



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MULTIRRESPUESTA DE CÉLULAS EN
REBANADAS DE ADENOHIPÓFISIS DE RATÓN EN
RESPUESTA A ALTERACIONES DE LOS EJES
NEUROENDÓCRINOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN FRANCISCO CUBILLOS ÁLVAREZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 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

Cubillos

Álvarez

Juan Francisco

55 46 71 18 18

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310605618

2. Datos del tutor

Dra.

Tatiana

Fiordelisio

Coll

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Patricia

Rivas

Manzano

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Mathieu Christian

Anne

Hautefeuille

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Rosa Nuria

Galindo

Solano

7. Datos del trabajo escrito

Multirrespuesta de células en rebanadas de adenohipófisis de ratón en respuesta a alteraciones de los ejes neuroendócrinos

71 p

2018

Tabla de contenido

Agradecimientos	4
Abreviaturas	5
Resumen	6
1. Introducción	7
1. Hipófisis	7
2. Neurohipófisis	8
3. Adenohipófisis	9
4. Irrigación de la hipófisis	12
5. Respuesta de Ca^{2+} intracelular	14
6. Ejes neuroendócrinos	17
1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	18
2. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	21
3. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	24
4. Prolactina	26
5. Hormona del crecimiento	27
2. Antecedentes	30
1. Plasticidad funcional de la hipófisis	30
2. Multifuncionalidad	32
3. Planteamiento del problema	35
4. Objetivos	36
1. Objetivo general	36
2. Objetivos particulares	36
5. Hipótesis	36
6. Materiales y método	36
1. Animales	36
2. Cirugías	37
3. Registro de actividad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en rebanadas de hipófisis	37
4. Análisis de datos	38
7. Resultados	40
1. Cambios en la respuesta	40
2. Cambios en la multirrespuesta	40

3. Cambios en la monorrespuesta	45
4. Cambios en la birrespuesta	46
5. Cambios en la trirrespuesta	50
6. Cambios en la tetrarrespuesta	51
8. Discusión	55
9. Conclusiones	61
10. Perspectivas	61
11. Literatura citada	63

Agradecimientos

A la Dra. Tatiana Fiordeliso, por su apoyo y dirección durante la realización de este trabajo, por su paciencia y comprensión, y a quien también quiero expresar mi profunda admiración por su compromiso con la sociedad y la ciencia en México.

A mis sinodales, la Dra. Patricia Rivas, el Dr. Mathieu Hautefeuille, el Dr. Luis Felipe Jiménez y la Biól. Nuria Galindo, por el tiempo que dedicaron a enriquecer esta tesis con sus valiosos comentarios y observaciones, y por su consideración al revisar este trabajo.

A la Biól. Ana Aquiles, por su enorme colaboración en la labor experimental y de análisis de resultado, así como por su amistad y su presencia constante.

A mis compañeros de laboratorio, por generar una atmósfera de camaradería y hostilidad a partes iguales que me permitió ser sin pretender.

Este trabajo fue financiado gracias a los proyectos PAPIIT IN227416 y CONACyT-ANR 273513.

Abreviaturas

[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular	IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica	IP₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
ADX	Adrenalectomía	IP3R	Receptor de IP ₃
AVP	Vasopresina	K_{ir}	Canal rectificador de potasio
cAMP	AMP cíclico	LH	Hormona luteinizante
Ca_v	Canal de calcio dependiente de voltaje	MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
CRH	Hormona liberadora de corticotropina	OQX	Orquiectomía
CRHR	Receptor de CRH	OVX	Ovariectomía
D2R	Receptor de dopamina 2	OXT	Oxitocina
DA	Dopamina	PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
DAG	Diacilglicerol	PKA	Proteína quinasa A
Eje HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	PKC	Proteína quinasa C
Eje HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	PLCβ	Fosfolipasa C-β
Eje HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	POMC	Proopiomelanocortina
FSH	Hormona foliculoestimulante	PRL	Prolactina
GCS	Glucocorticoides	RE	Retículo endoplásmico
GH	Hormona del crecimiento	SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico/endoplásmico
GHRH	Hormona liberadora de GH	SST	Somatostatina
GHRHR	Receptor de GHRH	SSTR	Receptor de SST
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas	T₃	Triyodotironina
GnRHR	Receptor de GnRH	T₄	Tiroxina
GNX	Gonadectomía	TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G	TRHR	Receptor de TRH
GR	Receptor de glucocorticoides	TSH	Hormona estimulante de la tiroides
GRK	Quinasa de GPCR	TX	Tiroidectomía
HCN	Canal activado por hiperpolarización y regulado por nucleótidos cíclicos		

Resumen

La hipófisis es una glándula esencial para el mantenimiento de la homeostasis en los vertebrados y para la regulación de múltiples funciones. Junto con el hipotálamo y las glándulas blanco de las hormonas que secreta, la hipófisis integra distintos ejes de regulación neuroendócrina, cuya alteración se asocia a diversas condiciones patológicas. Pese a la visión habitual de que cada tipo celular hipofisario responde a un único secretagogo hipotalámico, existe una proporción de células en esta glándula capaces de responder a dos o más factores liberadores hipotalámicos, las cuales se denominan células multirresponsivas. Con la finalidad de evaluar el efecto de las alteraciones en los ejes neuroendócrinos sobre la multirrespuesta en la hipófisis, se realizaron extirpaciones quirúrgicas de las glándulas adrenales, la tiroides y las gónadas en ratones hembra y macho. Se registró la respuesta de calcio intracelular de las células en rebanadas de hipófisis a factores hipotalámicos, y se cuantificó el número de células con respuesta a cada secretagogo y combinación de estos. Las células monorresponsivas fueron más abundantes que las multirresponsivas en todas las condiciones. Entre las células multirresponsivas, por lo general se presentó una mayor proporción de aquellas que respondieron a un menor número de factores hipotalámicos. Se observaron cambios en la respuesta de las células de la hipófisis a secretagogos, entre las que destacan un decremento en la proporción de somatotropos y, en la mayoría de los casos, un incremento en la presencia de gonadotropos. En hembras, cada alteración a los ejes se vio acompañada de un incremento en la proporción del tipo celular adenohipofisario correspondiente y, en varios casos, de un aumento en tipos de multirrespuesta que incluyen al factor hipotalámico asociado al eje. Lo anterior no se observó en machos. Además, las proporciones de diferentes tipos de monorrespuesta y multirrespuesta y su cambio después de alteraciones de los ejes fueron diferentes de lo reportado en estudios similares hechos en cultivos celulares, lo cual podría indicar que la respuesta de las células a señales hipotalámicas depende del contexto tisular en el que se encuentren.

1. Introducción

1. Hipófisis

La hipófisis es una glándula neuroendócrina presente en todos los vertebrados, la cual está involucrada en la regulación de múltiples funciones biológicas y en el mantenimiento de la homeostasis. Esta glándula se localiza en la silla turca, una depresión del hueso esfenoides, y está cubierta por un pliegue de la duramadre denominado diafragma selar. La hipófisis recibe su nombre de su posición bajo el cerebro, órgano con el cual se encuentra en estrecha interrelación (Melmed, 2011).

A través de la transducción de señales neuroendócrinas provenientes del hipotálamo, la hipófisis ejerce una función reguladora sobre la actividad de muchos tejidos del cuerpo, con los que interactúa mediante la secreción de hormonas. A su vez, la hipófisis es regulada por neurohormonas secretadas en el hipotálamo y por hormonas liberadas por sus glándulas blanco, con las cuales se establecen ejes de retroalimentación generalmente negativa. Esta interacción entre hipotálamo, hipófisis y tejidos blanco de hormonas hipofisarias es esencial para la regulación homeostática de los vertebrados y para la adaptación a retos ambientales y a cambios fisiológicos (Levine, 2012).

De acuerdo con su origen embriológico, la hipófisis se divide en dos partes: la neurohipófisis y la adenohipófisis, las cuales difieren en cuanto a anatomía, fisiología e histología. La neurohipófisis es de origen neuroectodérmico y surge como una proyección en dirección ventral del piso del diencefalo, llamada infundíbulo. Por su parte, la adenohipófisis tiene su origen embriológico en el ectodermo oral, iniciando como un divertículo del estomodeo que se expande en dirección dorsal, denominado bolsa de Rathke (Figura 1). Más adelante en el desarrollo embrionario, la bolsa de Rathke se escinde del estomodeo y se asocia con el infundíbulo. En el ser humano el proceso de desarrollo de la hipófisis comienza alrededor de la cuarta semana de gestación, mientras que en ratones esto sucede cerca del día embrionario 9 (Sheng, 1999; Kardong, 2012).

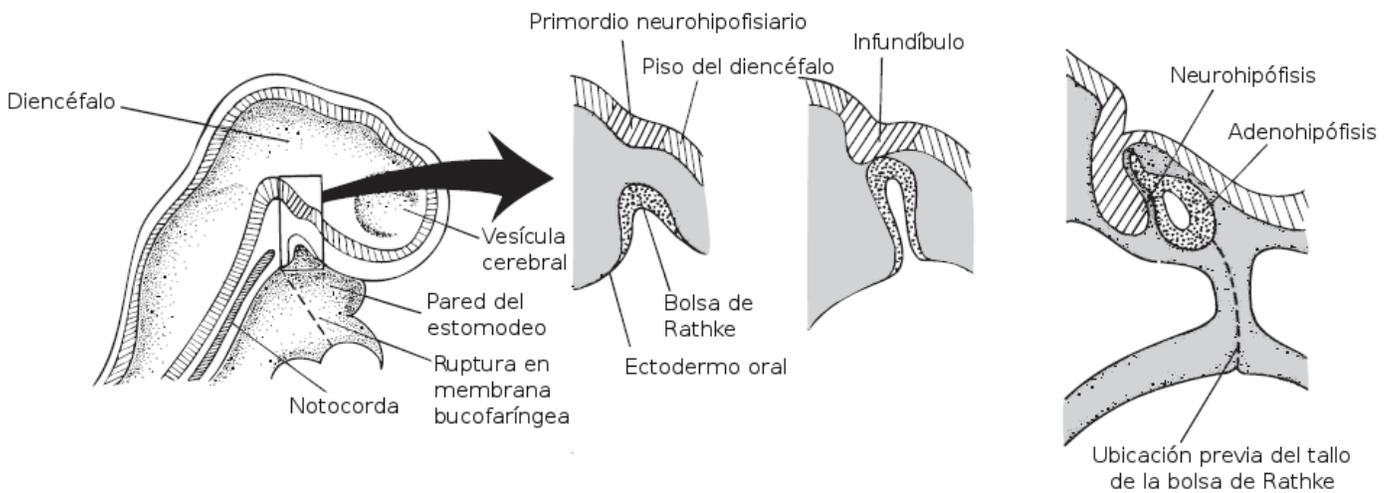


Figura 1. Desarrollo embrionario de la hipófisis. Un divertículo del estomodeo se expande dorsalmente y da origen a la bolsa de Rathke. A su vez, una proyección en dirección ventral del diencéfalo genera el infundíbulo. Las dos estructuras se asocian y la bolsa de Rathke pierde su conexión con el ectodermo oral, generando la adenohipófisis mientras que el infundíbulo da lugar a la neurohipófisis. Adaptado de Kardong (2012).

2. Neurohipófisis

La neurohipófisis es un componente neuroectodérmico de la glándula cuya principal función es la regulación homeostática del organismo a través de la secreción de las hormonas oxitocina (OXT) y vasopresina (AVP). Estas hormonas son liberadas en la *pars nervosa*, la división más grande de la neurohipófisis, la cual se encuentra compuesta principalmente por los axones no mielinizados de neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, por las terminales axónicas de estas células, y por pituicitos (células gliales que ayudan al almacenamiento y a la regulación de la secreción hormonal en las células neurosecretoras), (Ben-Shlomo y Melmed, 2011; Hall, 2015).

Además de la subdivisión mencionada, la neurohipófisis de los tetrápodos está integrada por el tallo infundibular (Figura 2), una estructura que conecta a la *pars nervosa* con la base del cerebro. Es a través de esta zona que atraviesan los axones de las células neurosecretoras que componen la neurohipófisis (Jameson, 2017).

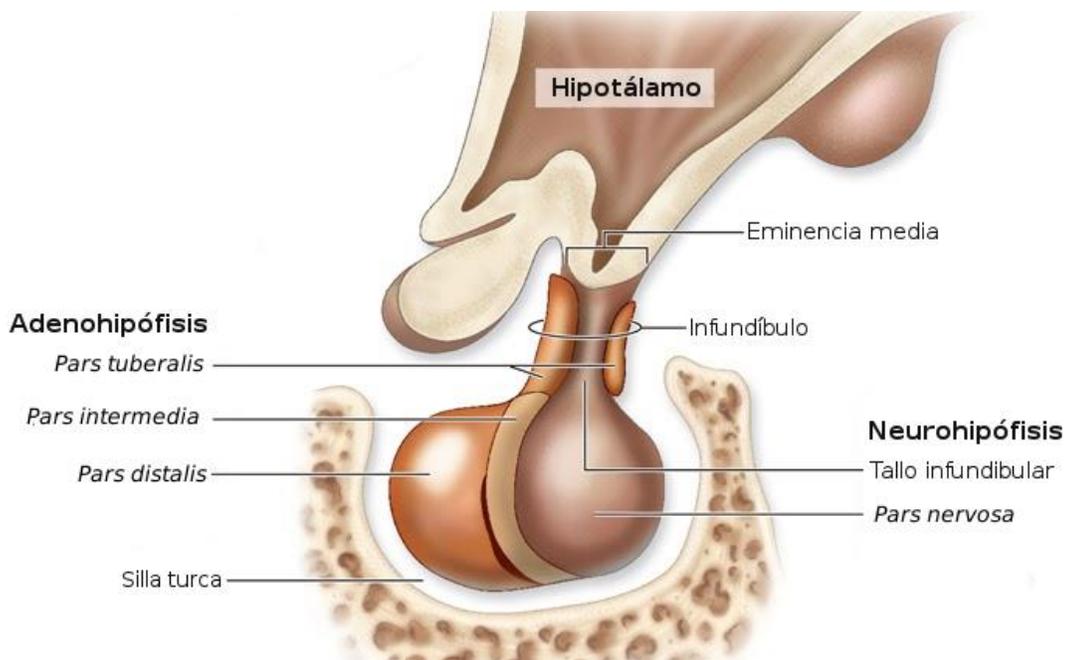


Figura 2. Anatomía de la hipófisis. La hipófisis se localiza sobre la silla turca del hueso esfenoides y se compone de dos partes: adenohipófisis, integrada por *pars tuberalis*, *pars intermedia* y *pars distalis* y neurohipófisis, integrada por tallo infundibular y *pars nervosa*. Esta glándula se conecta con la eminencia media del hipotálamo a través del infundíbulo. Adaptado de Mescher (2013).

3. Adenohipófisis

La adenohipófisis comprende la mayor parte de la hipófisis. Su función en la transducción de señales neuroendócrinas es clave para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo y permite el control de múltiples glándulas y la regulación de diferentes funciones biológicas (Ben-Shlomo y Melmed, 2011).

Esta región de la hipófisis desempeña una importante actividad endócrina, e incluye seis tipos de células excitables capaces de síntesis y secreción hormonal: gonadotropos que secretan hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), corticotropos que secretan hormona adrenocorticotrópica (ACTH), melanotropos que secretan hormona estimulante de los melanocitos (MSH), tirotropos que secretan hormona estimulante de la tiroides (TSH), lactotropos que secretan prolactina (PRL) y somatotropos que secretan hormona del crecimiento (GH). La liberación de estas hormonas depende de la actividad neurosecretora del hipotálamo, que secreta factores liberadores e inhibidores hacia la hipófisis (Levine, 2012).

La comunicación entre el hipotálamo y la adenohipófisis tiene lugar en la eminencia media, un área del hipotálamo en la que las ramificaciones de las arterias superiores hipofisarias forman el plexo capilar primario al que las terminales neurovasculares de las células neurosecretoras hipotalámicas liberan secretagogos. A diferencia del resto del hipotálamo, la eminencia media se encuentra desprovista de barrera hematoencefálica (Kleine y Rossmanith, 2016).

La adenohipófisis de los tetrápodos puede dividirse en tres regiones: *pars distalis*, *pars tuberalis* y *pars intermedia* (Figura 2).

En la *pars distalis* se lleva a cabo casi la totalidad de la función secretora de la adenohipófisis e incluye cinco tipos celulares endócrinos: gonadotropos, corticotropos, tirotropos, somatotropos y lactotropos. El tipo celular secretor más abundante de la *pars distalis* son los somatotropos, que representan alrededor del 50% de la población endócrina de la adenohipófisis. Por su parte, los lactotropos componen entre el 10 y el 25% de estas células, los corticotropos entre el 10 y el 15%, al igual que los gonadotropos, y los tirotropos son el tipo celular menos frecuente al representar menos del 10% del total de la población. Las proporciones de tipos celulares son variables en función del contexto fisiológico del organismo (Yeung, *et al.*, 2006; Jameson, 2017).

Las células endócrinas de la *pars distalis* se encuentran organizadas en grupos no necesariamente homotípicos, con un arreglo cordonal, y se encuentran soportadas por tejido conjuntivo reticular. A su vez, la *pars distalis* se encuentra rodeada por una cápsula de tejido conjuntivo denso fibroso, a partir de la cual surgen trabéculas de tejido conjuntivo hacia el interior de la glándula (Mescher, 2013).

La *pars tuberalis* es una proyección de la *pars distalis*, y envuelve al tallo infundibular de la neurohipófisis. Esta división de la adenohipófisis alberga a algunos gonadotropos (Ben-Shlomo y Melmed, 2011).

Por otra parte, la *pars intermedia* es una estructura celular localizada entre la *pars distalis* y las *pars nervosa*, derivada del lumen de la bolsa de Rathke. Su población endócrina se compone exclusivamente de melanotropos, los cuales secretan varios derivados de la proopiomelanocortina (POMC). Por lo general, la *pars intermedia* se encuentra poco desarrollada en tetrápodos, y en humanos adultos es rudimentaria (Drouin, 2011; Kardong, 2012).

Durante las primeras etapas del desarrollo de la adenohipófisis es esencial la interacción del ectodermo oral con el diencéfalo ventral. Factores de transcripción presentes en este último, como *Bmp4*, *Fgf8* y *10* y *Sox2* son importantes para la formación de la bolsa de Rathke. La proliferación celular en la bolsa de Rathke depende de la señalización de Shh y de factores de transcripción asociados con esta vía (Gil1-3). Posteriormente, diferentes factores transcripcionales de la familia LIM-HD como *Isl1*, *Lhx3* y *Lhx4* juegan papeles importantes en el mantenimiento celular de la hipófisis en desarrollo, así como en la regionalización de la misma.

Pitx1 y *Pitx2* son relevantes en la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células en esta etapa del desarrollo. *Fgf10* también es esencial para la supervivencia celular en esta fase (Zhu, *et al.*, 2007; Larkin y Ansorge, 2017).

El surgimiento de los tipos celulares depende de un cambio entre la tasa de expresión de factores que favorecen la proliferación celular y de factores que inducen la diferenciación. El primer tipo celular endócrino en diferenciarse son los corticotropos, alrededor del día e12.5 en ratón. La expresión de POMC es necesaria para la especificación de estas células, al igual que para el surgimiento de los melanotropos. La expresión de POMC depende de la interacción de varios factores de transcripción, incluyendo *Notch*, *Hes1*, *Tbx19* y *Pitx1*. *NeuroD1*, un factor bHLH (hélice-

bucle-hélice básica), también es importante para la expresión de POMC en corticotropos, pero no en melanotropos (Drouin, 2011).

La diferenciación de somatotropos, lactotropos y tirotropos es dependiente de la expresión del factor de transcripción *Pit1*, la cual comienza alrededor del día e13.5 en ratón y depende, a su vez, de otros factores como *Prop1*. Los mecanismos implicados en la separación del linaje de los somatotropos y de los lactotropos no están claros, aunque los estrógenos parecen ser una parte central de las interacciones que dan lugar a la diferenciación de lactotropos. La diferenciación de tirotropos, por su parte, depende de la expresión de *Gata2* además de la de *Pit1* (Drouin, 2011).

La diferenciación de gonadotropos depende de la expresión del factor de transcripción *Sf1*, en acción sinérgica con *Egr1*. Es posible que *Gata2*, cuya expresión en la hipófisis en desarrollo precede a *Sf1*, juegue un papel en la diferenciación de los gonadotropos, aunque su relevancia no está del todo dilucidada. Pese a que los gonadotropos son el último tipo celular en establecerse en la adenohipófisis, con expresión de LH y FSH en el día e16.5, *Sf1* es detectable en los futuros gonadotropos desde el día e13.5 en roedores (Figura 3) (Drouin, 2011).

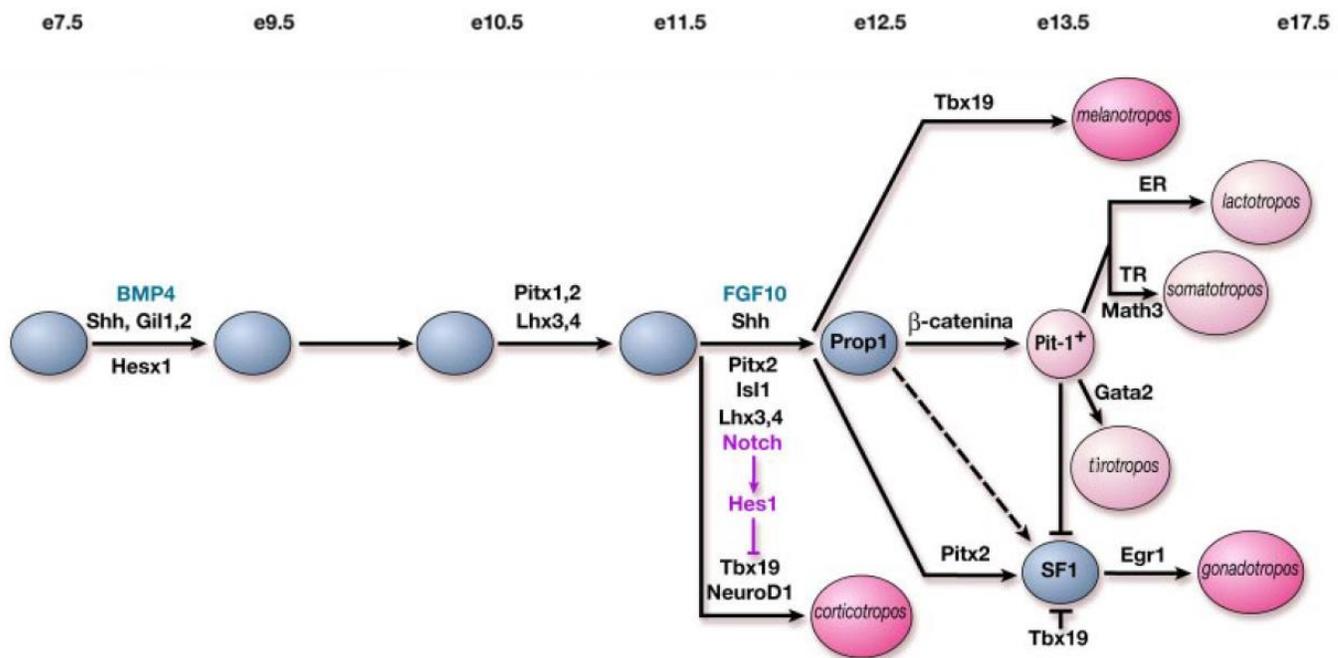


Figura 3. Diferenciación de los tipos celulares endocrinos de la adenohipófisis. La diferenciación de los tipos celulares de la adenohipófisis está asociada con la expresión de distintos factores de transcripción durante el desarrollo embrionario. Los linajes de corticotropos y melanotropos se diferencian tras la expresión de POMC, regulada por múltiples factores. La diferenciación de los gonadotropos depende de la expresión de *Sf1*. El linaje de somatotropos, lactotropos y tirotropos se diferencia tras la expresión de *Pit1*. La diferenciación de los tirotropos se da gracias al factor *Gata2*. Adaptado de Zhu, *et al.* (2007).

Durante el desarrollo de la adenohipófisis se establecen, además de las células endócrinas, varios tipos celulares sin actividad secretora, entre las que se cuentan las células foliculoestrelladas, células troncales y células vasculares o asociadas a la vasculatura.

Las células foliculoestrelladas tienen un origen neuroectodérmico, por lo que expresan marcadores como S100 y la proteína fibrilar acídica de la glía (GFAP). Estas células son excitables y forman una red en la adenohipófisis, estableciendo uniones comunicantes tanto con células endócrinas como con otras células foliculoestrelladas. Por esto, se ha propuesto que pueden desempeñar un papel en la orquestación de la secreción hormonal. Asimismo, las células foliculoestrelladas producen una serie de factores de crecimiento y de compuestos moduladores de la función endócrina, y expresan receptores a hormonas secretadas por células de la adenohipófisis, lo que podría implicar una función en la regulación de la actividad de esta glándula (Musumeci, *et al.*, 2015).

Algunas células en la adenohipófisis son positivas para el factor de transcripción *Sox2*, el cual se expresa en las células de la bolsa de Rathke durante el desarrollo embrionario. Estas células están presentes tanto en la *pars intermedia* como en la *pars distalis*, y están involucradas en la renovación de células endócrinas en la adenohipófisis, en la reparación de daño tisular y en la adaptación a condiciones de demanda fisiológica (Florio, 2011).

Finalmente, la adenohipófisis incluye también a células que integran a la vasculatura y a pericitos, células murales asociadas a los capilares sanguíneos, las cuales presentan actividad contráctil y están involucradas en la regulación del flujo de sangre dentro de la glándula (Del Río Valdés, 2015).

4. Irrigación de la hipófisis

La adenohipófisis cuenta con un sistema de vasos sanguíneos que permiten la comunicación a través de hormonas con el hipotálamo, así como la canalización de los productos de la secreción hormonal a la circulación sistémica (Figura 4). Esta glándula se encuentra irrigada por las arterias hipofisarias superiores, las cuales derivan de las arterias carótidas internas. En tetrápodos, estas arterias se ramifican a la altura del infundíbulo y forman el plexo capilar primario en la eminencia media. A partir de este plexo capilar, varios vasos sanguíneos corren en dirección a las *pars distalis*, en donde se establece el plexo capilar secundario, compuesto por capilares fenestrados. Mediante este conjunto de vasos sanguíneos, denominado sistema porta hipofisario, los factores liberadores e inhibidores provenientes del hipotálamo son distribuidos a las células endócrinas de la adenohipófisis, las cuales secretan hormonas que se dirigen a la circulación sistémica mediante venas que parten del plexo capilar secundario. Al mismo tiempo, existe un cierto grado de flujo sanguíneo retrógrado que permite el intercambio hormonal en ambos sentidos entre la adenohipófisis y el hipotálamo (Kaiser y Ho, 2016).

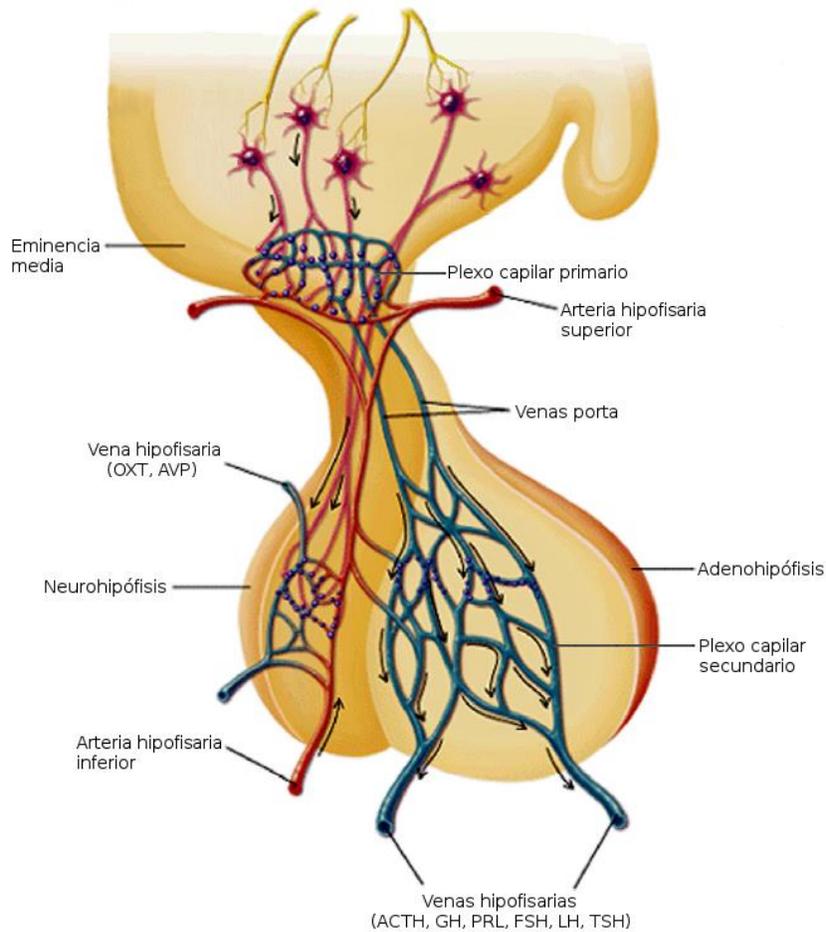


Figura 4. Irrigación de la hipófisis. La arteria superior hipofisaria se ramifica en la eminencia media y forma el plexo capilar primario, al que las células neurosecretoras hipotalámicas liberan su secreción. Estas hormonas viajan hacia el plexo capilar secundario, localizado en la *pars distalis*. Ahí, las células endócrinas hipofisarias entran en contacto con las neurohormonas y liberan sus propias hormonas, que salen a la circulación sistémica a través de las venas hipofisarias. La neurohipófisis está irrigada por las arterias hipofisarias superiores e inferiores, entre otras. Adaptado de Ben-Shlomo y Melmed (2011).

Por su parte, la neurohipófisis recibe sangre arterial de la circulación general, sin tener un sistema porta. El suministro sanguíneo hacia esta estructura está dado por varias arterias, entre las cuales resaltan las arterias hipofisarias superiores y inferiores, originadas de las arterias carótidas internas. Estas arterias se anastomosan en las inmediaciones de la neurohipófisis formando dos redes vasculares: el plexo anastomótico arterial circunfundibular, a la altura del tallo infundibular, y el círculo arterial hipofisario inferior, alrededor de la base de la hipófisis. A través de estos vasos sanguíneos, las hormonas liberadas por las terminales neurovasculares en la *pars nervosa* alcanzan la circulación sistémica (Gibo, *et al.*, 1993).

5. Respuesta de Ca^{2+} intracelular

La secreción hormonal depende de la señalización de calcio (Ca^{2+}), un catión divalente fundamental para todos los seres vivos debido a su capacidad para alterar la conformación de proteínas y campos electrostáticos a nivel local. Debido a dichas propiedades de este ion, muchos procesos celulares están asociados a su regulación, incluyendo además de la síntesis y secreción de hormonas a la proliferación celular, la contracción y la apoptosis, entre muchos otros. A causa de este papel fundamental en tantos procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis, varios de los cuales comparten vías efectoras, la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), al igual que sus patrones espaciotemporales de cambio, se encuentran sujetos a una estricta regulación por parte de diversos mecanismos. De esta manera las células compartimentalizan, extruyen o quelan al Ca^{2+} , manteniendo una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de alrededor de 100 nM, unas 20,000 veces menor a la concentración en el rango μM que se encuentra en el medio extracelular (Clapham, 2007).

Los tipos celulares secretores de la adenohipófisis son células excitables. En respuesta a la unión de determinados secretagogos hipotalámicos pueden generarse potenciales de acción y ocurrir cambios dinámicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante los cuales se da un incremento temporal de varios órdenes de magnitud en la concentración de este ion. De manera similar, la unión de ciertos agonistas de receptores en la membrana plasmática puede causar el efecto inverso y reducir la actividad eléctrica y de Ca^{2+} intracelular. La interacción de estos procesos determina la ocurrencia de la síntesis y la secreción de hormonas adenohipofisarias (Li, *et al.*, 1995).

La excitabilidad de las células de la adenohipófisis depende en gran medida de la actividad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v). Ante la despolarización de la membrana plasmática, estos canales se abren y permiten la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al interior de la célula. Existen varios canales Ca_v , los cuales se clasifican en canales de alto y de bajo umbral dependiendo de la magnitud de la despolarización de la membrana necesaria para su apertura. Los canales Ca_v tipo T son de bajo umbral y requieren un aumento pequeño en el potencial de membrana para activarse, inactivándose rápidamente después de abrirse. Por su parte, los canales Ca_v tipo L, N, P/Q y R son de alto umbral y permanecen activos por más tiempo, tras lo cual su inactivación no es completa. Las células endócrinas de la adenohipófisis presentan canales Ca_v tipo L y T (Stojilković, *et al.*, 2010).

En la vía G_s (Figura 5), la subunidad α de la proteína G activa a la enzima adenilato ciclasa, la cual cataliza la conversión de ATP a AMP cíclico (cAMP). El aumento en la concentración intracelular de cAMP, a su vez, activa a la proteína quinasa A (PKA), que fosforila residuos de serina y treonina en múltiples canales de membrana que al activarse permiten la entrada de iones que despolarizan a la membrana, promoviendo la apertura de canales Ca_v y la entrada de este ion del medio extracelular hacia el citosol. PKA, además, silencia a los canales rectificadores de potasio (K_{ir}), los cuales participan en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y dificultan la despolarización de la membrana (Stojilković, 2012).

La vía $G_{i/o}$ (Figura 5) tiene una función antagónica con la vía G_s . En este caso, la subunidad α de la proteína G, tras su activación y disociación, inhibe a la adenilato ciclasa. Esto impide la generación

de cAMP a partir de ATP y evita la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática. A su vez, las subunidades $\beta\gamma$ activan canales K_{ir} e inhiben la actividad de canales Ca_v tipo L, impidiendo la despolarización de la membrana plasmática y la secreción hormonal (Stojilković, *et al.*, 2010).

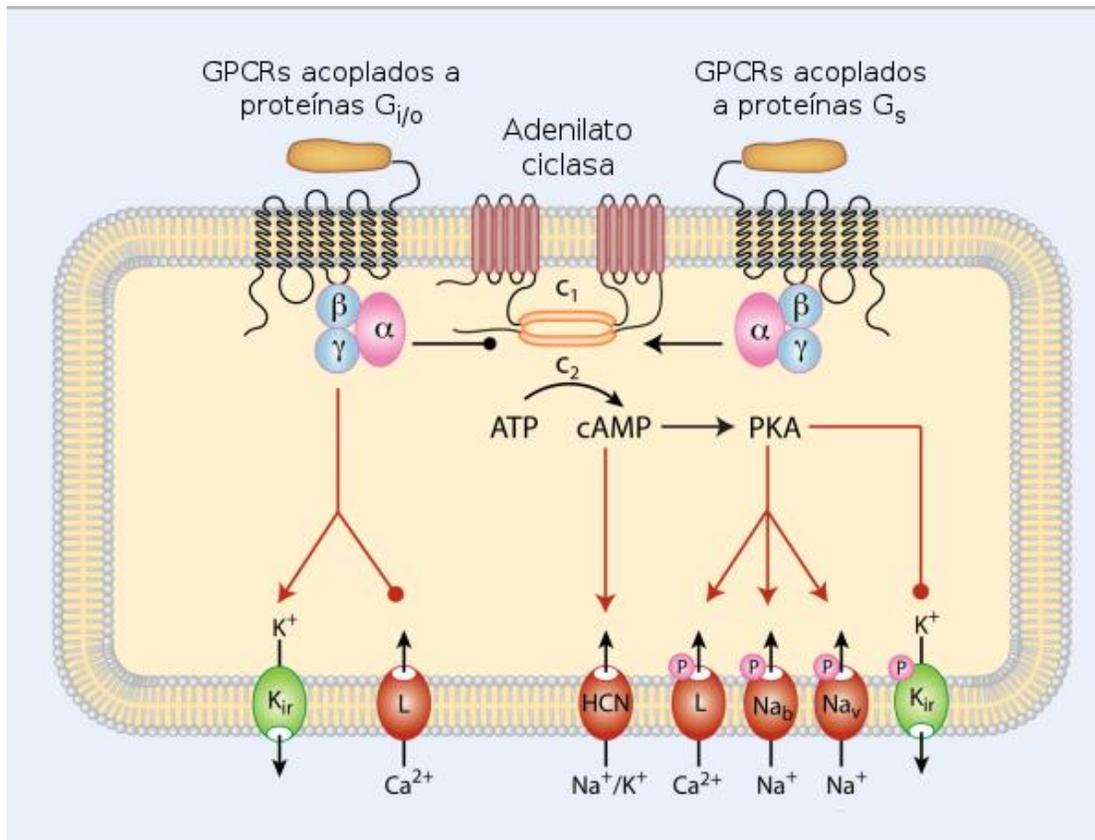


Figura 5. Vía de señalización mediada por GPCRs acoplados a proteínas G_s y $G_{i/o}$. La unión de un agonista a un GPCR en la membrana plasmática ocasiona la disociación de la subunidad α de la proteína G_s acoplada al receptor y la activación de la enzima adenilato ciclasa, la cual cataliza la conversión de ATP a cAMP. Al aumentar la concentración citosólica de cAMP se activa PKA, la cual permite la apertura de canales iónicos que despolarizan la membrana plasmática. PKA también causa el cierre de canales que mantienen el potencial en reposo de la membrana. La unión de agonistas a GPCRs acoplados a proteínas $G_{i/o}$ impide la despolarización de la membrana, ya que la subunidad α disociada de estas proteínas G inhibe a la adenilato ciclasa. Adaptado de Stojilković (2012).

En la vía $G_{q/11}$ (Figura 6), la subunidad α disociada de la proteína G se difunde al citosol y activa a la fosfolipasa C- β (PLC- β). Esta enzima cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) a diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). DAG, que es hidrofóbico, permanece en la membrana lipídica, mientras que IP_3 se difunde al citosol y alcanza sus receptores en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Los receptores de IP_3 (IP_3Rs) son canales catiónicos no selectivos que al abrirse permiten el paso de Ca^{2+} del RE al citosol, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por otro lado, DAG activa a diferentes isoformas de proteína quinasa C (PKC) presentes en la membrana plasmática, varias de las cuales también son activadas por el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ante el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocasionado por la salida de este ion del RE, bombas SERCA (ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico/endoplásmico) ayudan al relleno de

este reservorio y a la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, a la vez que bombas iónicas en la membrana plasmática, como el intercambiador Na^+/Ca^{2+} y la ATPasa de Ca^{2+} , extruyen al Ca^{2+} del citosol (Fiekers, 2001; Stojilković, *et al.*, 2005).

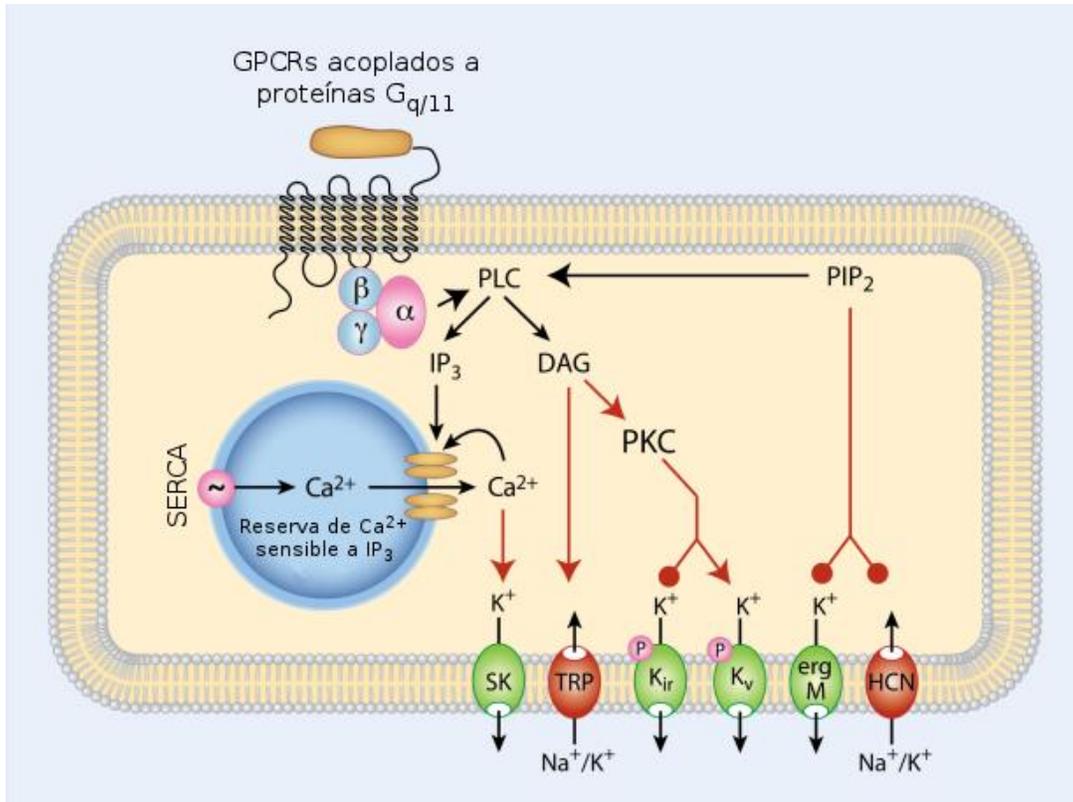


Figura 6. Vía de señalización mediada por GPCR acoplados a proteínas $G_{q/11}$. La unión de un agonista a un GPCR en la membrana plasmática ocasiona la disociación de la subunidad α de la proteína $G_{q/11}$ acoplada al receptor y la activación de PLC- β . Esta enzima cataliza la formación de IP_3 y DAG a partir de PIP_2 . DAG activa a PKC y genera la apertura o el cierre de diversos canales iónicos en la membrana plasmática. IP_3 activa canales iónicos en la membrana del RE, permitiendo la salida de Ca^{2+} hacia el citosol. Al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol, las bombas SERCA movilizan este ion al interior del RE. Adaptado de Stojilković (2012).

La activación de GPCR tiene como consecuencia la desensibilización de estos receptores. Este proceso puede darse por el desacoplamiento del receptor y las proteínas G a causa de su fosforilación por PKA o PKC, en lo que pueden estar involucrados DAG u otros mecanismos dependientes de Ca^{2+} , o mediante la acción de GRKs (quinasas de GPCR). Todas estas quinasas fosforilan residuos de serina o treonina en el carboxilo terminal de los GPCR, aunque las GRKs solamente presentan esta acción sobre receptores unidos a agonistas. La fosforilación de los GPCR permite la unión de β -arrestina, la cual los marca para endocitosis a través de complejos endocíticos. Tras ser endocitados, los GPCR pueden ser degradados en lisosomas o desfosforilados y reciclados (Ferguson, 2001).

Las células endócrinas de la adenohipófisis presentan actividad eléctrica espontánea independiente de la interacción con factores provenientes de fuera de la célula. Esto implica la generación de

potenciales de acción sin que se involucren vías de señalización en respuesta a la unión de agonistas con GPCRs, pero que son dependientes de la presencia de Ca^{2+} extracelular. La actividad de los canales activados por hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (HCN) se ha identificado como importante, aunque no suficiente, para que ocurra la actividad eléctrica espontánea en células de la adenohipófisis. Sin embargo, sólo en somatotropos y lactotropos esta actividad es suficiente para inducir un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tal que permita la secreción hormonal. Esto está relacionado con las características del cambio de potencial de membrana durante la generación de potenciales de acción espontáneos en estos dos tipos celulares y la manera en que influye en los osciladores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En somatotropos y lactotropos, además, la secreción inducida por actividad eléctrica espontánea se encuentra regulada negativamente por efectores de la vía $G_{i/o}$, específicamente por somatostatina (SST) y dopamina (DA). La actividad eléctrica espontánea es funcionalmente relevante, no solamente en cuanto a la secreción hormonal en somatotropos y lactotropos, sino también en lo que respecta al relleno de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} después de la estimulación con factores liberadores de hormonas (Li, *et al.*, 1995; Tomić, *et al.*, 1999; Van Goor, *et al.*, 2001; Kretschmannova, *et al.*, 2012; Durán-Pastén y Fiordeliso, 2013).

6. Ejes neuroendócrinos

El hipotálamo ejerce un control neurohumoral sobre la actividad secretora de la adenohipófisis. Las células de esta glándula liberan diferentes hormonas en respuesta a estímulos hipotalámicos, las cuales tienen su blanco en diversos tejidos a lo largo del cuerpo. A su vez, estos responden a dicha interacción produciendo una amplia gama de compuestos que generan cambios fisiológicos. Tanto el hipotálamo como la hipófisis son sensibles a señales endócrinas producidas en respuesta a las hormonas que liberan y, al mismo tiempo, ambos responden a metabolitos presentes en la circulación. Finalmente, el hipotálamo recibe conexiones neuronales aferentes mediante las cuales otras partes del cerebro pueden modular su actividad, estableciéndose frecuentemente una vía de comunicación indirecta asociada con los productos de la interacción de hormonas adenohipofisarias con sus blancos. El conjunto de interacciones entre hipotálamo, adenohipófisis y tejidos blanco de las hormonas que esta secreta establecen diferentes ejes de control neuroendócrino, los cuales constituyen sistemas de regulación homeostática (Levine, 2012).

Los ejes de regulación neuroendócrina pueden tener dos o tres niveles, dependiendo de si tienen glándulas blanco definidas (tres niveles) o si la principal interacción del eje se da entre el hipotálamo y la hipófisis, con múltiples tejidos blanco de las hormonas adenohipofisarias (dos niveles), (Figura 7). Habitualmente se reconocen como ejes neuroendócrinos solamente aquellos que se establecen entre hipotálamo, hipófisis y gónadas, glándulas adrenales o tiroides. Los distintos elementos de estos ejes integran y transducen información proveniente de distintas fuentes, entre las que predominan las señales del nivel inmediato superior en la composición del eje. De forma simplificada, puede considerarse que los ejes neuroendócrinos son capaces de detectar desviaciones del valor de referencia de diferentes parámetros fisiológicos en contextos biológicos específicos, y de responder a ellos mediante cambios en la secreción hormonal que

permiten mantener la homeostasis. Los ejes neuroendócrinos establecen sistemas de retroalimentación sobre su propia actividad, que por lo general son de tipo inhibitorio. Las asas de retroalimentación entre las glándulas blanco y el hipotálamo o la hipófisis se denominan asas largas, mientras que las que ocurren entre la hipófisis y el hipotálamo son asas de retroalimentación cortas (Levine, 2012).

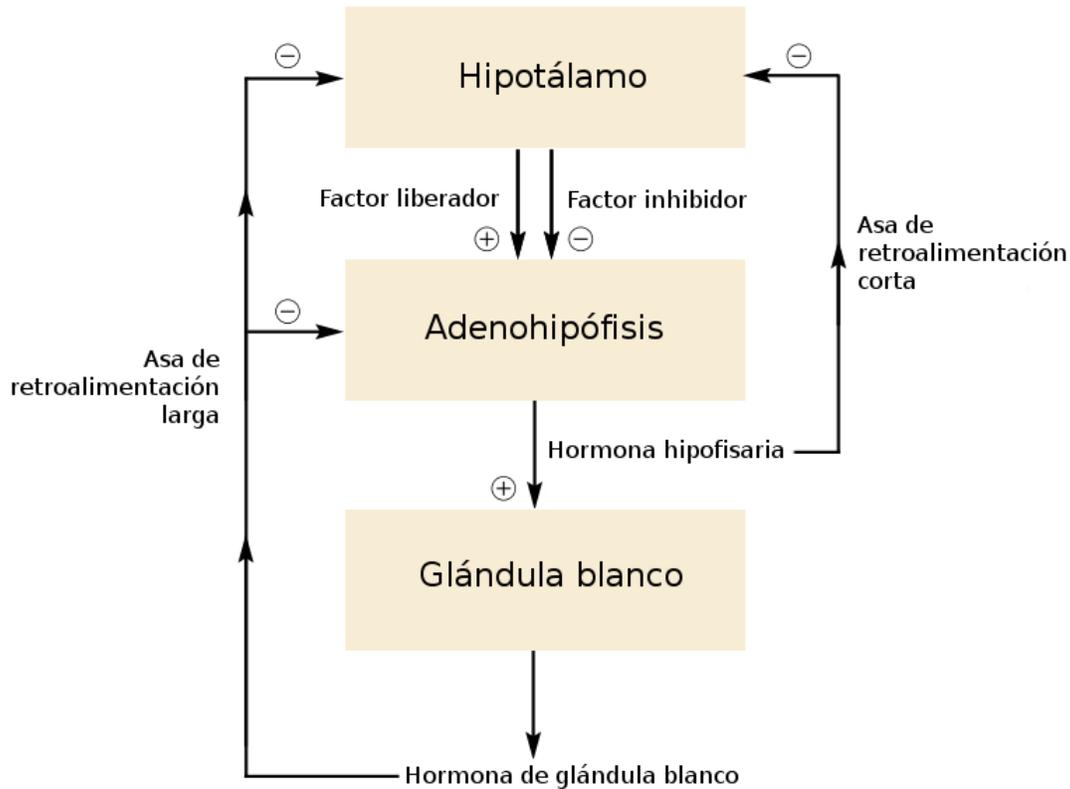


Figura 7. Representación esquemática de ejes de regulación neuroendócrina. El hipotálamo libera factores liberadores e inhibidores hacia la adenohipófisis. En respuesta, células en esta glándula secretan hormonas que viajan por el torrente sanguíneo y alcanzan sus glándulas blanco, generando secreción hormonal en estas. Las hormonas hipofisarias pueden establecer asas de retroalimentación corta con el hipotálamo, mientras que las hormonas producidas por las glándulas blanco tienen asas de retroalimentación larga con la adenohipófisis y el hipotálamo. Adaptado de Hiller-Sturmhöfel y Bartke (1998).

1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) está integrado por células parvocelulares de las regiones medio-basal, infundibular y periventricular del hipotálamo que secretan hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), gonadotropos en la hipófisis y células de la teca y de la granulosa, en hembras, o células de Sertoli y de Leydig en machos (Figura 8). Las neuronas GnRHérgicas hipotalámicas liberan GnRH hacia la circulación de la hipófisis, en la eminencia media. A través del sistema porta hipofisario, esta neurohormona alcanza a los gonadotropos, que liberan gonadotropinas (LH y FSH) en respuesta a la interacción de GnRH con su receptor de membrana. A

su vez, las gonadotropinas ejercen un efecto biológico al interactuar con células en el aparato reproductor (Kleine y Rossmannith, 2016).

El eje HHG permite la capacidad reproductiva de los organismos mediante la regulación de la gametogénesis y la esteroidogénesis (Kaiser, 2011).

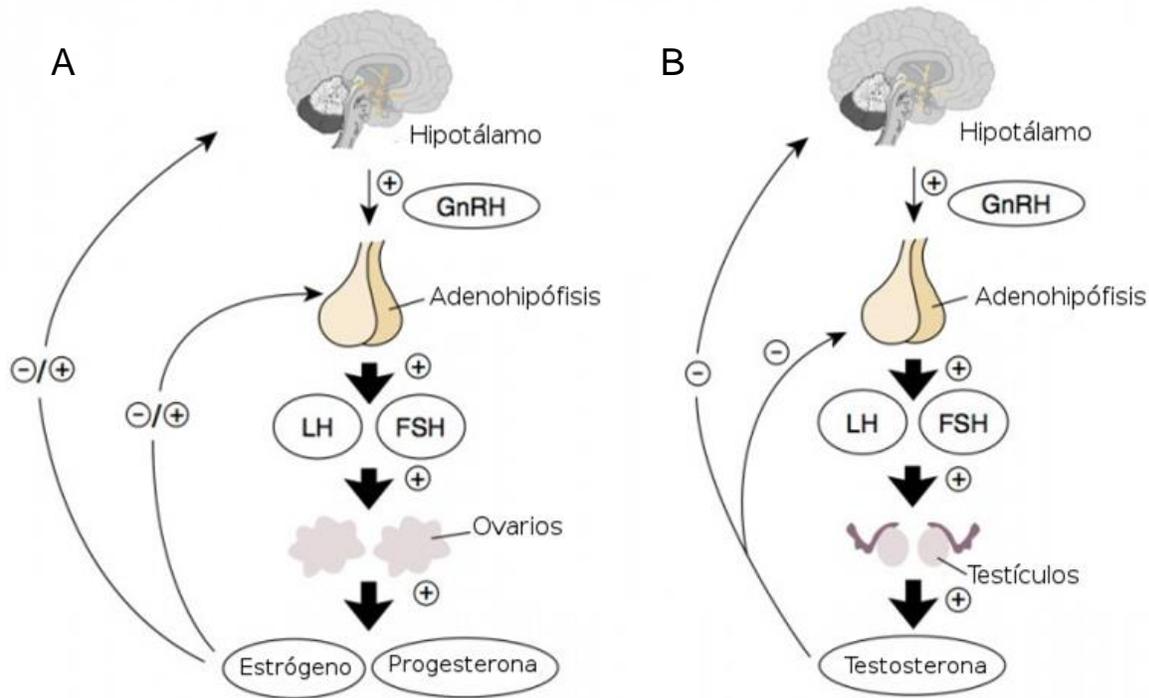


Figura 8. Componentes y regulación del eje HHG en hembras y machos. Neuronas del hipotálamo liberan GnRH a la eminencia media, tras lo cual esta hormona alcanza a los gonadotropos en la adenohipófisis. En respuesta a esto, los gonadotropos secretan LH y FSH al torrente sanguíneo, que interactúan con los ovarios (A) o los testículos (B) y estimulan la producción de hormonas sexuales, las cuales establecen un asa de retroalimentación negativa sobre el eje. Adaptado de Hiller-Sturmhöfel y Bartke (1998).

La molécula de GnRH es un decapeptido cuya unión con receptores de membrana en los gonadotropos da lugar a la síntesis y secreción de LH y FSH. Existen cuatro formas de GnRH descritas en vertebrados, las cuales varían en función del tejido y del grupo taxonómico. En tetrápodos se suele expresar alguna forma de GnRH1 y una GnRH2 que es común a todos, siendo GnRH1 la forma asociada con la secreción de gonadotropinas en la hipófisis (Chen y Fernald, 2008; Roch, *et al.*, 2012).

Las neuronas GnRHérgicas del hipotálamo liberan este secretagogo como resultado de su estimulación por diferentes factores. Entre los numerosos compuestos que regulan la actividad de estas células se encuentra la kisspeptina, la leptina, el gliceraldehído 3-fosfato (G3P), la hormona liberadora de corticotropina (CRH), glucocorticoides (GCs), DA, serotonina, GABA, glutamato y hormonas sexuales en sangre, así como la GnRH misma. De esta manera, la síntesis de GnRH está acoplada al estado metabólico y de estrés del organismo. La principal asa de retroalimentación

negativa del eje HHG se da a través de hormonas esteroideas producidas en las gónadas (estradiol, progesterona, testosterona). Sin embargo, niveles altos de estradiol en sangre antes de la ovulación actúan como una señal de retroalimentación positiva sobre la síntesis y secreción de LH mediante la estimulación de la liberación de GnRH en el hipotálamo y la sensibilidad de los gonadotropos a esta neurohormona. Compuestos como activinas, inhibinas y folistatina también son reguladores importantes de la función del eje HHG. Uno de los mecanismos mediante los cuales se ejerce esta regulación es el control de la expresión de GnRHR en los gonadotropos, la cual modifica la capacidad de estas células para responder a estímulos con GnRH. La modulación de la expresión de estos receptores es importante, por ejemplo, en la progresión de los ciclos sexuales en hembras (Millar, *et al.*, 2012; Durán-Pastén y Fiordeliso, 2013; Low, 2016).

La liberación de GnRH se da de forma coordinada, en pulsos cuya dinámica temporal tiene un efecto sobre la secreción de FSH o de LH. Pulsos de alta frecuencia de GnRH están asociados con la síntesis y secreción de LH, mientras que pulsos con baja frecuencia promueven que se libere FSH. Pese a que la secreción de esta última se ve influida por GnRH, esta hormona se produce y libera de manera constitutiva en los gonadotropos, y se encuentra limitada por la tasa de biosíntesis de FSH β . Cabe mencionar que tanto las gonadotropinas como TSH comparten una misma subunidad α , mientras que la subunidad β es específica para cada hormona (Krsmanović, *et al.*, 1996; Durán-Pastén y Fiordeliso, 2013).

Los gonadotropos, presentes en la *pars distalis* y en la *pars tuberalis*, son células medianas con una morfología ovalada a irregular, las cuales poseen un núcleo prominente, redondo y excéntrico. Tanto el aparato de Golgi como el RE rugoso son también notorios en estas células, que presentan gránulos de secreción electrodensos de diferentes tamaños. Estas células sintetizan y secretan gonadotropinas en respuesta a la unión de GnRH a su receptor en la membrana plasmática. Existen tres tipos de receptores de GnRH (GnRHRs) descritos, de los cuales GnRHR1 es la forma prevalente tanto en el hipotálamo como en los gonadotropos de los mamíferos. Este receptor es capaz de unirse a GnRH1 y 2. GnRHR2 es la forma más conservada de este receptor y se encuentra en todos los grupos de vertebrados, aunque en ocasiones está ausente en mamíferos, al igual que GnRH2. GnRHR1 de mamíferos es particular debido a que carece de carboxilo terminal intracelular, lo cual se ha asociado con su tasa lenta de desensibilización e internalización en esta clase de vertebrados (Childs, 1997; Millar, *et al.*, 2004; Kleine y Rossmannith, 2016).

Ante la unión a GnRH, los GnRHRs activan vías de señalización que resultan en secreción hormonal. Esto ocurre principalmente a través de proteínas $G_{q/11}$, aunque estos receptores pueden encontrarse asociados a proteínas G_s y G_i . La dinámica de la señalización intracelular inducida por GnRH puede tener diferentes patrones en cuanto a la $[Ca^{2+}]_i$: subumbral, si el estímulo no es suficiente para generar una respuesta capaz de dar lugar a suficiente liberación de Ca^{2+} de los reservorios, oscilatoria, en la que la concentración de este ion aumenta y disminuye secuencialmente, bifásica oscilatoria, en la que un aumento de gran magnitud en la $[Ca^{2+}]_i$ es seguido por oscilaciones en esta concentración, o bifásica no oscilatoria, cuando tras el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ tiene un solo pico. La generación de oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ está asociada con la dinámica de entrada y salida de Ca^{2+} del RE. Mientras que los IP3Rs en la membrana de este organelo

responden al aumento en la concentración de IP_3 , permitiendo el eflujo de Ca^{2+} del RE, la interacción de este ion con el lado citoplásmico de los receptores ocasiona una liberación todavía mayor de Ca^{2+} al citosol, amplificando la señal. Incrementos muy altos de la $[Ca^{2+}]_i$ en las inmediaciones de los IP_3Rs ocasionan, a su vez, la inactivación de los mismos, limitando la salida de Ca^{2+} al citosol. La interacción entre la activación de los IP_3Rs , su inactivación por Ca^{2+} y la acción de las bombas SERCA genera un patrón oscilatorio de la $[Ca^{2+}]_i$. Se ha sugerido que diferentes patrones de señalización de Ca^{2+} están involucrados en diferentes funciones, como la síntesis y secreción diferenciales de distintas hormonas (Stojilković y Tomić, 1996; Jiménez Medina, 2015).

En respuesta a GnRH, los gonadotropos liberan FSH y LH al torrente sanguíneo, ambas glucoproteínas diméricas. LH tiene receptores en la membrana de las células de la teca o de las células de Leydig, según el sexo. En el caso de las hembras, LH propicia el desarrollo de cuerpos lúteos, la ovulación y la síntesis de andrógenos en las células de la teca. En machos, esta hormona está asociada con la producción de testosterona en las células de Leydig. Por su parte, FSH cuenta con receptores en las células de la granulosa y de Sertoli. En las hembras, FSH ocasiona la conversión de andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa, y está implicada también en la foliculogénesis. En machos, esta hormona es importante en el proceso de espermatogénesis a través de la regulación de la actividad de las células de Sertoli (Wu, *et al.*, 2007; Richards y Panga, 2010; Kaiser, 2011).

Alrededor del 70% de los gonadotropos son bihormonales y secretan tanto LH como FSH, mientras que el resto de estas células son monohormonales. Las proporciones de gonadotropos mono y bihormonales están sujetas a cambios en función del contexto fisiológico, por ejemplo, en las fases del ciclo estral (Moriarty, 1976).

2. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) se establece entre neuronas parvocelulares CRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo, corticotropos en la adenohipófisis que liberan ACTH y las glándulas adrenales o suprarrenales (Figura 9). Este eje está relacionado con la respuesta a diferentes factores estresores, tanto psicológicos como físicos. Entre estos se encuentran la hipoglucemia, la actividad física intensa y el hambre. Además, el eje HHA está en estrecha interrelación con el sistema inmune, habiendo una regulación mutua entre las funciones de estos dos componentes (McEwen, 2000; Wang y Majzoub, 2011).

El eje HHA interactúa con los otros ejes neuroendócrinos, lo cual es de particular importancia en la respuesta a estresores físicos agudos, cuando desencadena la reacción de lucha, huida o parálisis. En este proceso, hay cambios hormonales en el organismo que incrementan la probabilidad de sobrevivencia, a costa del almacenamiento energético, el crecimiento y la función reproductora (Engelmann, *et al.*, 2004)

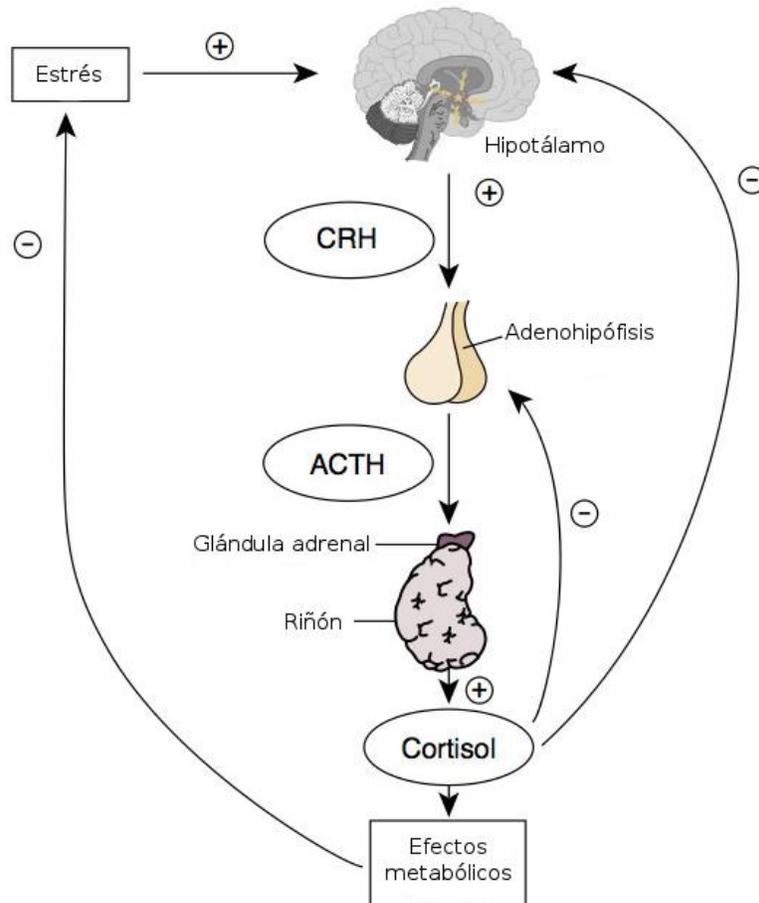


Figura 9. Componentes y regulación del eje HHA. Neuronas del hipotálamo liberan CRH a la eminencia media, tras lo cual esta hormona alcanza a los corticotropos en la adenohipófisis. En respuesta a esto, los corticotropos secretan ACTH al torrente sanguíneo, la cual interactúa con las glándulas adrenales y estimula la producción de corticosteroides, los cuales establecen un asa de retroalimentación negativa sobre el eje. Adaptado de Hiller-Sturmhöfel y Bartke (1998).

Neuronas hipotalámicas secretan CRH, una hormona peptídica que, tanto en primates como en roedores, tiene una secuencia de 41 residuos de aminoácidos. Al interactuar con receptores GPCRs en la membrana de los corticotropos, en la adenohipófisis, estas células liberan ACTH a la circulación sistémica. Dado que el eje HHA está involucrado en muchas funciones fisiológicas, la secreción de CRH por neuronas hipotalámicas está sujeta a regulación por varios factores que favorecen la liberación de esta neurohormona, como citocinas y neurotransmisores inflamatorios, glutamato, leptina y DA, y que la inhiben, como GCs, GABA y SST (Ben-Shlomo y Melmed, 2011).

Aparte de CRH, existen péptidos con secuencia similar (urocortina 1-3, sauvagina, urotensina I) que ejercen un papel regulador sobre la función del eje HHA. Además, AVP tiene un efecto sinérgico con CRH, potenciando la liberación de CRH en los corticotropos (Aguilera, *et al.*, 2004).

Los receptores de CRH (CRHRs) son GPCRs presentes en diferentes tejidos, que activan vías de señalización intracelular en respuesta a péptidos de la familia de CRH. Existen tres formas de

CRHRs. CRHR1 se encuentra en la membrana de los corticotropos, así como en estructuras del sistema nervioso como la corteza cerebral y el cerebelo. La expresión de este receptor en el núcleo paraventricular del hipotálamo se incrementa en respuesta a estrés. Mientras tanto, CRHR2 se presenta en áreas subcorticales del cerebro y tejidos periféricos. Los roedores tienen dos formas de CRHR2: α y β . CRHR2 α está presente en células del hipotálamo en estos animales (Aguilera, *et al.*, 2004).

Tanto CRH como urocortina 1 pueden unirse a CRHR1 y 2, mientras que las urocortinas 2 y 3 solamente se unen a CRHR2. Ante la activación de CRHR1 se da un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por proteínas G_s . En este caso, la acción de PKA ocasiona el cierre de los canales rectificadores TREK-1, lo que despolariza la membrana plasmática y ocasiona el influjo de Ca^{2+} asociado con el incremento en la síntesis de POMC. Tras su estimulación por un agonista, CRHR1 es rápidamente fosforilado mediante la acción de PKC, no de PKA, después de lo que se desensibiliza e internaliza. Al mismo tiempo, AVP actúa sobre la liberación de ACTH en los corticotropos a través de los receptores V1 y V2 presentes en la membrana de estas células. Estos receptores están involucrados en el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y en el incremento en la concentración de cAMP mediante la activación de adenilato ciclasa. AVP estimula la liberación de ACTH a través de la acción de PKC (Dieterich, *et al.*, 1996; Mazzocchi, *et al.*, 1997).

Los corticotropos, localizados en la *pars distalis* de la adenohipófisis, son células angulares, con RE bien desarrollado y aparato de Golgi prominente. La respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de estas células ante la estimulación con agonistas es oscilatoria, y dependiente de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, lo que genera un patrón observable en el cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ tras la exposición de las células a CRH. Además, a diferencia de lo que ocurre en gonadotropos, el papel de las bombas SERCA y de la reentrada de Ca^{2+} al RE parece ser menos importante en corticotropos, con un rol más prominente del transporte de Ca^{2+} al interior de las mitocondrias en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ (Guérineau, *et al.*, 1991; Lee y Tse, 2005; Wang y Majzoub, 2011).

Al contrario de lo que se observa en gonadotropos, mientras haya al menos una pequeña cantidad de CRHR1 en la membrana de los corticotropos, el número de estos receptores no parece jugar un papel importante en la respuesta de estas células a CRH y urocortina (Aguilera, *et al.*, 2004).

La estimulación con CRH y/o con urocortina 1 genera un aumento en la síntesis de POMC, que luego es procesado por distintos mecanismos y da lugar a diferentes productos. El corte de este péptido por prohormona convertasas permite la generación de ACTH en los corticotropos. ACTH es liberada al torrente sanguíneo e interactúa con receptores en la membrana de células de las glándulas adrenales, estimulando su actividad esteroideogénica (Aguilera, *et al.*, 2004).

Los GCs, sobre todo el cortisol, son los principales reguladores negativos del eje HHA. Estos compuestos son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y de unirse a receptores de GCs (GRs) tipo I y II en las neuronas CRHérgicas del hipotálamo, en respuesta a lo cual estas células sufren una disminución en la expresión del gen de CRH, en los niveles del péptido y en la tasa de secreción del mismo. Este efecto está asociado con la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células

CRHérgicas del hipotálamo y con el aumento de la neurotransmisión GABAérgica hacia estas células, lo cual inhibe la liberación de CRH. Además de su efecto sobre la secreción de CRH, los GCs también inhiben la secreción de AVP en neuronas hipotalámicas y la síntesis de POMC en corticotropos. Cabe mencionar que los GCs no tienen efecto, o incluso tienen un efecto positivo sobre la transcripción de CRH en neuronas CRHérgicas no involucradas en el control hipofisario (Dallman, 2005; Wang y Majzoub, 2011).

La liberación de ACTH sigue un ritmo circadiano, marcado por proyecciones de neuronas del núcleo supraquiasmático hacia las células del núcleo paraventricular del hipotálamo, con niveles altos de ACTH y GCs temprano en la mañana. Asimismo, ACTH es secretada en ráfagas irregulares a lo largo del día (Chung, *et al.*, 2011).

3. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) incluye a neuronas parvocelulares TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo, a tirotropos que secretan TSH y a la glándula tiroides (Figura 10). A través de la regulación entre estos componentes se ejerce un control sobre la homeostasis metabólica del organismo, así como de algunas funciones relacionadas como la termogénesis, la función cardiovascular, el desarrollo y el crecimiento (Nillni, 2010; Hall, 2015).

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido generado en células neurosecretoras hipotalámicas a través de la conversión enzimática de precursores de mayor longitud, mediante la acción de prohormona convertasas, exopeptidasas y la enzima PAM (monooxidasa peptidil-glicina alfa-amidante). La secuencia de este tripéptido se encuentra conservada en todos los vertebrados. TRH tiene receptores en la membrana de los tirotropos y los lactotropos, en la adenohipófisis. Su interacción con GPCRs en los tirotropos da lugar a la síntesis y secreción de TSH, la cual a su vez presenta receptores en las células de los folículos tiroideos, en los que promueve la incorporación de yodo y tiroglobulina y la producción de tiroxina (T_4), la cual es modificada a triyodotironina (T_3) tanto en la tiroides como en otros tejidos del organismo (Zoeller, *et al.*, 2007).

Los tirotropos son células de la *pars distalis* de la adenohipófisis con forma irregular (poligonal, alargada o estrellada), núcleo elíptico en posición central y organelos bien desarrollados, con gránulos de secreción hacia la periferia. Estas células presentan receptores de TRH (TRHRs), GPCRs estimulados por dicha hormona hipotalámica. En los vertebrados existen tres tipos de TRHR, de los cuales los roedores presentan TRHR1 y 2, siendo la primera la forma predominante en los tirotropos. Al ser estimulados con TRH, estos receptores activan la vía de señalización mediada por proteínas $G_{q/11}$, dando lugar al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de TSH asociados a la hidrólisis de PIP_2 y a la activación de la PKC. Esta respuesta de Ca^{2+} intracelular normalmente es de tipo bifásico no oscilatorio, con un aumento marcado en la $[Ca^{2+}]_i$ seguido de un descenso hacia una meseta en la concentración de este ion. Sin embargo, en ocasiones la dinámica de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ puede tener solamente un pico, sin pasar luego a una meseta, o exclusivamente una meseta. Después de su activación, TRHR1 es rápidamente fosforilado por la acción de GRK2, lo que permite

la internalización de estos receptores y la desensibilización de los tirotrópos a la estimulación con TRH (Saito, *et al.*, 2011; Hinkle, *et al.*, 2012; Stojilković, 2012; Kleine y Rossmannith, 2016).

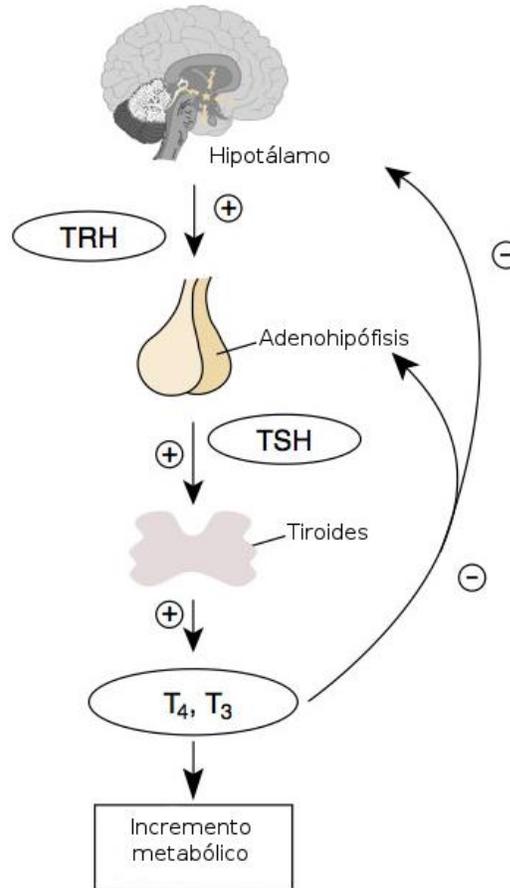


Figura 10. Componentes y regulación del eje HHT. Neuronas del hipotálamo liberan TRH a la eminencia media, tras lo cual esta hormona alcanza a los tirotrópos en la adenohipófisis. En respuesta a esto, los tirotrópos secretan TSH al torrente sanguíneo, la cual interactúa con la tiroides y estimula la producción de hormonas tiroideas, las cuales establecen un asa de retroalimentación negativa sobre el eje. Adaptado de Hiller-Sturmhöfel y Bartke (1998).

Además de regular la producción de TSH en los tirotrópos, TRH también regula la glucosilación de esta hormona adenohipofisaria, lo cual modifica su biodisponibilidad y, por lo tanto, su efecto fisiológico (Taylor y Weintraub, 1985).

Las hormonas tiroideas (T₄ y T₃), sintetizadas en la tiroides en respuesta a TSH, constituyen los reguladores negativos más importantes del eje HHT y tienen un efecto inhibitorio sobre la liberación hormonal de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo y de los tirotrópos. Estas hormonas se encuentran en el plasma sanguíneo en unión con otras proteínas. Además de esto, la síntesis y secreción de TSH en la adenohipófisis está sujeta a regulación por parte de moléculas como DA, SST

y GCs, las cuales representan la interacción del eje HHT con otros sistemas de regulación neuroendócrina. Existe evidencia que sugiere que la síntesis y secreción de TSH en la hipófisis se encuentra bajo regulación por factores endócrinos y parácrino como la neurotensina y la neuromedina B (Segerson, *et al.*, 1987; Pazos-Moura, *et al.*, 2003; Melmed, 2017).

4. Prolactina

La interacción entre neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares de los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo, neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular y los lactotrofos de la adenohipófisis establece un eje neuroendócrino de dos niveles centrado alrededor de la secreción de PRL (Figura 11). Este eje está involucrado en una gran cantidad de procesos en los vertebrados, entre las que se encuentran el balance electrolítico e hídrico, el crecimiento y el desarrollo (especialmente en organismos con metamorfosis), la reproducción, la regulación del sistema inmune, la lactancia, entre otros. En mamíferos, la PRL actúa conjuntamente con las gonadotropinas y modula su función en la formación y mantenimiento de los cuerpos lúteos, la secreción de progesterona, la maduración de ovocitos, la capacitación espermática y varios otros procesos (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001; Lovejoy, 2005; Melmed, 2017).

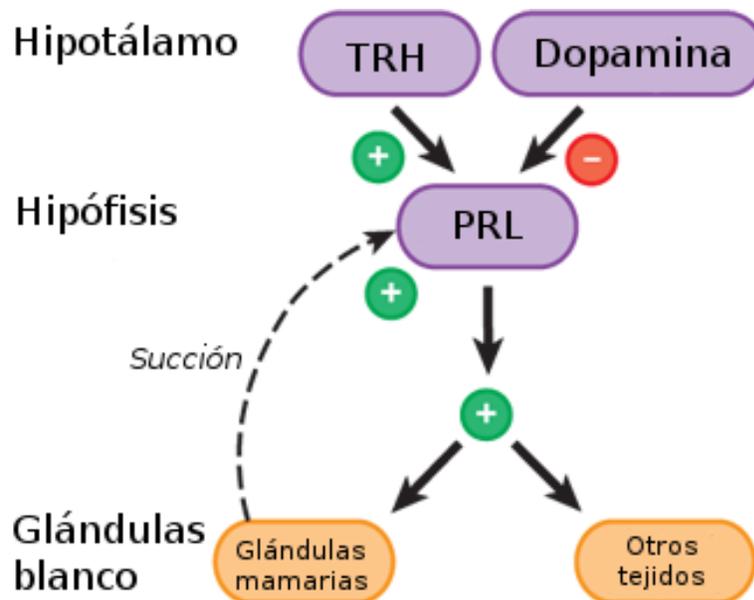


Figura 11. Regulación neuroendócrina de la secreción de PRL en mamíferos. Neuronas del hipotálamo liberan TRH y DA a la eminencia media, tras lo cual estos factores alcanzan a los lactotrofos en la adenohipófisis. En respuesta a la estimulación con TRH y otros compuestos, los lactotrofos secretan PRL al torrente sanguíneo, función inhibida por DA. PRL ejerce un efecto sobre múltiples tejidos blanco, incluidas las glándulas mamarias. Adaptado de Parker y Schimmer (2011).

Los lactotrofos son células redondas o poliédricas con núcleo ovalado, que tienen una gran cantidad de gránulos de secreción de tamaño variable. La secreción de PRL en estas células es estimulada por varios factores, entre los que resaltan TRH, AVP, VIP y OXT, la cual participa en la liberación de PRL estimulada por la succión en los pezones, en mamíferos. El tipo de respuesta de

Ca²⁺ intracelular a estos agonistas es bifásico no oscilatorio, con un pico en la [Ca²⁺]_i seguido de una meseta, en un proceso dependiente de la tasa de reentrada del Ca²⁺ a los reservorios intracelulares o de su extrusión de la célula. Pese a lo anterior, la liberación de PRL se debe principalmente a la interrupción de su inhibición tónica por DA, una catecolamina derivada de la transformación de tirosina. La principal fuente de esa catecolamina en la adenohipófisis son neuronas dopaminérgicas del hipotálamo que proyectan sus axones hacia la eminencia media. Adicionalmente, una parte del estímulo inhibitorio de DA que reciben las células de la *pars distalis* proviene de otras neuronas dopaminérgicas hipotalámicas que secretan este neurotransmisor directamente hacia la neurohipófisis o la *pars intermedia*, llegando a los lactotrofos mediante el intercambio sanguíneo entre estas estructuras (Freeman, *et al.*, 2000; Vallone, *et al.*, 2000; Stojilković, 2012; Melmed, 2017).

Existen cinco tipos descritos de receptores de DA (DR). La inhibición de la secreción de PRL en los lactotrofos causada por DA está mediada por el subtipo 2 de estos receptores (D2R), el cual es un GPCR acoplado a una proteína G_{i/o}. La activación de D2R tiene como resultado la hiperpolarización de la membrana plasmática, la inhibición de la adenilato ciclasa y la disminución en la concentración de cAMP y Ca²⁺ en el citosol. El proceso de desensibilización de D2R después de su estimulación con DA es independiente de GRKs (Vallone, *et al.*, 2000; Celver, *et al.*, 2013).

El principal mecanismo involucrado en la secreción de PRL es la inhibición de la liberación de DA por parte de las neuronas hipotalámicas que liberan este neurotransmisor al sistema porta hipofisario. La inhibición de la secreción de DA se lleva a cabo mediante la interacción de receptores en las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo con varios ligandos, como lactógenos, GCs e histamina. Asimismo, estas neuronas tienen receptores de PRL, mediante los cuales se establece un asa corta de retroalimentación negativa: el aumento en los niveles de esta hormona en sangre causa un incremento en la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa, la cual es el factor limitante en la biosíntesis de catecolaminas. Por lo tanto, esto conlleva una mayor síntesis y liberación de DA y la inhibición de la actividad endócrina de los lactotrofos. La actividad dopaminérgica en las neuronas de los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo es estimulada por acetilcolina y glutamato, así como por opioides. Factores que promueven la síntesis y secreción de PRL, como los estrógenos, también elevan niveles de DA. Estos compuestos disminuyen la sensibilidad de los lactotrofos a DA al reducir la expresión de D2R (Freeman, *et al.*, 2000).

5. *Hormona del crecimiento*

Neuronas parvocelulares GHRHérgicas y somatostatinérgicas de los núcleos arcuato y ventromedial del hipotálamo y los somatotrofos de la adenohipófisis integran un eje de regulación neuroendócrina de dos niveles (Figura 12), en el cual la liberación de GH incide sobre la actividad de múltiples tejidos a lo largo del cuerpo. Estos efectos se llevan a cabo tanto directamente por GH como por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el cual es producido en el hígado en respuesta a GH (Melmed, 2017).

Este eje es importante en muchos procesos de los vertebrados, entre los cuales destacan el crecimiento en longitud de los organismos antes de la edad adulta, el mantenimiento o incremento de los tejidos musculares y óseos a costa de las reservas de lípidos, la síntesis de proteínas, entre otros (Millar, *et al.*, 2012).

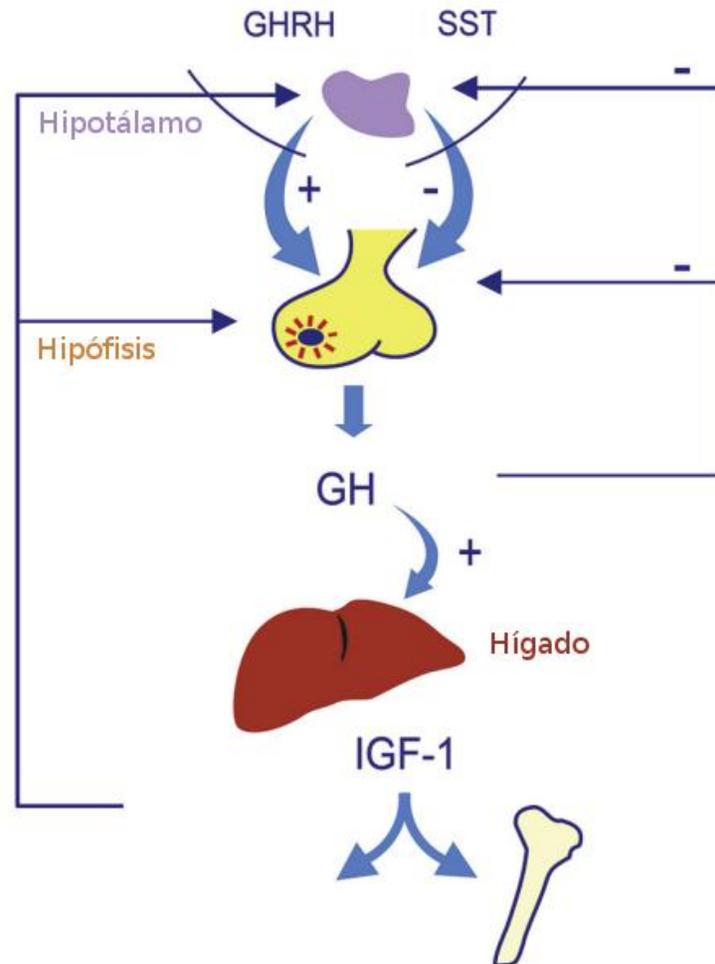


Figura 12. Regulación neuroendócrina de la secreción de GH. Neuronas del hipotálamo liberan GHRH a la eminencia media, tras lo cual esta hormona alcanza a los somatotropos en la adenohipófisis. En respuesta a esto, los somatotropos secretan GH al torrente sanguíneo, la cual interactúa con varios tejidos blanco, notablemente con el hígado. Tanto GH como IGF-1, producido por el hígado en respuesta a GH, establecen asas de retroalimentación negativa sobre el eje. Adaptado de Melmed (2017).

GH es una hormona de 44 residuos de aminoácidos secretada por los somatotropos en respuesta a la interacción de la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) con sus receptores de membrana. Los mamíferos presentan un receptor de GHRH (GHRHR) similar al que se encuentra en el resto de los vertebrados, aunque existe otra forma de este receptor, GHRHR2, que se ha encontrado en algunos peces, anfibios y aves. GHRHR puede reclutar tanto a proteínas G_s como $G_{q/11}$, en respuesta a cuya actividad se da un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y se sintetiza y libera GH al torrente sanguíneo (Millar, *et al.*, 2012; Tam, *et al.*, 2013).

De manera similar a lo que ocurre en tirotropos y lactotropos, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en los somatotropos en respuesta a GHRH es de tipo bifásico no oscilatorio, e involucra a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y a su salida de los reservorios intracelulares. GHRH se desensibiliza e internaliza rápidamente después de la interacción con su agonista (Stojilković, 2012).

La síntesis y secreción de GH se encuentra sujeta también a una regulación negativa por SST14, la cual proviene de neuronas somatostatinérgicas del hipotálamo. La SST lleva a cabo su función inhibitoria a través de la inhibición de la vía de cAMP mediante la activación de proteínas $G_{i/o}$, que lleva a la apertura de canales de K^+ y al cierre de canales de Ca^{2+} . Las células de la adenohipófisis presentan cuatro de los cinco tipos de receptores de SST (SSTRs): SSTR1, 2, 3 y 5. De estos, SSTR2 y 5 parecen tener un mayor efecto sobre la secreción de GH (Ben-Shlomo y Melmed, 2010).

Tanto la expresión de GHRH como de SST sufre un incremento ante la interacción de hormonas sexuales con las neuronas GHRHérgicas y somatostatinérgicas del hipotálamo, aumentando especialmente la producción de GHRH en la pubertad. La subida en la síntesis y secreción de estos factores es sexualmente dimórfico, y depende en parte de las diferencias en el número y la organización sináptica de las neuronas secretoras de estas dos neurohormonas en machos y en hembras (Millar, *et al.*, 2012).

Los somatotropos de la adenohipófisis actúan de manera coordinada, generando pulsos de GH característicos de machos y de hembras. Este dimorfismo sexual se manifiesta, en humanos, en la forma de pulsos nocturnos de gran amplitud de GH en hombres, mientras que en mujeres GH es liberada en pulsos más frecuentes con una amplitud baja (Jaffe, *et al.*, 1998).

La regulación de este eje neuroendócrino se da principalmente a través de GH e IGF-1, así como por ghrelina. Las neuronas GHRHérgicas del hipotálamo presentan SSTR2, pero no tienen receptores a GH, por lo que el efecto de esta hormona sobre su actividad es indirecto. Las neuronas somatostatinérgicas, por otro lado, tienen receptores a GHRH y a GH, los cuales estimulan la síntesis y secreción de SST. IGF-1, además, actúa directamente sobre los somatotropos inhibiendo la liberación de GH. Otros factores involucrados en la regulación del eje de GH son la acetilcolina y los GCs. Este eje se ve alterado en condiciones como el hambre, el estrés, la obesidad y el envejecimiento (Herman-Bonert y Melmed, 2011).

2. Antecedentes

1. Plasticidad funcional de la hipófisis

A través de la transducción de señales hipotalámicas y provenientes de la circulación sistémica, la hipófisis juega un papel fundamental en la respuesta fisiológica del organismo a condiciones internas y externas en movimiento constante. Cambios dinámicos en la actividad secretora de la adenohipófisis permiten modular los ejes neuroendócrinos y mantener la homeostasis frente a cambios internos ocasionales o periódicos, como los ciclos sexuales (Figura 13), la preñez, la lactancia y la pubertad) y ante alteraciones provenientes del medio como por ejemplo el estrés agudo, el hambre y el daño físico. Estas condiciones imponen demandas fisiológicas diferentes a las que los vertebrados responden a través de la adaptación funcional de la hipófisis y el hipotálamo (Hirano, *et al.*, 1976; Aoki, *et al.*, 1994; Martí y Armario, 1998; Kessler, *et al.*, 2010; Ranabir y Reetu, 2011; Le Tissier, *et al.*, 2017).

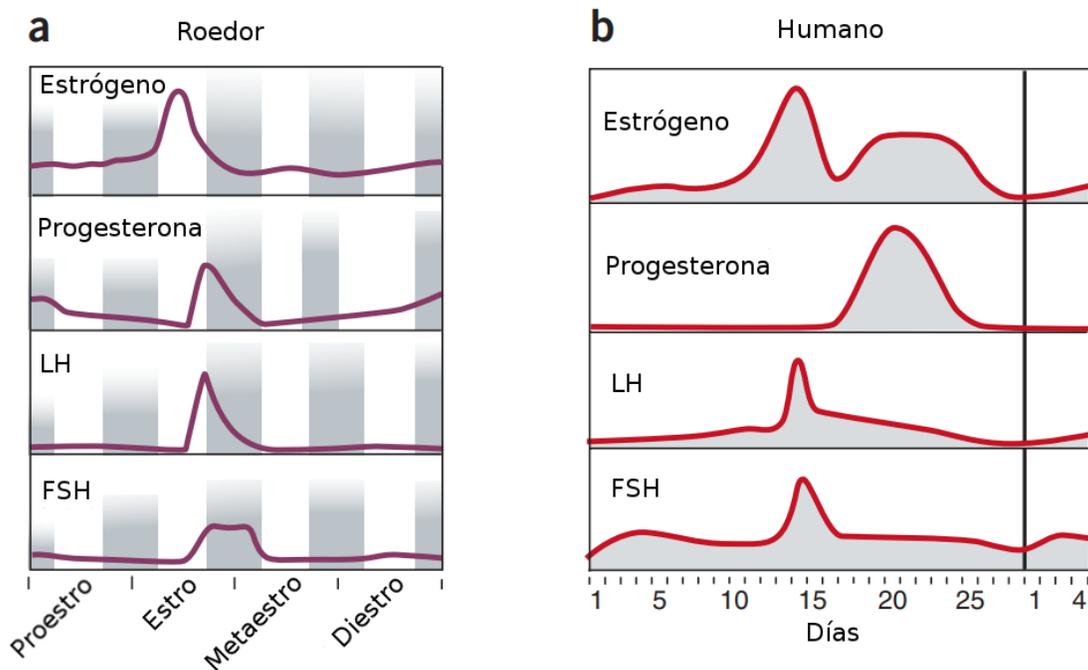


Figura 13. Cambio en niveles de hormonas sexuales a lo largo del ciclo sexual en roedores y humanos. En el panel a se observan los cambios en los niveles de estrógeno, progesterona, LH y FSH a lo largo del ciclo estral en roedores. El panel b muestra los cambios en estas hormonas durante el ciclo menstrual en humanos. La modificación coordinada, periódica de gonadotropinas y hormonas sexuales es necesaria para la progresión de los ciclos sexuales, e involucra cambios citológicos. Adaptado de Staley y Scharfman (2005).

La hipófisis también es capaz de reaccionar a alteraciones en los ejes neuroendócrinos, en la forma de insuficiencia de hormonas secretadas por las glándulas blanco. Esta condición puede ser causada por defectos en el funcionamiento de los componentes distales de los ejes neuroendócrinos o por la

extirpación de las glándulas blanco. Diversos estudios han observado los efectos de la alteración de los ejes de regulación neuroendócrina a través de la remoción quirúrgica de tejidos blanco de las hormonas hipofisarias. Estos procedimientos, predeciblemente, tienen un efecto sobre el eje neuroendócrino correspondiente, incluyendo cambios en el número y el tamaño de las células de la adenohipófisis, modificaciones en las características del RE y un incremento en la presencia de la hormona hipofisaria afectada por la pérdida de sus factores de retroalimentación negativa. Sin embargo, también se ha reportado que la perturbación de un eje neuroendócrino modifica a los demás. Por ejemplo, la extirpación de los testículos está asociada con un aumento en la masa de las glándulas adrenales. Un resultado relevante es que, mientras que hay un ligero aumento transitorio en el índice mitótico en la hipófisis en respuesta a la pérdida de las gónadas o de las glándulas adrenales, la remoción de ambos órganos no resulta en un incremento en este índice equivalente a la suma de lo que se observa en cada caso. Dicha respuesta ha llevado a autores a sugerir que hay poblaciones celulares dentro de la adenohipófisis que responden mitóticamente a alteraciones en más de un eje neuroendócrino (Kitay, 1963; Wynn, *et al.*, 1985; Ibrahim, *et al.*, 1986; Mizobuchi, *et al.*, 1996; Nolan, *et al.*, 1998; Nolan y Levy, 2006).

Las células troncales de la hipófisis, por su parte, han demostrado actividad bajo condiciones de ablación transgénica de poblaciones celulares adenohipofisarias, así como proliferación y diferenciación ante algunos cambios en la demanda fisiológica (Fu y Vankelecom, 2012; Rizzoti, *et al.*, 2013).

Los mecanismos de plasticidad de la adenohipófisis, resultado de una compleja red de interacciones, pueden dar lugar también a procesos patológicos cuando se encuentran desregulados, como la tumorigénesis (Melmed, 2003; Senovilla, *et al.*, 2004).

La generación de pulsos de secreción hormonal en la hipófisis es una formas importante en la que esta glándula modula su regulación sobre los tejidos blanco. Durante estos pulsos, la magnitud de la liberación hormonal no puede ser explicada a partir de la suma de células individuales secretando en respuesta a factores hipotalámicos. La secreción hormonal coordinada es de vital importancia en múltiples ejes neuroendócrinos y tiene una relación directa con varios procesos biológicos (Hodson, *et al.*, 2012; Le Tissier, *et al.*, 2017).

En este sentido, se ha observado que la división celular y la apoptosis controlada por hormonas son fenómenos que ocurren normalmente en la adenohipófisis. Sin embargo, estos procesos no explican el grado de plasticidad que presenta esta glándula, puesto que los cambios en la demanda fisiológica ocurren con demasiada frecuencia y, en ocasiones, intensidad, como para que mecanismos de esta naturaleza puedan responder con la temporalidad y precisión necesarias. Asimismo, el incremento en el contenido de gránulos de secreción en las células de la hipófisis no es plausible, pues estudios previos han demostrado que la acumulación de estos lleva a un incremento en su degradación en lisosomas. Por lo tanto, un contenido de hormona superior a la norma resultaría en la degradación del excedente (Takahashi, *et al.*, 1984; Powell, 2005; Seilicovich, 2010; Gannon y Christian, 2013).

Por otro lado, un mecanismo que explica la generación de pulsos hormonales de la magnitud necesaria para generar efectos fisiológicos específicos es la organización de las células de la adenohipófisis en redes tridimensionales homotípicas y heterotípicas, lo cual les permite responder a estímulos como un conjunto en lugar de como células individuales. Además de células endócrinas, se ha propuesto a las células foliculoestrelladas como participantes en la comunicación entre células endócrinas, ya que son capaces de conducir eficientemente impulsos eléctricos y de recibir y producir señales parácrinas. Además de la coordinación entre células endócrinas, la generación de pulsos implica la regulación del flujo sanguíneo y de la colecta de hormonas en los capilares fenestrados de la adenohipófisis, lo que permite la liberación de una mayor cantidad de hormona hacia la circulación sistémica (Fauquier, *et al.*, 2001; Schaeffer, *et al.*, 2011; Hodson, *et al.*, 2012; Mollard, *et al.*, 2012).

Un mecanismo celular que ha sido propuesto en relación con la adaptación rápida de la hipófisis a diferentes demandas fisiológicas es la transdiferenciación. En este proceso, células ya diferenciadas sufren una transformación hacia otro tipo celular sin pasar por un estado pluripotencial. Suele asumirse que este proceso implica estados intermedios entre los dos tipos celulares, con características morfológicas y funcionales de ambos. La transdiferenciación ha sido observada en la hipófisis bajo varias condiciones de cambio en la demanda funcional de esta glándula: en hipotiroidismo se presenta un aumento reversible de células que coalmacenan GH y TRH (tirosoomatotropos), mientras que durante el embarazo aumenta la proporción de células que expresan GH y PRL simultáneamente (lactosomatotropos). También se ha observado que la transdiferenciación entre lactotropos y somatotropos puede ser modulada por hormonas sexuales, y que la transdiferenciación es posible incluso entre células de linajes relativamente lejanos como los gonadotropos y los lactotropos (Horvath, *et al.*, 1990; Kineman, *et al.*, 1992; Vidal, *et al.*, 2000; Vidal, *et al.*, 2001; Radian, *et al.*, 2003; Shukuwa, *et al.*, 2006).

2. Multifuncionalidad

De manera general se considera que cada tipo celular endócrino de la adenohipófisis tiene asociado un solo secretagogo hipotalámico, en respuesta al cual libera una sola hormona (o dos, en el caso de los gonadotropos). Sin embargo, existe evidencia de que hay una proporción de células dentro de la hipófisis para las cuales esta visión ortodoxa de la respuesta y secreción hormonal no es aplicable, las cuales se denominan como multifuncionales. La multifuncionalidad puede darse con respecto a dos variables diferentes: la síntesis de hormonas y la respuesta a factores hipotalámicos (Villalobos, *et al.*, 1997).

La polihormonalidad hace alusión a la síntesis, almacenamiento y secreción de dos o más hormonas en una misma célula. La multirrespuesta, en el contexto de la actividad endócrina de la adenohipófisis, se refiere a la capacidad de las células de responder eléctricamente y presentar un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a dos o más factores liberadores hipotalámicos. En ambos casos, la relevancia funcional de estas células no ha sido esclarecida (Kasahara, *et al.*, 1994; Núñez, *et al.*, 2003).

Un concepto relacionado con este es el de secreción paradójica. Como su nombre lo indica, esto se refiere a la secreción de una hormona en respuesta a un factor liberador no correspondiente. De forma particular, varios estudios han enfatizado la presencia de células multifuncionales en la hipófisis (Figura 14), los cambios en la proporción de estas células bajo condiciones de estrés agudo y sus diferencias en cuanto a sexo y edad. Asimismo, se ha estudiado su relación con los adenomas hipofisarios, de los que se ha postulado que podrían ser las células iniciales (Kasahara, *et al.*, 1994; Villalobos, *et al.*, 1997; Núñez, *et al.*, 2003; Senovilla, *et al.*, 2004; Villalobos, *et al.*, 2004; Senovilla, *et al.*, 2005, 2008, 2015).

La respuesta de las células de la adenohipófisis a factores hipotalámicos está relacionada con la edad, habiendo una mayor abundancia de células no responsivas después del nacimiento, de células multiresponsivas en la pubertad y de células monoresponsivas en la senescencia. Estos cambios en la proporción de células multi, mono y no responsivas no presentan dimorfismo sexual en ratas (Senovilla, *et al.*, 2005).

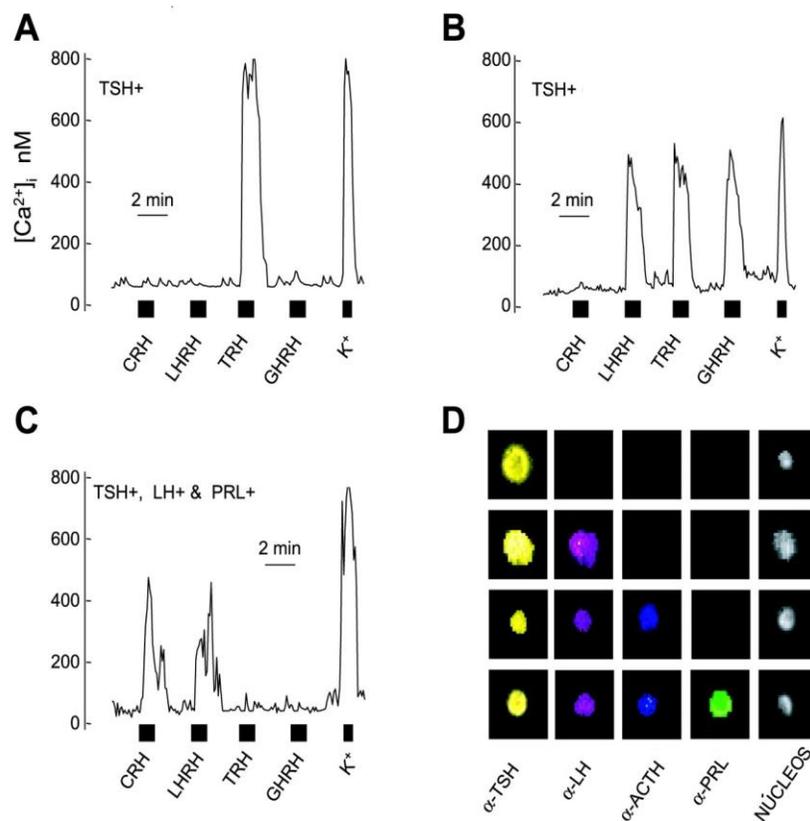


Figura 14. Caracterización de la multifuncionalidad en tirotropos. A, B y C muestran la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de tirotropos (células que presentaron TSH). En A se ve la respuesta de un tirotropo monohormonal, monoresponsivo. En B se ve la respuesta de un tirotropo monohormonal, multiresponsivo. En C se ve la respuesta de una célula polihormonal y multiresponsiva. D muestra un tirotropo monohormonal y tres tirotropos polihormonales. Modificado de Villalobos, *et al.* (2004).

Las células multifuncionales, tanto polihormonales como multirresponsivas, conforman parte de la población de los cinco tipos celulares de la adenohipófisis, aunque son menos abundantes en lactotropos y somatotropos. Estudios previos han mostrado que más de la mitad de las células secretoras de la adenohipófisis son polihormonales, y que las células multifuncionales son más frecuentes en hembras que en machos (Figura 15). Además, se ha reportado que las células polihormonales tienen una menor respuesta a secretagogos hipotalámicos, lo que podría disminuir su relevancia en secreción paradójica (Núñez, *et al.*, 2003).

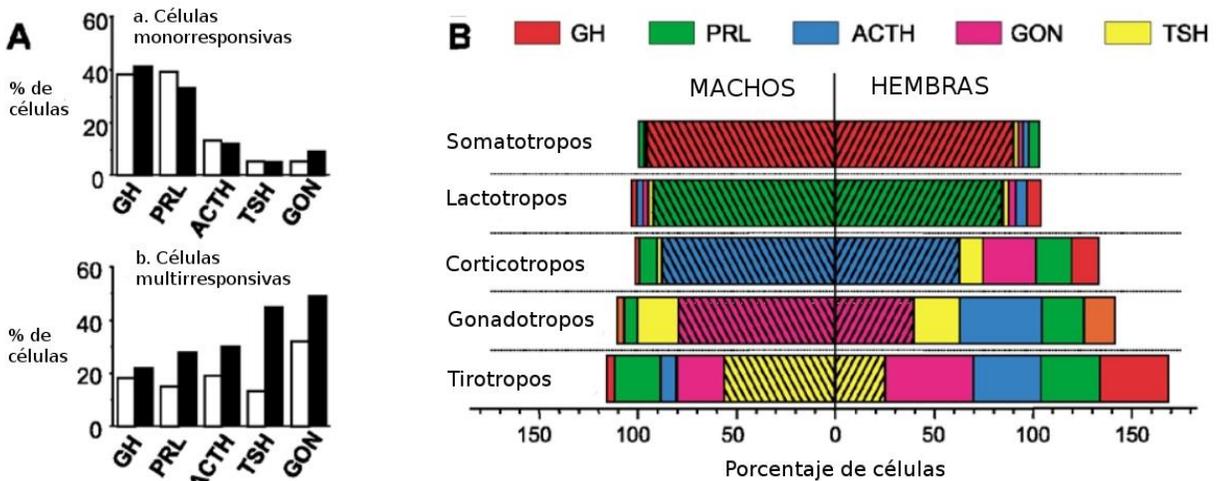


Figura 15. Dimorfismo sexual en la multifuncionalidad de células de la adenohipófisis. Las gráficas en A ilustran el porcentaje de células de cada tipo que es monorresponsivo y multirresponsivo para cada tipo celular. Las barras blancas indican machos y las barras negras hembras. La gráfica B muestra la proporción de células de cada tipo que contienen cada hormona en machos y en hembras. Barras rayadas indican las células monorresponsivas. Modificado de Núñez, *et al.* (2003).

Un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo sobre el impacto de la alteración de los ejes neuroendócrinos sobre la multirrespuesta en células de la hipófisis encontró resultados contradictorios con respecto a lo reportado por los estudios ya mencionados. Se determinó que los corticotropos, no los somatotropos ni los lactotropos, son el tipo celular menos proclive a la multirrespuesta. Asimismo, este trabajo concluyó que la multirrespuesta ocurre con mayor frecuencia conforme involucre a menos factores hipotalámicos, y que existen cambios en el patrón de multirrespuesta inducidos por alteraciones de los ejes de regulación neuroendócrina a través de la escisión de sus órganos blanco (Pedroza Cummings, 2016).

Aunque trabajos previos han hecho manifiesta la presencia de células multirresponsivas en la adenohipófisis sana y en adenomas hipofisarios, todos los estudios hechos al respecto se han realizado con células en cultivo o montadas en placas adhesivas. Ambos métodos implican la disociación proteolítica del tejido hipofisario, lo cual ocasiona la pérdida del microambiente de las células y de las asociaciones establecidas entre ellas. Las células de la adenohipófisis establecen redes tridimensionales que tienen un efecto en su función y diferenciación, las cuales se ven

afectadas al disgregar el tejido, siendo así que las células en cultivo establecen relaciones diferentes entre ellas que las que se observan *in vivo*. Además, la interacción con la vasculatura y con compuestos presentes en la circulación no se mantienen con dichos métodos, lo que puede comprometer la identidad celular en cultivo (Le Tissier, *et al.*, 2012).

3. Planteamiento del problema

Los estudios existentes al respecto de la multirrespuesta en células de la adenohipófisis se han realizado en cultivos celulares y han implicado un número pequeño de células, lo cual dificulta la obtención de datos representativos. Asimismo, la relevancia funcional de estas células y su posible papel en la adaptación del organismo a retos fisiológicos no han sido explorados.

Por lo anterior, los experimentos realizados en este trabajo se hicieron en rebanadas de tejido vivo (*ex vivo*). Esto permite que las células sean observadas poco tiempo después del sacrificio del animal y que las conexiones establecidas entre las células de la adenohipófisis se mantengan a un mayor grado que el que se tiene ante la disgregación del tejido. Además, las rebanadas de tejido contienen una mayor cantidad de células que las que se observan en cultivo, por lo que la información derivada de ellas es más representativa de la población total de las células endócrinas de la adenohipófisis.

4. Objetivos

1. Objetivo general

Evaluar los cambios en la multirrespuesta de células endócrinas en rebanadas de adenohipófisis de ratones hembra y macho, determinada a través de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$, a factores hipotalámicos después la extirpación de las glándulas blanco de los ejes neuroendócrinos.

2. Objetivos particulares

Determinar, mediante imagenología de $[Ca^{2+}]_i$, la proporción de células que responden a cada factor hipotalámico (GnRH, CRH, TRH, GHRH y DA) en rebanadas de adenohipófisis de ratones hembra y macho en condiciones control y tras la alteración de los ejes neuroendócrinos.

Determinar, mediante imagenología de $[Ca^{2+}]_i$, la proporción de células en rebanadas de adenohipófisis de ratones hembra y macho con respuesta a uno o a múltiples factores hipotalámicos y su cambio tras alteraciones de los ejes neuroendócrinos.

Determinar, mediante imagenología de $[Ca^{2+}]_i$, la proporción de células en rebanadas de adenohipófisis de ratones hembra y macho que responden a dos, tres y cuatro secretagogos hipotalámicos, así como las combinaciones de estos a las que se presenta respuesta, y cómo cambia la proporción de estas respuestas combinadas después de la alteración de los ejes neuroendócrinos.

5. Hipótesis

Al perturbar los distintos ejes neuroendócrinos y retirar las fuentes de factores de retroalimentación negativa, se observarán cambios en las proporciones de células multirresponsivas con respecto al control. En cada caso, se presentará una mayor proporción de células multirresponsivas que reaccionen a la exposición al factor hipotalámico asociado al eje alterado.

6. Materiales y método

1. Animales

Se emplearon 48 ratones de la cepa BALB/c (24 machos y 24 hembras) de dos meses de edad. Los animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura de 22°C y agua y alimento *ad libitum*. El cuidado, manejo y reproducción de los animales se realizaron en conformidad con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Para cada sexo se establecieron tres condiciones experimentales y un control, constando cada grupo de 6 animales. El tamaño de muestra fue determinado mediante una prueba de potencia estadística con ayuda del *software* G*Power (Faul, *et al.*, 2009).

2. Cirugías

Se realizaron extirpaciones quirúrgicas de las glándulas blanco de tres ejes neuroendócrinos: adrenalectomía (ADX) para el eje HHA, tiroidectomía (TX) para el eje HHT y ovariectomía (OVX) u orquiectomía (OQX) para el eje HHG. Cirugías simuladas fueron empleadas como condición control. Las cirugías se realizaron bajo anestesia con una combinación de xilacina 16 mg/kg y ketamina 120 mg/kg. La anestesia se administró por vía intraperitoneal, comprobando la adecuada sedación de los animales antes del inicio del procedimiento quirúrgico. Durante las semanas posteriores a la cirugía, los ratones adrenalectomizados recibieron NaCl 0.9% en el agua, a fin de compensar la deficiencia de sodio generada por la pérdida de las glándulas adrenales. Asimismo, a los animales tiroidectomizados se les suministró lactato de calcio 2% en el agua debido a que la TX implica necesariamente la extirpación también de las glándulas paratiroides, lo que conlleva una disminución en la capacidad de reabsorción de calcio (Van Pelt, 1977).

3. Registro de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ en rebanadas de hipófisis

Tres semanas después de las cirugías, los ratones se sacrificaron por decapitación bajo el efecto de anestesia. Para cada animal se extrajo la glándula hipófisis entera, de la que se obtuvieron rebanadas de 130 μ m de grosor. Estas rebanadas vivas se incubaron con el indicador fluorescente intensiométrico de Ca^{2+} Fluo-4 AM (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) 22 μ M en solución ACSF (líquido cefalorraquídeo artificial; NaCl 118 mM, KCl 3.01 mM, HEPES 1.09 mM, $NaHCO_3$ 2.5 mM, D-(+)-glucosa 11 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 4-8 mM, pH 7.3-7.4) con 0.2% de ácido plurónico F-127 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos a 37°C. Siguiendo la incubación con Fluo-4 AM, las rebanadas fueron lavadas con ACSF por 5 minutos y luego sometidas a un proceso de registro de respuesta a secretagogos hipotalámicos.

Para esto, las rebanadas se colocaron en una cámara de registro, previamente cargada con poli-L-lisina 30% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) y se mantuvieron en un sistema de perfusión constante con solución ACSF. Posteriormente se observaron con un microscopio estereoscópico de epifluorescencia (Leica M25 FA) equipado con un objetivo de 20x. La excitación del fluoróforo se hizo a 488 nm, capturándose su fluorescencia emitida a 510 nm. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante una cámara CCD enfriada (SenSys).

La captura de imágenes se llevó a cabo en secuencias de 600 imágenes, con una exposición de 200 ms en cada una.

Las rebanadas de tejido hipofisario se perfundieron secuencialmente con GHRH, CRH, GnRH, TRH, TRH seguido de DA y KCl 140 mM. La perfusión de cada factor se realizó por 30 segundos (en el caso de la aplicación de TRH y DA, cada una duró 15 segundos), con 10 minutos de reposo con

perfusión de ACSF entre cada uno. Se registró la actividad basal de $[Ca^{2+}]_i$ y la respuesta a cada factor hipotalámico y a solución de KCl 140 mM. La respuesta a esta última se utilizó como indicador de viabilidad celular.

Las neurohormonas se utilizaron a una concentración de 10 nM, a excepción de DA que se preparó a 2 μ M, y se diluyeron en solución ACSF.

4. Análisis de datos

Se utilizó el paquete Fiji del *software* de procesamiento de imágenes ImageJ a fin de obtener valores relativos de intensidad de Ca^{2+} intracelular de cada célula a partir de las secuencias de imágenes capturadas en el microscopio de epifluorescencia y seleccionar aquellas que presentaron respuesta a los factores hipotalámicos. Para el análisis únicamente fueron consideradas aquellas células que respondieron al estímulo con KCl 140 mM al final del registro (Schindelin, *et al.*, 2012).

Posteriormente, se empleó el *software* de análisis de datos Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EUA) para procesar la información tabular de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ de cada célula antes los distintos estímulos. Se utilizaron rutinas generadas por el Dr. Pierre Fontanaud (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, Francia) y por el Dr. León Islas (Facultad de Medicina, UNAM) para graficar los cambios relativos en la $[Ca^{2+}]_i$ de las células analizadas y para corregir los valores para compensar el fotoblanqueo del fluoróforo.

Los tipos celulares fueron determinados con base en la respuesta de las células a cada uno de los cinco factores hipotalámicos. De esta manera, se considera somatotropos a todas las células que con respuesta a GHRH, independientemente de su posible respuesta a otros secretagogos, corticotropos a aquellas células con respuesta a CRH y gonadotropos a las que responden a GnRH. La distinción entre tirotropos y lactotropos se hizo a partir de la presencia o ausencia de respuesta a TRH y a DA: se consideró como tirotropos a aquellas células que presentaron respuesta a TRH, que no varió ante la exposición a DA, y como lactotropos a las células que respondieron a TRH y también a DA.

A continuación se presenta un *raster* representativo de la respuesta a los factores hipotalámicos en una muestra de hipófisis, visualizado en Igor Pro, así como algunos perfiles de actividad de $[Ca^{2+}]_i$ de células mono y multirresponsivas (Figura 16).

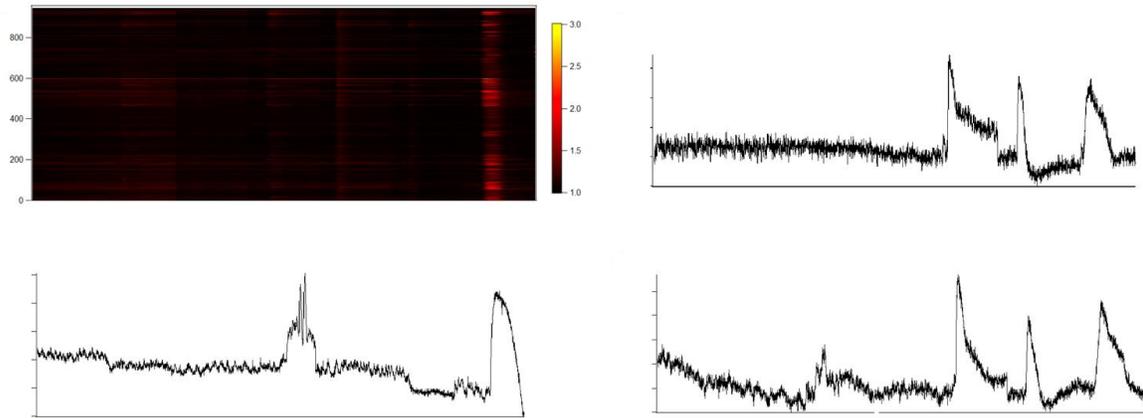


Figura 16. Respuesta de células de la adenohipófisis a factores hipotalámicos. En A se observa un *raster* representativo de la respuesta de todas las células en una muestra de hipófisis a factores hipotalámicos y a KCl 140 mM. En B-D se muestran diferentes perfiles de respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ a factores hipotalámicos. B representa a un lactotropeo monorresponsivo, cuya respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ se vio afectada por la presencia de DA en el medio. C ilustra un gonadotropo monorresponsivo, con una respuesta oscilatoria a GnRH. En D se muestra una célula multirresponsiva, la cual responde a CRH y a TRH, pero no a DA.

Para el análisis de los resultados experimentales se utilizó estadística paramétrica de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de homogeneidad de varianza y de distribución normal, seguidos de un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y una prueba *post-hoc* de Tukey empleando el *software* de análisis estadístico GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos). En todos los casos se consideró un $\alpha=0.05$ y se presentan los datos como media \pm error estándar de la media.

7. Resultados

1. Cambios en la respuesta

La proporción de los distintos tipos celulares de la adenohipófisis, determinada mediante la respuesta de las células a los factores hipotalámicos, presentó cambios entre sexos y entre las distintas condiciones. Estos cambios resultaron más perceptibles en hembras que en machos. En estos últimos, únicamente la población de somatotropos presentó cambios significativos ante las alteraciones de los ejes neuroendócrinos, habiendo una disminución en la representación de células responsivas a GHRH en los tres casos. Esta disminución en la proporción de somatotropos también se observó en hembras. Sin embargo, en estas hubo un incremento significativo de corticotropos tras ADX y de gonadotropos ante OVX y TX. Asimismo, se presentó un incremento no significativo de tirotropos en la TX con respecto al control. De esta forma, los cambios en las proporciones de los tipos celulares en hembras reflejaron la ausencia de retroalimentación negativa ocasionada por las cirugías, mientras que en machos no hubo tal respuesta “compensatoria” ante la perturbación de los ejes. De forma general, las hembras tienen una mayor frecuencia de cambios significativos en las proporciones de tipos celulares que los machos al enfrentarse a alteraciones en los ejes de regulación neuroendócrina (Figura 17).

Por otro lado, las hembras presentaron una mayor proporción de corticotropos y tirotropos en el control con respecto a los machos, mientras que en estos últimos hubo más gonadotropos en la condición control que en hembras. Ante las tres alteraciones de los ejes neuroendócrinos, las hembras tuvieron un mayor porcentaje de somatotropos que los machos, lo cual no se observa en el control. En el caso de la ADX, las hembras presentaron una proporción significativamente mayor de corticotropos que los machos, a la vez que estos tuvieron un mayor porcentaje de gonadotropos (Figura 18).

2. Cambios en la multirrespuesta

Tanto en machos como en hembras se observó un decremento en la proporción de células multirresponsivas ante las tres alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Sin embargo, ninguno de estos cambios resultó estadísticamente significativo. Por otra parte, pese a que en las cuatro condiciones se observó un mayor porcentaje de células multirresponsivas en hembras que en machos, esta proporción solamente resultó significativa en el caso de las gonadectomías (GNX), (Figura 19).

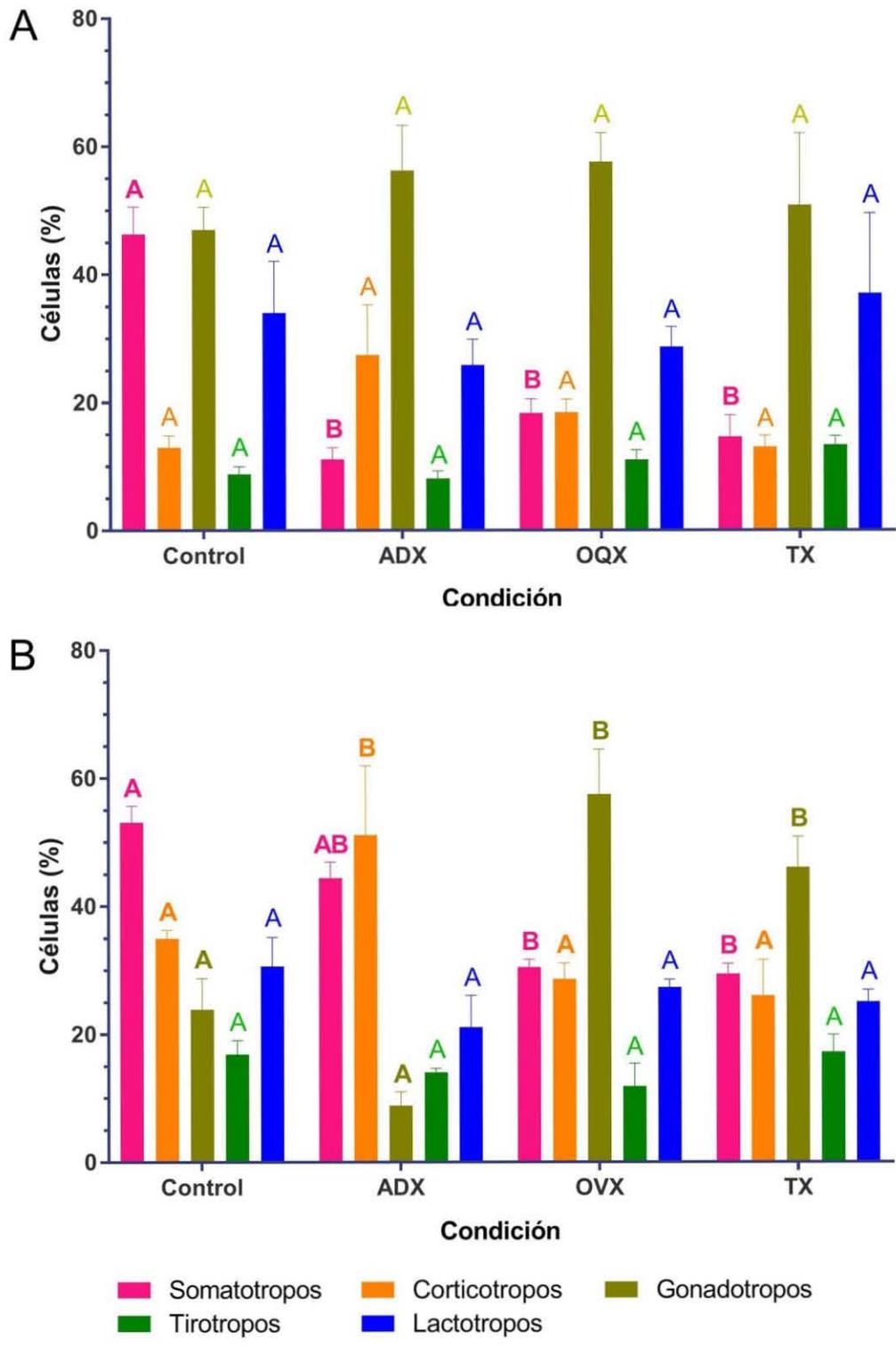


Figura 17. Cambios en la proporción de los tipos celulares de la hipófisis ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos en ambos sexos. Porcentaje de células con respuesta a cada factor hipotalámico en machos (A) y hembras (B). Comparaciones dadas para la proporción de cada grupo celular en las cuatro condiciones, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

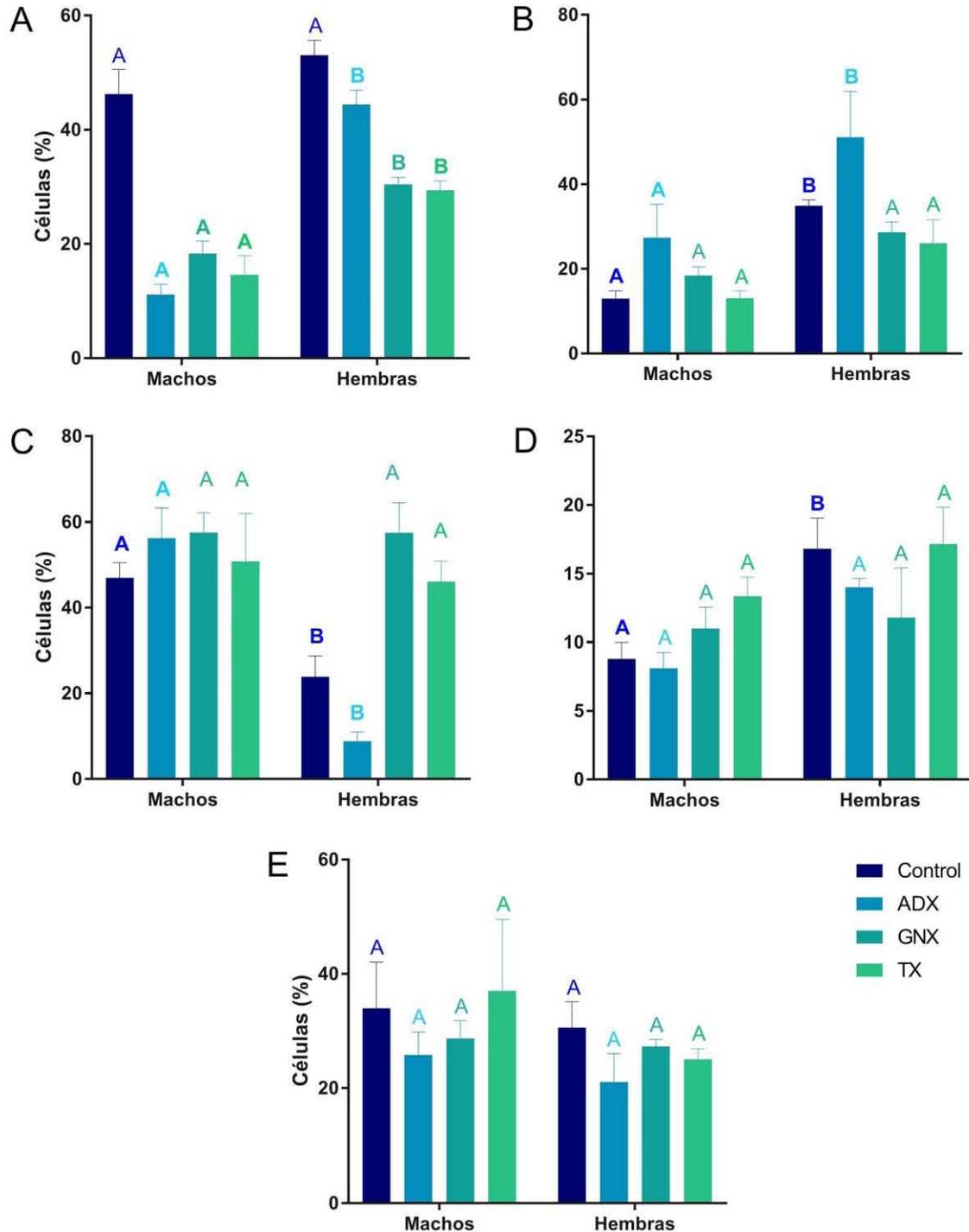


Figura 18. Proporción de los tipos celulares de la hipófisis ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos en ambos sexos. Porcentaje de células con respuesta a GHRH (A), CRH (B), GnRH (C), TRH (D) y DA (E). Comparaciones dadas para la proporción del tipo celular en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

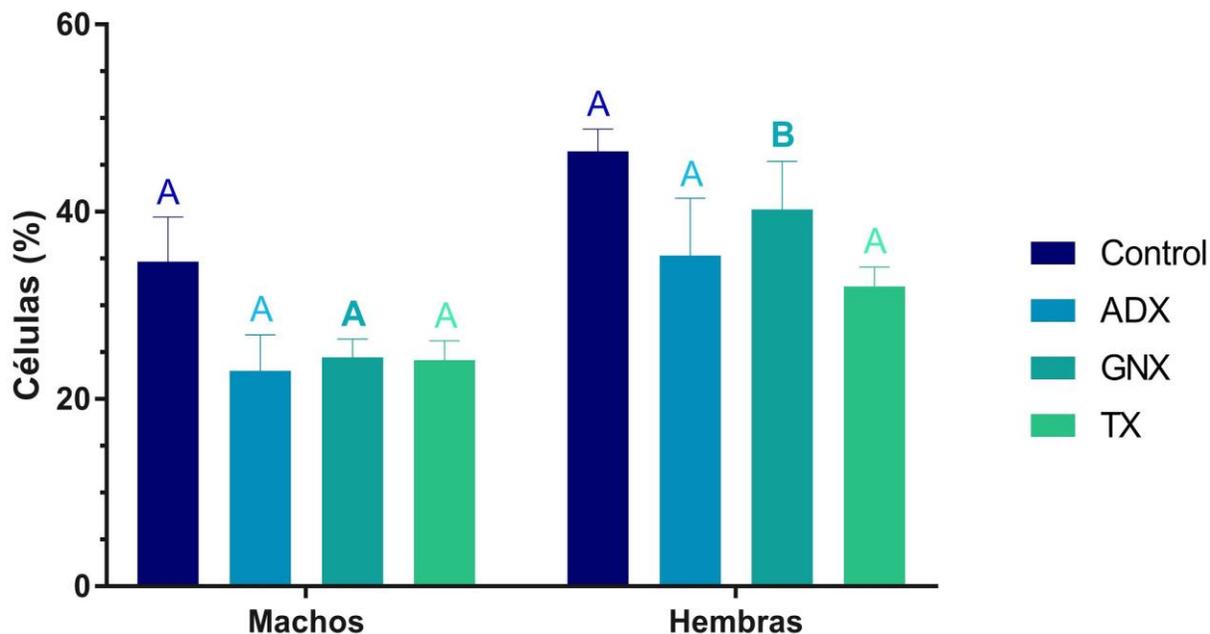


Figura 19. Cambios en la multirrespuesta en ambos sexos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células multirresponsivas a factores hipotalámicos en machos y hembras bajo las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células multirresponsivas en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

Por otro lado, a pesar de que la proporción de multirrespuesta no se vio significativamente afectada por las intervenciones quirúrgicas, el porcentaje de células birresponsivas disminuyó en ambos sexos, habiendo un cambio significativo en OQX y, en hembras, en TX. La proporción de células tri y tetrarresponsivas no exhibió cambios asociados a la remoción de glándulas blanco (Figura 20).

De acuerdo con el número de factores a los que respondieron las células, la proporción de células multirresponsivas sólo varió entre machos y hembras en el caso de las células birresponsivas, que fueron más frecuentes en hembras después de ADX que en machos ante la misma alteración. Por el contrario, las células trirresponsivas y tetrarresponsivas no mostraron diferencias en cuanto a su proporción en las diferentes condiciones entre machos y hembras, lo cual podría estar asociado a su menor frecuencia relativa (Figura 21).

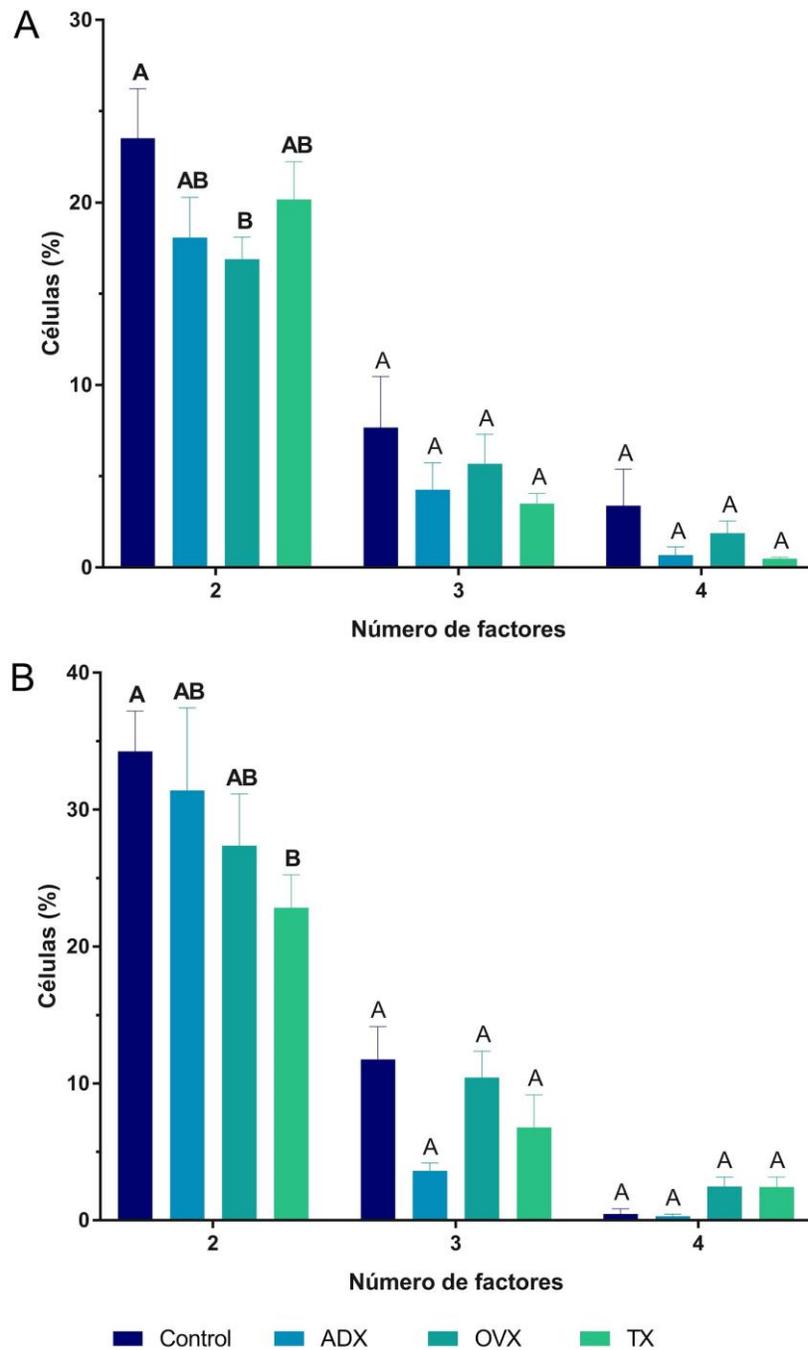


Figura 20. Proporción de células con respuesta a dos, tres y cuatro factores hipotalámicos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos en ambos sexos. Porcentaje de células multirresponsivas que responden a cada número de factores en machos (A) y hembras (B). Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada número de factores en las cuatro condiciones, representadas por letras. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

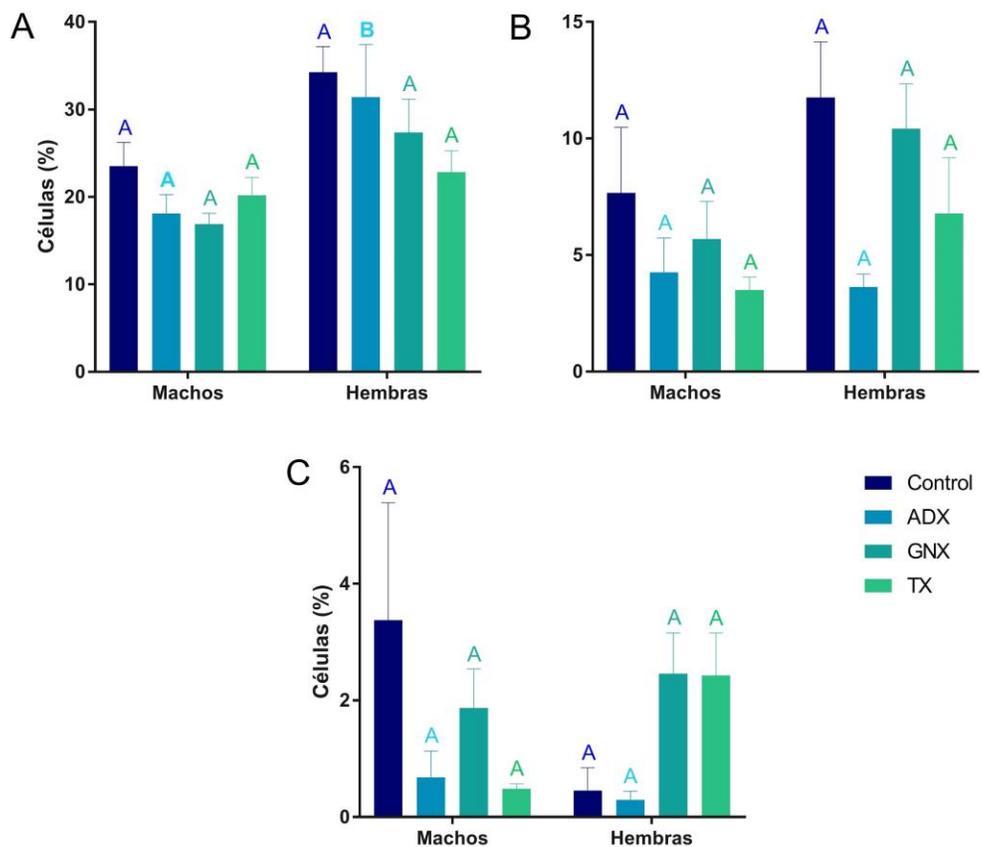


Figura 21. Diferencias en la proporción de células con respuesta a dos, tres y cuatro factores hipotalámicos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos en ambos sexos. Porcentaje de células que, en machos y en hembras responden a dos (A), tres (B) y cuatro (C) factores hipotalámicos en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada número de factores en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

3. Cambios en la monorrespuesta

En machos, la proporción de gonadotropos monorresponsivos aumentó significativamente en tras ADX y OQX. Los gonadotropos monorresponsivos comprenden una parte importante del incremento observado en la proporción de gonadotropos en machos en las tres condiciones experimentales. Los porcentajes de otros tipos celulares monorresponsivos no presentaron cambios significativos ante estas alteraciones de los ejes neuroendócrinos, pese a lo cual puede discernirse un incremento en la proporción de corticotropos monorresponsivos ante ADX, de gonadotropos monorresponsivos en TX y de tirotropos monorresponsivos en OQX y TX. A su vez, hubo una disminución no significativa de somatotropos monorresponsivos bajo las tres condiciones experimentales con respecto al control (Figura 22).

Por su parte, en hembras se observó una disminución en la proporción de somatotropos monorresponsivos en las tres condiciones experimentales (que sólo es significativa en TX). Al

mismo tiempo, se presentó un incremento significativo en el porcentaje de distintos tipos celulares monorresponsivos: corticotropos en ADX, gonadotropos en ADX y OVX y tirotropos en TX. Esto llama la atención, ya que sugiere que, en hembras, las alteraciones de los ejes neuroendócrinos implican un incremento en la monorrespuesta del tipo celular adenohipofisario correspondiente al eje comprometido (Figura 22).

La proporción de células monorresponsivas entre machos y hembras en las distintas condiciones fue diferente significativamente solamente en el caso de los somatotropos y los gonadotropos, en ADX. Los somatotropos monorresponsivos fueron más frecuentes en hembras después de ADX, mientras que los gonadotropos monorresponsivos estuvieron presentes en mayor proporción en machos que en hembras tras esta cirugía (Figura 23).

4. Cambios en la birrespuesta

La combinación más frecuente de dos respuestas a factores hipotalámicos en el grupo control de machos fue a GHRH y GnRH, la cual representó hasta un 15% del total de las células endócrinas de la adenohipófisis. Ante la perturbación de los tres ejes neuroendócrinos, las células con respuesta a GnRH y DA se volvieron la mayoría de las células birresponsivas, al igual que las células con respuesta a CRH y GnRH solamente tras ADX.

En machos se presentó un marcado decrecimiento, significativo, en la proporción de células responsivas simultáneamente a GHRH y GnRH al comparar al control con las tres condiciones experimentales. Aunque en ADX en machos no hubo un incremento en el porcentaje de corticotropos monorresponsivos, sí se observó un fuerte aumento en el porcentaje de células con respuesta a CRH y GnRH en esta condición, aunque este sólo fue significativo entre ADX y TX. Pese a que estos aumentos no fueron significativos, las proporciones de células con respuesta a GnRH y TRH o a GnRH y DA se incrementaron en las tres condiciones experimentales. Además, tras las alteraciones a los ejes neuroendócrinos se presentaron células con birrespuesta a CRH y TRH, las cuales no se observaron en el control (Figura 24).

En el grupo control de hembras, las células birresponsivas presentes en mayor proporción fueron las que respondieron a GHRH y ya sea a CRH o a DA. Tras ADX, las células con respuesta a GHRH y CRH ganaron prominencia, mientras que la birrespuesta a GHRH y GnRH fue la más frecuente después de TX y OVX. En este último caso, también hubo una proporción más de dos veces alta de células con respuesta a GnRH y DA que en cualquier otra condición. A diferencia de lo que ocurrió en machos, en hembras hubo un aumento de células con respuesta a GHRH y GnRH tras las alteraciones a los ejes neuroendócrinos, de las cuales la diferencia entre la condición control y TX fue significativa.

Por otra parte, en hembras, el porcentaje de células birresponsivas a GHRH y a CRH se incrementó significativamente ante ADX, y disminuyó también significativamente en OVX y TX.

Finalmente, se presentó una baja significativa en la proporción de lactosomatotropos, células con con respuesta simultánea a GHRH y a DA, en las tres condiciones experimentales, lo cual también se observó en machos (Figura 24).

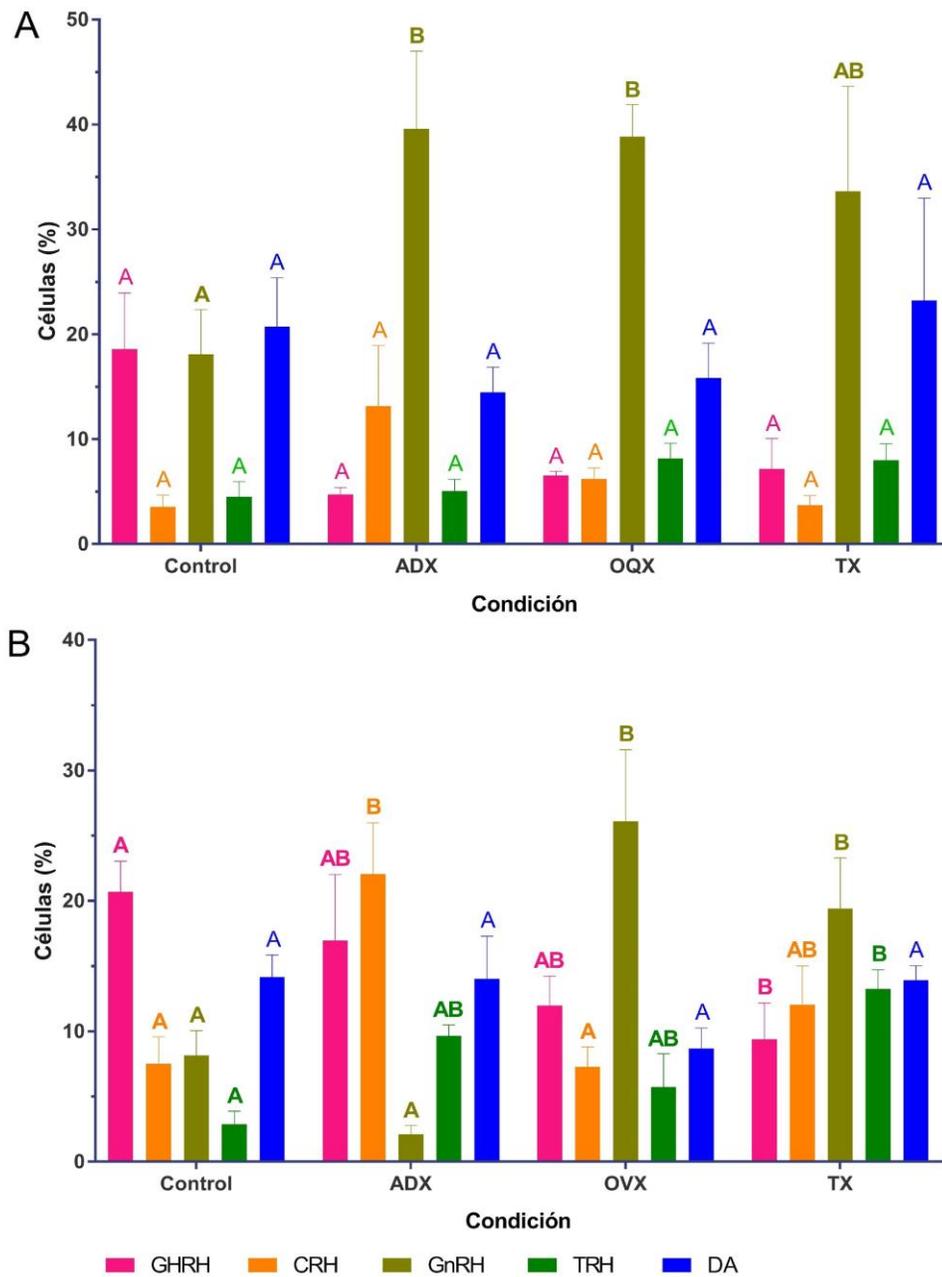


Figura 22. Tipos de monorrespuesta en ambos sexos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con monorrespuesta a cada factor hipotalámico en las cuatro condiciones en machos (A) y hembras (B). Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada factor en las cuatro condiciones, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

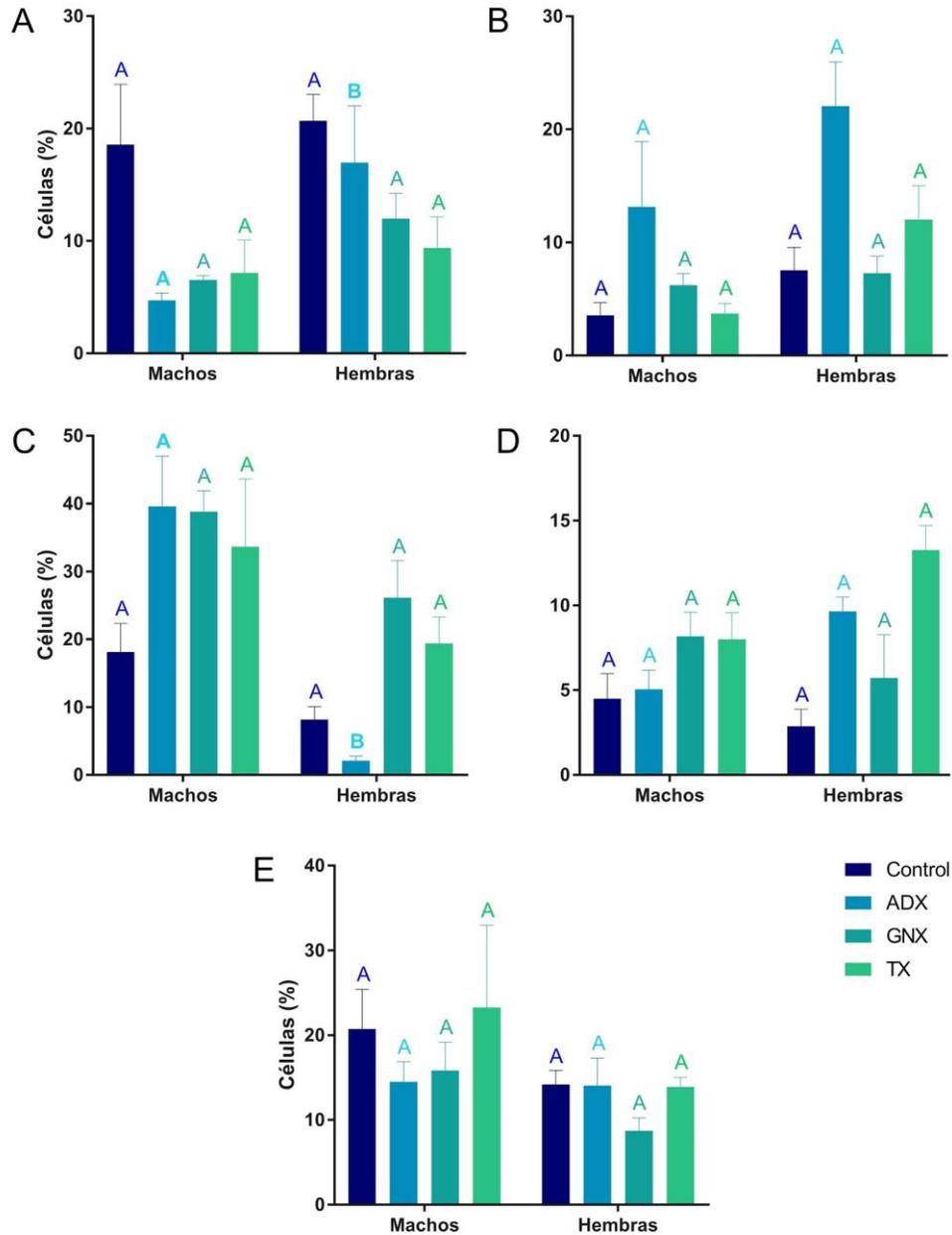


Figura 23. Diferencias en tipos de monorrespuesta entre machos y hembras ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con monorrespuesta a GHRH (A), CRH (B), GnRH (C), TRH (D) y DA (E) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada factor en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

La respuesta a CRH junto con otro factor aumentó tras ADX en machos, lo que no ocurrió para todas las combinaciones de birrespuesta con CRH en hembras (Figura 25). Por otro lado, tanto en machos como en hembras se observó un incremento en la proporción de células con respuesta a GnRH y TRH en TX (Figura 24).

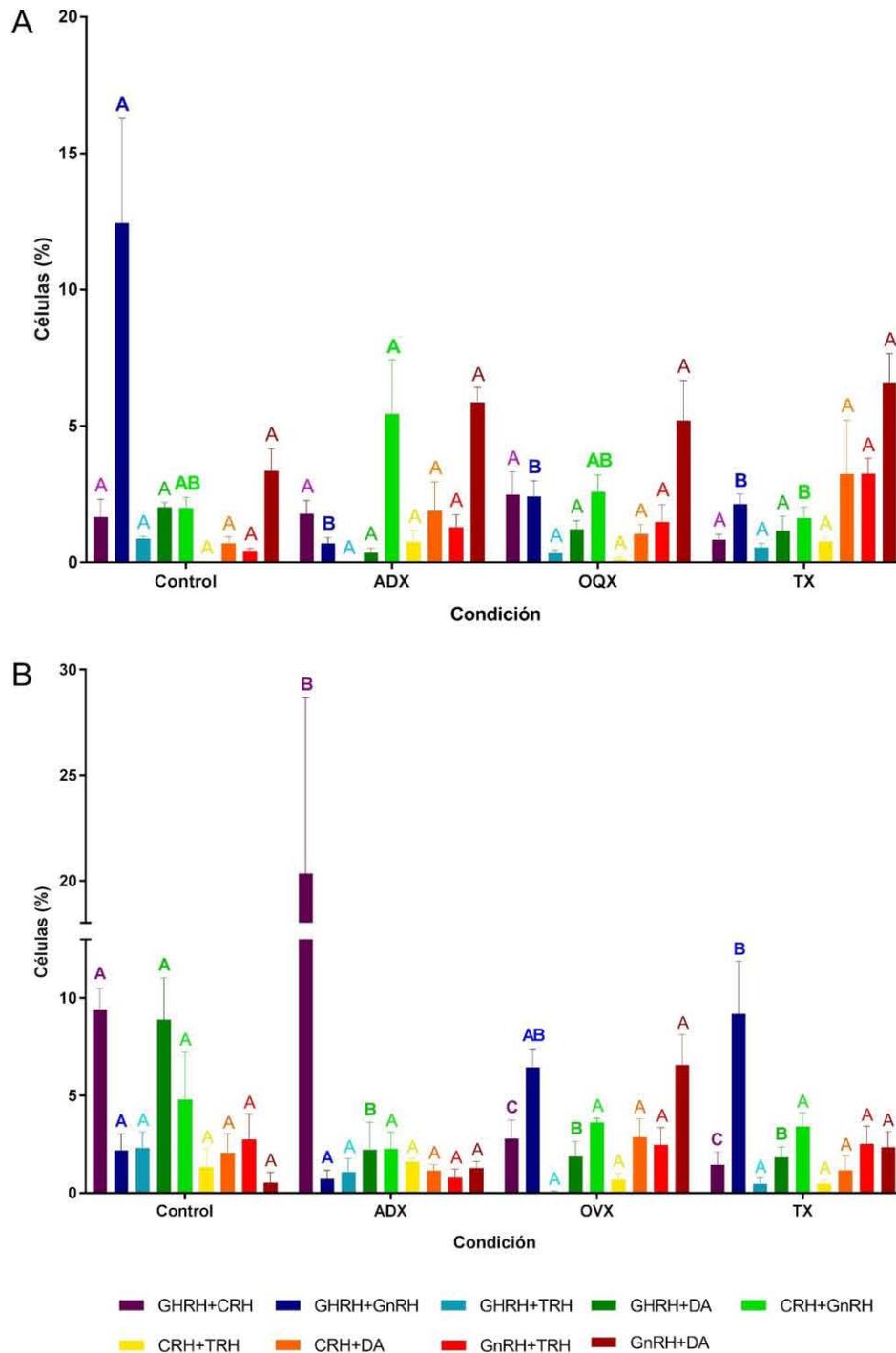


Figura 24. Tipos de birresposta en ambos sexos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con respuesta a distintas combinaciones de dos factores hipotalámicos en machos (A) y hembras (B) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada combinación de factores en las cuatro condiciones, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

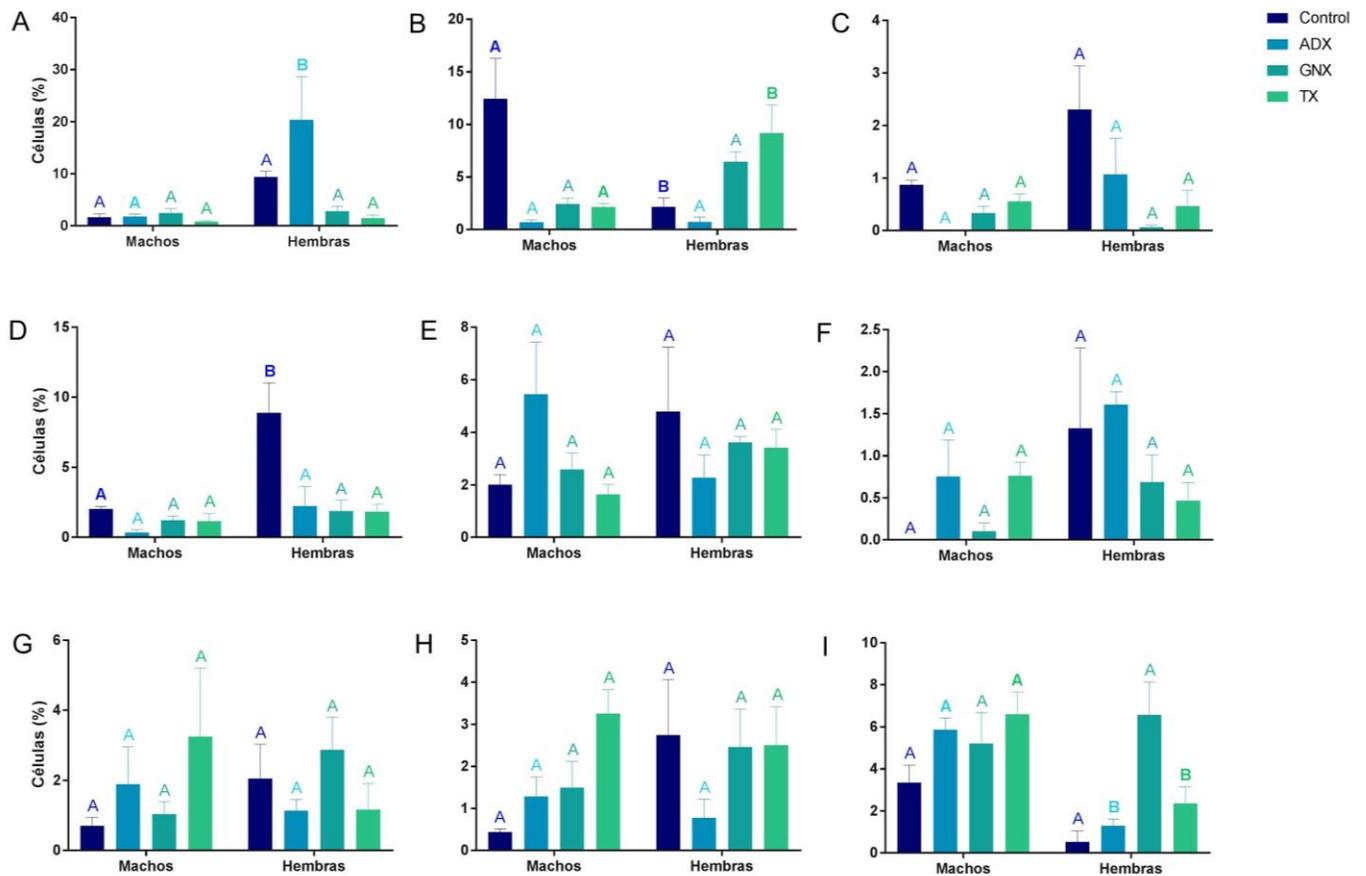


Figura 25. Diferencias en tipos de birrespuesta entre machos y hembras ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con respuesta a GHRH+CRH (A), GHRH+GnRH (B), GHRH+TRH (C), GHRH+DA (D), CRH+GnRH (E), CRH+TRH (F), CRH+DA (G), GnRH+TRH (H) y GnRH+DA (I) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada combinación de factores en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

5. Cambios en la trirrespuesta

En machos, las únicas combinaciones de tres respuestas que presentaron cambios significativos entre condiciones fueron a GnRH, CRH y ya sea TRH o DA. En ambos casos se tuvo una disminución en la proporción de células con este tipo de respuesta tras la perturbación de los ejes, siendo siempre mayor el porcentaje de respuesta a GnRH, CRH y DA. De manera similar a lo que se observó en la birrespuesta, en este caso hubo combinaciones de respuestas a secretagogos hipotalámicos que sólo se encontraron tras alteraciones de los ejes neuroendócrinos: CRH, TRH y ya sea GHRH o GnRH (Figura 26).

En hembras se observó un aumento significativo en la proporción de células con respuesta a GHRH, CRH y GnRH después de las tres alteraciones a los ejes neuroendócrinos. Cabe resaltar que esta combinación de respuestas no se observó en el grupo control. Asimismo, el porcentaje de células

con respuesta a GHRH, CRH y TRH y a GHRH, CRH y DA disminuyó en las tres condiciones experimentales. En el caso de esta última combinación, el decremento sólo fue significativo para TX. Finalmente, En OVX y TX se presentaron células con respuesta a GHRH, GnRH y DA, las cuales estuvieron ausentes en el control y en ADX, lo que difiere de lo encontrado en machos para esta forma de trirrespuesta. Asimismo, tras OVX se observó un aumento en la trirrespuesta que involucra a GnRH y DA (Figura 26).

En lo que respecta al grupo control de hembras, se presentó una proporción significativamente mayor de células con trirrespuesta a GHRH, CRH y TRH y a GHRH, CRH y DA, a comparación del grupo control de machos. También se encontró una mayor proporción de células con respuesta a GHRH, CRH y GnRH en hembras que en machos, la cual sólo fue significativa para TX. En OVX se observó un porcentaje mayor de células con respuesta a CRH, GnRH y TRH que en OQX. Por el contrario, en el grupo control y ADX de hembras no se encontraron células con respuesta a GHRH, GnRH y DA, que sí se presentaron en machos, siendo esto significativo para el control (Figura 27).

6. Cambios en la tetrarespuesta

Las células con respuesta a cuatro factores hipotalámicos representaron una proporción muy baja de la población total de células endócrinas de la adenohipófisis.

En machos, la combinación de respuestas a GHRH, CRH, GnRH y DA fue más frecuente que la misma combinación con TRH en lugar de DA en todas las condiciones. Pese a que la proporción de células con respuesta a GHRH, CRH, GnRH y TRH fue mayor en el control que en las condiciones experimentales y el porcentaje de respuesta a GHRH, CRH, GnRH y DA fue mayor en control y OQX que en ADX y TX, estas diferencias no resultaron significativas (Figura 28).

En hembras, por otra parte, la combinación de respuestas a GHRH, CRH, GnRH y TRH fue más alta que la otra combinación posible en control y ADX, mientras que lo contrario resultó cierto para OVX y TX. De forma distinta a lo que ocurrió en machos, hubo un aumento significativo en la tetrarespuesta a GHRH, CRH, GnRH y DA en OVX y TX, y una carencia completa de esta forma de respuesta en ADX (Figura 28).

La única diferencia significativa entre la proporción de células tetraresponsivas entre machos y hembras se presentó para la combinación GHRH, CRH, GnRH y DA en el control, en el que hubo un porcentaje menor de células con este tipo de respuesta en hembras. Además, pese a no ser estadísticamente significativo, en ADX en hembras no se observó esta combinación de respuestas (Figura 29).

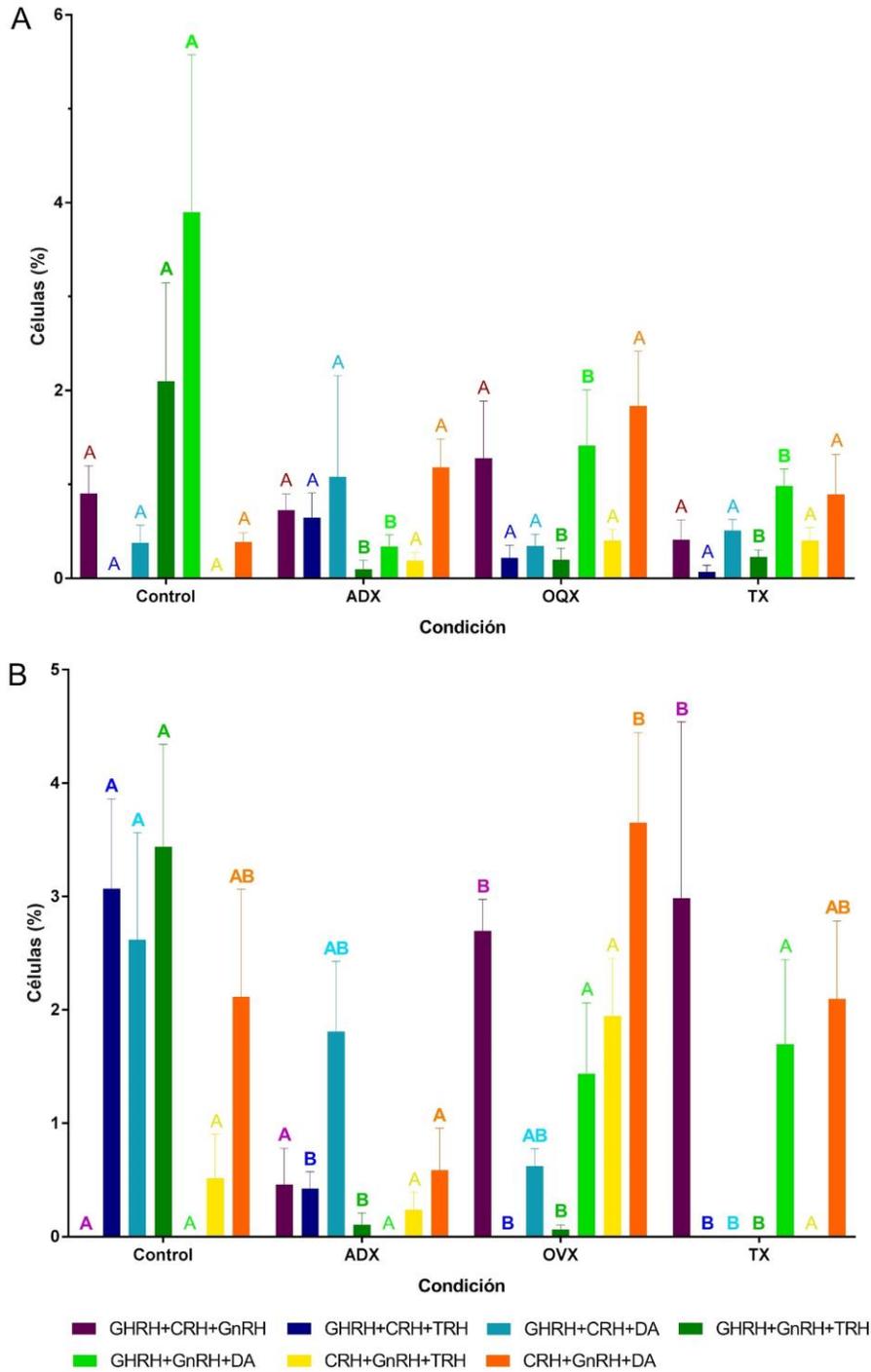


Figura 26. Tipos de trirrespuesta en ambos sexos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con respuesta a distintas combinaciones de tres factores hipotalámicos en machos (A) y hembras (B) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada combinación de factores en las cuatro condiciones, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

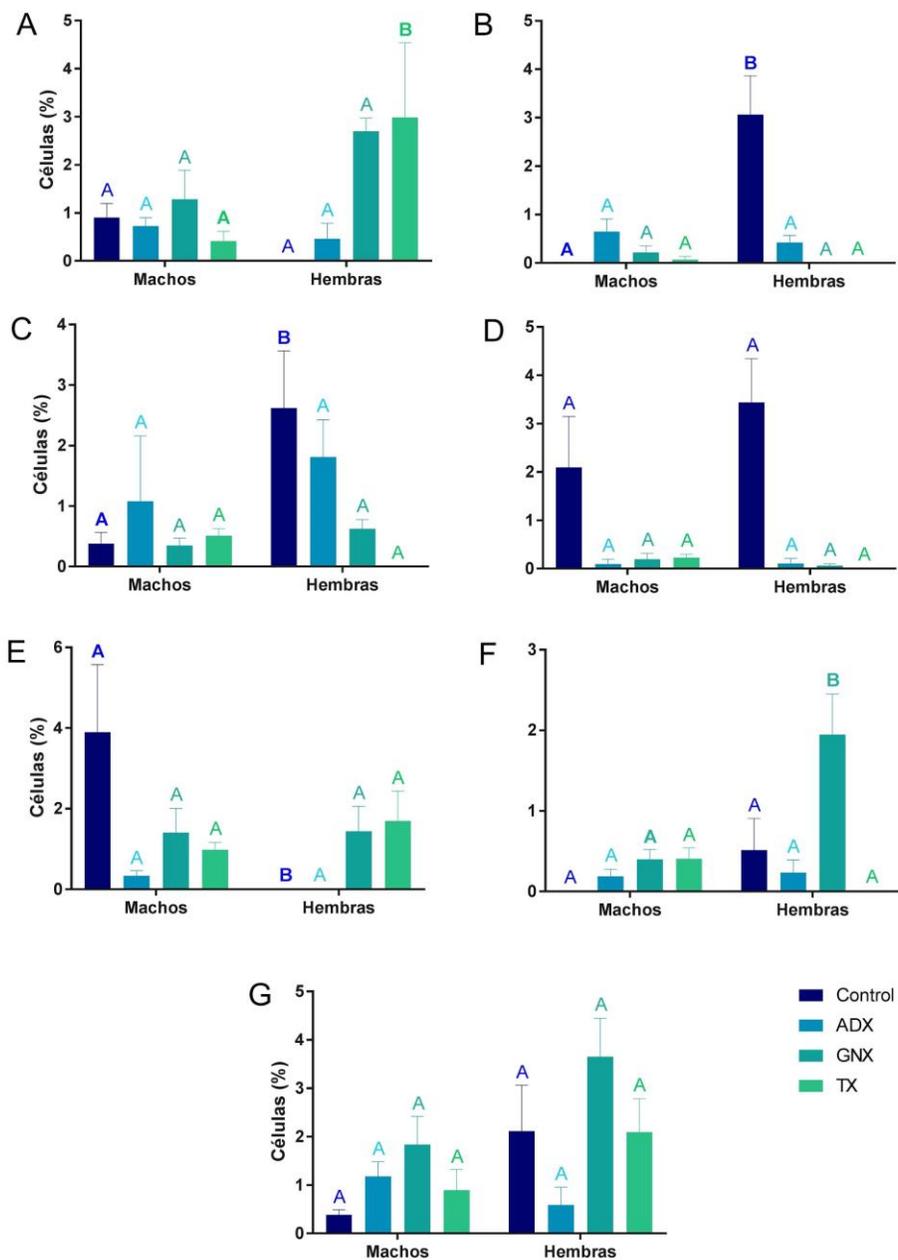


Figura 27. Diferencias en tipos de trirrespuesta entre machos y hembras ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con respuesta a GHRH+CRH+GnRH (A), GHRH+CRH+TRH (B), GHRH+CRH+DA (C), GHRH+GnRH+TRH (D), GHRH+GnRH+DA (E), CRH+GnRH+TRH (F) y CRH+GnRH+DA (G) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada combinación de factores en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

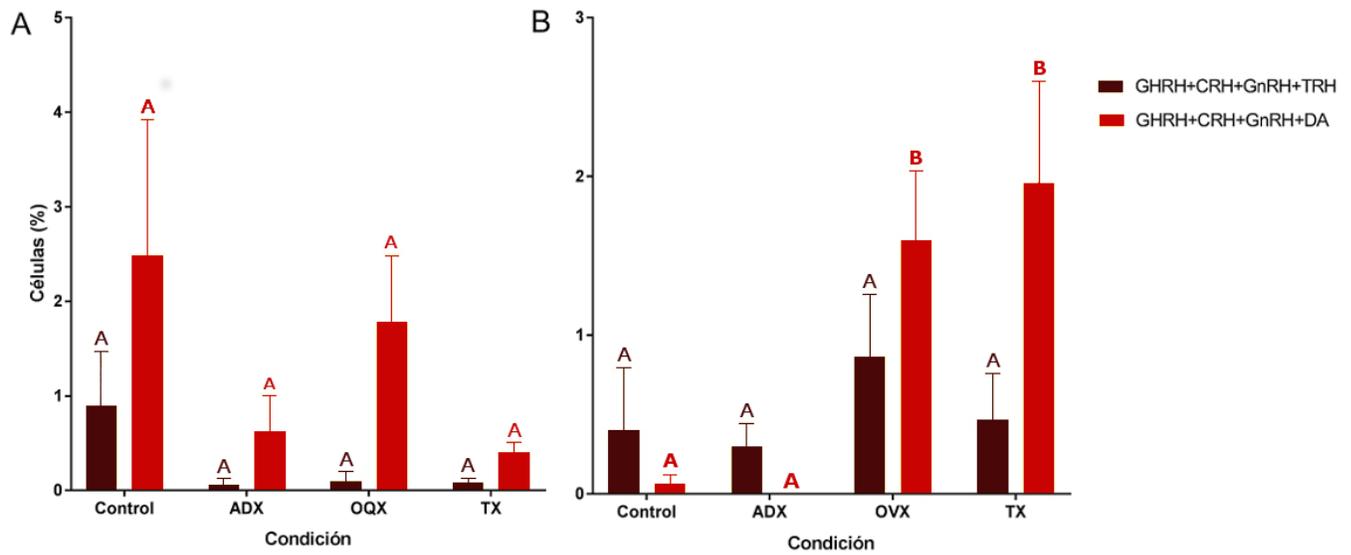


Figura 28. Tipos de tetrarrespuesta en ambos sexos ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con respuesta a combinaciones de cuatro factores hipotalámicos en machos (A) y hembras (B) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada combinación de factores en las cuatro condiciones, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

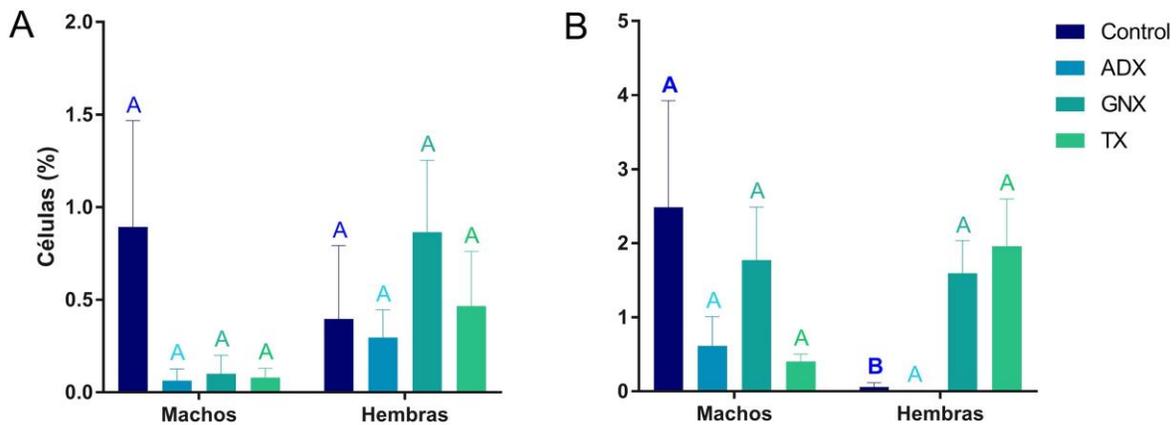


Figura 29. Diferencias en tipos de tetrarrespuesta entre machos y hembras ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos. Porcentaje de células con respuesta a GHRH+CRH+GnRH+TRH (A) y GHRH+CRH+GnRH+DA (B) en las cuatro condiciones. Comparaciones dadas para la proporción de células que responden a cada combinación de factores en la misma condición en machos y hembras, representadas por letras de colores. Letras diferentes, resaltadas en negritas, indican diferencias significativas.

8. Discusión

Con base en lo encontrado, se puede afirmar que existen cambios en las proporciones de los tipos celulares endócrinos adenohipofisarios, determinados a partir de su respuesta a factores liberadores e inhibidores hipotalámicos, cuando se remueven las glándulas blanco de los ejes neuroendócrinos en ratones de ambos sexos. Esto coincide con lo reportado en la literatura, según lo cual la pérdida de la retroalimentación negativa ocasiona alteraciones en el funcionamiento de los ejes (Kitay, 1963; Wynn, *et al.*, 1985; Ibrahim, *et al.*, 1986; Horvath, *et al.*, 1990; Mizobuchi, *et al.*, 1996; Nolan, *et al.*, 1998; Vidal, *et al.*, 2000; Vidal, *et al.*, 2001; Nolan y Levy, 2006).

El conjunto de los resultados de este trabajo sugiere que los somatotropos y los gonadotropos son los grupos de mayor importancia en los cambios en la respuesta observados ante la remoción de las glándulas blanco, ya que las proporciones de estos dos tipos celulares son las que cambian con mayor frecuencia y magnitud en ambos sexos tras las alteraciones. Resulta interesante que los somatotropos, las células más numerosas en la adenohipófisis, tiendan a disminuir en porcentaje ante las tres alteraciones de los ejes, lo cual insinúa un papel de estas células en la adaptación funcional de la glándula a retos fisiológicos. Esta posible importancia de los somatotropos en la plasticidad de la hipófisis ha sido propuesta por estudios que han reportado cambios en la proporción de este tipo celular ante eventos fisiológicos como la preñez, la lactancia, la progresión de los ciclos sexuales y las alteraciones de los ejes neuroendócrinos. En varios de estos casos se ha descrito la presencia de somatotropos multifuncionales y la transdiferenciación reversible de estas células hacia otros tipos celulares adenohipofisarios (Vidal, *et al.*, 2001; Childs, 2002; Jentoft, *et al.*, 2012).

La plasticidad exhibida por los somatotropos puede deberse a la presencia de receptores en estas células que se unen a factores hipotalámicos y a hormonas secretadas por los órganos blanco de otros ejes neuroendócrinos, como TRH, GnRH, hormonas sexuales y GCs. El grado de presencia de estos receptores está sujeta a cambios de acuerdo a la demanda fisiológica (Vidal, *et al.*, 2000; Vidal, *et al.*, 2001; Paez-Pereda, *et al.*, 2005; Edwards y Raetzman, 2018). Lo anterior es de especial relevancia para los receptores de estrógenos en el núcleo, los cuales se encuentran en estrecha relación con proteínas de regulación de la expresión génica involucradas en la identidad celular (Coradini y Oriana, 2014).

En ADX se observó un aumento en la proporción de corticotropos, significativo sólo en hembras, y un incremento en la presencia de tirotropos y gonadotropos con respuesta a CRH, en machos, y de somatotropos con respuesta a CRH, en hembras. Aunque se ha reportado un incremento en la actividad mitótica de corticotropos después de ADX (Sakuma, *et al.*, 1984; Taniguchi, *et al.*, 1995), trabajos posteriores han sugerido que el incremento de este tipo celular, bajo esta condición, se debe principalmente a la diferenciación de células sin contenido hormonal presentes en la adenohipófisis (Nolan y Levy, 2006; Rizzoti, *et al.*, 2013). Nolan y Levy (2006) demostraron que este aumento en la proporción de corticotropos no se debe a la proliferación de células corticotrópicas ni gonadotrópicas ya existentes, y descartaron la posibilidad de que provengan de otros tipos celulares hormonales de la adenohipófisis. Es importante mencionar que esta última

conclusión no deriva de resultados experimentales, sino de la suposición de que la divergencia temprana en el desarrollo embrionario de los corticotropos y de los otros tipos celulares (Zhu, *et al.*, 2007) es suficiente para impedir que células del linaje *Pit1* pudieran expresar fenotipos asociados con los corticotropos o transdiferenciarse hacia este tipo celular. Por esto, Nolan y Levy (2006) asumieron que células no positivas para ACTH ni para LH que dieran lugar a corticotropos eran necesariamente células no hormonales. Lo anterior entra en contradicción con lo encontrado en este trabajo en ADX, ya que tanto en machos como en hembras se presenta birrepuesta de corticotropos a otros factores hipotalámicos, y en hembras las células con respuesta a GHRH y CRH pueden ser hasta el 20% del total de la adenohipófisis en esta condición. Esto podría esperarse al considerar que las glándulas adrenales son una fuente importante de andrógenos y de GCs, a los que tanto los somatotropos como los gonadotropos son sensibles, por lo que la pérdida de la retroalimentación por estas hormonas impactaría a otros grupos celulares además de los corticotropos (Mostaghel, *et al.*, 2017). La inviabilidad de la transdiferenciación entre los corticotropos y otros tipos celulares de la adenohipófisis no puede asumirse *a priori*, ya que este proceso puede ocurrir incluso en linaje celulares muy distantes entre sí, encontrándose sujeto a regulación principalmente por factores epigenéticos, sensibles a señales extracelulares (Qin, 2016).

Un estudio previo (Keough y Wood, 1978) reportó un incremento significativo en la proporción de lactotropos y corticotropos y un decrecimiento en el porcentaje de somatotropos después de ADX en tanto en ratones hembra como en machos. Esto coincide parcialmente con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que hubo una mayor proporción de corticotropos y una menor proporción de somatotropos tras ADX en ambos sexos. Sin embargo, se observó una proporción ligeramente menor, no estadísticamente significativa, de lactotropos en esta condición tanto en machos como en hembras. Asimismo, se encontró un aumento en el porcentaje de gonadotropos después de la alteración del eje HHA que no fue observada en el trabajo citado. Una de las posibles explicaciones para estas diferencias es que Keough y Wood (1978) sacrificaron a los ratones cinco días después de la cirugía, cuando las condiciones fisiológicas alteradas por la cirugía no se han estabilizado todavía (Nolan y Levy, 2006; Durán Pastén, 2008). Dado que las observaciones en el presente trabajo se hicieron 21 días después de las cirugías, no es posible conocer si en los días previos hubo otros cambios en las proporciones de los tipos celulares que no se ven representadas más adelante.

La remoción de las gónadas estuvo relacionada con una disminución en la proporción de somatotropos, tanto en hembras como en machos. Esto puede ser causado por la pérdida de la principal fuente de estrógenos, los cuales están asociados con la proliferación y la apoptosis de somatotropos (Shinkai, *et al.*, 1995). Los niveles variables de estas hormonas en cada fase del ciclo estral se han asociado con efectos sobre los la concentración de GH, lo que sugiere un cierto grado de control por parte del eje HHG sobre la actividad de los somatotropos (Zárate y Seilicovich, 2010). En relación con lo anterior, el incremento cíclico en los niveles de gonadotropinas coincide con la aparición de células que comparten características fenotípicas de somatotropos y de gonadotropos (Childs, 2002).

Varios trabajos han resaltado la importancia de los estrógenos sobre la función de tipos celulares no pertenecientes al eje HHG, ya que los niveles de estas hormonas afectan la comunicación intercelular entre células foliculoestrelladas, la proliferación y apoptosis de células endócrinas en la adenohipófisis, las proporciones relativas de los tipos celulares secretores de esta glándula y la identidad celular, esto último a través de la generación de cambios epigenéticos (Shinkai, *et al.*, 1995; Kurono, 1996; Zárata y Seilicovich, 2010; Coradini y Oriana, 2014).

Otra explicación para la influencia de los gonadotropos sobre otros tipos celulares es que estos generan señales parácrinas que tienen un impacto en población de somatotropos, lactotropos y corticotropos, así como sobre la función de otros gonadotropos (Denef, 2008).

Estudios previos han identificado la presencia de células con fenotipo doble de tipos celulares adenohipofisarios en hipotiroidismo primario. Estas células se han explicado como estados intermedios en el curso de la transdiferenciación entre células pertenecientes al linaje de los somatotropos, los tirotropos y los lactotropos, y su relevancia funcional se infiere a partir del incremento en los niveles de TSH y PRL en esta enfermedad. La transdiferenciación reversible entre estos tipos celulares también ha sido reportada en relación con cambios en la demanda funcional del organismo. Se ha propuesto que estas formas de multifuncionalidad tienen que ver con la cercanía, en términos de desarrollo, entre estos tipos celulares, ya que la diferenciación de somatotropos, tirotropos y lactotropos depende de la expresión de *Pit1* (Vidal, *et al.*, 2001; Jentoft, *et al.*, 2012). Lo anterior no coincide con lo encontrado en el presente trabajo, en el cual no se observa un incremento en la proporción de células con respuesta a GHRH y TRH ni a GHRH y DA después de TX, pero sí un menor porcentaje de somatotropos y un incremento en la proporción de gonadotropos y tirotropos monorresponsivos, así como en células con respuesta doble a GHRH y GnRH. Si bien el método empleado no permite distinguir a células con birrespuesta a TRH y DA, las cuales serían contadas como lactotropos monorresponsivos, tampoco hay una mayor presencia de estas células en TX con respecto al control, lo que sugiere que no hay un aumento en el porcentaje de lactotirotropos. Es importante resaltar que los datos mencionados anteriormente provienen de estudios de caso en pacientes humanos, algunos de los cuales reportan lo encontrado en un solo paciente. Por lo tanto, es posible que las diferencias entre lo hallado en el presente trabajo y la información aportada por los estudios de caso se deba a la variación individual, especialmente al considerar que los humanos tienen un grado relativamente alto de diferencia entre sí, mientras que los ratones BALB/c son una cepa endógama, y por lo tanto isogénica y uniforme en cuanto a su composición genética (Festing, 2014).

En otro estudio de nuestro grupo de trabajo, Santiago Andres (2017) describió el aumento en la proporción de tirotropos en rebanadas de adenohipófisis de ratas macho tras TX. Esto también se observó en la adenohipófisis de ratón, aunque no fueron diferencias significativas. De manera similar a lo que se observó en el presente trabajo, en dicho estudio se reportaron diferencias entre los resultados de rebanadas de tejido y los provenientes de cultivos celulares. Estas discrepancias entre la información obtenida de células *ex vivo* e *in vitro* pueden adjudicarse a la pérdida, durante la disgregación del tejido para cultivo, de uniones comunicantes y adherentes entre las células, de los componentes de la matriz extracelular y de las redes funcionales entre células endócrinas y con

las células foliculoestrelladas (Stojilković, 2001; Mollard, *et al.*, 2012), factores que juegan un papel fundamental en la proliferación, la función y el mantenimiento de la identidad celular en la adenohipófisis (Morand, *et al.*, 1996; Paez-Pereda, *et al.*, 2005; Deneff, 2008; Holmberg y Perlmann, 2012; Coradini y Oriana, 2014; Farahani, *et al.*, 2014). Kurono y colaboradores (1996) demostraron que las gonadectomías están asociadas con una baja en el número de uniones comunicantes entre las células foliculoestrelladas a causa de la pérdida de la retroalimentación por hormonas sexuales. A su vez, esto está relacionado con la función hormonal en la adenohipófisis, ya que las células foliculoestrelladas están involucradas en la coordinación de la respuesta y en la comunicación entre células. Además, existen uniones comunicantes entre las células foliculoestrelladas y las células endócrinas, particularmente con lactotrofos y somatotrofos (Morand, *et al.*, 1996), lo que podría ser una posible causa para el impacto que sufre la respuesta a GHRH después de la remoción de las glándulas blanco, aunque el efecto de la pérdida de otros elementos de retroalimentación negativa sobre la unión intercelular no ha sido demostrado. Tanto las interacciones parácrinas como las endócrinas son importantes en el mantenimiento de la identidad celular y en la función hormonal de la adenohipófisis (Edwards y Raetzman, 2018). Sin embargo, las células en rebanadas de tejido son observadas poco tiempo después del sacrificio del animal, lo cual no puede hacerse en cultivo, constituyendo una posible explicación a las diferencias observadas entre ambas aproximaciones.

Las proporciones de células multirresponsivas y de los diferentes tipos de multirrespuesta observados en este trabajo difieren de lo antes reportado en cultivos celulares en ratas Wistar macho (Pedroza Cummings, 2016), en los que se observó un incremento en la multirrespuesta ante las alteraciones de los ejes neuroendócrinos. La proporción de células monorresponsivas a GnRH encontrada por dicha autora en su modelo de rata es considerablemente más baja que la hallada en el presente trabajo. Asimismo, la tendencia del cambio en el porcentaje de estas células es opuesta: en el estudio mencionado la proporción de gonadotropos monorresponsivos tiende a disminuir después de perturbaciones a los ejes neuroendócrinos, mientras que lo contrario ocurrió en las tres condiciones experimentales en la adenohipófisis de ratón. El trabajo citado también menciona un incremento en la población de lactotrofos ante afrentas a los ejes neuroendócrinos, lo cual no se observó en este caso. Además, Pedroza Cummings (2016) encontró un porcentaje alto de células birresponsivas a GHRH y a TRH en todas las condiciones que no se observó en ratón, y no halló el incremento en la proporción de células con respuesta a CRH y a GnRH que se vio en ratones en ADX. Estas diferencias pueden explicarse por las condiciones marcadamente distintas entre los cultivos celulares y las rebanadas de tejido vivo, y sugieren que la multirrespuesta es sensible a elementos del medio extracelular que no se mantienen en cultivo. Finalmente, las ratas Wistar son una cepa exógama, lo cual implica menor uniformidad genética entre individuos (Festing, 2014).

Pese a las múltiples discrepancias entre los hallazgos de este trabajo y el de Pedroza Cummings (2016), hubo similitudes entre estos como la disminución en la proporción de somatotrofos tras alteraciones de los ejes de regulación neuroendócrina y la mayor frecuencia de las formas de multirrespuesta que involucran a un menor número de factores hipotalámicos, con mayor ocurrencia de células birresponsivas en ambos sexos, frente a tri y tetraresponsivas. En cuanto a este último punto, salta a la vista que las células con respuesta a tres y cuatro factores hipotalámicos comprenden un porcentaje muy bajo de la población endócrina de la adenohipófisis,

y no exhiben las diferencias entre machos y hembras que se observan en la monorrespuesta y la birrespuesta. Por lo mismo, es posible que estas células no tengan una relevancia funcional en la adaptación a retos fisiológicos.

Núñez y colaboradores (2003) reportaron que los lactotropos y los somatotropos eran en su mayoría monorresponsivos, mientras que los tirotropos eran sobre todo multirresponsivos y, en hembras, también los corticotropos y gonadotropos. Estos datos fueron obtenidos de cultivos celulares, distinguiéndose los tipos celulares por su contenido hormonal, y difieren de la información proveniente de rebanadas de tejido. En este caso, las células con birrespuesta a GHRH y a otro factor son las células birresponsivas más frecuentes, tanto en hembras como en machos. En hembras, cabe mencionar que en la condición control, los lactosomatotropos pueden ser hasta el 10% de la población total de las células endócrinas de la adenohipófisis. En dicho caso, las células con respuesta a GHRH y a CRH también pueden representar un porcentaje parecido de las células endócrinas adenohipofisarias. Lo anterior puede deberse a la susceptibilidad de los somatotropos a cambios en las señales del medio, las cuales son muy diferentes *in vitro* a comparación de *ex vivo* (Vidal, *et al.*, 2001; Paez-Pereda, *et al.*, 2005).

De manera similar a lo que se observó en el presente trabajo, Núñez y colaboradores (2003) reportaron una mayor proporción de células multifuncionales en hembras que en machos. Lo anterior sugiere que estas células están involucradas en la mayor plasticidad de la adenohipófisis de las hembras, las cuales enfrentan retos fisiológicos frecuentes y de gran magnitud como parte de su ciclo de vida, como la progresión de los ciclos sexuales, la preñez y la lactancia, en mamíferos (Denef, 2008; Zárate y Seilicovich, 2010).

Aunque en hembras se observan incrementos en la presencia de los tipos celulares asociados al eje que se afecta, aunados a disminuciones en la proporción de somatotropos monorresponsivos, la disminución porcentual de estas células no es suficiente para explicar el aumento en otros tipos celulares. Por lo tanto, es posible que los cambios en la identidad y la respuesta de las células presentes en la hipófisis al momento de la cirugía se vean complementados por proliferación celular o por la diferenciación de células no comprometidas a ningún linaje endócrino. Lo anterior no puede descartarse tampoco para los otros cambios observados en las proporciones células con diferente tipo de respuesta (Taniguchi, *et al.*, 1995; Rizzoti, *et al.*, 2013). Estos aumentos en los tipos celulares vinculados al eje alterado pueden constituir un mecanismo de adaptación a nivel adenohipofisario frente a los retos impuestos por la pérdida de los órganos blanco de los ejes de regulación neuroendócrina.

Pese a que tanto hembras como machos responden a alteraciones de los ejes neuroendócrinos con cambios en la proporción de distintos tipos de respuesta a factores hipotalámicos, estos cambios no son homogéneos para cada forma de respuesta y perturbación en los dos sexos. Esto sugiere que la regulación de la función hipofisaria y la adaptación funcional a alteraciones de los ejes neuroendócrinos son diferentes entre machos y hembras. La mayoría de las diferencias observadas en cuanto a la respuesta de las células en un sexo y otro se dieron en ADX. Además de esto, dicha condición en hembras es el único caso en el que se observa una disminución en la proporción de

gonadotropos, tipo celular que aumenta en el resto de condiciones en hembras y en todas las condiciones experimentales en machos. Esto puede deberse a la estrecha interrelación entre los ejes HHA y HHG, siendo que este último involucra muchas diferencias entre machos y hembras asociadas a la función reproductora. Las glándulas adrenales son capaces de sintetizar andrógenos a partir de pregnenolona, por lo que al removerlas se pierde una fuente de estas hormonas esteroideas. A su vez, esto tiene un efecto sobre la regulación del eje HHG. La interrelación de los ejes HHA y HHG se ha observado en procesos patológicos como los de pacientes con síndrome de ovario poliquístico, en las cuales se presenta hiperandrogenismo causado por la síntesis excesiva de andrógenos en las glándulas adrenales. Es importante mencionar que la síntesis de andrógenos en estas mujeres se ve afectada por la administración de agonistas de GnRH. Además, la actividad de las neuronas GnRHérgicas del hipotálamo se ve afectada por CRH, hormona cuyos niveles en plasma se incrementan después de ADX (Rabadan-Diehl, *et al.*, 1997; Tellam, *et al.*, 2000; Doi, *et al.*, 2006).

La hipófisis integra información proveniente del hipotálamo y directamente de tejidos periféricos, con los que se encuentra en constante retroalimentación. Esta función requiere de un alto grado de plasticidad que permita la respuesta coordinada espaciotemporalmente a estímulos del organismo y adaptación a cambios fisiológicos tanto normales como patológicos. Por lo mismo, que en este trabajo se haya observado que la multirrespuesta es menos frecuente ante alteraciones de los ejes neuroendócrinos, tanto en hembras como en machos, permite sugerir que esta forma de respuesta está involucrada en la capacidad adaptativa de la adenohipófisis. Asimismo, el hecho de que este resultado difiera de lo encontrado en cultivo celular podría indicar que otros autores han tenido razón en sugerir que el mantenimiento de la identidad celular y la respuesta de las células son fenómenos a la vez plásticos y robustos que dependen del surgimiento de redes interregulatorias de múltiples elementos, tanto intracelulares como extracelulares, cuyo efecto podría ejercerse a través de la restricción de la expresión génica, viéndose afectado todo lo anterior al sacar a las células de su contexto tisular (Holmberg y Perlmann, 2012).

9. Conclusiones

Las alteraciones a los ejes neuroendócrinos no conllevan cambios en el porcentaje de células multirresponsivas, pero sí en la proporción de células con respuesta a los diferentes factores hipotalámicos y combinaciones de los mismos. Los cambios tanto en la monorrespuesta como en la multirrespuesta son distintos entre machos y hembras, e involucran diferencias en la respuesta a otros factores hipotalámicos además de los directamente implicados en el eje afectado. Además, lo anterior sugiere que los mecanismos mediante los cuales machos y hembras responden a retos fisiológicos son diferentes.

Los gonadotropos y somatotropos son las poblaciones celulares que sufren mayores cambios tras perturbaciones en la regulación neuroendócrina, y la mayor parte de los cambios en la multirrespuesta involucran a GnRH y/o a GHRH. Los somatotropos, así como los lactosomatotropos, tienden a disminuir en proporción cuando se afectan los ejes neuroendócrinos. Esto parece indicar un papel importante de dichos tipos celulares en la adaptación de la adenohipófisis a la remoción de las glándulas blanco de los ejes.

En hembras se presentó una mayor proporción de células multirresponsivas y una mayor variabilidad en la respuesta a factores hipotalámicos que en machos frente a perturbaciones de los ejes neuroendócrinos. Asimismo, en hembras se presentó un aumento en el porcentaje de los tipos celulares asociados al eje alterado. Esto sugiere una mayor plasticidad de la adenohipófisis en ratones hembra a comparación de los machos.

Los resultados obtenidos de rebanadas de tejido vivo fueron marcadamente distintos de los provenientes de células en cultivo, lo que indica que no hay una equivalencia entre ambas aproximaciones y acentúa la importancia de elementos del medio extracelular y de las interacciones intercelulares en el mantenimiento de la identidad y la función de las células de la adenohipófisis.

10. Perspectivas

Pese a que este trabajo demuestra los cambios en los tipos de multirrespuesta a factores hipotalámicos en la adenohipófisis tras alteraciones de los ejes neuroendócrinos, la relevancia funcional de estos cambios requiere de más pruebas para ser dilucidada. Particularmente, es necesario acoplar el estudio de la respuesta a secretagogos con la observación del contenido hormonal de las células y los niveles de hormonas en plasma sanguíneo. De esta forma puede determinarse el efecto de la multifuncionalidad sobre la adaptación de los organismos a retos fisiológicos.

Los cambios en la proporción de tipos celulares se observaron a las tres semanas de la inducción de la insuficiencia hormonal mediante la escisión de las glándulas blanco. Por lo tanto, no es posible determinar el proceso mediante el cual se dio el reajuste de las células en la adenohipófisis después de estas alteraciones. La realización de estudios similares, en los que el análisis de la respuesta de

las células se diera a tiempos variables desde la cirugía, permitiría entender mejor los cambios funcionales que ocurren en la hipófisis después de perturbaciones de los ejes neuroendócrinos, y el papel de la multifuncionalidad en dichos cambios.

Finalmente, las estimaciones de la respuesta de células adenohipofisarias a secretagogos hipotalámicos tendrían mayor precisión de contarse con un método más exacto para distinguir lactotrofos de tirotrofos a partir de su respuesta de $[Ca^{2+}]_i$.

11. Literatura citada

- Aguilera, G., Nikodemova, M., Wynn, P.C. y Catt, K.J. (2004). Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides*, 25(3), 319-329.
- Aoki, A., Pasolli, H.A. y Torres, A.I. (1994). Pituitary plasticity as correlate of secretory activity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 46(6), 435-436.
- Ben-Jonathan, N. y Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*, 22(6), 724-763.
- Ben-Shlomo, A. y Melmed, S. (2010). Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(3), 123-133.
- Ben-Shlomo, A. y Melmed, S. (2011). Hypothalamic Regulation of Anterior Pituitary Function. En Melmed, S. (Ed.), *The Pituitary* (pp. 21-45). China: Academic Press.
- Celver, J., Sharma, M., Thanawala, V., Christopher Octeau, J. y Koor, A. (2013). Arrestin-dependent but G-protein coupled receptor kinase-independent uncoupling of D2-dopamine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 127(1), 57-65.
- Chen, C.C. y Fernald, R.D. (2008). GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *Journal of Fish Biology*, 73(5), 1099-1120.
- Childs, G.V. (1997). Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. *Microscopy Research and Technique*, 39(2), 114-130.
- 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.
- Chung, S., Son, G.H. y Kim, K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(5), 581-591.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.
- Coradini, D. y Oriana, S. (2014). The role of maintenance proteins in the preservation of epithelial cell identity during mammary gland remodeling and breast cancer initiation. *Chinese Journal of Cancer*, 33(2), 51.
- Dallman, M.F. (2005). Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(3-4), 103-108.
- Del Río Valdés, D.C. (2015). *Regulación de la dinámica de calcio intracelular de los pericitos adenohipofisarios por el factor hipotalámico GHRH*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.
- Deneff, C. (2008). Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(1), 1-70.
- Dieterich, K.D., Grigoriadis, D.E., y De Souza, E.B. (1996). Homologous desensitization of human corticotropin-releasing factor, receptor in stable transfected mouse fibroblast cells. *Brain Research*, 710(1-2), 287-292.
- Doi, S.A., Al-Zaid, M., Towers, P.A., Scott, C.J. y Al-Shoumer, K.A. (2006). Steroidogenic alterations and adrenal androgen excess in PCOS. *Steroids*, 71(9), 751-759.
- Drouin, J. (2011). Pituitary Development. En Melmed, S. (Ed.), *The Pituitary* (pp. 3-19). China: Academic Press.
- Durán Pastén, M.L. (2008). *Estudio de los patrones de Ca²⁺ intracelular generados por el estímulo de GnRH en rebanadas de hipófisis de ratón macho castrado e inyectado con*

estradiol. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Licenciatura en Biología.

- Durán-Pastén, M.L. y 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, 127.
- Edwards, W. y Raetzman, L.T. (2018). Complex integration of intrinsic and peripheral signaling is required for pituitary gland development. *Biology of Reproduction*, ioy081.
- Engelmann, M., Landgraf, R. y Wotjak, C.T. (2004). The hypothalamic–neurohypophysial system regulates the hypothalamic–pituitary–adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25(3-4), 132-149.
- Farahani, E., Patra, H.K., Jangamreddy, J.R., Rashedi, I., Kawalec, M., Rao Pariti, R.K., ... y Wiechec, E. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*, 35(4), 747-759.
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A. y Lang, A.-G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41, 1149-1160.
- Fauquier, T., Guérineau, N.C., McKinney, R.A., Bauer, K. y 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.
- Ferguson, S.S.G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 53(1), 1-24.
- Festing, M.F. (2014). Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research. *ILAR Journal*, 55(3), 399-404.
- Fiekers, J.F. (2001). The contributions of plasma membrane Na⁺-Ca²⁺-exchange and the Ca²⁺-ATPase to the regulation of cytosolic calcium ([Ca²⁺]_i) in a clonal pituitary cell line (AtT-20) of mouse corticotropes. *Life Sciences*, 70(6), 681-698.
- Florio, T. (2011). Adult pituitary stem cells: from pituitary plasticity to adenoma development. *Neuroendocrinology*, 94(4), 265-277.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A. y Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523-1631.
- Fu, Q. y Vankelecom, H. (2012). Regenerative capacity of the adult pituitary: multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation. *Stem Cells and Development*, 21(18), 3245-3257.
- Gannon, S. y Christian, H. (2013). Secretory granule accumulation in anterior pituitary somatotrophs of TPC1 null mice. Presentado en Society for Endocrinology BES 2013, Harrogate, UK. *Endocrine Abstracts* 31 P244.
- Gibo, H., Hokama, M., Kyoshima, K. y Kobayashi, S. (1993). Arteries to the pituitary. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 51(10), 2550-2554.
- Guérineau, N., Corcuff, J.B., Tabarin, A. y Mollard, P. (1991). Spontaneous and corticotropin-releasing factor-induced cytosolic calcium transients in corticotrophs. *Endocrinology*, 129(1), 409-420.
- Hall, J.E. (2015). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Estados Unidos: Saunders.

- Herman-Bonert, V.S. y Melmed, S. (2011). Growth Hormone. En Melmed, S. (Ed.), *The Pituitary* (pp. 83-117). China: Academic Press.
- Hiller-Sturmhöfel, S. y Bartke, A. (1998). The endocrine system: an overview. *Alcohol Research and Health*, 22(3), 153-164.
- Hinkle, P.M., Gehret, A.U. y Jones, B.W. (2012). Desensitization, trafficking, and resensitization of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 180.
- Hirano, M., Igarashi, A. y Suzuki, M. (1976). Dynamic changes of serum LH and FSH during pregnancy and puerperium. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 118(3), 275-282.
- Hodson, D.J., Romanò, N., Schaeffer, M., Fontanaud, P., Lafont, C., Fiordelisio, T. y Mollard, P. (2012). Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells *in situ*. *Cell Calcium*, 51(3-4), 222-230.
- Holmberg, J. y Perlmann, T. (2012). Maintaining differentiated cellular identity. *Nature Reviews Genetics*, 13(6), 429.
- Horvath, E., Lloyd, R. V. y Kovacs, K. (1990). Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyrocytes. A morphologic study of the rat pituitary including immunoelectron microscopy. *Laboratory Investigation*, 63(4), 511-520.
- Ibrahim, S.N., Moussa, S.M. y Childs, G.V. (1986). Morphometric studies of rat anterior pituitary cells after gonadectomy: correlation of changes in gonadotropes with the serum levels of gonadotropins. *Endocrinology*, 119(2), 629-637.
- Jaffe, C.A., Ocampo-Lim, B., Guo, W., Krueger, K., Sugahara, I., DeMott-Friberg, R., ... y Barkan, A.L. (1998). Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(1), 153-164.
- Jameson, J.L. (2017). Approach to the Patient with Endocrine Disorders. En Jameson, J.L. (Ed.), *Harrison's Endocrinology* (pp. 2-7). McGraw-Hill Education.
- Jentoft, M.E., Osamura, R.Y., Kovacs, K., Lloyd, R.V. y Scheithauer, B. W. (2012). Transdifferentiation of pituitary thyrotrophs to lactothyrotrophs in primary hypothyroidism: case report. *Virchows Archiv*, 461(2), 221-225.
- Jiménez Medina, J.A. (2015). *Organización funcional de gonadotropos de ratón macho*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.
- Kaiser, U.B. (2011). Gonadotropin Hormones. En Melmed, S. (Ed.), *The Pituitary* (pp. 205-260). China: Academic Press.
- Kaiser, U. y Ho, K.K.Y. (2016). Pituitary Physiology and Diagnostic Evaluation. En Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R. y Kronenberg, H.M. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology* (pp. 176-231). Canadá: Elsevier.
- Kardong, K.V. (2012). *Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution*. Nueva York, NY: McGraw-Hill.
- Kasahara, K., Tasaka, K., Masumoto, N., Mizuki, J., Tahara, M., Miyake, A. y Tanizawa, O. (1994). Characterization of rat pituitary cells by their responses to hypothalamic releasing hormones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199(3), 1436-1441.

- Keough, E.M. y Wood, B.G. (1978). The effects of adrenalectomy and cortisol treatment on cell types, other than corticotrophs, in the anterior pituitary of the mouse. *Tissue and Cell*, 10(3), 563-570.
- Kessler, L., Nedeltcheva, A., Imperial, J. y Penev, P.D. (2010). Changes in serum TSH and free T4 during human sleep restriction. *Sleep*, 33(8), 1115-1118.
- Kitay, J.I. (1963). Pituitary-adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology*, 73(2), 253-260.
- Kineman, R.D., Faught, W. J. y Frawley, L.S. (1992). Steroids can modulate transdifferentiation of prolactin and growth hormone cells in bovine pituitary cultures. *Endocrinology*, 130(6), 3289-3294.
- Kleine, B. y Rossmanith, W.G. (2016). *Hormones and the Endocrine System*. Springer.
- Kretschmannova, K., Kucka, M., Gonzalez-Iglesias, A.E. y Stojilković, S.S. (2012). The expression and role of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in endocrine anterior pituitary cells. *Molecular Endocrinology*, 26(1), 153-164.
- Krsmanović, L.Z., Stojilković, S.S., y Catt, K.J. (1996). Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release and its regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 7(2), 56-59.
- Kurono, C. (1996). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: VI. Development of gap junctions between folliculo-stellate cells under the influence of ovariectomy and sex steroids in the female rat. *The Anatomical Record*, 244(3), 366-373.
- Larkin, S. y Ansorge, O. (15 febrero de 2017). Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland. En De Groot, L.J., Chrousos, G., Dungan, K., *et al.*, ENDOTEXT.ORG. Consultado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425703>.
- Lee, A.K. y Tse, A. (2005). Dominant role of mitochondria in calcium homeostasis of single rat pituitary corticotropes. *Endocrinology*, 146(11), 4985-4993.
- Levine, J.E. (2012). An Introduction to Neuroendocrine Systems. En Fink, G., Pfaff, D.W. y Levine, J.E. (Eds.), *Handbook of Neuroendocrinology* (pp. 3-20). China: Academic Press.
- Le Tissier, P.R., Hodson, D.J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M. y Mollard, P. (2012). Anterior pituitary cell networks. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(3), 252-266.
- Le Tissier, P., Campos, P., Lafont, C., Romanò, N., Hodson, D.J. y Mollard, P. (2017). An updated view of hypothalamic-vascular-pituitary unit function and plasticity. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(5), 257.
- Li, Y.X., Rinzel, J., Vergara, L. y Stojilković, S.S. (1995). Spontaneous electrical and calcium oscillations in unstimulated pituitary gonadotrophs. *Biophysical Journal*, 69(3), 785-795.
- Lovejoy, D.A. (2005). *Neuroendocrinology: An Integrated Approach*. Reino Unido: John Wiley & Sons.
- Low, M.J. (2016). Neuroendocrinology. En Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R. y Kronenberg, H.M. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology* (pp. 110-175). Canadá: Elsevier.
- Martí, O. y Armario, A. (1998). Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 241-260.
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Rebuffat, P., Tortorella, C. y Nussdorfer, G.G. (1997). Arginine-vasopressin stimulates CRH and ACTH release by rat adrenal medulla, acting via

the V1 receptor subtype and a protein kinase C-dependent pathway. *Peptides*, 18(2), 191-195.

- McEwen, B.S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886(1-2), 172-189.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1603-1618.
- Melmed, S. (2017). Hypothalamic-Pituitary Regulation. En Conn, P.M. (Ed.), *Conn's Translational Neuroscience* (pp. 317-331). Reino Unido: Academic Press.
- Mescher, A.L. (2013). *Junqueira's Basic Histology*. McGraw-Hill Education.
- Millar, R.P., Lu, Z.L., Pawson, A.J., Flanagan, C.A., Morgan, K. y Maudsley, S.R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews*, 25(2), 235-275.
- Millar, R.P., Newton, C.L. y Roseweir, A.K. (2012). Neuroendocrine GPCR Signaling. En Fink, G., Pfaff, D.W. y Levine, J.E. (Eds.), *Handbook of Neuroendocrinology* (pp. 21-53). China: Academic Press.
- Mizobuchi, M., Ishikawa, M., Okauchi, Y., Bando, H. y Saito, S. (1996). Effects of thyroidectomy on thyrotropin-releasing hormone (TRH) and somatotropin release-inhibiting factor (SRIF) patterns in intrahypophysial microdialysates in rats. *Endocrine Journal*, 43(6), 679-687.
- Mollard, P., Hodson, D.J., Lafont, C., Rizzoti, K. y Drouin, J. (2012). A tridimensional view of pituitary development and function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(6), 261-269.
- Morand, I., Fonlupt, P., Guerrier, A., Trouillas, J., Calle, A., Remy, C., ... y Munari-Silem, Y. (1996). Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology*, 137(8), 3356-3367.
- Moriarty, G.C. (1976). Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein hormones. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 24(7), 846-863.
- Mostaghel, E.A., Biehl, H., Hernandez, S., Zhang, A., Bartlett, J., Corey, E., ... y Nelson, P. (2017). Contribution of mouse adrenal glands to intratumor androgens and growth of castration-resistant prostate cancer xenografts. *Journal of Clinical Oncology*, 35(6), 224.
- Musumeci, G., Castorina, S., Castrogiovanni, P., Loreto, C., Leonardi, R., Aiello, F.C., ... e Imbesi, R. (2015). A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochemica*, 117(4-5), 355-366.
- 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.
- Nolan, L.A., Kavanagh, E., Lightman, S.L. y Levy, A. (1998). Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *Journal of Neuroendocrinology*, 10(3), 207-215.
- Nolan, L.A. y Levy, A. (2006). A Population of Non-Luteinising Hormone/Non-Adrenocorticotrophic Hormone-Positive Cells in the Male Rat Anterior Pituitary Responds Mitotically to Both Gonadectomy and Adrenalectomy. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(9), 655-661.

- Núñez, L., Villalobos, C., Senovilla, L. y García-Sancho, J. (2003). Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *The Journal of Physiology*, 549(3), 835-843.
- Paez-Pereda, M., Kuchenbauer, F., Arzt, E. y Stalla, G.K. (2005). Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(10), 1487-1494.
- Parker, K.L. y Schimmer, B.P. (2011). Introduction to Endocrinology: The Hypothalamic-Pituitary Axis. En Brunton, L.L., Hilal-Dandan, R. y Knollmann, B.C. (Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Estados Unidos: McGraw-Hill.
- Pazos-Moura, C.C., Ortiga-Carvalho, T.M. y Gaspar de Moura, E. (2003). The autocrine/paracrine regulation of thyrotropin secretion. *Thyroid*, 13(2), 167-175.
- Pedroza Cummings, L. (2016). *Caracterización de los cambios de la respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ en células endócrinas multirresponsivas a secretagogos hipotalámicos en la adenohipófisis de rata Wistar en diferentes condiciones fisiológicas*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Licenciatura en Biología.
- Powell, K. (2005). Excess secretory products fuse with lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 169(2), 216.
- Qin, H., Zhao, A., Zhang, C., y Fu, X. (2016). Epigenetic Control of Reprogramming and Transdifferentiation by Histone Modifications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(6), 708-720.
- Rabadan-Diehl, C., Makara, G., Kiss, A., Zelena, D. y Aguilera, G. (1997). Regulation of pituitary corticotropin releasing hormone (CRH) receptor mRNA and CRH binding during adrenalectomy: role of glucocorticoids and hypothalamic factors. *Journal of Neuroendocrinology*, 9(9), 689-697.
- Radian, S., Coculescu, M. y Morris, J. F. (2003). Somatotroph to thyrotroph cell transdifferentiation during experimental hypothyroidism-a light and electron-microscopy study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7(3), 297-306.
- Ranabir, S. y Reetu, K. (2011). Stress and hormones. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(1), 18.
- Richards, J.S. y Pangas, S.A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 963-972.
- Rizzoti, K., Akiyama, H. y Lovell-Badge, R. (2013). Mobilized adult pituitary stem cells contribute to endocrine regeneration in response to physiological demand. *Stem Cell*, 13(4), 419-432.
- Roch, G.J., Busby E.R. y Sherwood, N.M. (2012). Evolution of Reproductive Neurohormones. En Fink, G., Pfaff, D.W. y Levine, J.E. (Eds.), *Handbook of Neuroendocrinology* (pp. 73-94). China: Academic Press.
- Saito, Y., Mekuchi, M., Kobayashi, N., Kimura, M., Aoki, Y., Masuda, T., ... y Yanagisawa, T. (2011). Molecular cloning, molecular evolution and gene expression of cDNAs encoding thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes in a teleost, the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *General and Comparative Endocrinology*, 174(2), 80-88.

- Sakuma, S., Shirasawa, N., y Yoshimura, F. (1984). A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophysial cells in immature and mature castrated rats. *Journal of Endocrinology*, 100(3), 323-328.
- Santiago Andres, Y. (2017). *Caracterización de los cambios de la respuesta de calcio intracelular [Ca²⁺]i de tirotrópos en rebanadas de hipófisis de rata Wistar con hipotiroidismo primario*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Licenciatura en Biología.
- Schaeffer, M., Hodson, D.J., Lafont, C. y Mollard, P. (2011). Endocrine cells and blood vessels work in tandem to generate hormone pulses. *Journal of Molecular Endocrinology*, 47(2), R59-R66.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... y Tinevez, J.Y. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676.
- Segerson, T.P., Kauer, J., Wolfe, H.C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I.M. y Lechan, R.M. (1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*, 238(4823), 78-80.
- Seilicovich, A. (2010). Cell life and death in the anterior pituitary gland: role of oestrogens. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(7), 758-764.
- Senovilla, L., Núñez, L., de Campos, J.M., de Luis, D.A., Romero, E., Sánchez, A., ... y Villalobos, C. (2004). Multifunctional cells in human pituitary adenomas: implications for paradoxical secretion and tumorigenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(9), 4545-4552.
- Senovilla, L., García-Sancho, J. y Villalobos, C. (2005). Changes in expression of hypothalamic releasing hormone receptors in individual rat anterior pituitary cells during maturation, puberty and senescence. *Endocrinology*, 146(11), 4627-4634.
- Senovilla, L., Núñez, L., Villalobos, C. y García-Sancho, J. (2008). Rapid changes in anterior pituitary cell phenotypes in male and female mice after acute cold stress. *Endocrinology*, 149(5), 2159-2167.
- Senovilla, L., Núñez, L., de Campos, J.M., de Luis, D.A., Romero, E., García-Sancho, J. y Villalobos, C. (2015). Single-Cell Phenotypic Characterization of Human Pituitary GHomas and Non-Functioning Adenomas Based on Hormone Content and Calcium Responses to Hypothalamic Releasing Hormones. *Frontiers in Oncology*, 5, 124.
- Sheng, H.Z. y Westphal, H. (1999). Early steps in pituitary organogenesis. *Trends in Genetics*, 15(6), 236-240.
- Shinkai, T., Sakurai, Y. y Ooka, H. (1995). Age-related changes in the numbers of mammotrophs, somatotrophs and mammosomatotrophs in the anterior pituitary gland of female rats: a flow cytometric study. *Mechanisms of Ageing and Development*, 83(3), 125-131.
- Shukuwa, K., Izumi, S.I., Hishikawa, Y., Ejima, K., Inoue, S., Muramatsu, M., ... y Koji, T. (2006). Diethylstilbestrol increases the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 126(1), 111-123.
- Staley, K. y Scharfman, H. (2005). A woman's prerogative. *Nature Neuroscience*, 8(6), 697.

- Stojilković, S.S. y Tomić, M. (1996). GnRH-induced calcium and current oscillations in gonadotrophs. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 7(10), 379-384.
- Stojilković, S.S. (2001). A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(9), 378-380.
- Stojilković, S.S., Zemkova, H. y Van Goor, F. (2005). Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca²⁺ signaling-secretion coupling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(4), 152-159.
- Stojilković, S.S., Tabak, J. y Bertram, R. (2010). Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocrine Reviews*, 31(6), 845-915.
- Stojilković, S.S. (2012). Molecular mechanisms of pituitary endocrine cell calcium handling. *Cell Calcium*, 51(3-4), 212-221.
- Takahashi, S., Okazaki, K. y Kawashima, S. (1984). Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell and Tissue Research*, 235(3), 497-502.
- Tam, J.K., Chow, B.K. y Lee, L.T. (2013). Structural and functional divergence of growth hormone-releasing hormone receptors in early sarcopterygians: lungfish and *Xenopus*. *PLoS One*, 8(1), e53482.
- Taniguchi, Y., Tamatani, R., Yasutaka, S., y Kawarai, Y. (1995). Proliferation of pituitary corticotrophs following adrenalectomy as revealed by immunohistochemistry combined with bromodeoxyuridine-labeling. *Histochemistry and Cell Biology*, 103(2), 127-130.
- Taylor, T. y Weintraub, B.D. (1985). Thyrotropin (TSH)-releasing hormone regulation of TSH subunit biosynthesis and glycosylation in normal and hypothyroid rat pituitaries. *Endocrinology*, 116(5), 1968-1976.
- Tellam, D.J., Mohammad, Y.N. y Lovejoy, D.A. (2000). Molecular integration of hypothalamo-pituitary-adrenal axis-related neurohormones on the GnRH neuron. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(3), 205-216.
- Tomić, M., Koshimizu, T.A., Yuan, D., Andric, S.A., Živadinović, D. y Stojilković, S.S. (1999). Characterization of a plasma membrane calcium oscillator in rat pituitary somatotrophs. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35693-35702.
- Vallone, D., Picetti, R. y Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(1), 125-132.
- Van Goor, F., Živadinović, D., Martinez-Fuentes, A.J. y Stojilković, S.S. (2001). Dependence of Pituitary Hormone Secretion on the Pattern of Spontaneous Voltage-gated Calcium Influx. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33840-33846.
- Van Pelt, L.F. (1977). Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171(9), 842-844.
- Vidal, S., Horvath, E., Kovacs, K., Cohen, S.M., Lloyd, R.V. y Scheithauer, B. W. (2000). Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism. *Virchows Archiv*, 436(1), 43-51.
- Vidal, S., Horvath, E., Kovacs, K., Lloyd, R.V. y Smyth, H.S. (2001). Reversible transdifferentiation: interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia. *Modern Pathology*, 14(1), 20.

- Villalobos, C., Núñez, L., Frawley, L.S., García-Sancho, J. y Sánchez, A. (1997). Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: a cellular basis for paradoxical secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 14132-14137.
- Villalobos, C., Núñez, L. y García-Sancho, J. (2004). Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(6), E1166-E1170.
- Wang, O y Majzoub, J.A. (2011). Adrenocorticotropin. En Melmed, S. (Ed.), *The Pituitary* (pp. 47-81). China: Academic Press.
- Wu, X., Wan, S. y Lee, M.M. (2007). Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 429-433.
- Wynn, P.C., Harwood, J.P., Catt, K.J. y Aguilera, G. (1985). Regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the rat pituitary gland: effects of adrenalectomy on CRF receptors and corticotroph responses. *Endocrinology*, 116(4), 1653-1659.
- Yeung, C.M., Chan, C.B., Leung, P.S. y Cheng, C.H. (2006). Cells of the anterior pituitary. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(9), 1441-1449.
- Zárate, S. y Seilicovich, A. (2010). Estrogen receptors and signaling pathways in lactotropes and somatotropes. *Neuroendocrinology*, 92(4), 215-223.
- Zhu, X., Gleiberman, A.S. y Rosenfeld, M.G. (2007). Molecular Physiology of Pituitary Development: Signaling and Transcriptional Networks. *Physiological Reviews*, 87, 933-963.
- Zoeller, R.T., Tan, S.W. y Tyl, R.W. (2007). General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(1-2), 11-53.