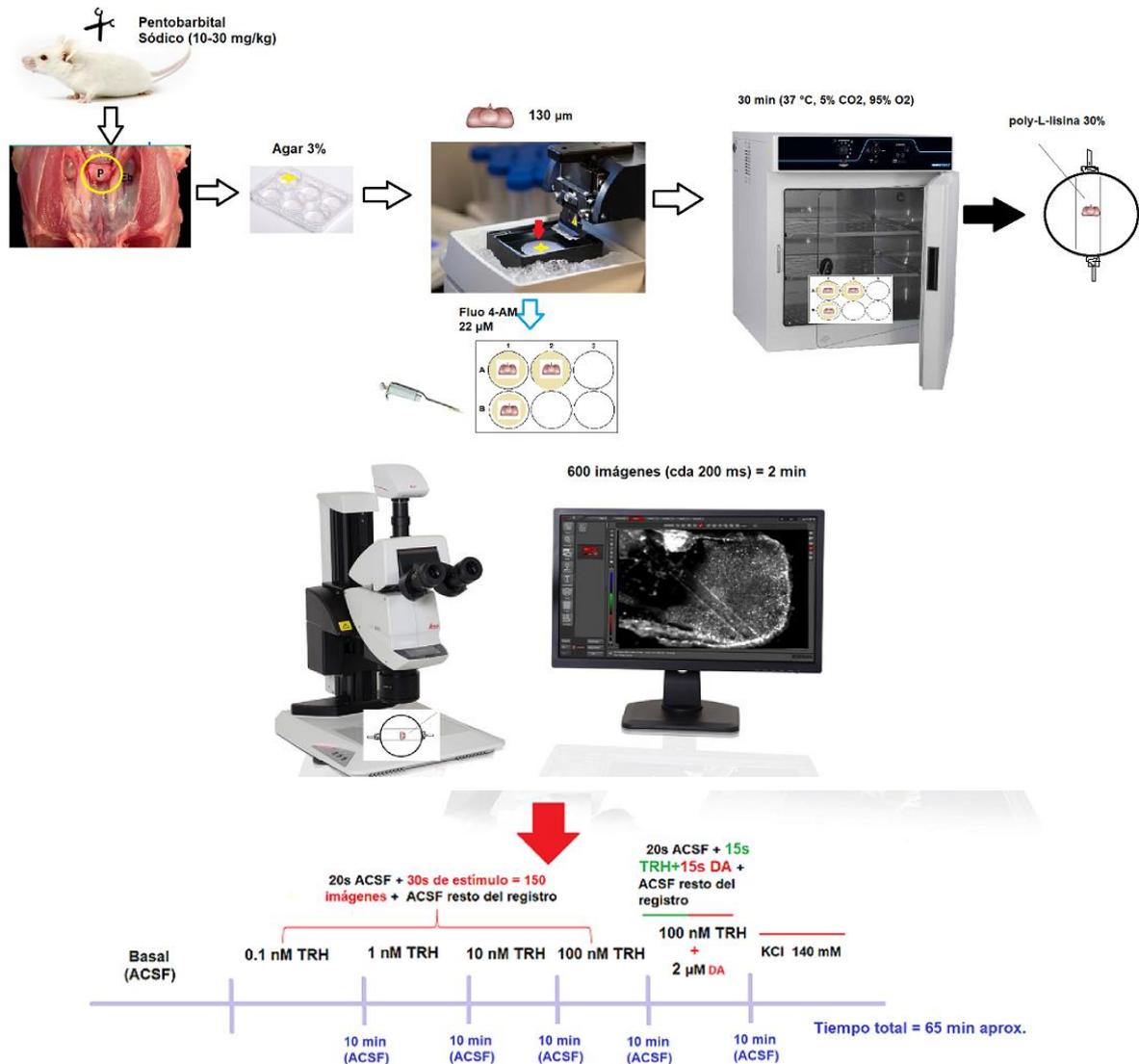


Figura 18. Diagrama del método experimental empleado para el registro de actividad celular por imagenología de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, así como la cronología del registro.

Análisis de las películas de registro de actividad celular por imagenología de Ca^{2+}

Por cada registro por condición realizado se obtuvo una película de actividad celular, que se analizó con ayuda del programa Image J-FIJI, marcando cada célula que respondió a las dosis de hormona agregadas. Adquiriendo una matriz de datos de la fluorescencia emitida en cada tratamiento (Basal, 0.1, 1, 10, 100 nM de TRH, 100 nM TRH + 2 μM DA, y KCl) a lo largo del tiempo de registro (600 imágenes = 2 min), así como las posiciones exactas de cada célula marcada en el plano x, y, de cada registro.

Proporción de grupos celulares y de su actividad espontánea

A partir de los valores de fluorescencia adquiridos en cada registro, se hizo una normalización de los mismos usando el siguiente arreglo $(F - \text{min}F_0 / \text{min}F_0)$, es decir los valores de fluorescencia (F) menos el mínimo valor ($\text{min}F_0$), sobre este mismo valor para cada célula registrada, que es método usual de normalización para fluorescencia. Posteriormente se graficaron transientes de calcio con los valores normalizados, por cada célula responsiva a las concentraciones de TRH agregadas durante

cada registro de actividad celular.

Con ayuda de un algoritmo en Python, se calcularon áreas bajo la curva con el método Simpson, de cada célula responsiva, únicamente del intervalo de tiempo del registro en el que hubo una despolarización de la célula, es decir, de las 600 imágenes de cada registro, sólo se calculó el área bajo la curva del intervalo (150-300 = 30s), que fue durante el cual se estimuló con los diferentes factores hipotalámicos. Con dichos valores de área bajo la curva se discriminaron los grupos celulares, siendo lactotopos aquellos que tuvieron un área menor en la respuesta de 100 nM TRH + 2 μ M DA, que 2 SD al área promedio de todas las concentraciones de TRH (1, 10, 100 nM). Una vez obtenidas las proporciones de lactotopos y tirotropos, se normalizaron al número total de células, calculado por la actividad que tuvieran en 140 mM KCl, donde toda célula viva tendía a despolarizarse.

El resultado de proporciones celulares, se corroboró con las proporciones calculadas a partir de la discriminación de grupos celulares de acuerdo a la forma de cada transiente de $[Ca^{2+}]_i$, ya que cada grupo endócrino posee una respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ característica. El porcentaje de actividad espontánea, se realizó de manera similar, primero, por áreas bajo la curva, y luego por la visualización de la actividad de calcio basal.

Análisis de área bajo la curva

Una vez clasificados los grupos celulares, se determinó nuevamente el intervalo de estímulo en cada concentración de TRH, calculando así el área bajo la curva del total de las células clasificadas. Del total de valores obtenidos, se seleccionaron 30 aleatoriamente en cada registro por condición, (150 valores por cada condición); los cuales fueron comparados por concentración de TRH, entre condiciones, mediante la aplicación de una ANOVA de una vía, ya que nuestra única variable independiente fue el área bajo la curva, determinando así las diferencias entre grupos.

Análisis de redes

A partir del número de célula que correspondió a cada lactotopos y tirotropos, se consideró la cantidad de nodos que iban a ser representados en la red. Posteriormente se seleccionaron los valores de fluorescencia de cada célula, a lo largo del tiempo, por cada tratamiento. Con ayuda de una dinámica en Python, se hizo una correlación de estos valores, con un desfase de 0.5 del tiempo total, obteniendo los valores de correlación de Spearman, seguido de la aleatorización 1000 veces de cada matriz de datos por tratamiento, obteniendo una distribución normal de los valores de correlación, que se utilizó para poder eliminar aquellas correlaciones que puedan estar dadas por azar, seleccionando únicamente los valores que estuvieran en 2 SD de dicha distribución. De la matriz con los valores de correlación de Spearman, se escogieron los valores que fueran $[0 < x < 1]$. Una vez obtenida esta matriz, se construyó la red considerando las posiciones reales de cada célula, y su valor de correlación en las conexiones con otras. Se graficó la probabilidad de conexión de cada nodo en un histograma de frecuencias, ajustando tres posibles funciones a la distribución obtenida: la normal, Poisson y exponencial, calculando el promedio de la probabilidad y su variación a lo largo del cambio de concentración de hormona (Apéndice 1). La distribución normal se ajustó, con el fin de refutar dicha distribución de probabilidad de conexión.

Análisis topológico

Se realizó un análisis local y global heurístico, a través de la comparación de diferentes métricas que describen la topología de la red. Cada algoritmo utilizado en dicho análisis fue tomado de la

paquetería Networkx de Python versión 3.5.2., logrando obtener las siguientes métricas, que de acuerdo con (Magoni, 2002; Mahadevan *et al.*, 2006; Pržulj, 2007), describen la estructura de las redes, de forma local. Entre ellas está, el coeficiente de agrupamiento, promedio de la distancia más corta entre nodos, el coeficiente de asortatividad, la densidad de la red y la excentricidad, (Apéndice 2). Tanto el promedio de la vía más corta como la excentricidad, sólo pudieron obtenerse en aquellas cuyos nodos estuvieran conectados al menos una vez. En cada red analizada, se obtuvieron estas métricas a las que posteriormente se aplicó un análisis estadístico básico además de una ANOVA de una vía para cada métrica, con el fin de describir los cambios en la conexión local, entre condiciones estudiadas.

VIII. Resultados

Los estudios de regionalización celular en la hipófisis, sugieren e incluso han mostrado que existe una distribución espacial característica de cada grupo. Es decir, la adenohipófisis cuenta con una organización distribucional de cada grupo celular. Por ello se buscó realizar mapas de dispersión de los grupos celulares de interés, a partir de los registros de actividad de $[Ca^{2+}]_i$, de los cuales se analizó la actividad de cada célula responsive a las distintas concentraciones de TRH, discriminando así lactotrofos y tirotrofos, de acuerdo a la inhibición con TRH+DA. A partir de las coordenadas de los ROI's seleccionados como células (lactotrofos y tirotrofos) de las películas correspondientes a cada registro, se sacaron los mapas de distribución celular (Fig. 19), observando que en diestro, el número de ambos grupos celulares es menor, en comparación con la densidad observada en proestro, estro y lactante. En esta última, se observa un aumento de tirotrofos, en contraste con las anteriores.

Se observó además que la distribución de ambos grupos celulares no se encuentra definida en alguna región, lateral o central, de los lóbulos hipofisarios. Sin embargo la proporción en número sí aumenta (Fig. 20).

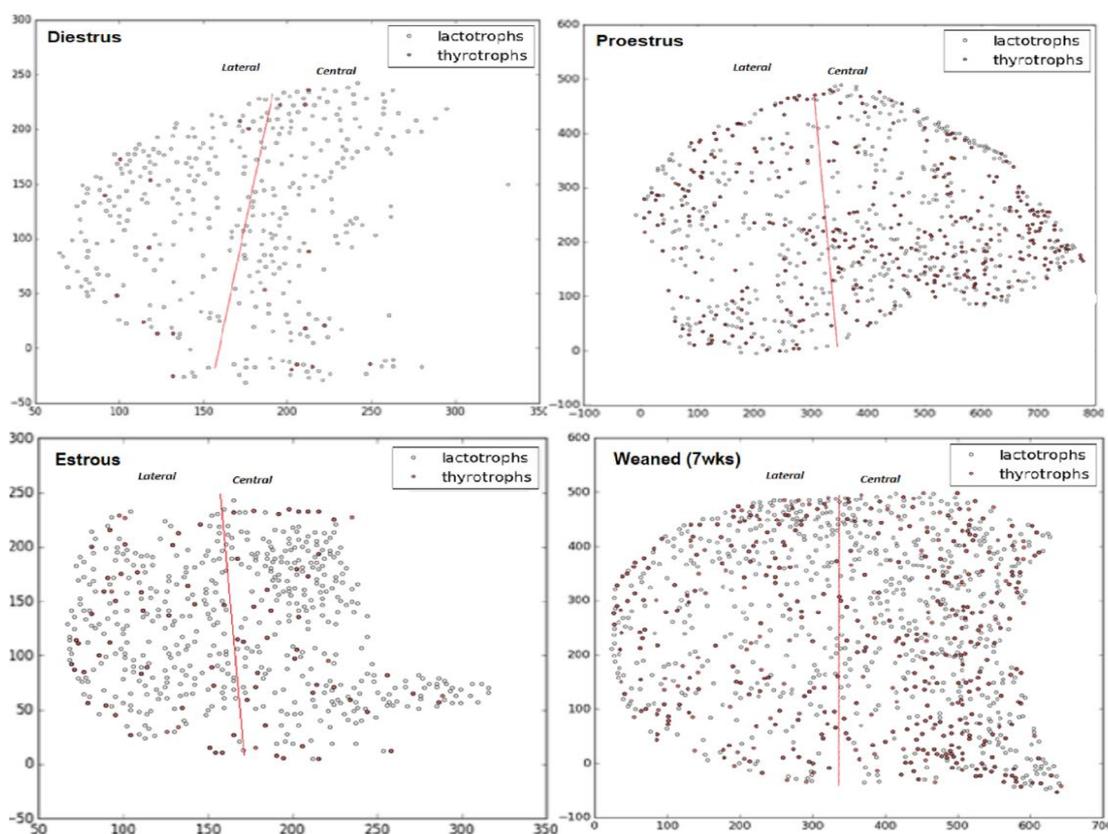


Figura 19. Mapas de dispersión de la distribución celular de lactotrofos y tirotrofos en cada condición empleada, en uno de los lóbulos de la rebanada de la glándula, divididos de acuerdo en región lateral y central de acuerdo a la posición de la neurohipófisis.

La proporción porcentual de ambos grupos celulares, normalizada al número total poblacional en cada registro, varía de acuerdo a la fase del ciclo estrol, siendo en el diestro, las proporciones más bajas en lactotrofos (46.13 ± 4.613), tirotrofos (6.48 ± 5.261) y en lactante (weaned) las más altas, lactotrofos (43.42 ± 4.343), tirotrofos (12.19 ± 5.561). Mientras que el mayor incremento de tirotrofos se observa que está en estrous teniendo una proporción de (14.29 ± 4.892) (Fig. 20).

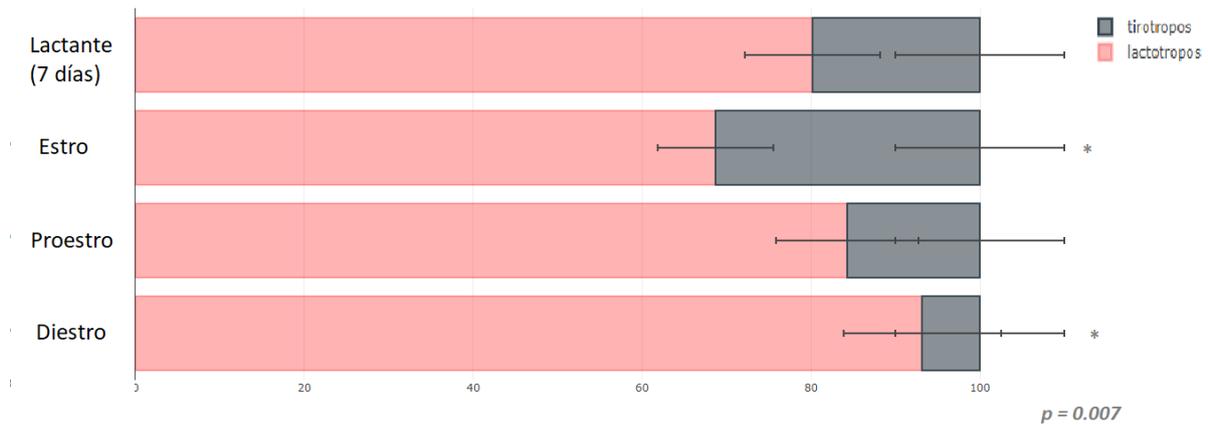


Figura 20. Proporción porcentual de ambos grupos celulares en cada condición, con error porcentual del 5%. Diferencias significativas en estro y diestro, con una $p = 0.0007$.

Muchas de las células endócrinas poseen actividad espontánea, uno de los grupos celulares que la presenta son los lactotrofos e incluso pueden llegar a secretar en ella. Por ello, mediante el análisis de cada transiente de $[Ca^{2+}]_i$ en el registro de actividad basal, se contabilizó la proporción de células tirotrofos y lactotrofos que tuvieran actividad espontánea, donde en estro son del ~ 60-100%. En tanto que la menor proporción de tirotrofos y lactotrofos, presentan actividad espontánea en la etapa diestro entre el ~ 59– 83 %, en proestro ~ 76-88%, y en lactancia (weaned) ~ 81-88% (Fig. 21).

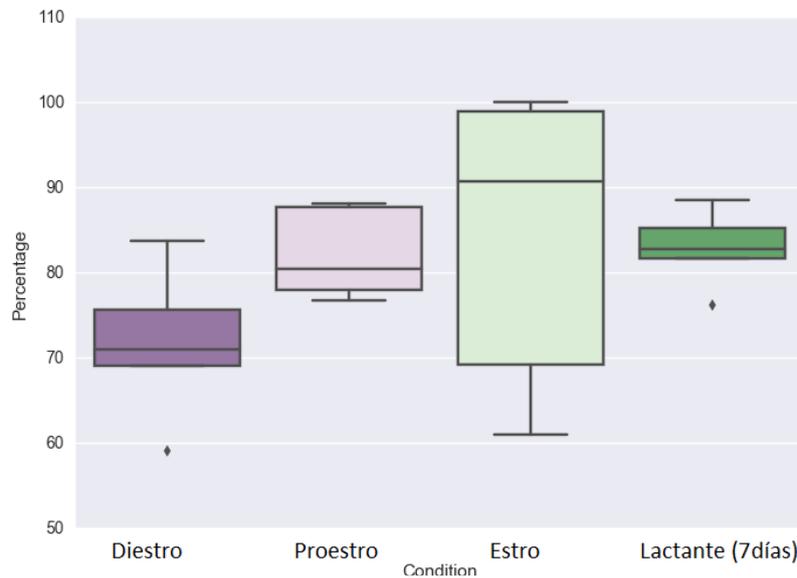


Figura 21. Porcentajes de lactotrofos y tirotrofos que presentaron actividad espontánea (Basal) en cada condición. Se muestran diferencias significativas en Diestro y en Lactancia (Weaned). ($p=0.26$). Las barras representadas en cada caja del gráfico, representan los percentiles 75, 25 de la distribución en cada condición, teniendo más variación los valores en Diestro y en Lactancia (Weaned).

En cada registro, también pudo observarse que las transientes de $[Ca^{2+}]_i$, son distintas respecto a la respuesta de las diferentes concentraciones de TRH, según la condición, como se muestra en la

(Fig. 22), donde se presentan tres ejemplos de respuesta celular y el cúmulo de todas las respuestas en cada tratamiento.

En la condición de lactancia (weaned) se observa que el cúmulo de células presenta actividad de $[Ca^{2+}]_i$ ante todas las concentraciones de TRH. Es posible notar en el cúmulo de las transientes, que en diestrus las células carecen de actividad espontánea, así como a la mayoría de las concentraciones de TRH. En proestrous, la mayor parte de lactotropos y tirotropos responden a las concentraciones más altas de TRH, 10 nM y 100 nM. Mientras que en estrous aumenta la actividad espontánea, pero disminuye la actividad en TRH+DA, concordando con el incremento de tirotropos, y de actividad espontánea observados en las (Figs. 20, 21).

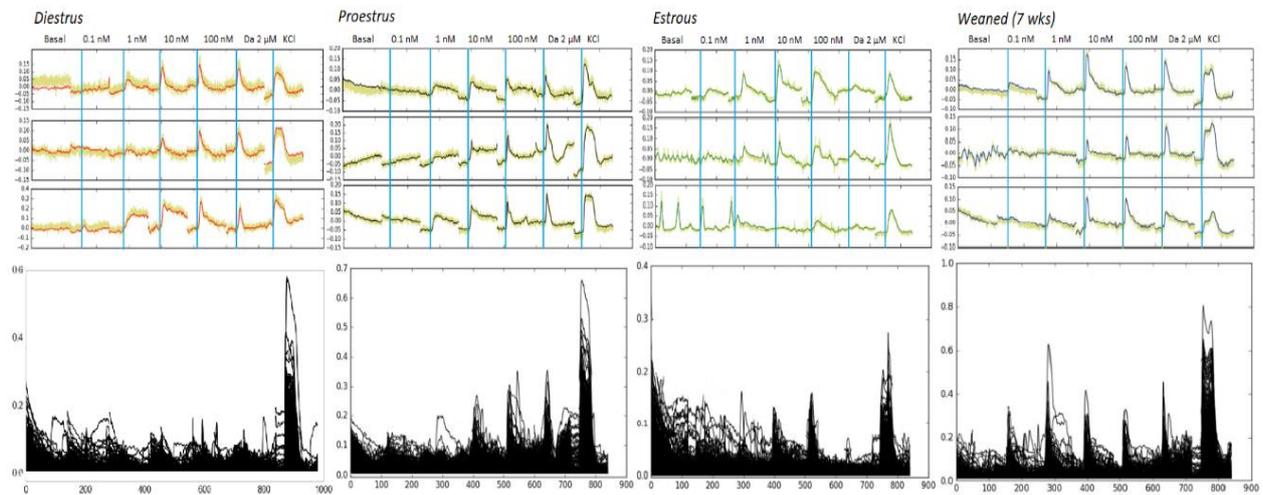


Figura 22. Ejemplo de la actividad de $[Ca^{2+}]_i$, en cada tratamiento (Basal, 0.1, 1, 10, 100 nM de TRH, TRH+Da, y KCl), y el cúmulo de la señal de todas las células en cada condición.

El porcentaje de células en cada registro que respondieron a las diferentes concentraciones de TRH, se muestra en la (Fig.23). Donde en estrous se presentan las proporciones más altas de respuesta a todas las concentraciones (98.05%, 89.81%, 93.86 %, 99.47%), respectivamente. En diestrus los porcentajes fueron menores (74.04 %, 77.88%, 83.15%, 84.35%). Mientras que en proestrous, el mayor número de células, responden a 10 nM TRH, al igual que en la lactancia.

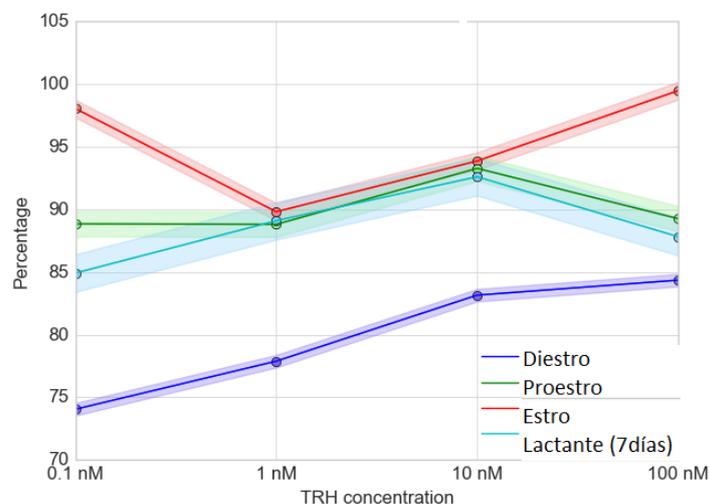


Figura 23. Proporción de lactotropos y tirotropos que respondieron a las diferentes concentraciones de TRH, en cada condición, con diferencia significativa en diestro y estro. $p < 0.001$

Además de existir diferencias entre condiciones por el número de células que responden a cada concentración de hormona, también varía la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ entre condiciones y entre concentraciones hormonales. En la (Fig.24), se observan los valores de área bajo la curva, por condición (1=Diestrus, 2= Proestrous, 3= Estrus, 4= Lactante (weaned)), en cada concentración de TRH, empleada.

Es posible afirmar que conforme aumenta la concentración de TRH, los valores de área bajo la curva también aumentan en todas las condiciones. Es decir, en 10 y 100 nM, diestrus y estrus tienen los valores más altos, mientras que en las concentraciones 0.1, y 1 nM, los valores más altos se encuentran en las condiciones estrous, proestrous, y lactante (weaned), siendo estos siempre mayores en estrous.

En la (Fig. 22), se observó que existe una respuesta a todas las concentraciones hormonales (0.1, 1, 10,100 nM), en estro y en lactancia, mientras que en diestro y proestro, la respuesta se observa principalmente en las concentraciones más altas, (10 -100 nM). Esto permite hacer una relación con los valores representados en la (Fig. 24), ya que en diestrus se observa un aumento en los valores de área bajo la curva en 10 y en 100 nM, al igual que en proestrous; en estrous y en la condición de lactancia (weaned), los valores permanecen altos en todas las concentraciones, siendo mayores en estrous.

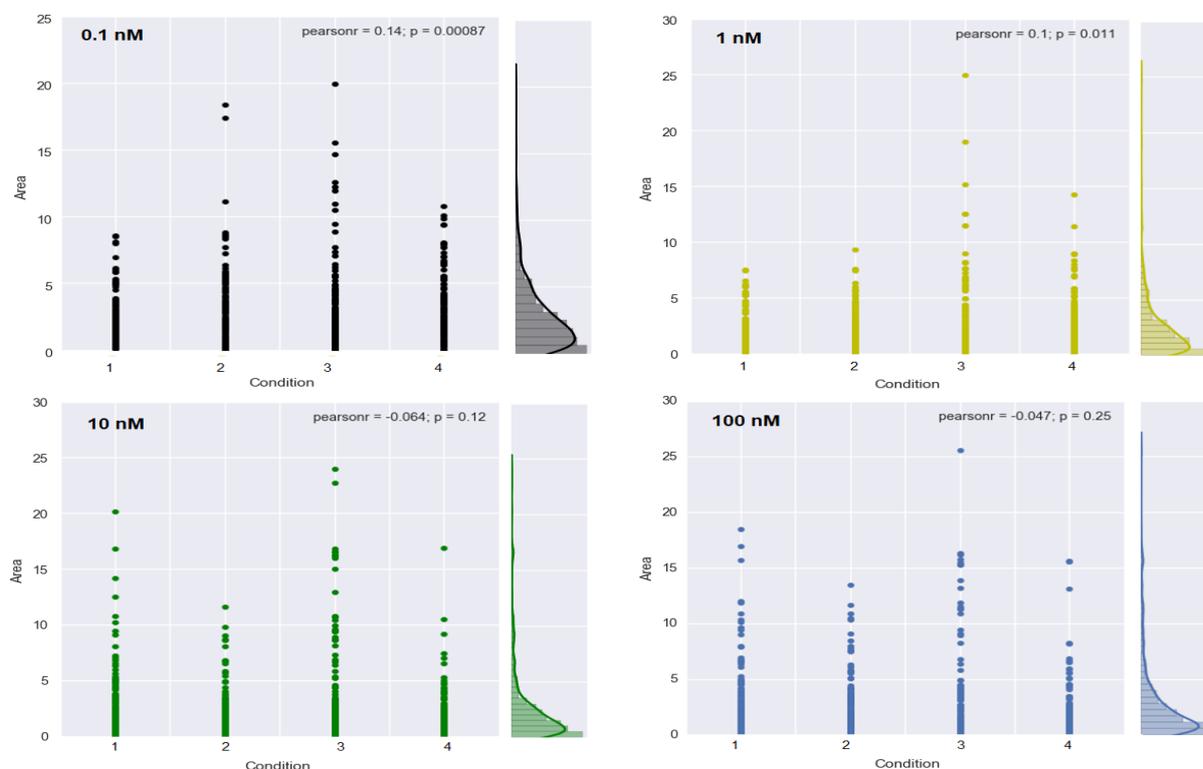


Figura 24. Dispersión de los valores de área bajo la curva (ABC), en cada concentración hormonal de TRH (0.1, 1, 10,100 nM), en todas las condiciones (1=Diestro, 2=Proestro, 3=Estro, 4= Lactancia (weaned)). En cada grafica se observan dos histogramas, posicionados arriba y a la derecha de cada una. El primero representa el número de valores graficados (150 por condición), mientras que el segundo muestra la distribución de todos los valores de ABC. Además, se muestra una línea de tendencia marcada por el promedio de los valores en cada condición, así como la variación de los mismos. Para cada concentración se obtuvo un valor p, que representa la existencia de diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de las concentraciones 0.1, 1 nM, mientras que en 10 y en 100 nM, ($p > 0.05$), no existe diferencia significativa.

Como se observó en las figuras anteriores la actividad de $[Ca^{2+}]_i$ puede brindar mucha información desde el punto de vista analítico, ya que hasta este punto se ha logrado discernir diferencias entre condiciones, así como también entre concentraciones de TRH, ya sea desde la comparación del área bajo la curva de cada transiente de $[Ca^{2+}]_i$ o por la cantidad de células que respondieron a cada concentración de TRH. Así mismo se demostró que existen diferencias en la densidad poblacional de acuerdo a cada condición fisiológica. Todos estos resultados tienen una relación incluso a nivel de comunicación celular, como es el caso de las redes celulares. Por esto para cada condición empleada, se aplicó un análisis de redes por correlación temporal de los valores de fluorescencia obtenidos en cada registro de actividad. Una vez seleccionados los nodos como aquellas células que resultaron ser lactotropos y tirotropos, se dibujaron las conexiones con una escala de colores representativa de su valor de correlación de Spearman.

En la (Fig. 25), existen dos escalas de valores de correlación, la escala de verdes y azules, y la de magentas y naranjas correspondientes a la red de lactotropos y tirotropos, respectivamente. Se puede observar que en Diestrus, no existe una red de tirotropos sobresaliente como en las otras condiciones. Esto concuerda con la densidad poblacional de tirotropos que existen en esta condición (Fig. 20) ya que entre menos células existan de un grupo celular, menos posible es su interacción con otro. En Proestrus y en Lactancia (Weaned) se observa una interacción entre las redes de ambos grupos celulares, recordando que en ambas condiciones la densidad de población de ambos grupos es alta.

También se observa que las conexiones entre redes cambian de acuerdo a la concentración de TRH, siendo así que conforme aumenta la concentración de TRH, disminuye la cantidad de conexiones entre células, siendo así 0.1 nM, donde existen más. No obstante, aunque en las concentraciones más altas de estímulo, disminuye el número de conexiones, el valor de correlación de conexión aumenta. Es decir, aunque las células tengan más conexiones entre sí en 0.1 nM, el valor de correlación en la conexión que existe en 10 nM y en 100 nM ($p = 0.4 - 0.8$), principalmente en las condiciones, proestrous, estrous y lactante (weaned), siendo más evidente en estrous.

Por otra parte, los valores de correlación se presentan altos aún (0.4 - 0.6), en la dosis 100 nM TRH + 2 μ M Da, en la mayoría de las condiciones, siendo más representativa en la lactancia, y exceptuando en diestrus. En la misma dosis, tanto en proestrous, estrous y lactante (weaned) la red de tirotropos aumenta en sus valores de correlación, y número de conexión. Las distribuciones de conectividad representan la cantidad de conexiones en el eje y y en el x la probabilidad de que ocurran. Se observa que en la mayoría de las distribuciones las conexiones tienden a disminuir la probabilidad de que ocurran conforme aumenta la cantidad de conexión. Es decir entre más conexiones hay menos probable es que ocurran. Sin embargo hay distribuciones en las que se observa casi la misma probabilidad en todas las posibles conexiones, que generalmente sucedieron en la dosis de 140 mM KCl, donde todas las células vivas en la rebanada sufrieron una despolarización.

En diestrus, las distribuciones son similares en los tres primeros tratamientos (Basal, 0.1 nM y 1 nM de TRH), ya que entre más conexiones disminuye la probabilidad de conexión, y esto se observa en las redes, puesto que son las que poseen más conexiones. Por otra parte, a partir de la concentración 10 nM, disminuye el número de conexiones, por lo que las distribuciones de conexión presentan mayor probabilidad en la menor cantidad de conexiones. Estas características se pueden observar en estrous, donde las distribuciones que describen las concentraciones más altas de TRH, concentran la mayor probabilidad en la menor cantidad de conexiones. No obstante la distribución de conectividad es similar en proestrous y en lactancia (weaned), ya que en ambas estas distribuciones tienen una tendencia exponencial, lo que quiere decir que la mayor probabilidad de conexión entre nodos está en los que se conectan una sola vez con otros.

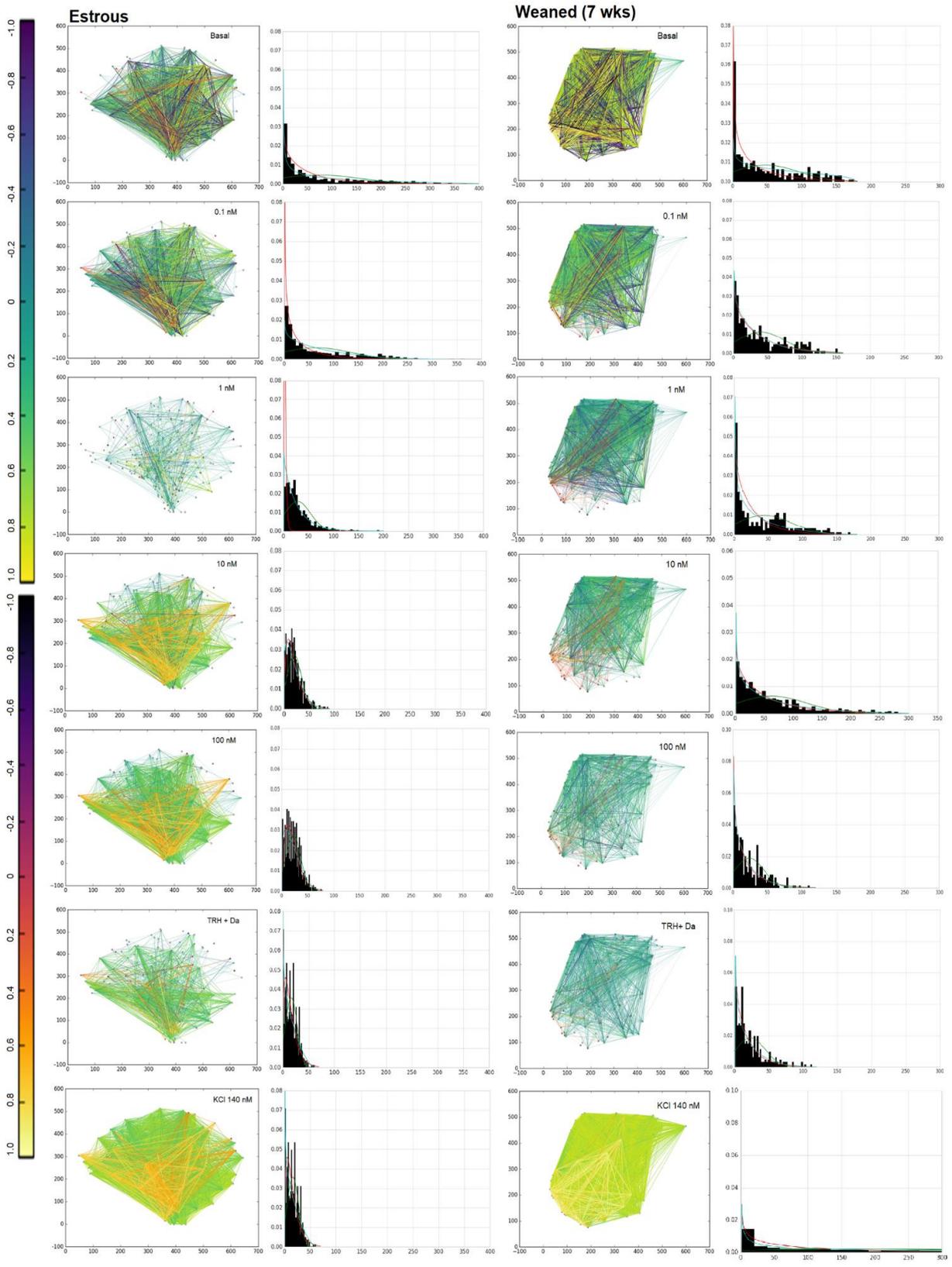


Figura 25. Redes celulares en cada condición y tratamiento, con su respectivo histograma de probabilidad de conexión, en donde se observan tres funciones: en rojo, Poisson; en azul, exponencial y en verde, una función normal, ajustándose principalmente las funciones exponencial y Poisson.

Además de la distribución de probabilidad de conexión en cada red, se calcularon cinco métricas que describen la topología local de las redes obtenidas en cada condición a lo largo del registro. En la Tabla 1 se presenta la denotación asignada a cada métrica calculada, y en la Tabla 2 los valores de dichas métricas en cada condición a lo largo del registro. Los valores de δ , r , C fueron graficados y comparados entre condiciones mediante una prueba ANOVA de una vía, resultando diferentes significativamente en el promedio coeficiente de agrupamiento (Fig. 26). A diferencia de todos los valores, en ϵ son números enteros, ya que representan la máxima distancia (número de nodos) que existe entre un nodo y otro en la red. Cabe mencionar que tanto α como ϵ , sólo pudieron ser calculadas en las redes que tuvieran todos los nodos conectados en al menos una vez en la red, ya que no todas las células tuvieron actividad basal y tampoco respuesta a 0.1 estos dos parámetros se encontraron generalmente en 1, 10, 100 nM y en TRH+Da. En KCl, no fue posible calcular estos valores dado que en todos los registros, existen células que responden en las primeras concentraciones hormonales, pero en KCl ya no tienen respuesta.

La densidad de la red, representa la proporción de las conexiones que existen entre las conexiones que pueden existir en la red, siendo los valores más altos en basal, en 0.1 nM y en KCl, lo cual concuerda con lo discutido anteriormente, ya que al menos en 0.1 nM y en KCl aumenta el número de conexiones en la red, y solo en algunas condiciones como estro y lactancia la red basal posee la misma característica.

El coeficiente de asortatividad describe la preferencia de los nodos de la red, por conectarse a otros similares o no, a ellos. De acuerdo con (Newman, 2002) dicho coeficiente puede describir a dos tipos de red, las redes asortativas y disasortativas. Las primeras se caracterizan por tener nodos que se conectan con otros que tienen el mismo grado de conexión, es decir el mismo número de conexiones, presentando un coeficiente $r < 1$. Mientras que las disasortativas, son características por tener nodos que se conectan con otros que no tienen el mismo grado de conexión, con un coeficiente $-1 \geq r$. Las redes en sistemas biológicos poseen un coeficiente similar a las redes disasortativas, tendiendo así a conectarse con nodos con diferente grado de conexión. En este caso, las redes que se obtuvieron presentan ambos, en KCl, todas las redes son disasortativas en todas las condiciones, en tanto que las presentan un coeficiente asortativo en la respuesta a cada concentración hormonal, y a basal. Otra característica de las redes asortativas, es que son más estables conectivamente, ya que si se llegara a remover uno de sus nodos, la conexión de la red no se rompería, en cambio en las redes disasortativas, la remoción de cualquier nodo rompería su completa conexión. Lo cual indica que la conexión ante estímulo de TRH y en actividad espontánea en estas redes endócrinas, es estable, en todas las conexiones, desde este sentido. El promedio del coeficiente de agrupamiento indica otra proporción que considera la conexión de un nodo con sus vecinos más cercanos, se considera que si es $C = 1$, se encuentra completamente conectado (Sarämäki *et al.*, 2007). Los valores más altos obtenidos se encuentran en Basal, 0.1, y KCl, en todas las condiciones, nuevamente en donde existen mayor número de conexiones. Este coeficiente nos aproxima más hacia el agrupamiento de las subredes que coordinan la conexión global, es decir, al formarse más subgrupos en ella, su conexión será más eficiente y estable. La mayoría de los subgrupos obtenidos en las redes de todas las condiciones en este estudio, forman triángulos y cuadrados, indicando que la coordinación local de la red se da entre 3 y 4 células cercanas.

También se calculó la el promedio de la vía más corta de conexión, así como la excentricidad de las redes. No en todas las dosis de cada registro se pudo calcular estos parámetros, debido a que para ello se necesita que todos los nodos de la red se encuentren conectados, y muchas veces las células no presentaban actividad espontánea, o respuesta a alguna concentración de TRH, así como también dejaban de responder a KCl, después del estímulo con TRH. En las dosis donde fue posible

calcularlas, fue en 1, 10, 100 nM y TRH+Da, donde se presentaron redes donde todas las células estuvieron conectadas (Tabla 2). De acuerdo con (Fronczak *et al.*, 2004) si $\alpha > 2$, es considerada otra propiedad de las redes de libre escala, mientras que si $2 < \alpha < 3$, las redes pueden tener propiedades estructurales similares a las redes de *ultra – small world* en donde muchas de las trayectorias de conexión están dadas por hubs dentro de la red. Por último, la excentricidad describe la máxima distancia entre un nodo con otro, es decir, el número de nodos con los que tiene que conectarse, antes de tener una conexión con otro, en este caso entre 3 y 4, en las redes en las que pudo calcularse dicho parámetro.

De todos los artículos que describen estos parámetros, ninguno hace una comparación estadística de ellos (Magoni, 2002; Mahadevan *et al.*, 2006; Pržulj, 2007). Sin embargo se consideró hacerlo en este trabajo, con el fin de encontrar diferencias entre las condiciones estudiadas. Sin embargo el único parámetro que tuvo una diferencia significativa fue el promedio del coeficiente de agrupamiento, siendo esto la condición que más se diferencia de las otras, con una $p = 0.05$.

Tabla 1. Denotación de las métricas

<i>Métrica</i>	<i>Denotación</i>
<i>Densidad</i>	δ
<i>Coefficiente de asortatividad</i>	r
<i>Promedio del Coeficiente de agrupamiento</i>	C
<i>Vía más corta promedio</i>	α
<i>Excentricidad</i>	ϵ

Tabla 2. Valores de cada métrica a lo largo de las concentraciones hormonales, entre condiciones.

Diestrus	δ	r	C	α	ϵ
Basal	0.089	0.092	0.564		
0.1 nM	0.187	0.261	0.529		
1 nM	0.177	0.19	0.472		
10 nM	0.162	0.271	0.479		
100 nM	0.143	0.272	0.376	1.94	3
TRH + Da	0.132	0.203	0.383	1.99	3,4
KCl	0.719	-0.006	0.889		

Proestrus					
Basal	0.395	-0.026	0.738		
0.1 nM	0.335	0.123	0.644		
1 nM	0.251	0.19	0.569	1.96	3
10 nM	0.166	0.321	0.54	2.04	3,4
100 nM	0.104	0.322	0.497		
TRH + Da	0.084	0.099	0.472		
KCl	0.393	-0.351	0.768		
Estrous					
Basal	0.224	0.139	0.583		
0.1 nM	0.195	0.235	0.453		
1 nM	0.085	0.304	0.165	2.048	3,4
10 nM	0.061	0.291	0.097	2.102	3
100 nM	0.065	0.24	0.109	2.066	3
TRH + Da	0.049	0.017	0.091		
KCl	0.506	-0.07	0.758		
Weaned (7wks)					
Basal	0.203	0.149	0.516		
0.1 nM	0.158	0.29	0.445		
1 nM	0.167	0.244	0.491	1.978	3,4
10 nM	0.1	0.278	0.397		
100 nM	0.112	0.152	0.364	1.972	3
TRH + Da	0.101	0.245	0.408	2.08	3,4
KCl	0.299	-0.294	0.746		

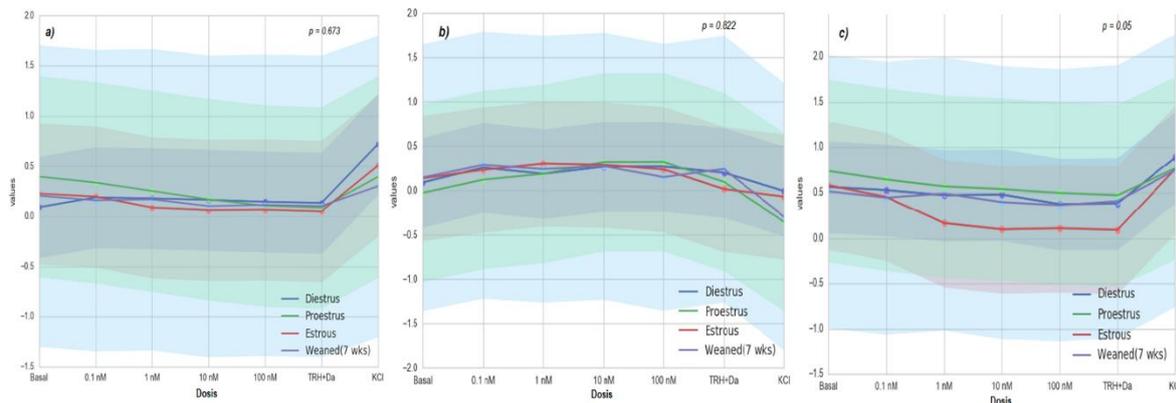


Figura 26. Comparación de las métricas entre condiciones, por cada dosis registrada. a) Muestra los valores de la densidad de red, teniendo una diferencia no significativa entre grupos. b) Representa los valores del coeficiente de assortatividad, cuya diferencia tampoco es significativa entre grupos. c) Muestra los valores del promedio del coeficiente de agrupamiento teniendo una diferencia significativa ($p=0.05$).

IX. Discusión

Los resultados de este trabajo, demuestran que las diferentes vías que participan en la regulación de la actividad endócrina en la hipófisis, a lo largo de los cambios en la demanda fisiológica, en este caso, el ciclo reproductivo y lactancia, como la densidad poblacional, regionalización, y sobre todo comunicación celular mediante conexiones, presentan diferencias a lo largo de dichas condiciones. La bondad del método de experimentación empleado en este trabajo, permite prevalecer la estructura tridimensional que hasta ahora se ha descrito que tiene el sistema endócrino hipofisario, por ello remarcamos que es factible que esta aplicación pueda aproximarnos al comportamiento natural que tiene la hipófisis.

Densidad poblacional y regionalización

Como se ha descrito en los párrafos introductorios, la capacidad de proliferación celular, está presente en todos los grupos celulares, siendo mayor en lactotrofos, principalmente. Sin embargo, también se ha reportado, que los somatotrofos, cuya densidad poblacional es mayor que todos los otros grupos endócrinos, presenta mayor capacidad de transdiferenciación ante diferentes estímulos fisiológicos, lo que significa que puede reaccionar ante otros factores hipotalámicos e incluso secretar hormonas que no le correspondan (Villalobos *et al.*, 2004). Esta característica, aunada con la propia proliferación celular, puede favorecer el aumento o no, en la densidad poblacional de lactotrofos y tirotrofos. Reconocemos en el presente trabajo, que existe una diferencia en la proporción de ambos grupos celulares durante las condiciones estudiadas, incrementándose porcentualmente ambos grupos. Los lactotrofos son mayores porcentualmente en diestro, aunque no existe una diferencia significativa con la condición de proestro, cuya proporción es muy similar. La diferencia se presenta en estro y en la lactancia, donde en la primera, se observa un incremento de tirotrofos significativo en comparación con la proporción de todas las demás condiciones. Esto coincide con lo reportado por (Oishi *et al.*, 1993), en donde realizó un conteo de los distintos grupos endócrinos por inmunoreacción hormonal, a lo largo de las distintas fases del ciclo estral, en el cual diestro presenta niveles bajos de todos los grupos celulares, mientras que estro, y proestro, un aumento en tirotrofos, somatotrofos, lactotrofos y gonadotrofos siendo más evidente en estro que en proestro. En la lactancia, se observó que la proporción conjunta de lactotrofos y tirotrofos es mayor que en todas las demás condiciones, alcanzando casi el 60% de la población endócrina.

Por otra parte, diversos han sido los trabajos que han reportado la regionalización anatómica en la hipófisis (Le Tissier *et al.*, 2012; Mollard *et al.*, 2012) de cada uno de sus grupos celulares. Sin embargo, aquí se ha observado que dicha regionalización, al menos de los grupos endócrinos de interés, es indistinta en las zonas lateral y central de los lóbulos hipofisarios, a lo largo de las condiciones estudiadas. Posiblemente la discriminación de dicha regionalización se ve sesgada por el tipo de datos de los cuales se están discriminando, ya que como se ha mencionado, el estímulo de TRH, puede llegar a activar, no solamente a lactotrofos y tirotrofos, sino también a somatotrofos en proceso de transdiferenciación. De hecho, existen reportes sobre la proporción de mammosomatotrofos (somatotrofos transdiferenciados a lactotrofos) en los niveles hormonales basales, siendo aproximadamente de (8-15%) (Harvey *et al.*, 1994), lo que pudiera ocasionar su consideración como lactotrofos, bajo el método de estudio aplicado en este trabajo.

Comunicación y conectividad

Hemos abordado que uno de los principales procesos en la secreción hormonal, es la movilización de $[Ca^{2+}]_i$. Muchos trabajos que abordan la dinámica de actividad en células excitables, describen la

movilización de $[Ca^{2+}]_i$, puesto que es uno de los principales procesos que permite la excitabilidad de la célula, así como también la exocitosis de vesículas, y como consecuencia la liberación hormonal también. En este trabajo se ha estudiado la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ tanto de lactotopos como de tirotropos, en respuesta a distintas concentraciones de TRH, logrando observar que en nuestro modelo experimental, la respuesta más estable que coincide con la descrita en publicaciones anteriores (Hinkle *et al.*, 1974,1996,2012), se presenta en las concentraciones más altas 10 nM, 100 nM, observando en 0.1 y 1 nM respuestas poco características de tirotropos y lactotopos. Esto puede deberse a que la señalización de TRH a bajas concentraciones, puede provocar que las vías de señalización que se desencadenan, principalmente la de IP3, responsable de la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ de los reservorios celulares, se afecte de alguna manera, ya sea disminuyendo su señalización o retrasando su activación, provocando así la liberación alterada de $[Ca^{2+}]_i$. Por otra parte, también es posible que la PMCA (Ca^{2+} ATPasa de membrana plasmática), activada también por el estímulo de TRH en la célula, se altere y permita esta liberación poco convencional de $[Ca^{2+}]_i$ teniendo incluso respuestas oscilatorias ante concentraciones de 0.1 nM.

Dentro de las condiciones estudiadas, existen diferencias en la respuesta a las concentraciones de TRH en relación con los valores calculados de área bajo la curva de las transientes de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 24), principalmente en 0.1 y 1 nM existen diferencias significativas, ya que en la respuesta a 0.1 nM, proestro y estro tienen los valores más elevados, mientras que en diestro y lactancia se concentran los valores en un rango (1-5). En 1 nM, los grupos que poseen los valores más elevados son estro y lactancia, siendo estro el grupo donde se concentran los valores más elevados. Más aún, en 10 y 100 nM, los valores de área bajo la curva no varían tanto como en las dos primeras concentraciones, y por lo mismo no existen diferencias significativas entre condiciones. Pero esto no quiere decir que respondan igual al estímulo, ya que en la (Fig. 23) se observa que en estro es en donde el mayor porcentaje de tirotropos y lactotopos responden a todas las concentraciones, siendo mayor en 0.1 y 100 nM de TRH, mientras que en diestro se tienen los porcentajes más bajos de células activadas en dichas concentraciones. Como se sabe un estímulo hipotalámico genera la secreción hormonal de un grupo endócrino específico, pero dicha secreción no es una acción unitaria, sino grupal, donde el número de células que se estimulan sí influye en el pico de secreción que se generará, por ello es factible afirmar en este sentido que la respuesta a las concentraciones de TRH es distinta entre las condiciones estudiadas.

Otro factor importante en la respuesta celular, es la consideración de la actividad basal que poseen, puesto que esto garantiza muchas veces que la célula pueda responder a un estímulo fácilmente. De hecho, algunos grupos endócrinos son capaces de secretar en su actividad espontánea, y dentro de ellos se encuentran los lactotopos. En la (Fig. 21), se observa nuevamente que es en estro en donde se tienen los porcentajes más elevados de las células con actividad espontánea, y en diestro los menores. Según (Van Goor *et al.*, 2001) los lactotopos son uno de los grupos que pueden generar grandes amplitudes en su señal espontánea, indicando su capacidad de generar una señal de Ca^{2+} ante algún estímulo.

Todas estas características favorecen la respuesta hormonal de los grupos endócrinos, sin embargo la comunicación celular entre grupos es otra de ellas y como se describió en la introducción, existen varias vías de comunicación entre estos, ya sea comunicación con células vecinas, a través de uniones estrechas, uniones gap, comunicación paracrina y yuxtacrina; o con células más alejadas, mediante la participación de las células foliculoestrelladas. A partir del conocimiento de estas vías de comunicación se ha propuesto la existencia de redes celulares endócrinas, que fomentan la sincronía en la secreción hormonal. La formación de redes analizada en este estudio, tiene como base los valores de fluorescencia emitidos en el registro de la actividad celular, el cual no puede dictaminarse como único parámetro fidedigno en el análisis de la conexión celular. Afortunadamente, existen

antecedentes en donde se ha hecho un análisis de redes similar al expuesto aquí, en células endócrinas, y su reensayo con técnica Patch Clamp, comprobando así que el estímulo en una célula puede generar la comunicación con otras y su consecuente activación (Hodson *et al.*, 2012). En la (Fig. 25) se observan las posibles redes celulares que pueden formarse en las condiciones de estudio, junto con la distribución de probabilidad de conexión. Dado que los grupos endócrinos de interés son los lactotropos y tirotropos, se gradicaron ambas redes por separado. Sin embargo al unir las se percibe una interacción entre ambas, por ello se han colocado como una sola. Esto resulta coherente, ya que TRH estimula a ambos grupos celulares, siendo así posible su conexión.

La robustez de la red de tirotropos depende directamente de su densidad poblacional. En diestro, esta red es poco perceptible, por lo mismo. En cambio en estro, lactancia e incluso en proestro es más visual la formación de esta, como se puede observar con ayuda de la escala de colores en la (Fig.25).

Dentro de las principales caracterizaciones de las redes está la distribución de conectividad, que indica la probabilidad de conexión que tiene cada nodo, en este caso, cada célula. Observamos que la mayoría de las distribuciones tiende a ser una función exponencial, y de hecho esta es una característica de las redes biológicas. Dicha probabilidad es mayor cuando los nodos se tienen bajas conexiones, y disminuye cuando aumenta el número de conexiones de nodos. Es decir, en este caso es más probable que una célula se conecte una vez con otra, a que se conecte más de 50 veces con otra. De hecho algo interesante que resaltar es que, el mayor número de conexiones se encuentra cuando estimulamos en la concentración más baja, aunque dichas conexiones tengan un valor de correlación bajo (de 0.2-0.4), mientras que las conexiones disminuyen cada que se estimula con mayor concentración hormonal, pero aumenta el valor de correlación (de 0.6-0.8). En el estímulo con KCl, donde todas las células vivas de la hipófisis se despolarizan, presenta una red con gran número de conexiones, con valores de correlación muy altos, cercanos a 1, y su distribución de probabilidad casi es lineal en algunos casos, indicando que dichos nodos tienen una probabilidad de conexión similar, si se trata de 1 o de 50 conexiones.

Desde otro punto de vista, se logró caracterizar a dichas redes endócrinas a partir de la topología local de la red, lo cual permite describir la comunicación celular que en ella se concibe. Esta caracterización se llevó a cabo a partir de la medición de 5 parámetros que de acuerdo con (Magoni, 2002; Mahadevan *et al.*, 2006; Pržulj, 2007) describen la estructura de las redes, de forma local (Tabla 1). En la (Tabla2) se muestra el valor de cada parámetro en cada dosis registrada. Comenzando por el coeficiente de densidad, se observa que la redes son más densas en las primeras tres dosis (Basal, 0.1 nM, 1 nM) y en KCl, lo cual coincide con la (Fig. 25) en donde es posible distinguir mayor número de conexiones en dichas dosis. Así mismo los valores del coeficiente de agrupamiento de cada red, es mayor en las tres dosis mencionadas y en KCl, en todas las condiciones; en la lactancia se presenta un aumento de dicho coeficiente en la dosis TRH + DA. Esto sugiere que la comunicación celular presente ante el estímulo de las concentraciones más bajas de TRH es más abundante respecto a la cantidad de conexiones que se involucran en ellas y en su disposición de formar grupos con vecinos cercanos. Es posible que al ser los primeros estímulos en el registro de actividad $[Ca^{2+}]_i$, se presente una ventaja de respuesta. Es decir, debido a que las rebanadas empleadas en el registro de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ permanecen en ACSF los reservorios de $[Ca^{2+}]_i$ están intactos en todas las células que prevalecen vivas en la rebanada por lo que ante el primer estímulo de TRH, puede que esto permita mayor comunicación entre ellas.

El coeficiente de asortatividad oscila entre los valores $\sim 0.1-0.2$ ($r < 1$), en cada condición, teniendo muy poca variación como se muestra en la (Fig. 26b), esto representa que las redes obtenidas son

asortativas. En otras palabras, dichas redes se conectan, entre nodos que tienen conexiones similares, sin importar la dosis que se esté evaluando. Sólo se presentan valores negativos ($-1 \geq r$), es decir redes disasortativas, en las dosis de KCl en todas las condiciones y en basal de proestro. Los valores de excentricidad ranquean entre $\sim 3 - 4$, lo que quiere decir que una nodo tiene que cruzar de 3 a 4 nodos aproximadamente, para poder conectarse con uno más lejano. Mientras que los valores de la vía promedio más corta se encuentran entre $\sim 1.9 - 2.01$, indicando otra característica de las redes que entra dentro de la clasificación de libre escala (Fig 16Bi), de acuerdo con (Fronczak *et al.*, 2004). Por otra parte, tanto la excentricidad como la vía promedio más corta sólo fueron calculadas cuando las redes se encontraban completamente conectadas, es decir todos los nodos tenían al menos una conexión en la red, lo cual permite discutir la relación que existe entre las dosis en las que se pudieron calcular y la condición. En diestro estos parámetros se pudieron calcular en la dosis de 100 nM y en 100 nM TRH+Da; en proestro en las dosis 1 y 10 nM de TRH; en las dosis 1,10 y 10 nM en estro y en lactante en 1 nM, 100 nM y 100 nM TRH+Da. Remitiéndonos a la demanda fisiológica que se presenta en cada condición, tendría sentido que en diestro, donde las concentraciones hormonales son basales y no hay una demanda hormonal necesaria, el total de células estimuladas por TRH tuvieran al menos una conexión cuando la concentración de este es la más alta, así que el mayor estímulo provocaría la activación de todas las células en cuestión. La demanda fisiológica aumenta en las condiciones subsecuentes, proestro, estro y lactancia, y precisamente en todas estas, las concentraciones en donde fue posible calcular ambos parámetros, son en las más altas 10 y 100 nM TRH. Sin embargo, ante 1 nM de TRH, en estas mismas condiciones la interacción de las células es completa, lo que permitiría aludir que a partir de esta concentración, la glándula está fisiológicamente dispuesta a dar un estímulo hormonal que compense el estímulo de dicho factor hipotalámico.

Explicación fisiológica

Recordando el ciclo reproductivo y los procesos endócrinos que implica, se puede llegar a explicar todos los cambios descritos en los párrafos anteriores. De todas las fases del ciclo estral, la que genera mayor demanda fisiológica es estro, en donde se encuentran elevados los niveles hormonales de LH, FSH, PRL y E2, puesto que en esta fase es donde se genera la ovulación. No obstante en proestro, también hay un incremento de LH, FSH, de PRL y de progesterona. Mientras que en diestro, los niveles hormonales permanecen basales. Por otra parte en la lactancia existe una demanda mucho mayor de PRL, principalmente. El que existan los niveles elevados de PRL, es consecuencia del estímulo hipotalámico de TRH, lo que permite la estimulación de tirotrópos y de lactotópos, por lo tanto los cambios en la comunicación entre estos grupos celulares, está justificada por la demanda fisiológica que representan las condiciones más importantes en este estudio: estro, proestro y lactancia.

No obstante, las diferencias más representativas en las características descritas, están en estro, tanto en la densidad poblacional de ambos grupos celulares, como en la comparación de los valores de área bajo la curva, principalmente en 0.1 y 1 nM, y en la proporción de células que poseen actividad basal, también. Cada una de estas características, fundamenta el comportamiento de las redes calculadas, no sólo en estro, sino en todas las condiciones. Aunque los parámetros descriptivos de las redes calculados no indican grandes cambios entre condiciones, si logran describir el comportamiento, la estructura y la versatilidad de las redes desde un punto de vista local, y no sólo general.

X. Conclusiones

Este trabajo permite concluir que, el estudio de la plasticidad funcional de la hipófisis desde el punto de vista de la comunicación celular permite aproximarnos a la regulación que en ella se lleva a cabo ante los cambios en la demanda fisiológica. En este caso el ciclo reproductivo en hembras y en la lactancia, se observó que entre mayor sea la demanda de secreción, más modificaciones se presentan en el comportamiento de las células endócrinas, desde su respuesta al factor hipotalámico, como en su densidad poblacional, y así mismo en la comunicación grupal. Así mismo, se puede afirmar que las condiciones que presentan más modificaciones son en primer lugar, esto característico por presentar una gran demanda hormonal en el ciclo reproductivo, seguido de proestro y la lactancia. No obstante, este análisis deja a la luz nuevas cuestiones relacionadas con la comunicación celular, ya que es válido cuestionar ahora, si estas redes se coordinan después del estímulo hipotalámico, o si los agrupamientos locales tienen algún tipo de regionalización funcional, quizás central, en donde se sabe que inicia la irrigación vascular, por lo tanto la señalización empieza desde esa región. Por otra parte sería novedoso realizar un análisis topológico más robusto que compare los parámetros calculados para la descripción de la topología local de las redes.

XI. Apéndices

Apéndice 1

Probabilidad de conexión

La probabilidad de conexión en cada nodo, se calculó a partir del número del grado de cada nodo, es decir el número de conexiones que tuvo cada uno en la red.

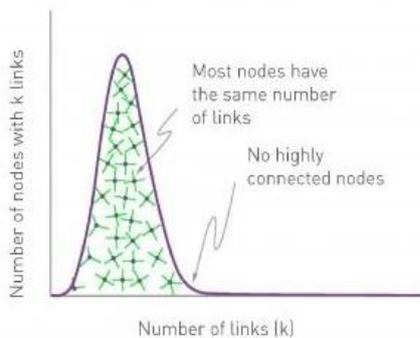
$$p_k = \frac{N_k}{N}$$

Es decir, la probabilidad (P), de que un nodo (N) esté conectado (k) veces. La clasificación acorde con la distribución de grado, son las siguientes:

Distribución de Poisson

Las redes que siguen esta distribución se consideran finitas, cuyo grado de conexión es muy similar en todos los nodos. Generalmente se consideran a este tipo de redes como aleatorias, y son poco comunes en la naturaleza.

a. POISSON

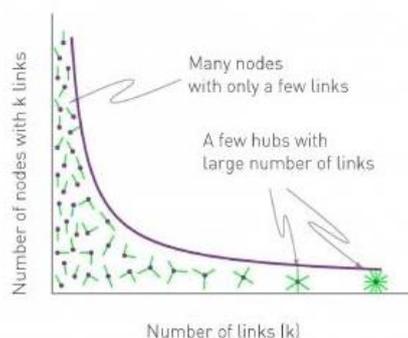


$$P(k) \approx e^{-pN} \frac{(pN)^k}{k!} = e^{-\langle k \rangle} \frac{\langle k \rangle^k}{k!}$$

Distribución Exponencial

Las redes cuya distribución de grado se comportan como una función exponencial, son consideradas finitas y de libre escala, donde todos los nodos se encuentran conectados, generalmente, al menos una vez. Esta distribución es la más parecida al circuito o vía Eurliana, en donde cada nodo está conectado exactamente una vez, por lo menos.

c. POWER LAW



$$P(k) = Ck^{-\gamma}$$

Apéndice 2

Algoritmos heurísticos

Densidad

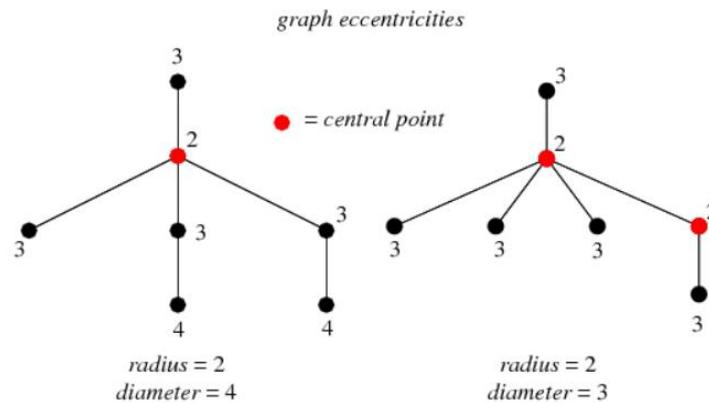
La densidad de la red, está descrita por una proporción del número de conexiones que tiene, entre el número de conexiones que pueden existir en la red, siendo que si esta proporción significa 1, se le considera como una red completa, en el sentido de su conectividad.

$$\text{Density} = \frac{2L}{n(n-1)}$$

Donde L, es el número de conexiones existentes, y n, el número de conexiones posibles.

Excentricidad

La excentricidad en grafos conectados, está descrita como la máxima distancia que existe entre un nodo v con otro u . Es decir, cuantos nodos tiene que cruzar v para poder conectarse con u . Muchas veces este valor coincide con el diámetro de la red.



Coefficiente de agrupamiento

A este parámetro se le conoce como la tendencia que existe en las redes de conectarse un nodo con otro vecino, y está descrito por:

$$C_i = \frac{2t_i}{k_i(k_i - 1)}$$

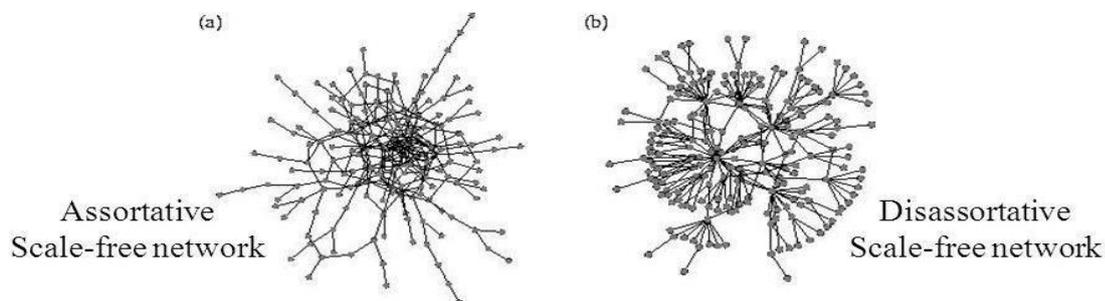
Donde C_i representa el coeficiente de agrupamiento; t_i el número de triángulos formados alrededor de cada nodo i , y k es el grado de conexión de cada nodo i .

Asortatividad

Se describe la asortatividad como la preferencia que pueden presentar aquellos nodos, cuyo grado de conexión es elevado, y formar conexiones con nodos de la misma índole. Si un nodo de alto grado de conexión presenta preferencia de conexiones con otro de bajo conexión, se dice que la red es disasortativa.

$$r = \frac{1}{\sigma_q^2} \sum_{jk} jk(e_{jk} - q_j q_k),$$

Donde e_{jk} representa la distribución de la probabilidad de unirse dos nodos j y k aleatoriamente. q_k y q_j representa la distribución de probabilidad, pero en redes disasortativas. La diferenciación de ambas distribuciones en una red, se puede calcular mediante la función de correlación de las conexiones posibles entre los nodos de diferentes grados, y la corrección normalizada de dicha función resulta en la función anterior. Cuando los valores r son positivos se dice que la red es asortativa, cuando son negativos se dice que es diasortativa.



Se ha descrito anteriormente que las redes disasortativas, son menos estables, ya que si un nodo deja de estar conectado, hay más posibilidad de que la conexión global se rompa, son más comunes en sistemas biológicos. Mientras que las redes asortativas, se han observado en sistemas artificiales y físicos, siendo este tipo de redes, más estable.

Promedio de vía más corta promedio

El promedio de la vía más corta promedio, es la medida promedio del número de pasos de todas las posibles conexiones entre dos nodos.

$$a = \sum_{s,t \in V} \frac{d(s,t)}{n(n-1)}$$

Donde, V representa el set de nodos, G , $d(s,t)$ la vía más corta entre el nodo s y t ; y n representa el número de nodos en la red G .

XII. Referencias

1. Albert, R., & Barabási, A. L. (2002). Statistical mechanics of complex networks. *Reviews of modern physics*, 74(1), 47.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008) *The Molecular Biology of the Cell*, 5th edition, New York, Garland Science, Page 881.
3. Asa, S. L., Kelly, M. A., Grandy, D. K., & Low, M. J. (1999). Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 140(11), 5348-5355.
4. Newman, M. E. (2002). Assortative mixing in networks. *Physical review letters*, 89(20), 208701.
5. Barabási, A. L. (2016). Random networks In: Barabási, A. L. (2016). *Network science*. Cambridge university press. [Online]: <http://barabasi.com/networksciencebook/>
6. Ben-Jonathan, N., & Liu, J. W. (1992). Pituitary lactotrophs endocrine, paracrine, juxtacrine, and autocrine interactions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 3(7), 254-258.
7. Ben-Shlomo, A., Melmed, S. (2010). Hypothalamic regulation of anterior pituitary function In *The pituitary*. Academic press. (pp. 24-26). Los Angeles, USA. [Online]: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380926-1.10002-1>
8. Bondy, J. A., & Murty, U. S. R. (1976). *Graph theory with applications* (Vol. 290). London: Macmillan.
9. Bonnefont, X., Lacampagne, A., Sanchez-Hormigo, A., Fino, E., Creff, A., Mathieu, M. N., ... & Alonso, G. (2005). Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16880-16885.
10. Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4), e35538.
11. Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, A-41.
12. Caron, M. G., Kilpatrick, B. F., & De Lean, A. (1983). The dopamine receptor of the anterior pituitary gland: Ligand binding and solubilization studies.
13. Childs, G. V. (2009). Pituitary Gland (Cell Types, Mediators, Development).
14. Childs, G. V. (2002). Development of gonadotropes may involve cyclic transdifferentiation of growth hormone cells. *Archives of physiology and biochemistry*, 110(1-2), 42-49.
15. Christensen, H. R., Zeng, Q., Murawsky, M. K., & Gregerson, K. A. (2011). Estrogen regulation of the dopamine-activated GIRK channel in pituitary lactotrophs: implications for regulation of prolactin release during the estrous cycle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(3), R746-R756.
16. Clifton, D. & Steiner, R. (2009). The Portal System, in Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology (Sixth Edition). *Reproductive Endocrinology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
17. Couly, G. F., & Le Douarin, N. M. (1985). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras: I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Developmental biology*, 110(2), 422-439.
18. Cross, R. (2017). Artificial Intelligence helps scientists map behavior in the fruit fly brain. *Science*, 357.
19. Dasen, J. S., O'Connell, S. M., Flynn, S. E., Treier, M., Gleiberman, A. S., Szeto, D. P., ... & Rosenfeld, M. G. (1999). Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*, 97(5), 587-598.
20. Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(1), 1-12.

21. De Lean, A., Garon, M., Kelly, P. A., & Labrie, F. (1977). Changes of pituitary thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor level and prolactin response to TRH during the rat estrous cycle. *Endocrinology*, 100(6), 1505-1510.
22. De Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X. B., Foye, P. E., Danielson, P. E., ... & Frankel, W. N. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 322-327.
23. Demarest, K. T., Duda, N. J., Riegler, G. D., & Moore, K. E. (1983). Placental lactogen mimics prolactin in activating tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain research*, 272(1), 175-178.
24. Drigo, R. A., & Bianco, A. C. (2011). Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(10), 1432-1441.
25. Durán-Pastén, M. L., & Fiordeliso, T. (2013). GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Frontiers in endocrinology*, 4.
26. Faglia, G. (1998). The clinical impact of the thyrotropin-releasing hormone test. *Thyroid*, 8(10), 903-908.
27. Fauquier, T., Guérineau, N. C., McKinney, R. A., Bauer, K., & Mollard, P. (2001). Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8891-8896.
28. Finch, C. E. (1976). The regulation of physiological changes during mammalian aging. *The Quarterly Review of Biology*, 51(1), 49-83.
29. Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological reviews*, 80(4), 1523-1631.
30. Fronczak, A., Fronczak, P., & Hołyst, J. A. (2004). Average path length in random networks. *Physical Review E*, 70(5), 056110.
31. Fu, X., Nishimura, S., & Porter, T. E. (2004). Evidence that lactotrophs do not differentiate directly from somatotrophs during chick embryonic development. *Journal of endocrinology*, 183(2), 417-425.
32. Gasca, A. T. (2005). El hipotálamo: su complejidad morfológica y su capacidad para dirigir los sistemas reguladores del organismo. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. [Online]: <https://analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/570/587>
33. Gonzalez-Iglesias, A. E., Murano, T., Li, S., Tomić, M., & Stojilkovic, S. S. (2008). Dopamine inhibits basal prolactin release in pituitary lactotrophs through pertussis toxin-sensitive and-insensitive signaling pathways. *Endocrinology*, 149(4), 1470-1479.
34. Guillou, A., Romanò, N., Steyn, F., Abitbol, K., Le Tissier, P., Bonnefont, X., ... & Martin, A. O. (2015). Assessment of lactotroph axis functionality in mice: Longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*, 156(5), 1924-1930.
35. Greef, W. D., Voogt, J. L., Visser, T. J., Lamberts, S. W. J., & SCHOOT, P. V. D. (1987). Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology*, 121(1), 316-322.
36. Harris, G. W. (1951). Neural Control of the Pituitary Gland.—I. *British Medical Journal*, 2(4731), 559.
37. Hartnell, J. M., Pekary, A. E., & Hershman, J. M. (1987). Comparison of the effects of pulsatile and continuous TRH infusion on TSH release in men. *Metabolism*, 36(9), 878-882.
38. Harvey, S., Scanes, C. G., & Daughaday, W. H. (1994). *Growth hormone*. CRC press, p.p.47
39. Hinkle, P. M., Woroch, E. L., & Tashjian, A. H. (1974). Receptor-binding affinities and biological activities of analogs of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing pituitary cells in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 249(10), 3085-3090.
40. Hinkle, P. M., Nelson, E. J., & Ashworth, R. (1996). Characterization of the calcium response to thyrotropin-releasing hormone in lactotrophs and GH cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 7(10), 370-374.

41. Hinkle, P. M., Gehret, A. U., & Jones, B. W. (2012). Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Frontiers in neuroscience*, 6.
42. Hodson, D. J., Molino, F., Fontanaud, P., Bonnefont, X., & Mollard, P. (2010). Investigating and modelling pituitary endocrine network function. *Journal of neuroendocrinology*, 22(12), 1217-1225.
43. Hodson, D. J., Romanò, N., Schaeffer, M., Fontanaud, P., Lafont, C., Fiordeliso, T., & Mollard, P. (2012). Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ. *Cell Calcium*, 51(3), 222-230.
44. Hodson, D. J., Schaeffer, M., Romanò, N., Fontanaud, P., Lafont, C., Birkenstock, J., & Fernandez-Fuente, M. (2012). Existence of long-lasting experience-dependent plasticity in endocrine cell networks. *Nature communications*, 3, 605.
45. Jackson, I. M., & Reichlin, S. (1977). Thyrotropin-releasing hormone: abundance in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *Science*, 198(4315), 414-415.
46. Keeler, C., Dannies, P. S., & Hodsdon, M. E. (2003). The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *Journal of molecular biology*, 328(5), 1105-1121.
47. Kelly, R. B. (1985). Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*, 230, 25-33.
48. Kirsten, D. (2000). The thyroid gland: physiology and pathophysiology. *Neonatal Network*, 19(8), 11-26.
49. Lechan, R. M., & Toni, R. (2016). Functional anatomy of the hypothalamus and pituitary. Page 2.
50. Lerant, A. N. N. A., Herman, M. E., & Freeman, M. E. (1996). Dopaminergic neurons of periventricular and arcuate nuclei of pseudopregnant rats: semicircadian rhythm in Fos-related antigens immunoreactivities and in dopamine concentration. *Endocrinology*, 137(9), 3621-3628.
51. Le Tissier, P. R., Hodson, D. J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M., & Mollard, P. (2012). Anterior pituitary cell networks. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(3), 252-266.
52. Lupien, S. J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., & Schramek, T. E. (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and cognition*, 65(3), 209-237.
53. Magner, J. A., & Weintraub, B. D. (1982). Thyroid-stimulating hormone subunit processing and combination in microsomal subfractions of mouse pituitary tumor. *Journal of Biological Chemistry*, 257(12), 6709-6715.
54. Mariotti S, Beck-Peccoz P. Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. [Updated 2016 Aug 14]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. [Online]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278958/>
55. Martin AJM, Dominguez C, Contreras-Riquelme S, Holmes DS, Perez-Acle T (2016) Graphlet Based Metrics for the Comparison of Gene Regulatory Networks. *PLoS ONE*11(10): e0163497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163497>
56. McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (67).
57. Melmed, S., Polonsky, K. S., Larsen, P. R., & Kronenberg, H. M. (2011). *Williams textbook of endocrinology*, Philadelphia: Saunders.
58. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 78(1), 189-225.
59. Mollard, P., Hodson, D. J., Lafont, C., Rizzoti, K., & Drouin, J. (2012). A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(6), 261-269.
60. Nicoletti, I., Filipponi, P., Fedeli, L., Ambrosi, F., Giammartino, C., Spinozzi, F., &

- Santeusano, F. (1986). Catecholamines and pituitary function. IV. Effects of low-dose dopamine infusion and long-term bromocriptine treatment on the abnormal thyrotroph (TSH) dynamics in patients with pathological hyperprolactinaemia. *Acta endocrinologica*, 111(2), 154-161.
61. Nillni, E. A. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(2), 134-156.
 62. Núñez, L., Villalobos, C., Senovilla, L., & García-Sancho, J. (2003). Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *The Journal of physiology*, 549(3), 835-843.
 63. Oishi, Y., Okuda, M., Takahashi, H., Fujii, T., & Morii, S. (1993). Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *The Anatomical Record*, 235(1), 111-120.
 64. Pržulj, N. (2007). Biological network comparison using graphlet degree distribution. *Bioinformatics*, 23(2), e177-e183.
 65. Rizzoti, K., & Lovell-Badge, R. (2017). Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Molecular and cellular endocrinology*, 445, 7-13.
 66. Ruohonen, K. Graph theory; 2008. *Tampere University of Technology*, pags.14-27 Retrieved from:http://math.tut.fi/~ruohonen/GT_English.pdf
 67. Sanchez-Cardenas, C., Fontanaud, P., He, Z., Lafont, C., Meunier, A. C., Schaeffer, M., & Gouty-Colomer, L. A. (2010). Pituitary growth hormone network responses are sexually dimorphic and regulated by gonadal steroids in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21878-21883.
 68. Saramäki, J., Kivelä, M., Onnela, J. P., Kaski, K., & Kertesz, J. (2007). Generalizations of the clustering coefficient to weighted complex networks. *Physical Review E*, 75(2), 027105.
 69. Sekulić, M. I. (2003). Pituitary thyrotropic cells are affected by steroid hormones. *Jugoslovenska medicinska biohemija*, 22(3), 185-200.
 70. Schaeffer, M., Hodson, D. J., Meunier, A. C., Lafont, C., Birkenstock, J., Carmignac, D., & Mollard, P. (2011). Influence of estrogens on GH-cell network dynamics in females: a live in situ imaging approach. *Endocrinology*, 152(12), 4789-4799.
 71. Sherwood, L. (2015). *Human physiology: from cells to systems*. Cengage learning, 655-699.
 72. Sheward, W. J., Fraser, H. M., & Fink, G. (1985). Effect of immunoneutralization of thyrotrophin-releasing hormone on the release of thyrotrophin and prolactin during suckling or in response to electrical stimulation of the hypothalamus in the anaesthetized rat. *Journal of endocrinology*, 106(1), 113-119.
 73. Schwartz, J., & Cherny, R. (1992). Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocrine reviews*, 13(3), 453-475.
 74. Simmons, D. M., Voss, J. W., Ingraham, H. A., Holloway, J. M., Broide, R. S., Rosenfeld, M. G., & Swanson, L. W. (1990). Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes & Development*, 4(5), 695-711.
 75. Sinha, Y. N. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, 16(3), 354-369.
 76. Smith, M. S., McLean, B. K., & Neill, J. D. (1976). Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*, 98(6), 1370-1377.
 77. Sornson, M. W., Wu, W., Dasen, J. S., & Flynn, S. E. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384(6607), 327.
 78. Stojilkovic, S. S., Tabak, J., & Bertram, R. (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocrine reviews*, 31(6), 845-915.
 79. Stojilkovic, S. S. (2005). Ca²⁺-regulated exocytosis and SNARE function. *Trends in*

- Endocrinology & Metabolism*, 16(3), 81-83.
80. Sun, Y., Lu, X., & Gershengorn, M. C. (2003). Thyrotropin-releasing hormone receptors--similarities and differences. *Journal of molecular endocrinology*, 30(2), 87-97.
 81. Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C., & Weintraub, B. D. (2002). Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiological reviews*, 82(2), 473-502.
 82. Takata, K. I., Watanabe, S., Hirono, M., Tamaki, M., Teraoka, H., & Hayashizaki, Y. (1989). The role of the carboxyl-terminal 6 amino acid extension of human TSH β subunit. *Biochemical and biophysical research communications*, 165(3), 1035-1042.
 83. Tuazon, P. T., Lorenson, M. Y., Walker, A. M., & Traugh, J. A. (2002). p21-activated protein kinase γ -PAK in pituitary secretory granules phosphorylates prolactin. *FEBS letters*, 515(1-3), 84-88.
 84. Vallar, L., & Meldolesi, J. (1989). Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends in pharmacological sciences*, 10(2), 74-77.
 85. Van Goor, F., Zivadinovic, D., Martinez-Fuentes, A. J., & Stojilkovic, S. S. (2001). Dependence of Pituitary Hormone Secretion on the Pattern of Spontaneous Voltage-gated Calcium Influx CELL TYPE-SPECIFIC ACTION POTENTIAL SECRETION COUPLING. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33840-33846.
 86. Villalobos, C., Núñez, L., & García-Sancho, J. (2004). Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(6), E1166-E1170.
 87. Weatherall, M. (1990). *In search of a cure: A history of pharmaceutical discovery*. Oxford University Press, USA.
 88. Weeke, J. (1975). The response of thyrotropin and triiodothyronine to various doses of thyrotropin releasing hormone in normal man. *European journal of clinical investigation*, 5(1), 447-453.
 89. Williams, V. L., DeGuzman, A., Dang, H., Kawaminami, M., Ho, T. W., Carter, D. G., & Walker, A. M. (2007). Common and specific effects of the two major forms of prolactin in the rat testis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(6), E1795-E1803.
 90. Zhu, X., Gleiberman, A. S., & Rosenfeld, M. G. (2007). Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiological reviews*, 87(3), 933-963.