



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Estudio de los fenotipos de las células folículo estelares
en la hipófisis anterior de la rata”**

TESIS

Que presenta

ALEJANDRO GARCÍA GODÍNEZ

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
FISIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

MARÍA EUGENIA DEL CARMEN MENDOZA GARRIDO
RUBÉN GERARDO CONTRERAS PATIÑO

Ciudad de México

Septiembre, 2017

Índice

ÍNDICE.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. LA HIPÓFISIS.....	3
3.2. LAS CÉLULAS FOLÍCULO ESTELARES (CFE).....	5
3.3 UNIONES OCLUSORAS.....	9
3.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS CFE.....	20
3.6 LAS CÉLULAS DE LA HIPÓFISIS ANTERIOR EXPRESAN DIFERENTES CADHERINAS.....	33
3.7 LA HETEROGENEIDAD DE LAS CFE.....	34
4. PROBLEMA.....	38
5. HIPÓTESIS.....	38
6. OBJETIVO GENERAL.....	39
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
8.1 ANIMALES.....	39
8.2 GLÁNDULAS HIPÓFISIS.....	40
8.3 CULTIVO CELULAR.....	40
8.4 INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA.....	41
8.5 INMUNOCITOQUÍMICA.....	42
8.6 WESTERN BLOT.....	42
8.7 RT-PCR.....	43
8.8 ANTICUERPOS.....	44
9. RESULTADOS.....	46
9.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CFE QUE EXPRESAN A LA GFAP Y/O A LA S100B Y SU PROPORCIÓN EN EL TEJIDO DE LA HIPÓFISIS ANTERIOR.....	46
9.2 SUBPOBLACIÓN DE CFE ESTELARES QUE EXPRESAN VIMENTINA.....	49
9.3 LAS CFE EPITELIALES EXPRESAN CLDN4.....	53
9.4 EN LOS VASOS SANGUÍNEOS DE LA ADENOHIPÓFISIS SE EXPRESAN CLDN2 Y CLDN5.....	57
10. DISCUSIÓN.....	61

10.1 LAS CFE SON UNA MEZCLA DE SUBPOBLACIONES CELULARES	61
10.2 LAS CFE SE IDENTIFICAN MEJOR CON EL DOBLE MARCAJE DE S100B Y GFAP	62
10.3 LAS CFE “ESTELARES” SON DE FENOTIPO GLIAL	62
10.4 LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE CFE “ESTELARES” PUEDEN CORRESPONDER A DISTINTOS ESTADÍOS DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CFE GLIALES.....	63
10.5 LAS CFE EPITELIALES CONSTITUYEN UN EPITELIO DE TRANSPORTE	64
10.6 ¿QUÉ SE TRANSPORTA EN EL EPITELIO DE LA HIPÓFISIS ANTERIOR Y HACIA DÓNDE?	65
10.7 LA EXISTENCIA DE DOS SUB-POBLACIONES DE CFE EPITELIALES ENCONTRADAS EN ESTE ESTUDIO INDICA QUE PODRÍA HABER DISTINTOS ESTADÍOS DE DIFERENCIACIÓN DE ESTAS CÉLULAS	68
10.8 LA CLDN-2 ENDOTELIAL.....	69
11. CONCLUSIONES	70
11. PERSPECTIVAS.....	70
12. ABREVIATURAS	71
13. BIBLIOGRAFÍA	73

Agradecimientos

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico prestado al autor de esta tesis.

Al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) del CINVESTAV-IPN, en particular a la QFB Sirenia González del laboratorio de microscopía electrónica y a Iván Galván Mendoza del laboratorio de microscopía confocal.

A la M en C Elsa Aguirre del departamento de Embriología de la Escuela de Medicina de la UNAM.

Y por su inestimable ayuda a Tere de la Vega, Carmen Lozano Agama y Osvaldo Ríos del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN

1. Resumen

La hipófisis es una glándula endócrina dividida anatómicamente en la **hipófisis anterior**, la intermedia y posterior. La **hipófisis anterior** está formada por dos grandes grupos celulares: las granulares o secretoras de hormonas y las agranulares. De las células agranulares, las más abundantes son las **células folículo estelares (CFE)**, un grupo heterogéneo identificado comunmente por expresar a la proteína S100 β y a los filamentos intermedios (FI) vimentina y GFAP, así como a la proteína de unión E-Cadherina. Las CFE forman folículos con células que expresan características epiteliales, y grandes extensiones citoplasmáticas en células que se encuentran fuera de los folículos. Por otro lado, cumplen con una gran variedad de funciones como la de modular la secreción hormonal y la permeabilidad y proliferación de las células endoteliales, a través de secretar factores parácrinos como la IL-6, el FGF2, TGF β y VEGF; son células fagocíticas de limpieza (*scavengers*), modulan la matriz extracelular, y las que forman el folículo, transportan iones de manera vectorial. Sin embargo, no todas las CFE cumplen con estas funciones y la expresión sus proteínas marcadoras es diferenciada, lo que ha sugerido la existencia de varias subpoblaciones de CFE. La propuesta de esta tesis fue identificar a estas subpoblaciones y medir en qué proporción se encuentran. Los resultados muestran que existen al menos seis subpoblaciones de CFE con base en la expresión de sus proteínas marcadoras: dos epiteliales que corresponde al 33% del total de CFE; tres estelares o gliales que corresponden al 35% y una no glial ni epitelial que corresponde al 27%. Las CFE epiteliales expresan *cldn4* en contraste con el endotelio vascular que expresa *cldn2* y la vimentina se expresa solo en las alas de la hipófisis anterior tanto en CFE estelares como epiteliales. Los resultados nos permiten realizar las siguientes afirmaciones: para medir a la población total de CFE es necesario marcarlas con S100 β y GFAP, el nombre de CFE gliales es más apropiado para las CFE estelares, las diferentes subpoblaciones de CFE se distribuyen de manera regionalizada y el transporte de iones en el folículo es transcelular.

2. Abstract

The pituitary is an endocrine gland anatomically divided into anterior, intermediate and posterior pituitary. The anterior pituitary gland is made up of two large cell groups: the granular cells or hormone-secreting cells, and the agranular cells. The most abundant agranular cells are the folliculo stellate cells (FSC), a heterogeneous cell group commonly identified by expressing the S100 β protein and the intermediate filaments (IF) vimentin and GFAP, as well as the binding protein E-Cadherin. FSCs form either follicles with cells that express epithelial characteristics or present large cytoplasmic extensions with stellar shape localized outside the follicles. On the other hand, they fulfill a great variety of functions such as modulating the hormonal secretion of the secretory cells, and the permeability and proliferation of endothelial cells, through secreting paracrine factors such as IL-6, FGF2, TGF β and VEGF. They also are scavenger cells and, also, modulate the extracellular matrix. In addition, the follicle cells transport ions in a vectorial way. However, not all FSCs comply with these functions, and the expression of their marker proteins is variable, suggesting the existence of several subpopulations of FSCs. The purpose of this thesis was identified and measure these subpopulations. The results show that there are at least six subpopulations of FSC based on the expression of their marker proteins: two epithelial subpopulations that corresponds to 33% of the total; three stellar or glial subpopulations corresponding to 35% and one non-glial or non-epithelial subpopulation corresponding to 27%. Epithelial FSCs express cldn4 in contrast to the vascular endothelium expressing cldn2, and vimentin is expressed only in the anterior pituitary wings, in both stellar and epithelial FSCs. These results allow us to make the following statements: to measure the total population of FSC it is necessary to stain them with S100 β and GFAP antibodies; it is more appropriate to name glial FSCs to the stellate cells; the different subpopulations of FSCs are distributed in a regionalized manner; and the transportation of ions in the follicle is via transcellular transport.

3. Introducción

3.1. La hipófisis

La hipófisis es una glándula endócrina que sintetiza y secreta hormonas para controlar la reproducción, maduración sexual, crecimiento, metabolismo y la respuesta al estrés. La hipófisis se aloja en un espacio óseo del hueso esfenoides llamado “silla turca”, rodeada por el *diafragma sellae*, una doble membrana solo atravesada por el tallo hipofisiario. Desde el punto de vista anatómico, la hipófisis se divide en tres regiones (figura 1):

1. **Hipófisis posterior**, *pars neuralis* o *neurohipófisis*, formada de las terminaciones nerviosas de las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. A través de estas terminaciones se secretan la oxitocina y la hormona antidiurética (ADH) necesarias para la contracción uterina y la reabsorción renal de H₂O, respectivamente. En la neurohipófisis las terminaciones nerviosas residen en una estructura de células gliales llamadas pituicitos, semejantes a los astrocitos del sistema nervioso central (Schaeffer *et al.* 2010).

2. **Hipófisis intermedia** o *pars intermedia*. Está compuesta por una población homogénea de células endócrinas, los “*melanotropos*”, productores de péptidos bioactivos, principalmente la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) o melanotropina, inductora de la síntesis de melanina en la piel. Los *melanotropos* sintetizan al precursor hormonal llamado *propiomelanocortina* el cual es procesado por proteólisis, generando a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), endorfinas y la propia MSH. Los *melanotropos* coexisten en la hipófisis intermedia con células de soporte que algunos autores identifican como **células foliculo-estelares (CFE)**. La hipófisis intermedia se origina, embriológicamente de una plácoda del ectodermo orofaríngeo que se invagina y forma la bolsa de Rathke (Borst *et al.* 1996; Lerner 1993; Lamacz *et al.* 1991).

3. **Hipófisis anterior** o *pars distalis*, es el lóbulo que está constituido por diferentes tipos de células: diversos tipos de células *secretoras* y *no secretoras* de hormonas, cuyo origen embriológico es el mismo que el de la hipófisis intermedia

(Devnath *et al.* 2008; Inoue *et al.* 1999; Schaeffer *et al.* 2010). A las hipófisis anterior e intermedia, se les denomina en conjunto **adenohipófisis**.

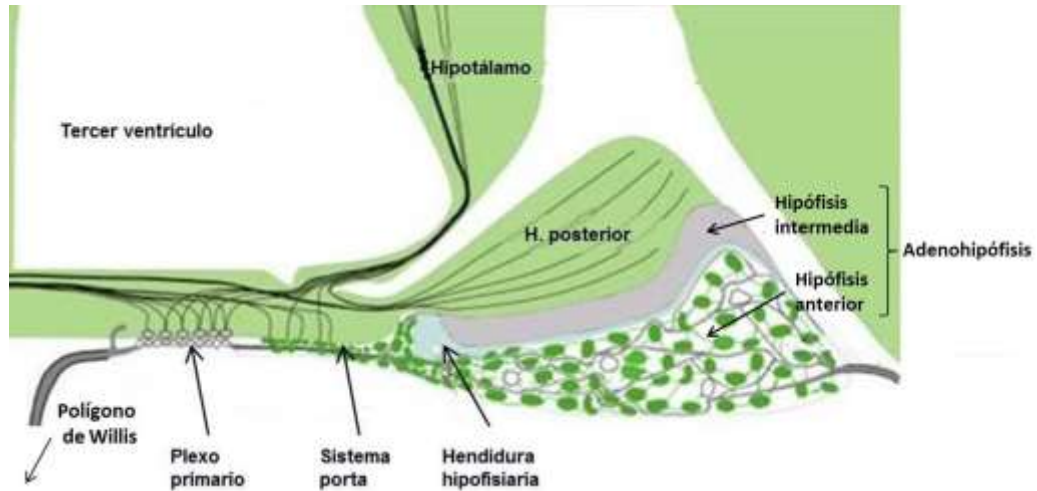


Figura 1. Esquema de la glándula hipófisis. Se representa un corte sagital con las tres regiones anatómicas de las hipófisis mencionadas en el texto: *hipófisis posterior*, *intermedia* y *anterior*. Entre la *hipófisis intermedia* y *anterior* (gris), se encuentra la hendidura hipofisiaria, un remanente de la bolsa de Rathke embrionaria. Además se puede observar la comunicación entre la hipófisis anterior y el hipotálamo, por medio de un sistema porta que proviene del polígono de Willis, y forma el plexo capilar primario y drena hacia los vasos porta hipofisiarios que se continúan con el plexo capilar secundario (Shirasawa *et al.* 2004).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica muestran que la *hipófisis anterior* está compuesta de células **granulares** y **agranulares**, que se distinguen por la presencia o ausencia de gránulos electrodensos, respectivamente. Las células **granulares** almacenan en los gránulos las hormonas que sintetizan y, dependiendo del tipo de hormona que expresen, pueden ser *lactotropas* que secretan prolactina (Prl), *somatotropas* productoras de hormona de crecimiento (GH), *corticotropas* si sintetizan hormona adrenocorticotropa (ACTH), *tirotropas* que secretan a la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y las *gonadotropas* productoras de hormona folículo

estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH, figura 2A, Devnath *et al.* 2008; Inoue *et al.* 1999; Schaeffer *et al.* 2010).

Por otro lado, las células **agranulares** incluyen tres tipos de células de *soporte*: las **células foliculo-estelares (CFE)**, que tienen una forma de estrella y pueden asociarse en folículos, los *pericitos* que son células planas, alargadas y envuelven a los vasos sanguíneos y las **células endoteliales** que los forman (Figura 2B, Devnath *et al.* 2008; Denef2008; Inoue *et al.* 1999; Satoh *et al.* 1989). Frecuentemente los macrófagos se extravasan y entran en el parénquima de la hipófisis anterior (Allaerts *et al.* 1997). El presente trabajo se centra en estudiar las poblaciones celulares que constituyen a las CFE de la adenohipófisis.

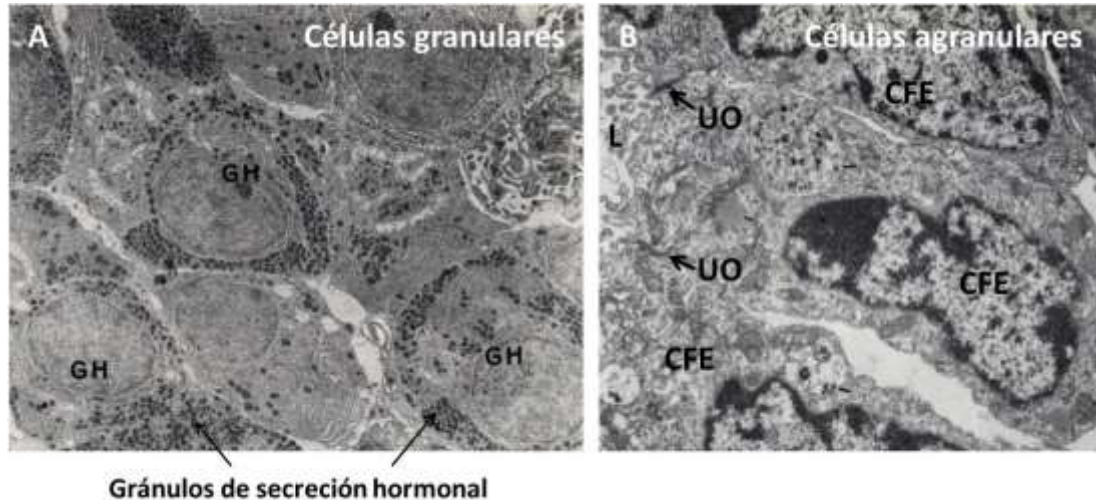


Figura 2. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de la hipófisis anterior donde se observan células granulares y agranulares. En (A) se muestran células con múltiples cuerpos electrodensos, correspondientes a gránulos de secreción hormonal; en este caso células gonadotropas (GH). En (B) se observan tres células agranulares foliculo estelares (CFE). (UO = uniones ocluseras; L = lumen. Imagen A: Tixier-Vidal *et al.* 1975; Imagen B: Vila-Porcile 1972).

3.2. Las células foliculo estelares (CFE)

Las CFE son el grupo más numeroso de células agranulares, con un 5% a 10% del total de células de la hipófisis (Devnath et al. 2008). Fueron observadas inicialmente por Rinehart y Farquhar (1953) en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. Rinehart y Farquhar (1953) y Farquhar (1957) caracterizaron a estas células como células cromóforas porque no unen colorantes (Fucina, hematoxilina, etc.), agranulares por que no muestran gránulos de secreción en su citoplasma, lo que les llevó a inferir que eran células precursoras de las secretoras de hormonas y “*estelares*” en referencia a su forma similar a una estrella, producto de la emisión de largas prolongaciones citoplasmáticas radiadas. Rinehart y Farquhar (1953) y Farquhar (1957) también observaron que un grupo de CFE rodea cavidades pequeñas, lo que llevó a Yoshida (1966) a sugerir el nombre de células “*foliculares*”.

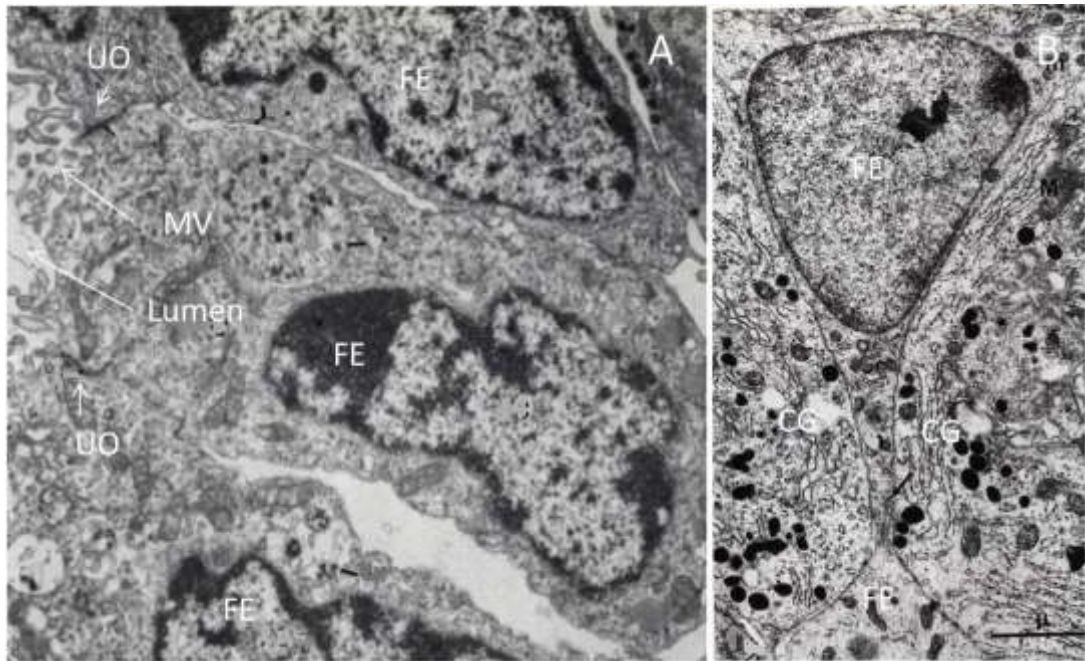


Figura 3. Tipos de células FE por su aspecto en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. En este par de imágenes se pueden observar dos diferentes fenotipos expresados por las CFE: en la imagen A se trata un grupo de tres CFE con características *epiteliales* o *foliculares*, unidas entre sí por uniones ocluseras (UO) y expresando microvellosidades (MV) al interior de un lumen. Por otro lado, en la imagen B, se ve a una CFE *estelar* que extiende una prolongación citoplasmática entre dos células granulares (CG) y se une con otra prolongación citoplasmática de otra CFE estelar (en el recuadro, señalada con una flecha, se observa la unión célula-célula. Vila-Porcile 1972).

Vila-Porcile (1972), estudió estas células durante el desarrollo postnatal de la rata mediante microscopía electrónica de transmisión. Sus observaciones le llevaron a sugerir que las células foliculares y las estelares, son dos formas de un mismo tipo celular, por lo que acuñó el término de "*células folículo-estelares*" (CFE). También demostró que las células que forman los folículos o "*foliculares*", son células con características epiteliales, que expresan microvellosidades y uniones ocluseras, mientras que las células "*estelares*" extienden prolongaciones citoplasmáticas largas que se unen con las de otras células idénticas. Vila-Porcile (1972) propuso el modelo de organización celular de la hipófisis anterior que se muestra en la figura 4.

En el modelo de Vila-Porcile (1972), los procesos celulares citoplásmicos de las CFE rodean y separan grupos de células secretoras. Las CFE, tanto "*estelares*" como "*foliculares*", tienen abundantes polirribosomas citosólicos y un retículo endoplásmico rugoso poco desarrollado, en comparación con las células granulares. El núcleo de ambas clases de CFE tiene forma irregular y, en algunas células, un nucléolo conspicuo (Blanco *et al.* 1978). Las CFE "*foliculares*" tienen polaridad ápico-basal, rodean pequeños lúmenes hacia los que proyectan microvellosidades y cilios mayores y se unen entre sí por medio de uniones ocluseras (UO; Vila-Porcile 1972), adherentes (Vila Porcile 1972), desmosomas (Tixier-Vidal *et al.* 1975) y uniones comunicantes (Soji *et al.* 1997, Tixier-Vidal *et al.* 1975). Por otro lado, las CFE foliculares forman uniones comunicantes y desmosomas entre sí, con las estelares y con las granulares (figura 4; Inoue *et al.* 1999; Soji *et al.* 1989; Vila-Porcile 1972). De manera que las CFE "*foliculares*" son, claramente, epiteliales.

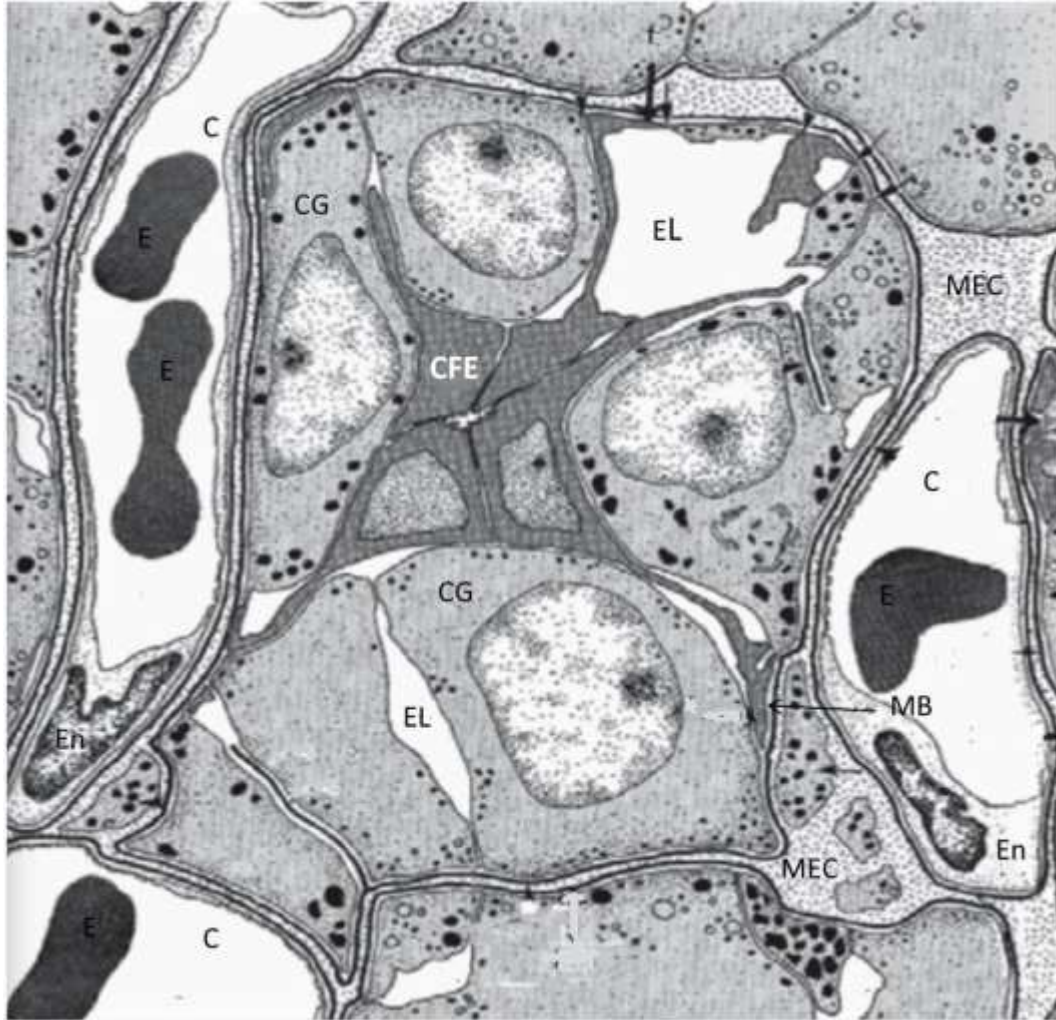


Figura 4. Arquitectura de la glándula hipofisiaria. Modelo desarrollado por Vila-Porcile (1972) en el cual propone que las células de la hipófisis anterior se organizan en lóbulos formados por células granulares (CG) y foliculo estelares (FE), rodeados por una membrana basal (MB) y matriz extracelular (MEC). Se observan capilares de tipos fenestrados (C) con células endoteliales (En) y eritrocitos (E), rodeados de su propia membrana basal (MB). Al centro del lóbulo se observan CFE formando un foliculo (en oscuro) y extendiendo prolongaciones citoplasmáticas entre las células granulares (CG) y hasta la vecindad de los capilares. Entre las células granulares se observan espacios llamados *lacunares* (EL) que se propone son espacios donde se vierte el contenido hormonal de estas células.

3.3 Uniones ocluseras

Las UO's se expresan tanto en células epiteliales como endoteliales, en la región más apical de la membrana lateral. Se observan en microscopía electrónica como una serie de puntos de fusión entre las caras externas de las membranas de células adyacentes (Farquhar y Palade 1963). En esos puntos de fusión, el espacio extracelular está completamente obliterado. En micrografías obtenidas por criofractura, las uniones ocluseras se observan como una serie de filamentos continuos y entrelazados en la *cara exoplásmica* (E) de la membrana plasmática con ranuras complementarias en la *cara protoplásmica* (P; figura 5. Staehelin 1973). Estos filamentos y surcos están formados por polímeros de proteínas transmembranales que se unen a través de sus dominios extracelulares, con polímeros de la membrana plasmática opuesta. Se sabe que estos polímeros están formados por las proteínas transmembranales de la familia Marvel como ocludina (Furuse *et al.* 1993), y las denominadas claudinas (cldn. Figura 5. Furuse *et al.* 1998;). Además en las UO's se localizan las proteínas periféricas de membrana ZO1, ZO2, ZO3 (Stevenson *et al.* 1988), entre otras. Las UOs, además de unir a las células, regulan el paso de agua, iones y moléculas a través de la vía paracelular (Claude y Goodenough 1973) y forman una barrera que impide la difusión, en el plano de la membrana plasmática, de los lípidos y proteínas del dominio apical al lateral y viceversa (figura 6. van Meer y Simons 1986).

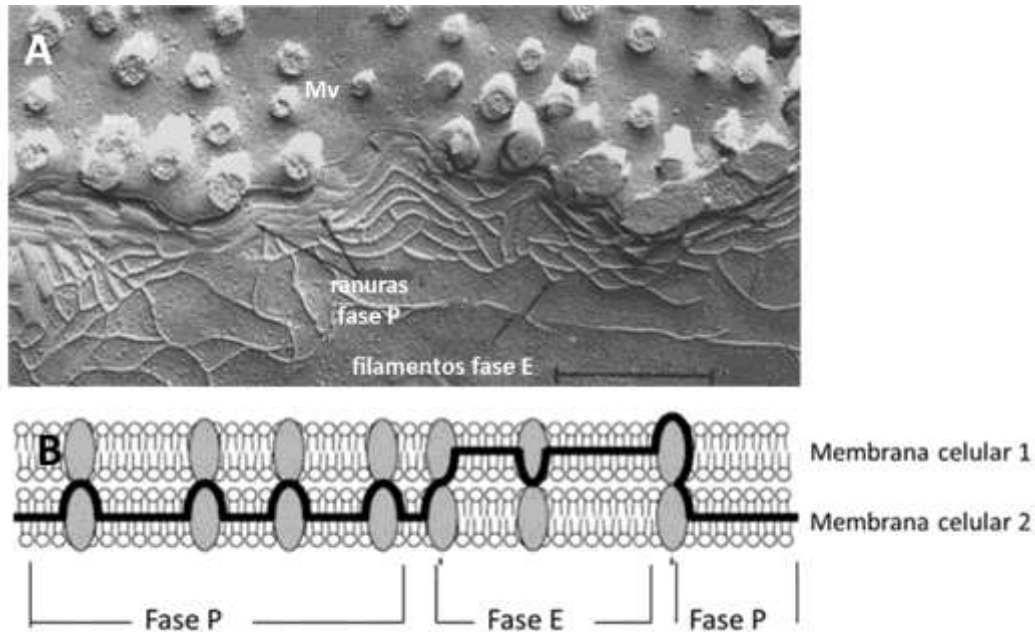


Figura 5. Estructura de las UO vista por microscopía de criofractura. Imagen obtenida de un epitelio de alta resistencia de intestino de ratón en la que se presentan al menos 6 filamentos en la cara P y sus correspondientes surcos en la cara E. En el dibujo de la parte inferior (B) se ilustran proteínas intermembranales (óvalos grises) de dos membranas adyacentes. La zona de la criofractura se localiza justo debajo de la línea negra mostrándonos la formación de filamentos en la cara P y surcos en la cara E (Barra = 0.4 μm . Mv = microvellosidades Claude y Goodenough 1973; Gonzalez-Mariscal *et al.* 2003; Suzuki *et al.* 2014).

Las claudinas son una familia de 27 proteínas que fueron identificadas por primera vez en humanos por Furuse *et al.* (1998) y son las principales determinantes de la permeabilidad paracelular (figura 6). Son proteínas entre 21-28 kDa que consisten de cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares, dominios amino- y carboxilo-terminal citoplasmáticos y una pequeña asa intracelular (figura 7. Suzuki *et al.* 2014). Estas proteínas determinan la permeabilidad paracelular en diferentes tejidos, que puede evaluarse mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) (Cerejido *et al.* 1978). Con base en la magnitud de la RET, se clasifican en claudinas de poro o de barrera (Hou et al. 2013). Por ejemplo, la sobreexpresión de la *cldn4* en las células epiteliales MDCKII de baja resistencia, triplica la RET, por lo que la *cldn4* es una claudina de barrera (Van Itallie *et al.* 2001), mientras que la sobreexpresión de la *cldn2* en las células epiteliales MDCKI

de alta resistencia, disminuye la RET por lo que esta proteína se clasifica como una claudina de poro (Furuse *et al.* 2001). En la nefrona, las claudinas de poro como la cldn2, se expresan en segmentos altamente permeables como el túbulo proximal, mientras que en los segmentos poco permeables como los túbulos colectores se expresan claudinas de barrera como cldn4 y cldn8 (González-Mariscal *et al.* 2000; Kiushi-Saichin *et al.* 2002; Reyes *et al.* 2002).

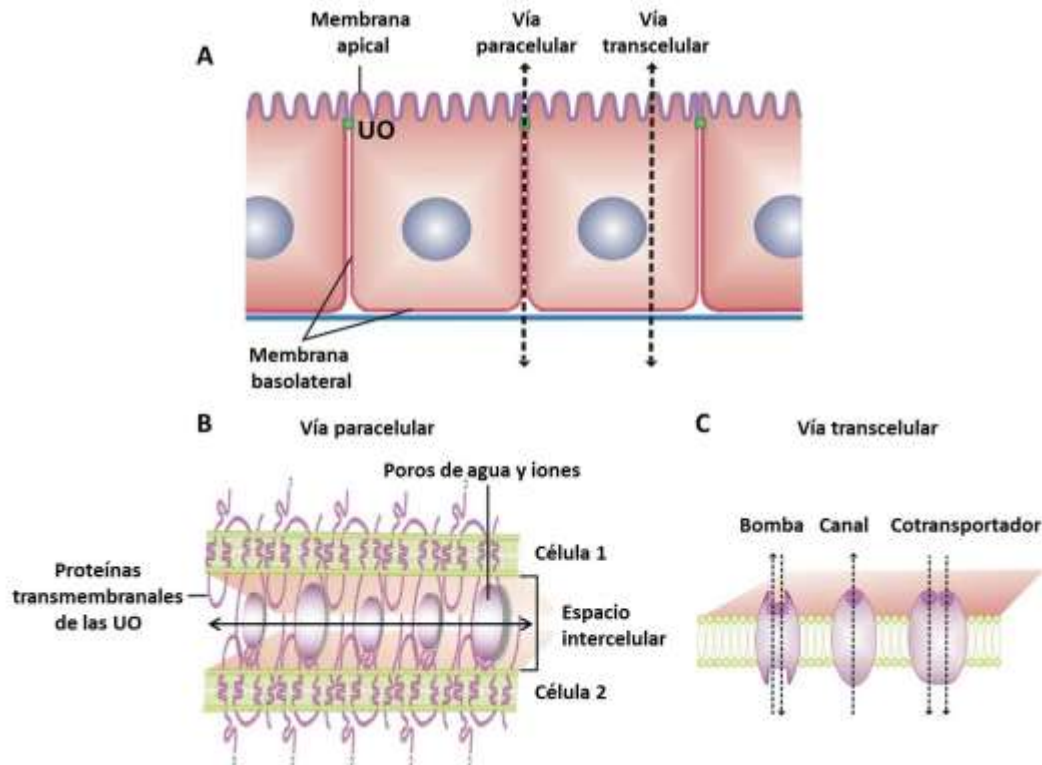


Figura 6. Funciones de las UO. Dibujo de un epitelio que señala que además de la unión intercelular, las UO modulan el transporte de iones y agua por la vía paracelular (A) de una manera pasiva dependiente del gradiente electroquímico, a través de proteínas transmembranales que forman poros selectivos a tamaño y carga (B). En la vía transcelular de transporte, intervienen proteínas como las bombas que ocupan ATP, los canales y los transportadores (González-Mariscal *et al.* 2007)

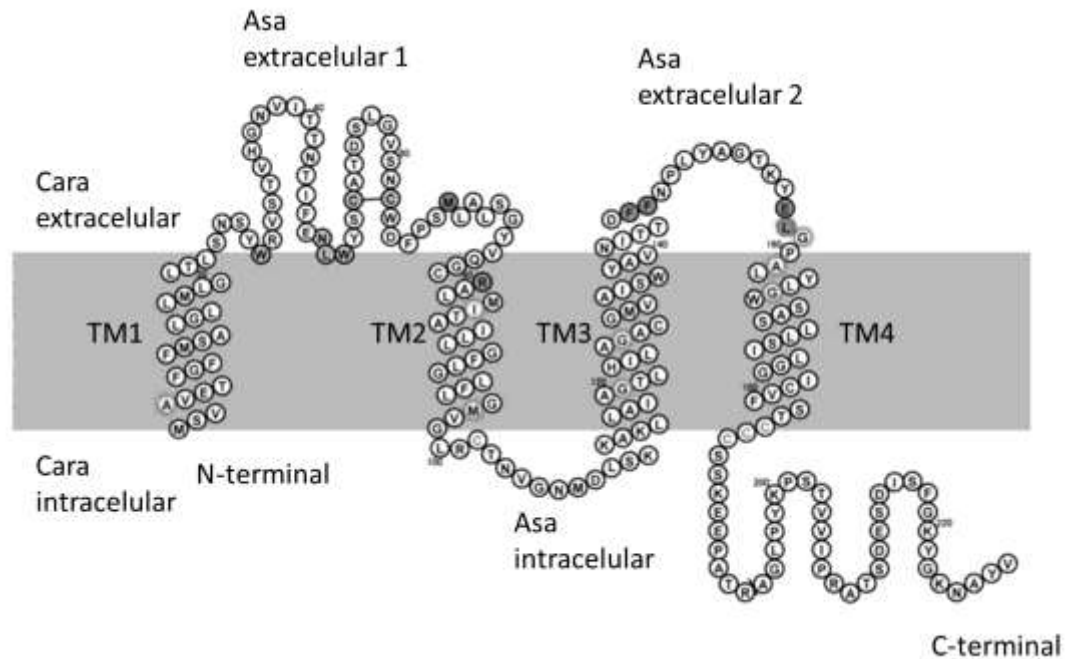


Figura 7. Diagrama topológico de la cln15 basado en la estructura obtenida por cristalografía. En el diagrama se muestra la estructura de una claudina clásica como las que se describen en el texto, (Suzuki *et al.* 2014).

Como se muestra en las imágenes de criofractura de la figura 8, las CFE epiteliales de cultivos primarios de hipófisis anterior de rata, desarrollan entre 7 y 11 filamentos (Wifingler *et al.* 1984) y, en los cultivos de CFE epiteliales de bovino, que forman una monocapa, las células desarrollan una RET de $451 \Omega \cdot \text{cm}^2$ y forman domos (Ferrara *et al.* 1987). Estos resultados demuestran que las UOs de las CFE epiteliales son de alta resistencia y baja permeabilidad y que estas células forman un epitelio de transporte, y sugieren que deben expresar claudinas de barrera, como la cln4.

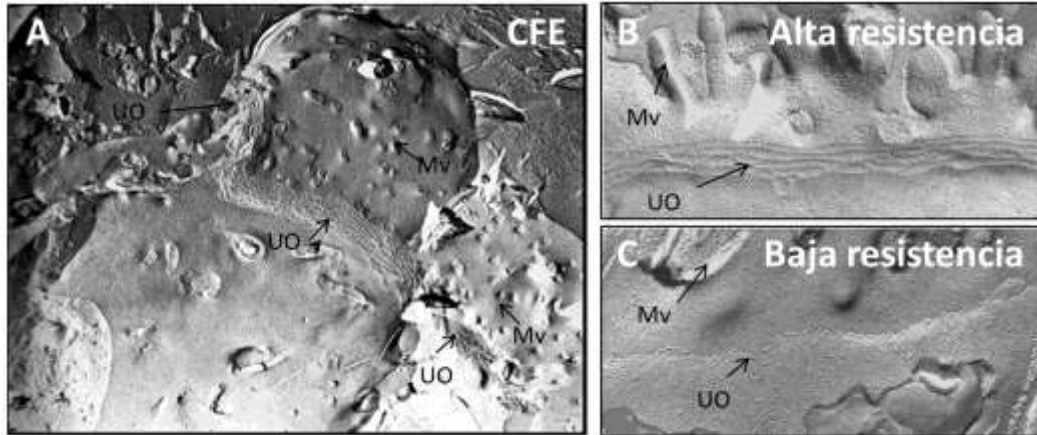


Figura 8. Las UO de las CFE epiteliales son de alta resistencia y baja permeabilidad. En la imagen obtenida por criofratura de un cultivo primario de hipófisis anterior (A) se encuentran tres CFE epiteliales unidas por UO's (flechas negras). En la célula central podemos contar entre 7 y 11 filamentos en la cara E lo que indica que son UO's de baja permeabilidad y alta resistencia que se corrobora al comparar esta imagen con B y C obtenidas de segmentos de alta (B) y baja resistencia (C) de nefrona de ratón. (UO = uniones ocluseras, Mv = microvellosidades. Barra en B y C = 100 nm. Claude *et al.* 1997; Wilfinger *et al.* 1984).

Las UOs son la frontera entre la membrana apical y la lateral de las células epiteliales. La división de la membrana plasmática en estos dominios distintos es parte de la *polaridad* que caracteriza a estas células y es esencial para que estas células transporten sustancias vectorialmente (Cerejido *et al.* 2004). La membrana plasmática apical de las células epiteliales se distingue por expresar microvello y un cilio mayor. Ambas estructuras expresan proteínas específicas, como la dipeptidil peptidasa IV (Girardi *et al.* 2001) y la tubulina acetilada (Ishikawa *et al.* 2011, Larre *et al.* 2011), respectivamente. La figura 9 muestra una imagen de microscopía electrónica de tejido de hipófisis de rata, con CFE epiteliales que expresan microvellosidades (mv) y un cilio mayor (cilio) con su aspecto típico de rueda de carreta (Vila-Porcile 1972).

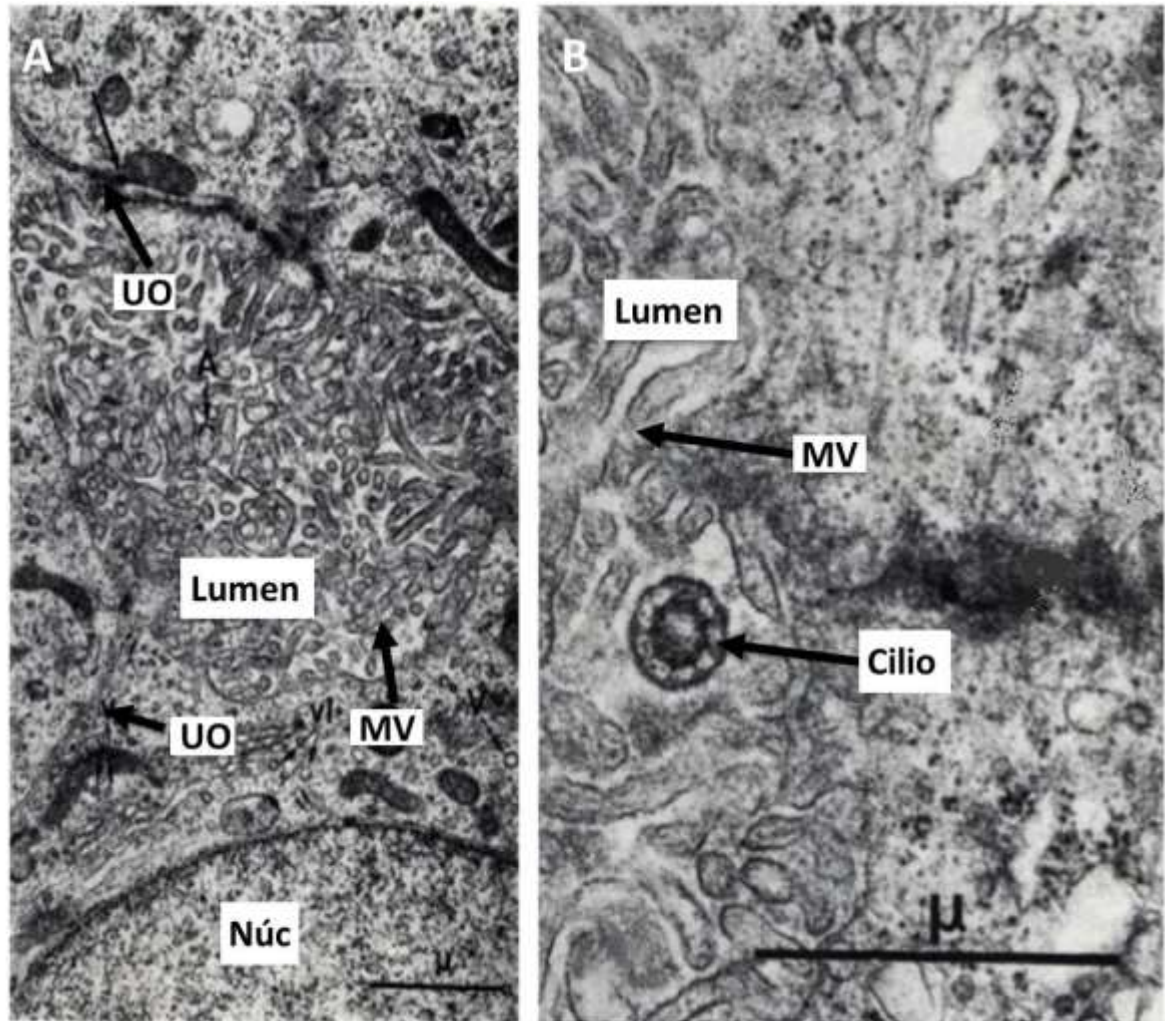


Figura 9. Las CFE epiteliales son células polarizadas que expresan microvellosidades y cilio mayor hacia el interior de los lúmenes foliculares. En estas micrografías de microscopía electrónica de transmisión obtenidas de la hipófisis anterior de rata, se observa en la imagen A a CFE's epiteliales con microvellosidades en la cara apical de la membrana y en la imagen B además, un cilio mayor cortado transversalmente con su característica forma similar a una rueda de carreta (MV = microvellosidades, Núc = núcleo, UO = unión oclusora. Vila -Porcile 1972).

3.4 Funciones de las CFE

Las CFE foliculares también expresan al canal de Na^+ epitelial (ENaC) y canales de Cl^- (CFTR) pues las obtenidas de cultivos primarios de bovino, expresan corrientes de corto circuito sensibles a amilorida, ouabaína y DPAC (un inhibidor de canales de

cloro) (figura 9. Ferrara *et al.* 1987,1988; Rogan *et al.* 2010). En otros trabajos se demostró que las CFE expresan al intercambiador de Na^+/H^+ NHE2 y que los ratones modificados genéticamente para que no lo expresen, desarrollan lúmenes (L) foliculares mayores (figura 10. Miller *et al.* 2011), resultado de un transporte transepitelial defectuoso. Por otro lado, los niños con fibrosis quística, además de la deficiencia en el transporte de Cl^- a través del canal CFTR, tienen una talla menor causada por una menor secreción de la hormona de crecimiento (Rogan *et al.* 2010). Todo lo anterior indica que el transporte transcelular de iones y agua en las CFE, de alguna forma modula la secreción de las células granulares.

Desde la primera ocasión en que se observó a las CFE, se detectaron lisosomas abundantes en su citoplasma y se especuló que debían de tener una intensa *actividad fagocítica de limpieza (scavengers)*. Esta actividad ha sido demostrada en la hipófisis anterior de ratas con la observación, por microscopía electrónica, de cuerpos apoptóticos dentro de las CFE (figura 11. Drewett *et al.*, 1993). Lo que no sabemos es qué población de CFE ejerce esta función.

Como se observa en la figura 4, las CFE podrían formar una red tridimensional que soporte a las células secretoras y, dado que secretan factores de crecimiento como el de fibroblastos (FGF. Ferrara *et al.* 1987) y el vascular endotelial (VEGF. Gospodarowicz y Lau 1989) y citocinas como la interleucina 6 (IL6. Lohrer *et al.* 2000; Spangelo *et al.* 1991; Vankelecom *et al.* 1989), también podrían ser proveedoras de dichos factores tanto para las células granulares como para las células endoteliales, modulando la secreción hormonal de las primeras y la proliferación y permeabilidad de las segundas (figura 12. Arzt *et al.* 1999; Deneff 2008; Hentges *et al.* 2000; Sosa *et al.* 2013).

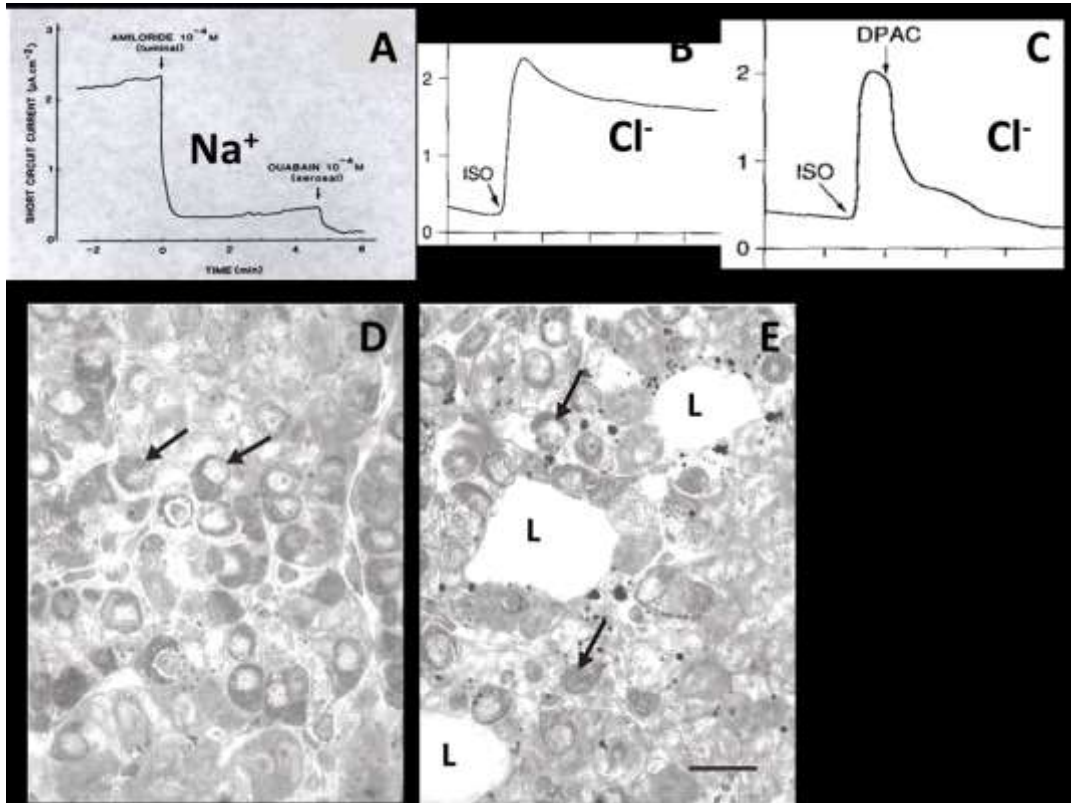


Figura 10. Las CFE epiteliales ingresan Na^+ al interior de la célula y expulsan Cl^- e H^+ al lumen folicular. La presencia de una corriente de Na^+ de corto circuito sensible a amilorida en la cara apical de las CFE epiteliales, indica la expresión del ENaC, dicha corriente se abate al 100% cuando se inhibe a la bomba de Na^+/K^+ ATPasa con uabaina (A). Una corriente de Cl^- de corto circuito aumenta al retar a las CFE con isoproterenol en su cara basolateral y se abate al adicionar al medio apical ácido carbóxico difenilamina (DPAC) un antagonista de los canales de Cl^- entre los que se encuentra el CFTR (B y C). Como se indica en el texto, las CFE epiteliales expresan en su dominio apical al intercambiador de Na^+/H^+ NHE2, de tal manera que los ratones modificados genéticamente para que no lo expresen, desarrollan lúmenes foliculares mayores como se observa en la imagen D (ratón silvestre) en comparación con la imagen E (ratón transgénico; Ferrara *et al.* 87 y 88; Miller *et al.* 2011; Rogan *et al.* 2010).

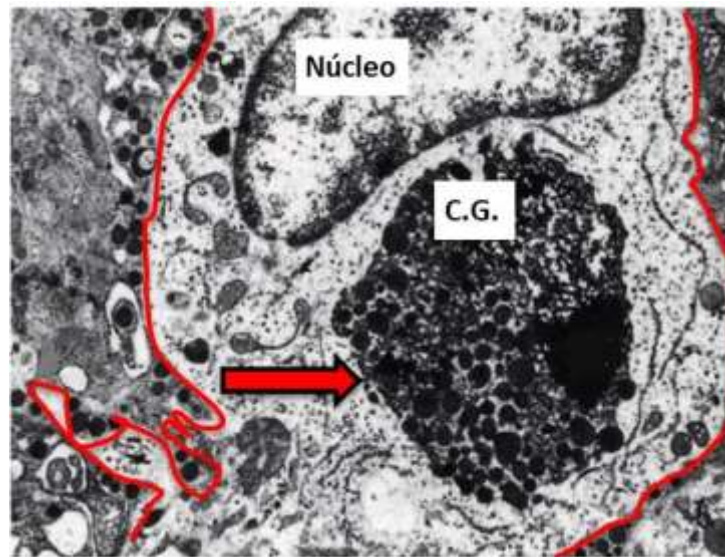


Figura 11. Las CFE son células “scavenger”. En la micrografía obtenida por microscopía electrónica, se delinea con rojo a una CFE, dentro de la cual se observa a una célula granular (CG) en apoptosis (flecha roja) lo cual indica que las CFE son células con fagocitosis de limpieza o células “scavenger” (Drewett et al. 1993).

Las CFE se contactan entre sí con uniones intercelulares (ver abajo) y soportan agrupaciones de células endócrinas en forma de cordones. Las CFE modulan a las secretoras de diversas maneras. Se sabe que las CFE hacen contactos con los vasos sanguíneos (Cardell 1969; Inoue *et al.* 1999) y que regulan la proliferación y permeabilidad de las células endoteliales a través de la secreción del VEGF y FGF (Gospodarowicz y Lau 1989). Se ha sugerido que las CEF también pueden recibir mensajes químicos de los vasos sanguíneos y transferir esta información a las células secretoras para modular la secreción hormonal (Denef, 2008). Las CFE forman una red de comunicación a través de sus uniones comunicantes, lo que permite que se transmitan ondas de calcio a lo largo del tejido para sincronizar su actividad y, a través de la secreción de factores y la regulación de las concentraciones iónicas, participar en la *sincronización de la secreción hormonal de las células secretoras* (Fauquier *et al.*, 2001; Denef, 2008; Shirasawa *et al.*, 2004). Estas uniones comunicantes se forman de conexina 43 (Devnath e Inoue, 2008; Shirasawa *et al.*, 2004). Hoy en

día se acepta ampliamente que las células FE juegan un papel importante en la comunicación interna de la glándula (figura 13).

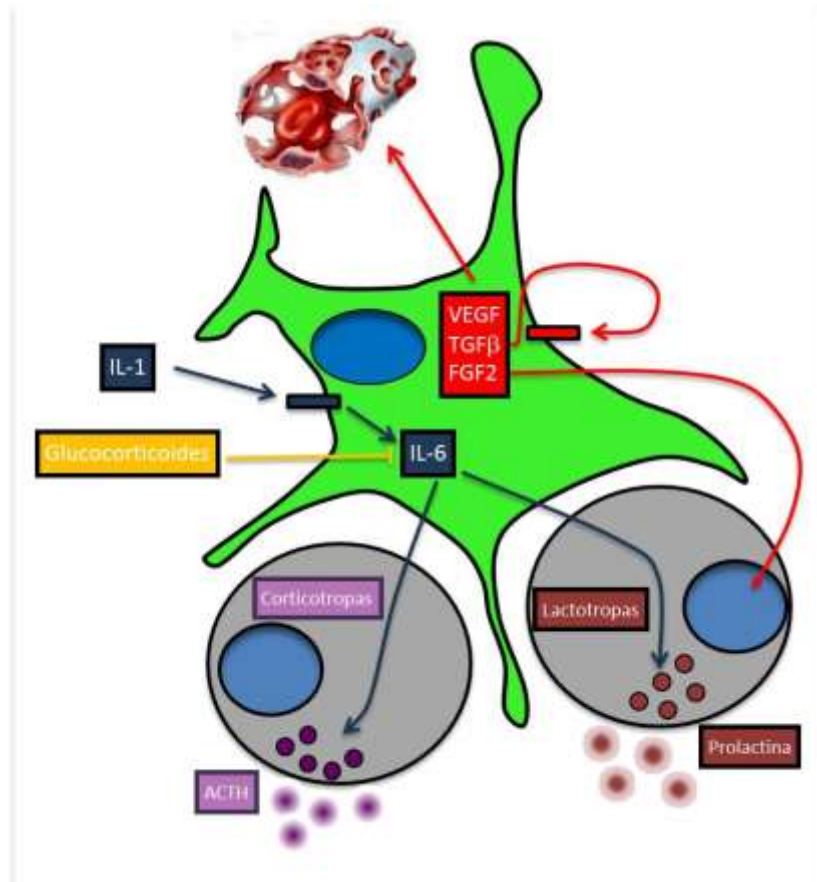


Figura 12. Las CFE modulan la liberación hormonal. En el dibujo se representa a una CFE (verde) que ante el estímulo de la citosina interleucina 1 (IL-1, azul) libera interleucina 6 (IL-6, azul), lo cual promueve la secreción de prolactina (café) y ACTH (morado). La ACTH a su vez, estimula en las glándulas suprarrenales la síntesis de glucocorticoides (amarillo) que en las CFE ejercen un mecanismo de retroalimentación negativa al inhibir la liberación de IL-6. Todo lo anterior en respuesta al estrés. Las CFE también liberan factores de crecimiento como el VEGF, TGFβ y FGF2 (rojo), expresando receptores para TGFβ en un mecanismo de control autócrino. El VEGF y FGF2 modulan la proliferación y permeabilidad de las células endoteliales (región superior izquierda en rojo y gris, formando un vaso capilar fenestrado. Arzt *et al.* 1999; Deneff 2008; Ferrara *et al.* 1987; Gospodarowicz y Lau 1989; Hentges *et al.* 2000; Lohrer *et al.* 2000; Sosa *et al.* 2013; Spangelo *et al.* 1991; Vankelecom *et al.* 1989).

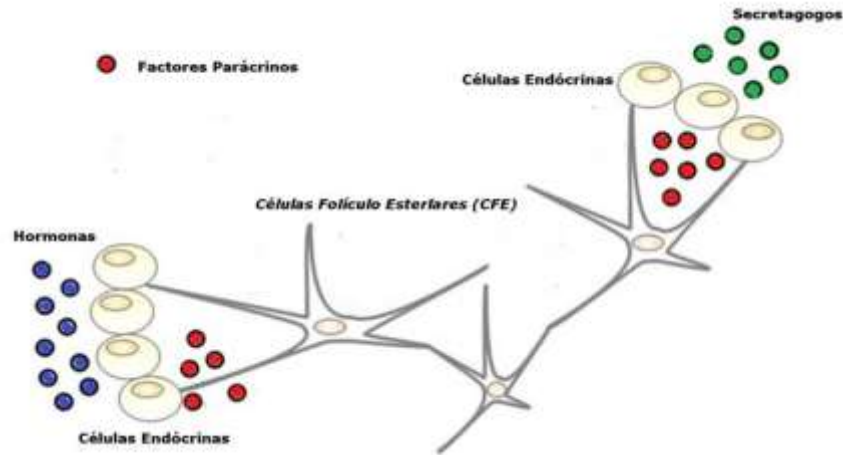


Figura 13. Las CFE forman una red de comunicación a lo largo de la hipófisis anterior. En el dibujo, los autores representan una red de CFE que recibe estímulos químicos (rojo) de un cordón de células granulares, transmitiendo esos estímulos a través de la red de CFE que al final modula la secreción hormonal (azul) de otro cordón de células granulares. Esta propuesta se basa en el hecho de que las CFE forman una red acoplada por uniones comunicantes que permite transmitir segundos mensajeros los cuales promueven la liberación de Ca^{2+} en la célula contigua. El modelo podría explicar la liberación coordinada de hormonas como la GH que se presenta en la hipófisis anterior (Hodson et al.2011).

Además, las CFE producen fibronectina (figura 14. Liu *et al*, 1989) e inhibidores de metaloproteasas (Denef, 2008; Devnath e Inoue, 2008; Inoue *et al*, 1999), lo que sugiere que son moduladoras de la matriz extracelular.

En resumen las CFE modulan la secreción hormonal, la permeabilidad y proliferación del endotelio vascular y la matriz extracelular. Las CFE epiteliales compartimentalizan el tejido, transportan iones y agua por la vía transcelular y regulan la secreción hormonal al manejar el contenido iónico del espacio extracelular de las células granulares.

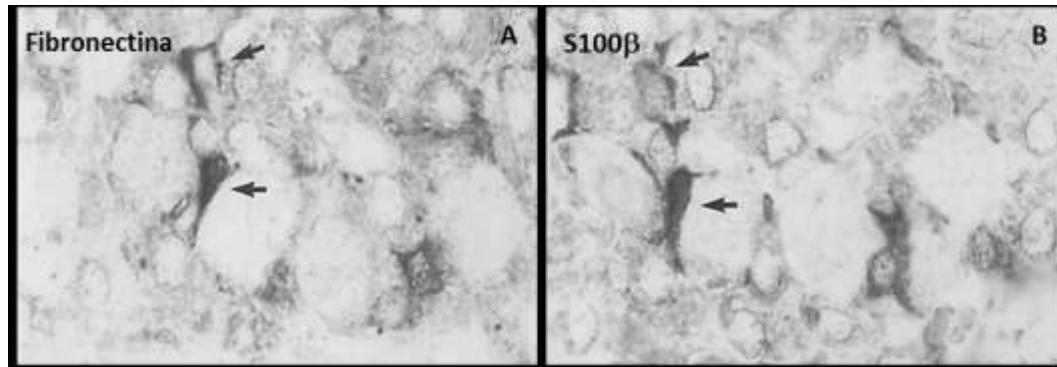


Figura 14. Las CFE modulan la matriz extracelular. En las micrografías de cortes histológicos seriados de la hipófisis anterior, se observa la expresión de fibronectina, una proteína de matriz extracelular, marcada con peroxidasa de rábano (marcas negras en A) en CFE identificadas por la proteína S100 β (en negro en B), proteína a la que se describirá más adelante. Las flechas señalan a las mismas células (Liu *et al.* 1989).

3.5 Identificación de las CFE

Las CFE expresan a la proteína S100 β distintiva de las células gliales diferenciadas. La S100 β se expresa principalmente en el citoplasma y ocasionalmente en el núcleo de las CFE, y a nivel tisular a todo lo largo del parénquima glandular, delineando pequeños lúmenes o en delgadas prolongaciones citoplasmáticas que corren entre las células secretoras o delinean la hendidura hipofisiaria (Figura 15; Ishikawa *et al.* 1983; Nakajima *et al.* 1980; Cocchia *et al.* 1980).

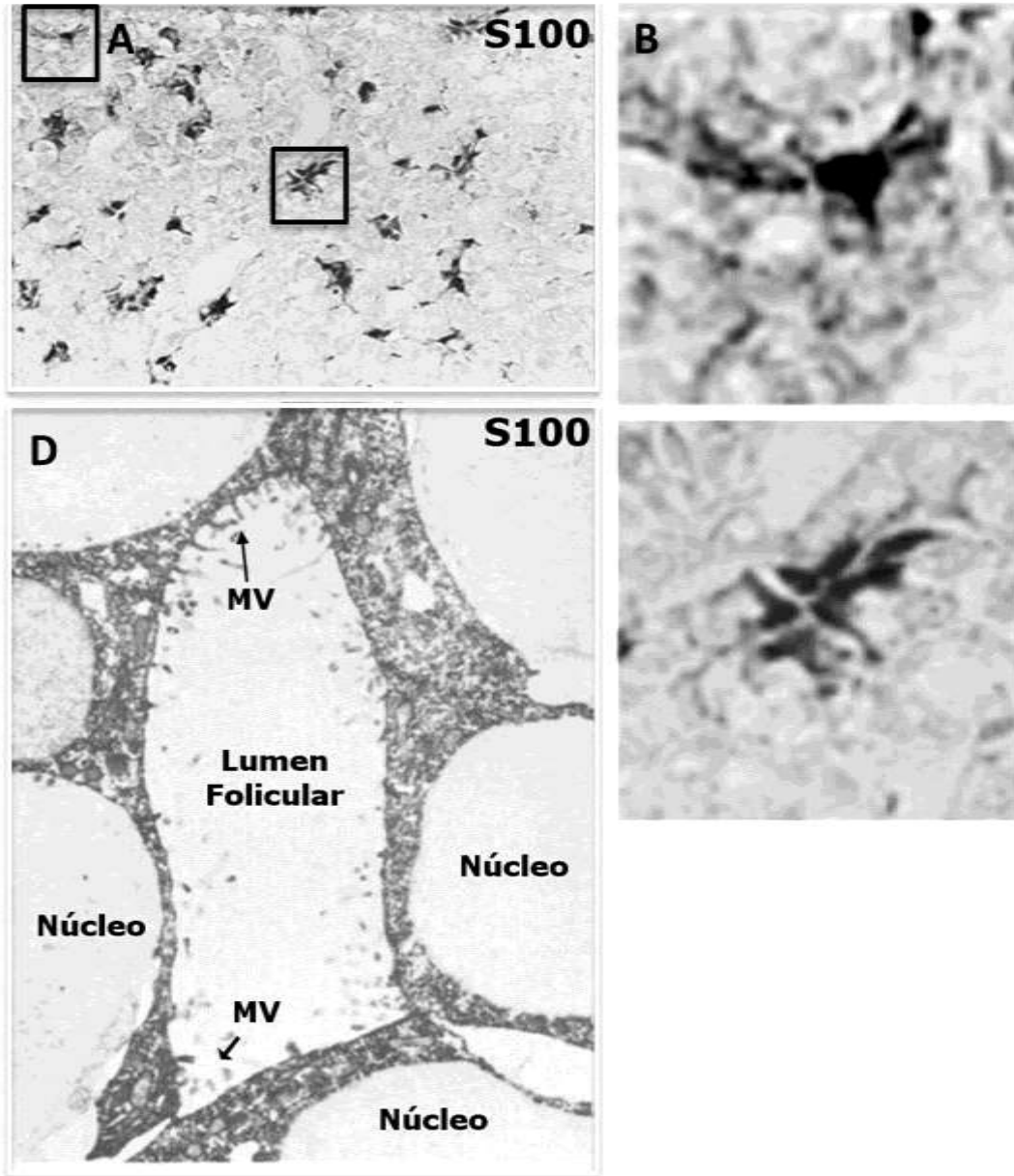


Figura 15. Las CFE se reconocen en la hipófisis anterior por expresar exclusivamente a la proteína S100 β . En los cortes histológicos de la figura, se observa la expresión de la proteína S100 β a lo largo del parénquima de la hipófisis anterior (imagen panorámica A) en las células estelares aparentemente aisladas y con grandes prolongaciones citoplasmáticas (inserto B) o en las células agrupadas alrededor de lúmenes (inserto C). En la ampliación de la imagen D se observan CFE alrededor de un lumen y expresando a la proteína S100 β (Cocchia *et al.* 1980; Nakajima *et al.* 1980. MV= microvellosidades).

S100 β es una proteína ácida de 11 KDa, exclusiva de los vertebrados, miembro de la familia S100 que incluye a 25 miembros con el dominio de unión a Ca²⁺ EF-mano, (EF-hand; figura 16), que a su vez pertenece a la superfamilia de proteínas entre las que destaca la calmodulina (Donato *et al.* 2009). La S100 β , usualmente en forma de homodímeros (figura 16 y 17; Donato 2001; Donato *et al.* 2009; Santamaría-Kisiel *et al.* 2006) se expresa en astrocitos, oligodendrocitos maduros, adipocitos, células epiteliales renales, progenitoras neurales y en las CFE (Arcuri *et al.* 2002; Donato *et al.* 2009; Nakajima *et al.* 1980). La unión de dos moléculas de Ca²⁺ al dominio EF-mano de la S100 β cambia la conformación de la proteína e induce su dimerización y activación. El cambio conformacional deja expuesto un sitio hidrofóbico que interactúa con una gran variedad de proteínas, entre las que se encuentran la tubulina, filamentos intermedios tipo III, como GFAP y vimentina, y proteínas que modulan la polimerización de la actina, entre otras. Esta interacción induce cambios en la actividad de las proteínas blanco modulando la transcripción (Donato 2001; Onions *et al.* 1997), proliferación (Donato 2001; Selinfreund *et al.* 1990) y diferenciación celular (Onions *et al.* 1997; Raponi *et al.* 2007). De manera más específica, la S100 β participa en la homeostasis del Ca²⁺ y las señales que dependen de ella (Donato 2001; Marsili *et al.* 1992), la dinámica de formación de los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios tipo III (Donato 2001; Sorci *et al.* 1998), así como la actividad de varias enzimas y el metabolismo (Donato 2001; Landar *et al.* 1996; Zimmer *et al.* 1986). La S100 β regula la fosforilación de proteínas, por ejemplo, en el caso de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) la S100 β enmascara los sitios de fosforilación de este filamento intermedio inhibiendo su polimerización y promoviendo su despolimerización (figura 17. Baudier *et al.* 1987; Donato 2001; Frizzo *et al.* 2004).

Además, se conoce que las CFE y los astrocitos liberan a la S100 β al medio extracelular (Ishikawa *et al.* 1983; Shashoua *et al.* 1984). Si bien se sabe poco sobre las implicaciones funcionales de esta “secreción”, existe evidencia substancial de que ejerce efectos tróficos o tóxicos dependiendo de su concentración. En concentraciones nanomolares, la S100 β extracelular promueve la sobrevivencia de las

neuronas (Bhattacharyya *et al.* 1992; Huttunen *et al.* 2000), favorece el crecimiento de las neuritas (Huttunen *et al.* 2000; Van Eldik *et al.* 1991) y estimula la proliferación de los astrocitos (Gonçalves *et al.* 2000); en concentraciones micromolares, induce la apoptosis tanto en neuronas (Hu *et al.* 1996; Huttunen *et al.* 2000) como en astrocitos (Hu *et al.* 1996) al estimular a los receptores de los productos finales de la glicocilación avanzada (RAGE por sus siglas en inglés).

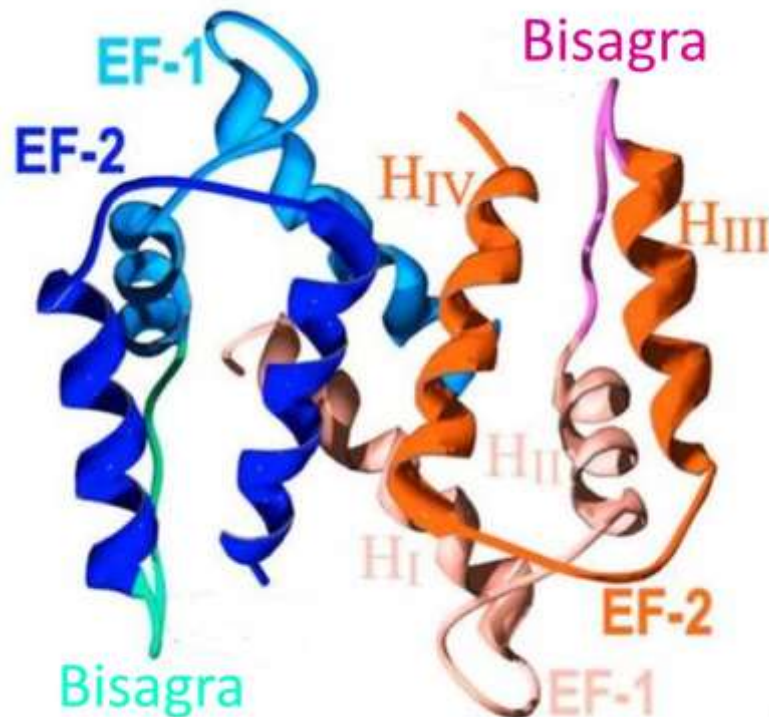


Figura 16. Diagrama que representa la estructura de un dímero de proteínas S100. Los monómeros de proteínas S100 se representan en azul y naranja. Cada monómero de S100 está formado por dos dominios de unión a calcio hélice-asa-hélice llamados mano-EF (EF-hand), unidos por una región bisagra. El dominio N-terminal está formado por las hélices HI y HII unidas por el asa L1. Este dominio es diferente al dominio canónico mano-EF por lo que se le ha llamado S100 específico o pseudo mano-EF (EF-1). Mientras que el dominio C-terminal (HIII y HIIV unidos por el asa L2) está formado por el motivo canónico mano-EF (Heizmann *et al.* 2002).

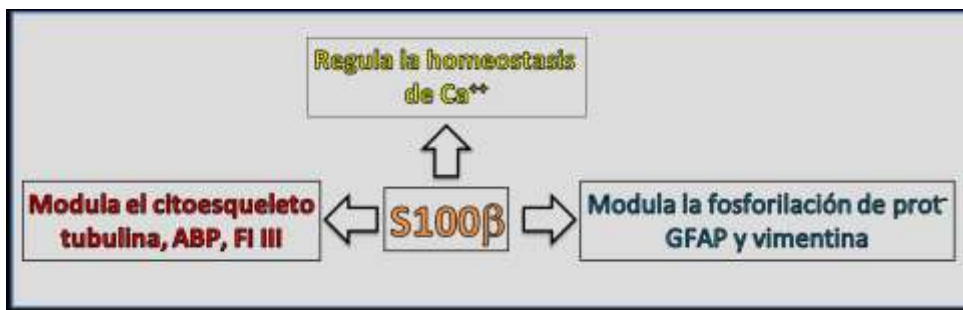
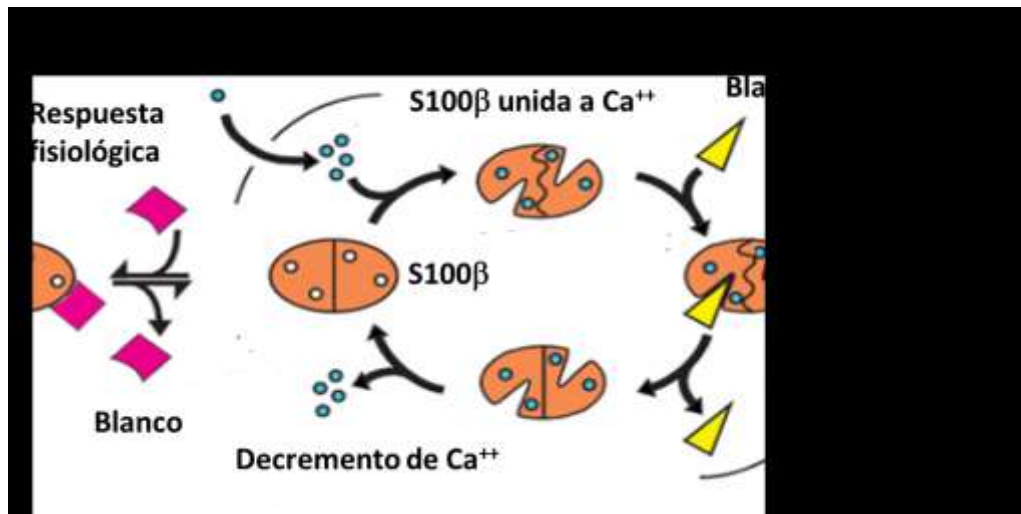
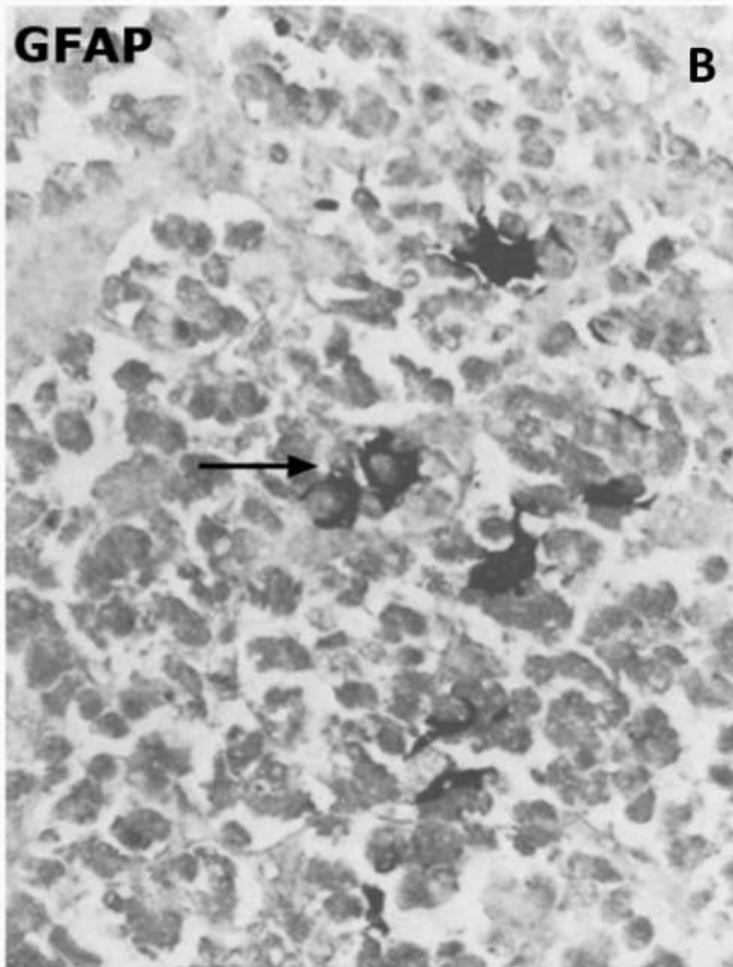
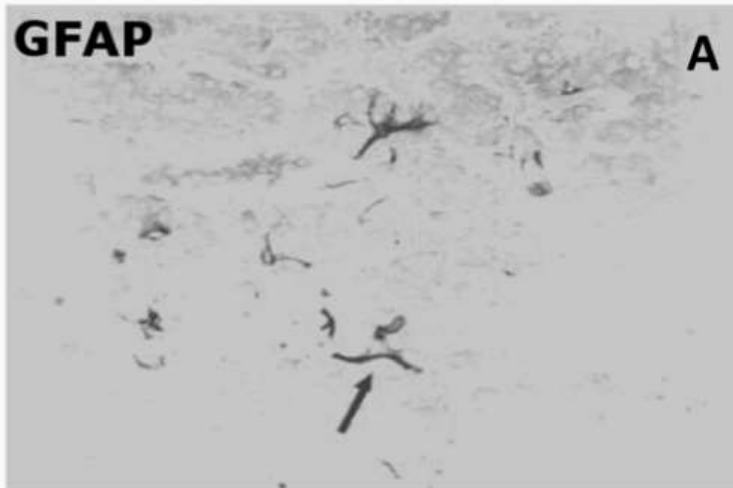


Figura 17. Esquema de las funciones de las S100β. Las diferentes proteínas S100 tienen una expresión tejido específica. La S100β se expresa principalmente en células gliales y se encuentra formando homodímeros (naranja) que en presencia de calcio (círculos azules), expone sitios hidrofóbicos que le permiten unirse a sus proteínas blanco (triángulos amarillos) impidiendo de forma estérica que estas moléculas sufran modificaciones postraduccionales como las fosforilaciones. Además de regular la homeostasis de Ca^{2+} , la S100β modula el citoesqueleto al unirse a tubulina, a proteínas ABP como CapZ y FI's de tipo III como vimentina y GFAP. En el caso de los FI's, S100β induce su despolimerización e inhibe su polimerización por impedimento estérico de cinasas (Ralton *et al.* 1994; Santamaria-Kisiel *et al.* 2006).

Dos blancos importantes de S100 β en los astrocitos son la **proteína ácida fibrilar glial (GFAP)** y la **vimentina**, proteínas que forman filamentos intermedios. La GFAP es característica de la neuroglia y su expresión se regula por la propia S100 β (Frizzo *et al.* 2004; Höfler *et al.* 1984). Estos hechos llevaron a sugerir que las CFE también podrían expresar a la GFAP y vimentina. Los trabajos en donde se abordó esta sugerencia mostraron que, en efecto las CFE son las únicas células de la hipófisis anterior que expresan a la GFAP (figura 18. Sorci *et al.* 1998; Velasco *et al.* 1982). Las CFE también expresan a la vimentina (Marín *et al.* 1989), en células que rodean lúmenes pequeños (Figura 19; Cardin *et al.* 2000; Avila-Rodriguez *et al.* 2016; Höfler *et al.* 1984).

Los filamentos intermedios (FI) son uno de los principales componentes del citoesqueleto de las células de vertebrados y están estrechamente asociados al mantenimiento de la forma celular por lo que son cruciales en la determinación del fenotipo celular. Miden 10 nm de diámetro, se forman de dímeros paralelos superenrollados de proteínas filamentosas con colas y cabezas globulares con sitios de fosforilación que regulan la organización de la proteína en filamentos y su expresión sitio específica. Los polímeros de FI se asocian progresivamente en dímeros, tetrámeros y protofilamentos, cuatro de éstos forman un filamento maduro (Figura 20; Parry *et al.* 2007). En mamíferos hay al menos 70 genes que codifican para proteínas de FI que se expresan de manera tejido específica y se clasifican en cinco grupos. El grupo III se caracteriza por formar homo y heteropolímeros e incluye a la GFAP que se encuentra en las células de la glía, la vimentina típica de los fibroblastos, la periferina que está presente en las neuronas y la desmina en las células de músculo esquelético (Eriksson *et al.* 2009; Iwatsuki *et al.* 2010; Kornreich *et al.* 2015).



18. Las CFE estelares expresan al filamento intermedio de células gliales GFAP. En las micrografías de cortes histológicos de la hipófisis anterior, se marcó con anticuerpos anti GFAP y peroxidasa a este filamento intermedio, observándose que se expresa en células aisladas con largas prolongaciones citoplasmáticas (Höfler *et al.* 1984; Velasco *et al.* 1982).

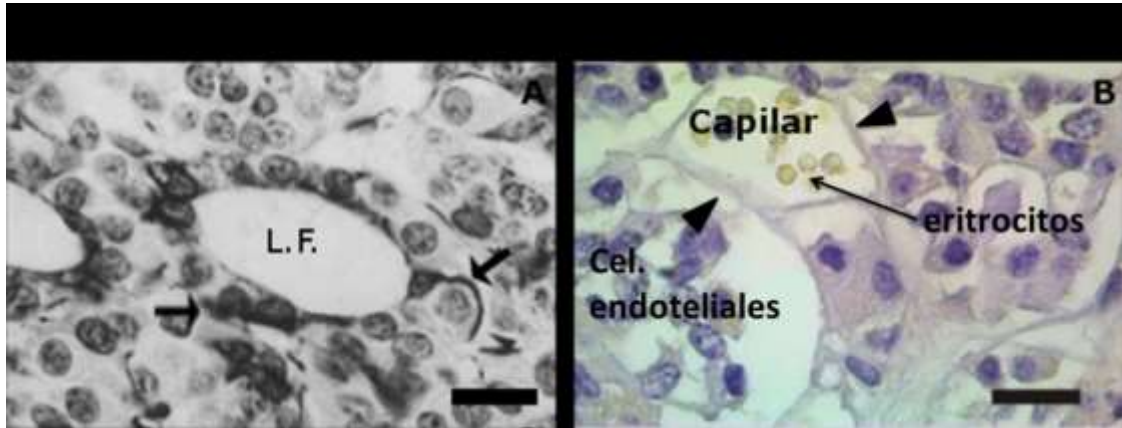


Figura 19. La vimentina se expresa en las CFE epiteliales y no en los vasos sanguíneos. El filamento intermedio vimentina se expresa típicamente en las células mesenquimales, algunos tipos de células gliales, en la mayoría de las células endoteliales; en la hipófisis anterior se expresa en algunas CFE epiteliales (A) sin embargo, no en las células endoteliales (B) como muestran este par de micrografías de cortes histológicos. Las imágenes no muestran la distribución de esta proteína en la glándula (Ávila-Rodríguez *et al.* 2016; Marin *et al.* 1989).

La fosforilación en sitios específicos del dominio amino terminal de la vimentina, bloquea la polimerización e induce el desensamble de los filamentos preexistentes (Chou *et al.* 1991; Inagaki *et al.* 1987; Sihag *et al.* 2007). Por otro lado, se han descrito sitios probables de fosforilación que promueven el efecto contrario, es decir, la polimerización y formación de filamentos (Eriksson *et al.* 2004; Sihag *et al.* 2007). De igual manera, el dominio amino terminal de la GFAP tiene sitios de fosforilación que están implicados en el ensamble y desensamble del FI, permitiendo que el astrocito presente una gran plasticidad (Eng *et al.* 2000; Frizzo *et al.* 2004; Inagaki *et al.* 1994; Sihag *et al.* 2007).

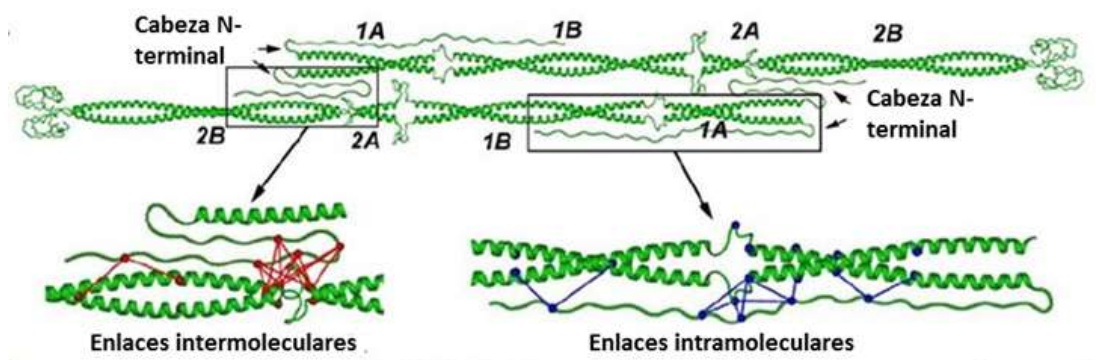
A**B**

Figura 20. Estructura y polimerización de los filamentos intermedios III. En A el dibujo representa la estructura común de los FI III como GFAP y vimentina formada por un dominio central α -hélice y flanqueada por dos dominios no α -hélice, el dominio cabeza en el extremo N-terminal y el dominio cola en el C-terminal. En el dominio cabeza se encuentran residuos de serina y treonina, blancos de fosforilación que producen cambios conformacionales que permiten la polimerización de estas proteínas. En particular en GFAP, cerca del dominio central se localiza la secuencia de una caja RP (RP box: RLSL-RM-PP) blanco de la Ca^{2+} /calmodulina, proteína cinasa II (CaMKII) y de la S100 β que impide estéricamente que actúe la CaMKII. La imagen de listones B, muestra cómo se forman los dímeros y tetrameros con los que se inicia la polimerización de los FI's. Las uniones que forman los FI's, los convierten en el elemento más estable del citoesqueleto (Kreplak *et al.* 2004; Ralton *et al.* 1994).

Los ratones con la GFAP abatida genéticamente tienen un desarrollo, reproducción y esperanza de vida normales, sin embargo, exhiben menos materia blanca cerebral y su barrera hematoencefálica es más permeable (Giménez y Ribotta

et al. 2000). Además, la GFAP de los astrocitos aumenta su expresión en la astrogliosis, un proceso provocado por daño al tejido neural. Los astrocitos en la astrogliosis recobran la capacidad de expresar a la vimentina, su núcleo se hipertrofia y, en algunos casos, el tejido desarrolla hiperplasia (Eng *et al.* 2000). Por otro lado, en células poco diferenciadas, como la línea celular de glioblastoma C6 que expresa tanto marcadores neurales como a la GFAP, cuando se retan con drogas que estimulan a la adenilato ciclasa, como la forskolina, disminuyen la expresión de las proteínas neurales y aumentan la de GFAP (Salero-Coca *et al.* 1995; Segovia *et al.* 1994).

La vimentina es un componente de los FI típicos de las células mesenquimales y una proteína altamente conservada entre las especies. Los ratones a los que se les ha abatido genéticamente esta proteína, se desarrollan y reproducen normalmente y tienen una esperanza de vida normal. No obstante, sus células gliales pierden sus ramificaciones y se atrofian. Estos ratones tardan más tiempo en reparar sus heridas, porque sus fibroblastos y células mesenquimáticas migran más lentamente que las de los ratones normales, y también presentan una disminución en el proceso de extravasación de los leucocitos y se pierde la barrera del endotelio vascular (Colucci-Guyon *et al.* 1994; Eckes *et al.* 1998; Galou *et al.* 1996). La vimentina organiza proteínas involucradas en migración (Eckes *et al.* 1998; Ivaska *et al.* 2007; Nieminen *et al.* 2006), adhesión (Calderwood 2004; Ivaska *et al.* 2007; Kottke *et al.* 2006) y señalización celular (Ivaska *et al.* 2005; Ivaska *et al.* 2007; Runembert *et al.* 2002) e interactúa con ellas a través de sus dominios amino y carboxilo terminales con abundantes sitios de fosforilación por cinasas diversas. Cada tipo de cinasa participa en funciones específicas como la mitosis, diferenciación y respuesta al estrés (Ivaska *et al.* 2007).

En el desarrollo temprano, la vimentina constituye los FI de los astrocitos inmaduros y la glía radial (Figura 21; Bignami *et al.* 1982; Galou *et al.* 1996). Poco

después, alrededor del nacimiento, la GFAP comienza a expresarse y coexiste brevemente con la vimentina. Cuando los astrocitos maduran, la GFAP substituye a vimentina (esquema de la figura 21. Galou *et al.* 1996; Pixley *et al.* 1984; Schnitzer *et al.* 1981). Una substitución parecida acontece en los cultivos primarios de astrocitos (figura 21 A-D. Galou *et al.* 1996), sin embargo, algunas células, por ejemplo los astrocitos fibrosos, tanicitos, de la glía de Bergmann, de Schwann, precursoras gliales y las que se encuentran en gliosis reactiva, expresan simultáneamente a la GFAP y la vimentina (figura 21 E y F). En todas estas células la vimentina es necesaria para que la GFAP polimerice adecuadamente (Galou *et al.* 1996). Es necesario investigar si este mismo proceso de la substitución de la vimentina por la GFAP también se presenta en las CFE.

La astrogliosis se caracteriza por la pérdida de arborizaciones como resultado del desensamble de los filamentos de GFAP, el aumento de la cantidad de S100 β y la liberación de factores tróficos neuroprotectores que luego favorecen la respuesta inflamatoria. Los astrocitos entonces adquieren una forma alargada, migran a la zona del daño para proliferar y sanar la herida y es en este sitio donde la célula glial recupera la expresión de la GFAP filamentosa. Cuando se tiñe a la GFAP en el sitio de la lesión se observa una zona rica en células gliales con expresión elevada de este filamento intermedio (Brozzi *et al.* 2009; Donato *et al.* 2009; Frizzo *et al.* 2004; Sorci *et al.* 1998).

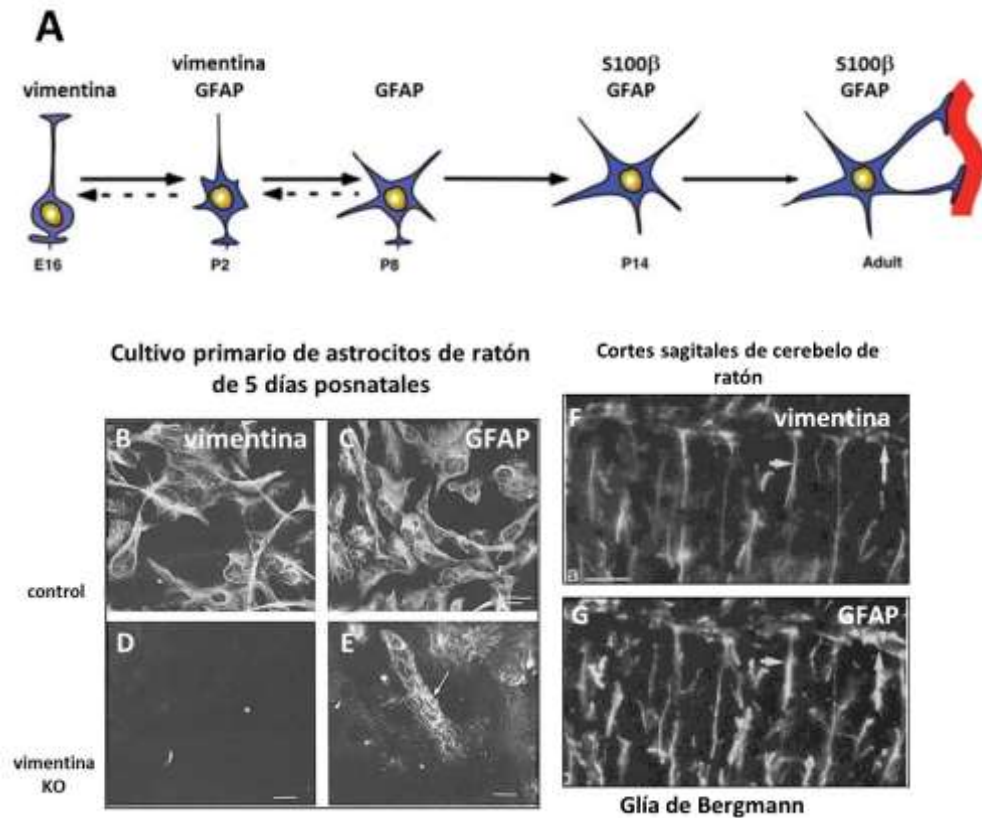


Figura 21. Relación de vimentina y GFAP con el desarrollo y la forma de las células gliales. Como se narra en el texto, en el dibujo A, se observa el desarrollo de los astrocitos y su expresión diferenciada de FI. Las micrografías de fluorescencia muestran cultivos primarios de astrocitos de ratón (B-E) que expresan vimentina y GFAP (B y C) y cómo se modifica la polimerización de GFAP cuando se abate a vimentina (D y E). F y G son cortes histológicos de corteza de ratón donde con anticuerpos fluorescentes se marcó a vimentina y GFAP en la glía de Bergmann (Galou *et al.* 1996; Raponi *et al.* 2007).

Si se bloquea la expresión de la S100β en las células de astroglioma de la línea GL15 y las células de Müller MIO-M1, se observa que se desensamblan las fibras de estrés, aumenta la actina cortical, las células adquieren una forma *estelar*, aumentan los filamentos intermedios de GFAP y las células reducen su migración y

proliferación (Figura 22; Brozzi *et al.* 2009). Sería muy importante investigar si las CFE responden de la misma manera que los astrocitos cuando disminuye S100 β .

Línea celular GL15, astrocitoma

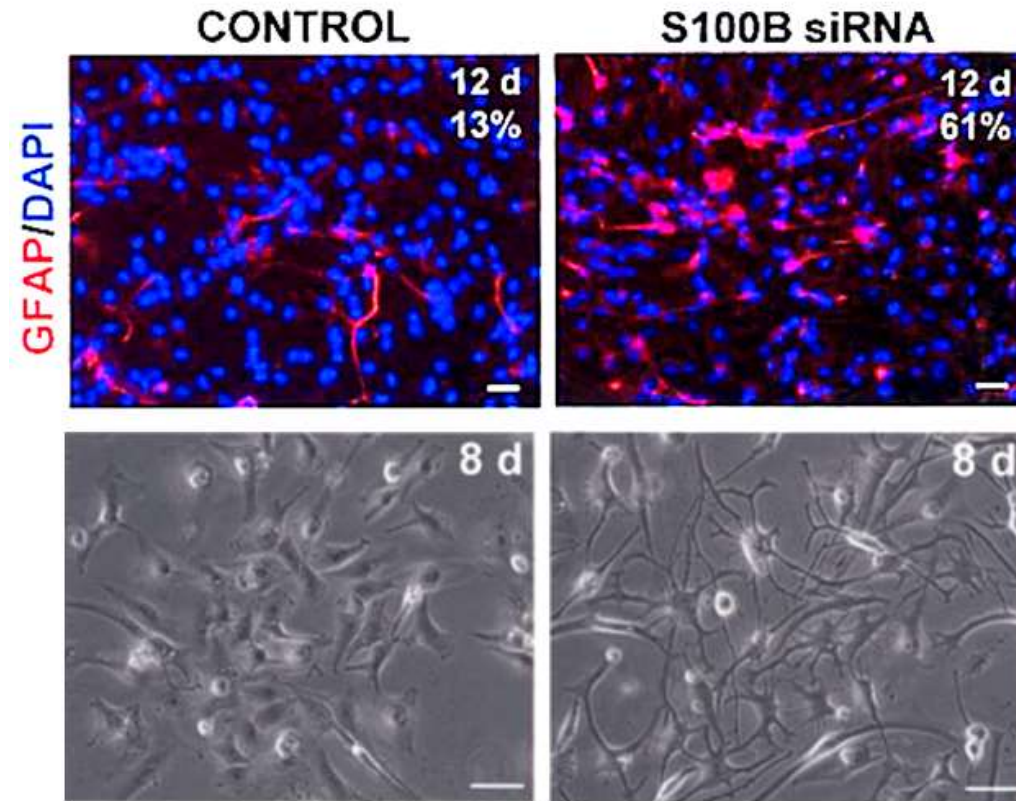


Figura 22. Relación entre las proteínas S100 β y GFAP. Esta relación se pone de manifiesto en estas imágenes de la línea celular GL15 de astrocitoma donde el 13% de las células expresan a la GFAP y tienen forma extendida sobre el sustrato, mientras que si se abate la expresión de S100 β con un siRNA, las células que expresan a la GFAP aumentan al 61% y adquieren una forma estelar (Brozzi *et al.* 2009).

3.6 Las células de la hipófisis anterior expresan diferentes cadherinas.

Las cadherinas constituyen una superfamilia de 12 familias tentativas de receptores transmembranales de adhesión celular dependiente de Ca^{2+} que comparten la característica de tener el dominio cadherina (EC). Las cadherinas se expresan de manera específica en distintos tejidos y en diferentes fases del desarrollo. La familia más abundante es la de las protocadherinas, pero la mejor conocida es la de las cadherinas clásicas que se subdivide en las de tipo I y II. Las de tipo I tienen cinco dominios EC y un dominio intracelular muy parecido entre sí. Tienen además un “predominio” característico antes del primer repetido y, en éste último, un triptófano esencial para la unión. Ésta familia incluye a la cadherina epitelial o E-cadherina, también llamada uvomorulina, la placentaria o P-cadherina, la neural o N-cadherina y la R-cadherina. Las de tipo II se caracterizan porque su predominio es más pequeño que el de las cadherinas tipo I, su primer dominio repetido tiene dos triptófanos esenciales y su dominio intracelular es distinto. Este tipo incluye, por ejemplo, a las cadherinas de la -5 a la -11. El dominio intracelular de las cadherinas clásicas une a un grupo de tres proteínas llamadas α -, β - y p120 cateninas (Hirano y Takeichi 2012; Patel *et al.* 2003). La α -catenina une a las cadherinas con el citoesqueleto del anillo cortical de actina (Aberle *et al.* 1996), la β -catenina forma parte de la unión adherente pero también es una proteína crucial en la ruta de señalización WNT (Brembeck *et al.* 2006) y la p120-catenina es una proteína reguladora de la misma unión (Hong *et al.* 2016). El dominio extracelular de una cadherina, se une al de la célula vecina que, en la gran mayoría de los casos, debe ser del mismo tipo, razón por la que la unión celular se denomina homotípica (Hirano y Takeichi 2012).

Las células secretoras de hormonas de ratas adultas expresan N-cadherina (Chauvet *et al.* 2009; Kikuchi *et al.* 2006), mientras que las CFE que forman al folículo expresan E-cadherina (figura 23. Chauvet *et al.* 2009; Kikuchi *et al.* 2006). Las células adenohipofisarias durante el periodo de desarrollo temprano coexpresan

E y N-cadherinas, pero ya maduras, sólo su a cadherina correspondiente (Kikuchi *et al.* 2007).

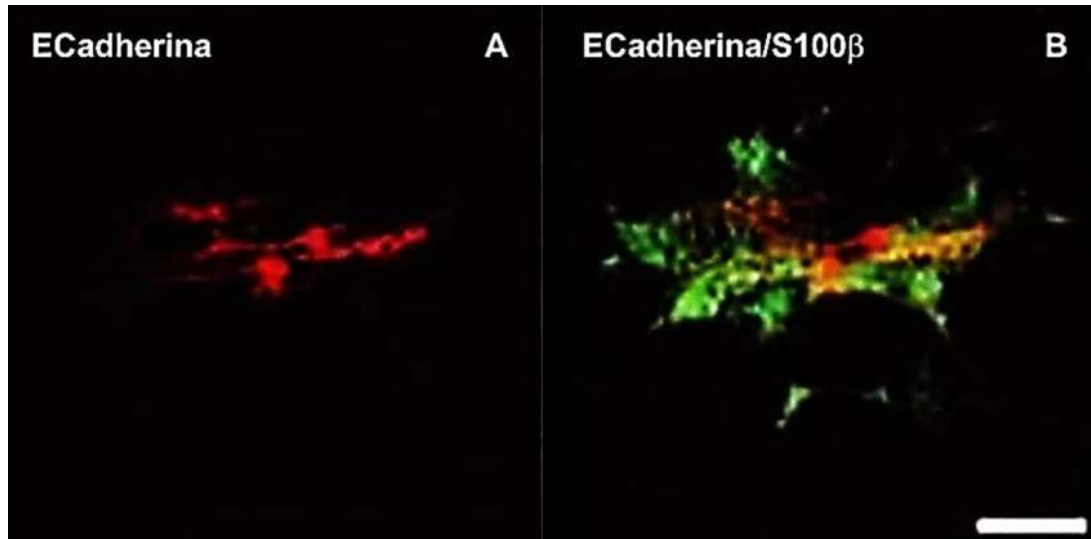


Figura 23. Las uniones adherentes de las CFE epiteliales están formadas por E-cadherina. En las micrografías de fluorescencia se observa a las CFE identificadas por la S100β (B) rodeando un lumen y expresando a E-cadherina (A). Las CFE fuera del lumen, probablemente las estelares, no expresan E-cadherina (Chauvet *et al.* 2009).

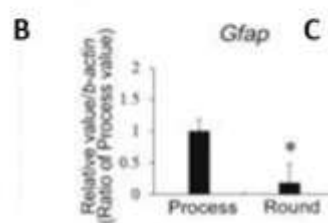
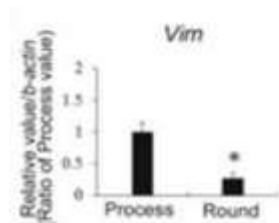
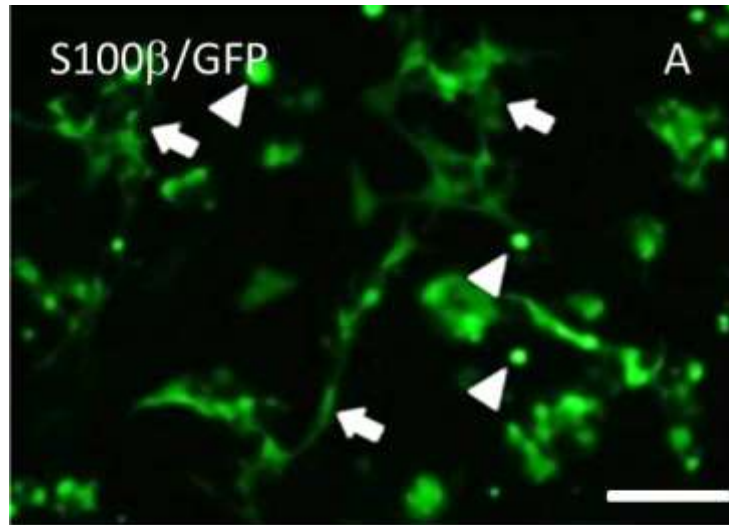
Así pues, las CFE se pueden identificar en el tejido adenohipofisiario de la rata adulta porque la mayoría expresa S100β, además, algunos subtipos también expresan a la GFAP, y en el folículo estas expresan a la E-cadherina y a la vimentina.

3.7 La heterogeneidad de las CFE

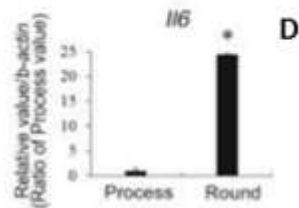
Las CFE son en realidad una población de la que se desconoce su grado de heterogeneidad, función y origen. Vila-Porcile (1974) describió a las CFE como “foliculares” y “estelares”, pero mostrando que pueden ser dos poblaciones

diferentes. Allaerts y Vankelecom (2005), clasificaron a las CFE en tres subpoblaciones: las CFE similares a las células inmunes dendríticas, identificadas por su expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y por la secreción de Il-6; las CFE similares a astrocitos, las cuales expresan a la GFAP, y las células CFE epiteliales, las cuales se distinguen por su característica morfológica epitelial y por la expresión de las keratinas 8-18.

Horiguchi *et al.* (2014), en ratas transgénicas que expresan al gen de la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de la proteína S100 β , identificaron dos subpoblaciones de células FE en cultivos de 72 horas de evolución: unas aplanadas, con grandes procesos citoplasmáticos, que rodean agregados de células secretoras de hormonas y otro grupo de CFE redondas, localizadas dentro de agregados de células secretoras. Por su diferente afinidad a la matriz extracelular, en particular a la laminina, pudieron aislar ambas poblaciones y caracterizarlas. De tal manera que demostraron que las células aplanadas expresan abundantemente a los ARN mensajeros para la vimentina y la GFAP, y las redondas a los ARN mensajeros para la Il-6, el receptor del sistema de complemento y el fibrinógeno Cd11b, que son marcadores de células dendríticas inmunológicas. Estos hallazgos sugieren que, en esas condiciones de cultivo, las células aplanadas corresponden a las células FE con características gliales astrocíticas y las redondas representan a la población de células FE similares a células dendríticas inmunológicas (figura 24) de acuerdo a la clasificación de Allaerts y Vankelecom (2005), quedando por esclarecerse si en la primera población también se encuentran las CFE epiteliales.



Alargadas



Redondas

Figura 24. Expresión de dos poblaciones de CFE. Imagen de fluorescencia de un cultivo de CFE de la hipófisis de rata, donde las células están identificadas y seleccionadas por la proteína verde fluorescente acoplada a la S100 β (S100 β /GFP en A) donde se observan dos fenotipos de células FE: redondas (cabezas de flecha) y extendidas con procesos citoplasmáticos (flechas). En B, C y D se muestra la expresión diferenciada entre estos fenotipos de CFE de diversos ARN mensajeros (Vim = vimentina, Il6 = interleucina 6, Horiguchi *et al.* 2014). Barra = 100 μ m.

En resumen, partiendo de los fenotipos de CFE descritos por Vila-Porcile (1974), Allaerts y Vankelecom (2005) proponen la existencia de un tercer fenotipo con base en las proteínas que expresan. Horiguchi y su grupo (2014) describen dos subpoblaciones en cultivo primario de rata, por microscopía electrónica se distinguen dos poblaciones de CFE, las estelares y las epiteliales. Las estelares expresan proteínas típicas de células gliales astrocíticas como la S100 β y la GFAP, pero no se sabe si también expresan a la vimentina. Sin embargo, dadas las características similares de estas células con las de los astrocitos, esperamos que coexista en ellas la expresión de estas proteínas en el desarrollo de la glándula o durante los procesos de remodelación que esta presenta. Las CFE epiteliales, se reconocen por la expresión de S100 β , vimentina y E-cadherina y no sabemos si expresan también a la GFAP (lo cual no podemos descartar), ni cuáles claudinas se encuentran en sus UO's, aunque esperamos que, dados los antecedentes aquí planteados, se exprese una claudina de barrera, y proponemos a la cldn4. Además, es posible que existan subpoblaciones, por ejemplo de células estelares que expresen o no vimentina, o células epiteliales que expresen o no GFAP. Caracterizar dichas subpoblaciones es un trabajo que requiere investigación en animales, cultivos primarios y líneas celulares (Figura 25).

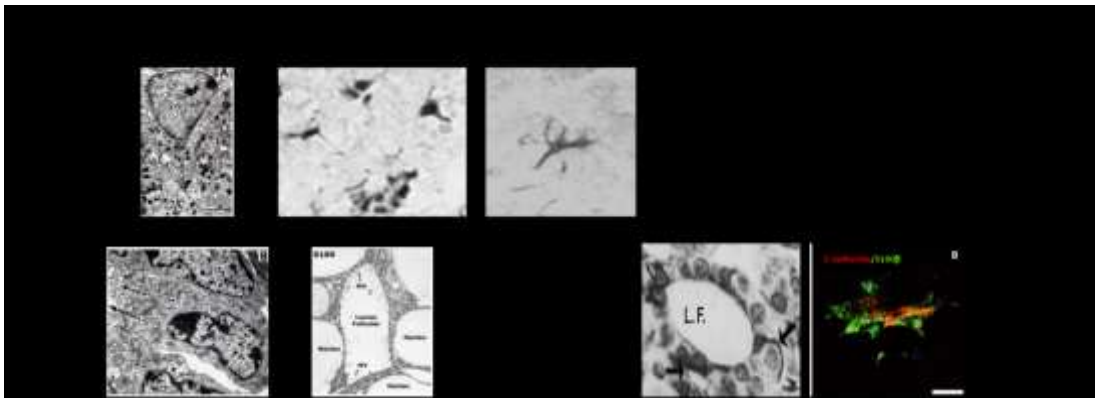


Figura 25. Poblaciones de CFE y proteínas que las identifican. La explicación de esta figura se encuentra en el texto.

En esta tesis proponemos abordar lo siguiente:

4. Problema

¿Cuántas subpoblaciones de CFE existen en la hipófisis anterior de rata adulta y en que proporciones se encuentran?

5. Hipótesis

Existen más de tres subpoblaciones de CFE: dos o más estelares y dos epiteliales. Las células epiteliales son las más abundantes y expresan una claudina de barrera.

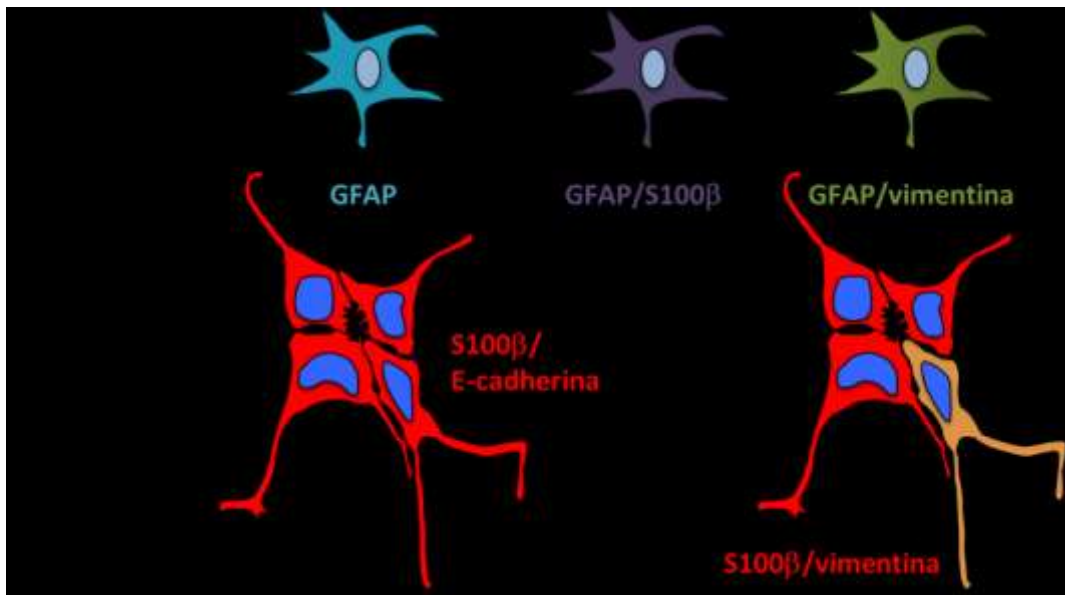


Figura 26. Hipótesis gráfica. Suponemos que al menos existen las cinco subpoblaciones de CFE enumeradas en el esquema, en base a la forma y combinación de sus marcadores proteicos. Por ejemplo la diferencia en el número de células que expresan a la S100β y la GFAP nos permite hipotetizar que existen dos subpoblaciones de CFE estelares, más una que expresa a la vimentina; misma proteína que distingue a una subpoblación de CFE epiteliales.

6. Objetivo General

Identificar a las diferentes subpoblaciones de CFEs y medir en qué proporciones se encuentran.

7. Objetivos Específicos

1. Identificar a las subpoblaciones de CFE que expresan a la GFAP y/o a la S100 β y medir su proporción en el tejido adenohipofisiario.
2. Demostrar que existe una subpoblación de CFE estelares que expresa vimentina.
3. Investigar si las CFE epiteliales expresan cldn4 y en qué proporción.
4. Investigar en la glándula hipófisis anterior qué otras claudinas (cldns) se expresan.

8. Material y métodos

8.1 Animales

Se usaron ratas hembras de 14 y 90 días de edad de la cepa Wistar criadas en la unidad de protección y experimentación de animales de laboratorio (UPEAL-CINVESTAV). Los animales tuvieron ciclos de luz y oscuridad de 12 horas con agua y alimento *ad libitum*.

8.2 Glándulas hipófisis

Se sacrificó a los animales por decapitación, se disecó por planos la cabeza y se obtuvo la hipófisis. Para obtener cortes de tejido, la glándula se sumergió en paraformaldehído al 4% (Sigma Aldrich, EE.UU) diluido en una solución salina amortiguadora a base de fosfatos (PBS: NaCl 130 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, K₂HPO₄ 1.5 mM, pH 7.4) por 4 horas a temperatura ambiente (TA). Una vez terminado el periodo de fijación, las glándulas se colocaron en una solución de sacarosa al 20% (Merck Sharp & Dohme Corp, Alemania) en PBS a 4°C durante 24 horas. Al término del tiempo, se cubrió el tejido con un medio de inclusión para cortes congelados (Tissue-Tek, O.C.T. Compound, Japan). El tejido se cortó obteniéndose secciones seriadas de tejido de 8 µm de grosor en un microtomo (Leica CM1520, Alemania) a -20°C y se colocaron en un portaobjetos cubierto con 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Aldrich, EE.UU).

8.3 Cultivo Celular

Para obtener el cultivo primario de las células de hipófisis anterior, en condiciones de esterilidad, se separó la hipófisis posterior desechándola, mientras que la adenohipófisis se cortó en cuatro pedazos. Las fracciones de tejido se procesaron enzimáticamente con colagenasa tipo 2, al 0.1% (Worthington EE.UU.), en medio de cultivo 199 (Gibco, EE.UU) durante 45 min a 37°C, seguido de una segunda digestión de 5 min con tripsina al 0.1% (Sigma Aldrich, EE.UU.), a 37°C disuelta en PBS adicionado con EDTA al 0.3% (Research Organics Inc., EE.UU.). Después de este tratamiento, las fracciones de tejido se incubaron con inhibidor de tripsina de soya 0.1 mg/ml (Gibco, EE.UU.), y deoxirribonucleasa I 63.3 µg/ml (DNasa, Worthington Biochemicals, EE.UU.) disueltas en medio de cultivo. La composición del medio de cultivo fue: medio de cultivo 199, 950mg/100ml (Gibco EE.UU.),

HEPES 2.4 mg/ml (Sigma-Aldrich, EE.UU.), con bicarbonato de sodio 0.6 mg/ml (NaHCO₃, Merck Sharp & Dohme Corp, Alemania), pH 7.4. La solución celular se centrifugó a 800 rpm descartando el sobrenadante y se suspendió la pastilla en medio de cultivo. Las células se disociaron mecánicamente ocupando una pipeta Pasteur, hasta observar al microscopio células aisladas y cúmulos de hasta 10 células como máximo. Las células se cultivaron en cajas Petri de 60 mm de diámetro o en cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro, ambos cubiertos con una solución de 3 mg/ml de colágena I/III (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) a razón de 1×10^6 células por caja Petri y 90, 000 células por cubreobjeto y se mantuvieron con medio 199 adicionado con suero bovino fetal 2% (Equitec-Bio, EE.UU.) más ITS (insulina 0.01mg/ml, transferrina 0.055 mg/ml y selenito de sodio 0.005 mg/ml; Sigma-Aldrich, EE.UU.) y antibiótico 1% (10,000 UI/ml penicilina y 10,000 µg/ml estreptomycin) a pH 7.4, de acuerdo al trabajo de Luo *et al.* 2006 y en condiciones estándar de cultivo. El medio de cultivo fue reemplazado cada tercer día.

8.4 Inmunohistoquímica de fluorescencia

Las secciones de tejido congeladas de 8 µm de grosor se descongelaron y rehidrataron en PBS 0.1 M durante 30 min a TA; para ser permeabilizadas posteriormente con etanol 70% (J.T. Baker EE.UU.) a -20°C durante 1 min y Tritón X-100 0.2% (Sigma-Aldrich, EE.UU) en PBS durante 30 min a TA. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, el tejido se trató con cianoborohidruro de sodio 0.2% (NaBH₃CN; Sigma-Aldrich, EE.UU.) por 10 min a TA y con albúmina libre de IgG's 1% (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) por 30 min a TA. Posteriormente, los tejidos se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C y enseguida se hizo la incubación con los anticuerpos secundarios durante 2 hrs a TA. Para teñir los núcleos se utilizó 4',6-diamino-2-fenilindol 1µm/ml (DAPI, Molecular Probes, Life Technologies; EE.UU.) por 5 min a TA. Se montó el tejido y

se observó en un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Alemania) y las imágenes obtenidas se analizaron utilizando los programas FIJI de ImageJ y GIMP 2.8.

8.5 Inmunocitoquímica

Las células se lavaron con PBS a 37°C para en seguida fijarlas y permeabilizarlas con paraformaldehído 3.5% (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y Tritón al 0.1% (Sigma-Aldrich, EE.UU.) en PBS por tres minutos a TA y se continuó el proceso de fijación con paraformaldehído 3.5% en PBS, por 20 min a TA. Posteriormente, para bloquear los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, las células se trataron con cianoborohidruro de sodio al 0.2% (NaBH₃CN; Sigma-Aldrich, EE.UU.) por 10 min a TA y con albúmina libre de IgG's 1% (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) por 30 min a TA. En seguida, las células se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios utilizados en este estudio durante toda la noche a 4°C, en seguida se hizo otra incubación con anticuerpos secundarios acoplados a moléculas fluorescentes por 30 min a TA. Los núcleos se tiñeron con DAPI por 5 min a TA. Las preparaciones se montaron utilizando un medio acuoso protector de fluorescencia (Vectashiel, Vector Laboratories, EE.UU.) para ser observadas en un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Alemania). Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando los programas FIJI de ImageJ y GIMP 2.8.

8.6 Western Blot

Una vez extraída la glándula, se cortó en pedazos pequeños que se lisó con una solución RIPA: Triton X-100 al 1%, deoxicolato de sodio al 1% (Research Organics;), SDS al 0.1% (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.), NaCl 150 mM (Merck Sharp & Dohme Corp, Alemania), TRIS 50 mM; Complete 4mM (Roche, Alemania); PMSF

0.1 mM, ortovanadato de sodio 10 mM y fluoruro de sodio 10 mM (el resto de los reactivos Sigma-Aldrich, EE.UU.), incubando el tejido durante 10 min a 4°C para después sonicarse por 3 seg a 30% de amplitud, en dos ocasiones (Sonic, Vibracell, EE.UU.). La suspensión se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su utilización. A las muestras se les determinó la concentración de proteínas por el método de micro-Bradford (Bio-Rad, Reino Unido) y se resuspendieron en una solución amortiguadora Laemmli (SDS al 4%, glicerol al 20% y Tris HCl 125 mM, pH 6.8). Se colocaron en el gel muestras de 50 µg de proteína, para ser separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a una membrana de PVDF (0.45 mm, Millipore, Alemania). Las membranas se incubaron en una solución bloqueadora de leche libre de grasas al 0.5% más Tween 20 al 0.2% (Sigma-Aldrich, EE.UU) en PBS durante 60 min a TA, y posteriormente se incubaron con un anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. En seguida se realizó una incubación con el respectivo anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano durante 30 min a TA. Las bandas de proteína se evidenciaron ocupando el método de quimioluminiscencia (Luminata Forte, Millipore, USA).

8.7 RT-PCR

Para homogeneizar y extraer el ARN del tejido se utilizó el reactivo Trisol (Sigma-Aldrich, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total (5mg) fue transcrito de forma inversa en ADN complementario (cDNA) utilizando la transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney (M-MuLV, New England Biolabs, EE.UU.). La expresión del ARNm de *cldn4* y *cldn2* fue estudiada por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) usando el sistema de detección TaqMan y el conjunto de reactivos Universal PCR MasterMix (Applied Biosystem, Life Technologies, EE.UU.) en 2µl de cDNA. Las sondas utilizadas fueron: para *cldn4*: el reactivo Rn01196224_s1 con la sonda

ATTTAAGGTCTGTTACAGCTGTAA; *cldn2*: el reactivo Rn02063575_s1, con la sonda: TTATAGTTCTTGTATGCGCATTTGT y para la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de rata (GAPDH) el cual fue usado como gen endógeno, el reactivo Rn01775763_g1 con la sonda: AGGAGTCCCCATCCCAACTCAGCCC. Cada muestra de cDNA fue analizada por triplicado. Las secuencias de ADN producto de la PCR de cada muestra fueron detectadas por fluorescencia usando el sistema ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EE.UU.). El protocolo de PCR se realizó a 95°C por 10 min, 95°C para 15 seg y 60°C por 1 min (40 ciclos). Los resultados son el promedio de los ciclos en los que se detectó la amplificación del mRNA (CT) \pm la desviación estándar.

8.8 Anticuerpos

Los anticuerpos y las concentraciones que se utilizaron en este trabajo, se muestran en las siguientes tablas:

Anticuerpos Primarios	Isotipo	Concentración	Proveedor
Anti S100 β monoclonal	Ratón IgG	1:500	Sigma- Aldrich
Anti S100 policlonal	Conejo IgG	1:250	Sigma- Aldrich
Anti GFAP monoclonal	Ratón IgG	1:300	Cell Signaling Technology
Anti GFAP policlonal	Conejo IgG	1:400	Dako
Anti Vimentina monoclonal	Conejo IgG	1:50	Cell Signaling Technology

acoplado a Alexa 647			
Anti Vimentina monoclonal	Ratón IgG	1:200	Sigma- Aldrich
Anti Claudina 4 monoclonal	Ratón IgG	1:300	Invitrogen
Anti Actina monoclonal	Conejo IgG	WB: 1:2000	

Anticuerpo Secundario	Isotipo	Concentración	Proveedor
Anti conejo acoplado a fluoresceína (FITC)	Burro IgG (H+L)	1:400	Jackson Immuno Research
Anti ratón acoplado a rodamina (TRITC)	Burro IgG (H+L)	1:400	Jackson Immuno Research
Anti ratón acoplado a Alexa Fluor 555	Burro IgG (H+L)		Invitrogen
Anti ratón acoplado a Alexa Fluor 647	Burro IgG (H+L)		Invitrogen

Anti ratón acoplado a peroxidasa de rábano	Cabra IgG (H+L)		Calbiochem
Anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano	Burro IgG (H+L)		Pierce. Thermo Scientific

9. Resultados

9.1 Identificación de las subpoblaciones de CFE que expresan a la GFAP y/o a la S100 β y su proporción en el tejido de la hipófisis anterior

Para verificar si existe más de un fenotipo de CFE, comenzamos tiñendo cortes histológicos con anticuerpos fluorescentes contra las proteínas S100 β (en verde) y GFAP (en rojo, los núcleos en azul. Figura 27). Las marcas fluorescentes para ambas proteínas colocalizan entre sí, se encuentran muy cercanas en la misma célula o se expresan en células separadas (imágenes panorámicas, a-d). Estos resultados demuestran que existen células que expresan solo S100 β (flechas en e y h), solo GFAP (cabezas de flecha en f y h) y células que expresan ambas proteínas (flechas vacías en g y h).

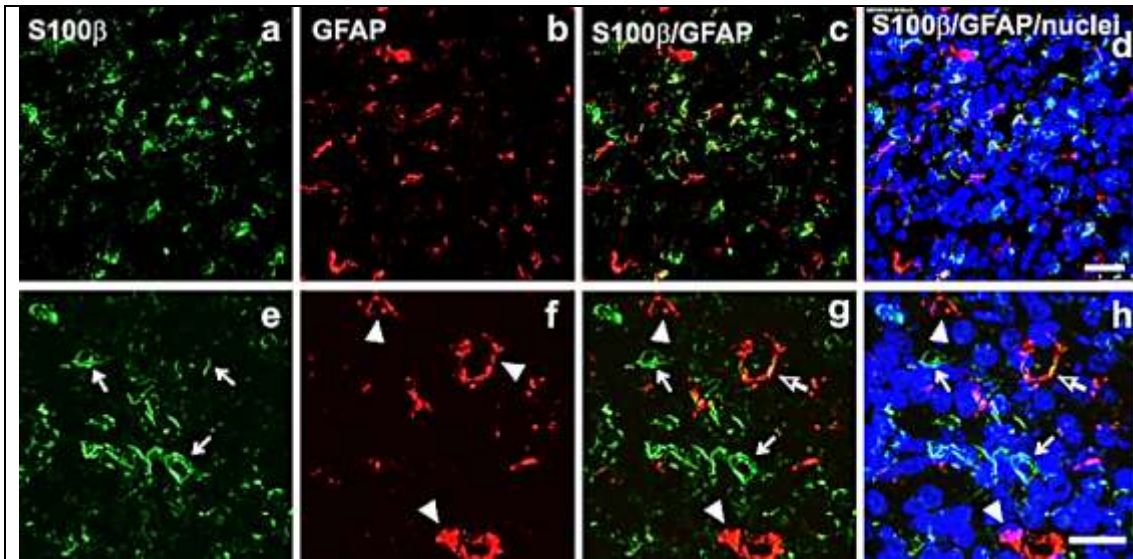


Figura 27. Subpoblaciones de las CFE que expresan a la GFAP y a la S100β. Micrografías de fluorescencia de cortes de hipófisis de rata adulta donde se marcó en verde a la proteína S100β (a, c, d, e, g, h) y en rojo a GFAP (b, c, d, f, g, h). Los núcleos se teñeron en azul (d, h). Las imágenes a-d son panorámicas y e-h son magnificaciones. La descripción detallada se encuentra en el texto. Barra = 25 μm.

Para averiguar la proporción en que se expresan estas poblaciones, contamos las células de las distintas poblaciones en 10 diferentes campos de cuatro diferentes ensayos. Los resultados se observan en la gráfica de la figura 28, donde las células que solo expresan S100β corresponden al 60 %, las que sólo expresan GFAP al 20% y las que expresan a ambas proteínas al 15% (el total de CFE se obtuvo sumando el número de células de estas tres poblaciones). De tal manera que la S100β es la proteína más abundante en las CFE, y las células que expresan a la GFAP, sola o junto con la S100β, constituyen el 35% de las CFE en tejido.

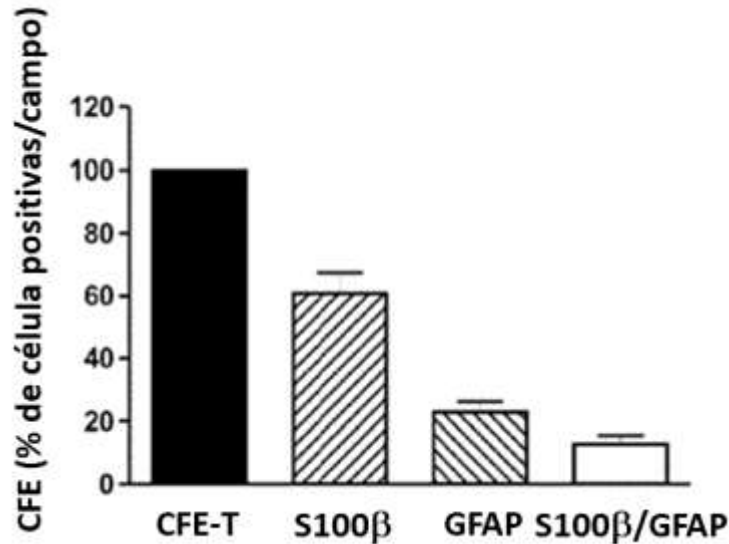


Figura 28. Poblaciones de CFE identificadas por S100β y GFAP en cortes de tejido de hipófisis rata. Proporción de células positivas para S100β, GFAP o S100β y GFAP. El número de células que expresan una u otra proteína fueron contadas en diez diferentes campos de al menos cuatro diferentes imágenes como la de la figura 21, obtenidas por inmunofluorescencia (CFE-T es el número total de CFE tomado como 100%). Los datos corresponden a la media ± el error estándar (García-Godínez *et al.* 2014).

En la neuroglía, la GFAP se expresa, principalmente, en células con forma de estrella (Galou *et al.* 1996). En esta tesis se investigó si esto ocurre también en las CFE. Para evidenciar qué forma desarrollan las CFE de la hipófisis anterior que expresan GFAP, se extrajeron y se cultivaron células de la hipófisis anterior en cubreobjetos, luego se marcaron con anticuerpos fluorescentes contra la GFAP (figura 29). Las células que expresan a la GFAP (verde) desarrollan en cultivo una forma de estrella y expresan redes de filamentos citoplásmicos, tanto alrededor del núcleo (azul) como en largas prolongaciones citoplasmáticas, de manera muy similar a los astrocitos de la neuroglia. Este resultado demuestra que la población de CFE que expresa GFAP tiene características de células gliales y permite plantear la posibilidad de que ejecuten funciones similares y/o tengan un origen común.

GFAP/núcleos

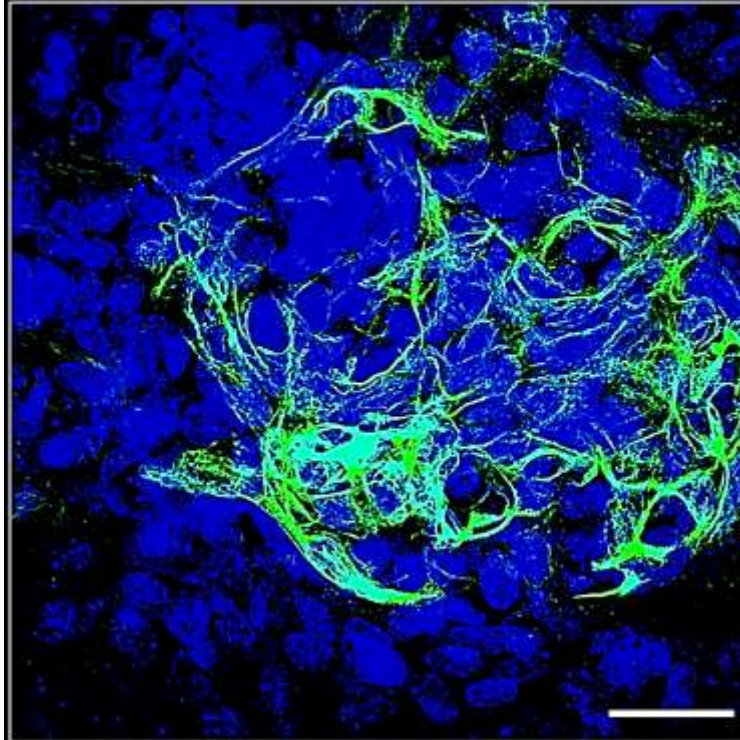


Figura 29. En cultivo las CFE con GFAP tienen forma estelar. En un cultivo primario de células de hipófisis anterior, estas se organizaron formando cúmulos sobre una capa de células planas. Hacia la parte superior del cúmulo, a los diez días de cultivo, se situaron CFE que expresan a la GFAP de forma fibrilar alrededor del núcleo y en largas prolongaciones citoplasmáticas. Estas células se encontraron agrupadas, formando una red y tenían forma estelar (Barra = 25 μ m).

9.2 Subpoblación de CFE estelares que expresan vimentina

Sabemos que en las células gliales algunas proteínas se expresan secuencialmente: primero la vimentina en el embrión y los primeros días posnatales, luego la vimentina y la GFAP en los primeros días posnatales y, finalmente, sólo la GFA en las células adultas y diferenciadas (Raponi *et al.* 2007; Schtzer *et al.* 1981). Este fenómeno se observa también en astrocitos en cultivo. Ya que las CFE estelares tienen propiedades gliales, cabe preguntarse si presentan un programa de expresión de vimentina y GFAP similar al de los astrocitos. Para averiguar esta alternativa se cultivaron células extraídas de hipófisis anteriores de ratas de 14 días de nacidas y se observaron en

función del tiempo de cultivo. Mientras que las células de 2 días de cultivo co-expresan vimentina y GFAP (figura 30, verde), así como sólo vimentina (rojo), las de 10 días de cultivo expresan *únicamente* vimentina o GFAP, demostrando que siguen un patrón de expresión de estas proteínas similar al de los astrocitos.

Luego se investigó si las poblaciones de CFE que expresan vimentina y vimentina/GFAP también se encuentran en la hipófisis anterior. Por lo tanto, se obtuvieron rebanadas horizontales de hipófisis y se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra GFAP (figura 30, verde) y vimentina (rojo). Sorprendentemente solo detectamos tinción de vimentina en las alas de la hipófisis, las cuales se muestran marcadas con un recuadro en el esquema (i) de la figura 31. En estas zonas, se observan células que coexpresan GFAP y vimentina, así como otras que sólo expresan a la vimentina (figura 31, A-D). Fuera de estas regiones las células de la hipófisis anterior expresan únicamente GFAP (figura 31, E-I). Este resultado suma dos subpoblaciones más a las CFE que expresan GFAP: las que expresan GFAP/vimentina y las que solo expresan vimentina, ambas limitadas a las alas de la glándula y apoyan la posibilidad de que las CFE con características gliales se desarrollen en un patrón temporal similar al de los astrocitos en desarrollo.

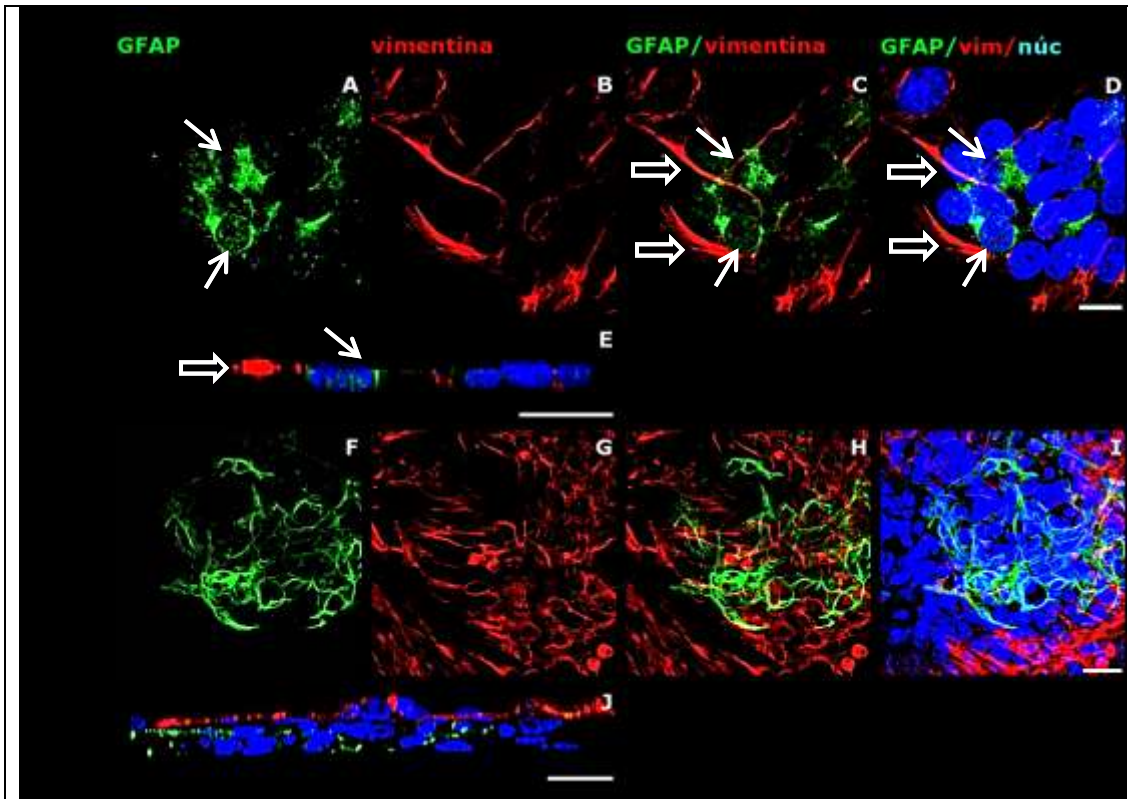
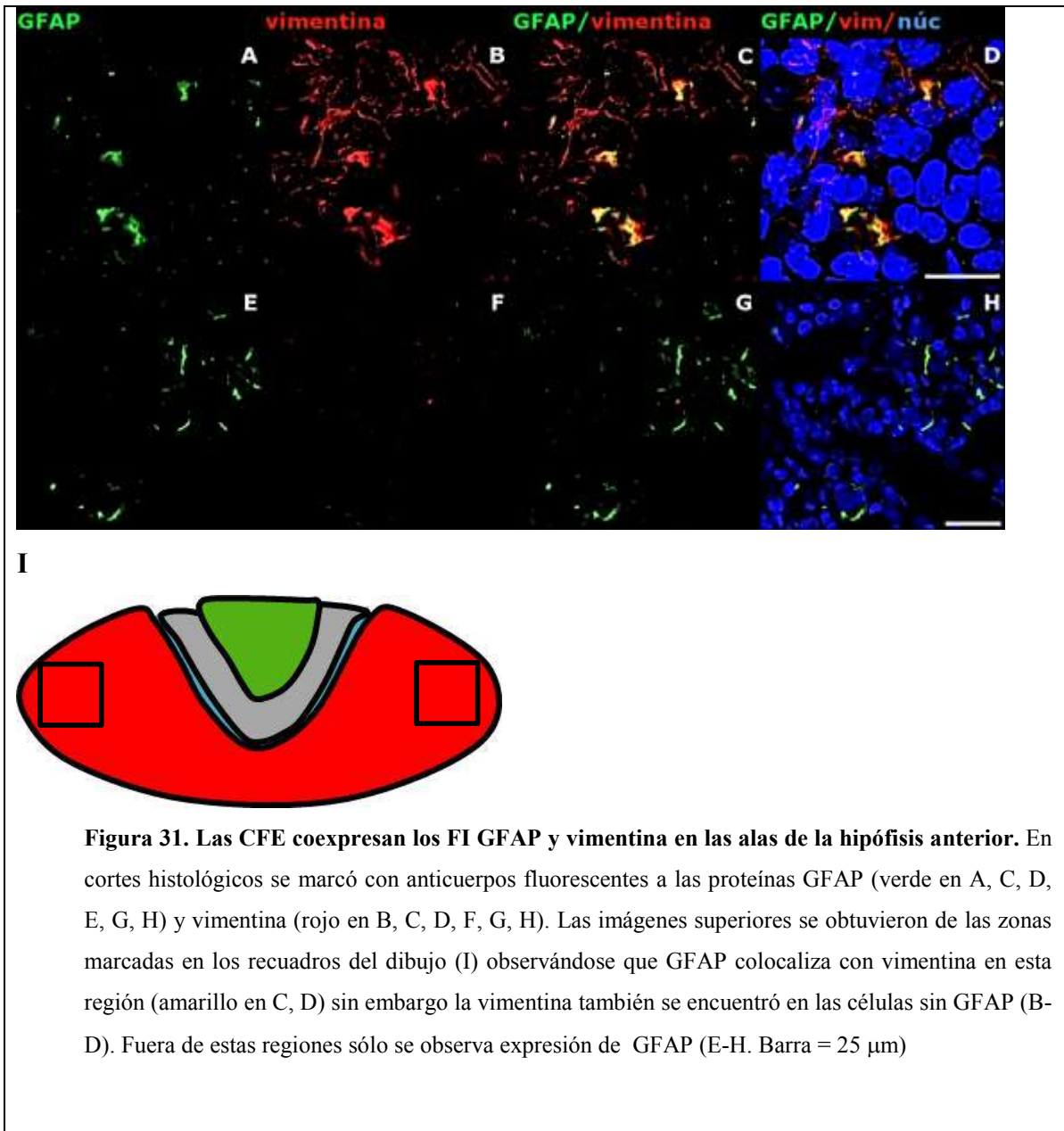


Figura 30. Expresión de FI en CFE en cultivo. En cultivos primarios de hipófisis anterior, se pueden apreciar a los dos días de cultivo, células que expresan GFAP perinuclear y en el soma (verde en A, C, D y E; flechas blancas) y vimentina en los procesos citoplasmáticos (B-E, flechas vacías) y células que solo expresan a vimentina (B-E, flechas vacías). A los diez días de cultivo, ambos filamentos intermedios se expresan en diferentes células (F-J. Barra = 25 μ m).

El hecho de que algunas CFE sigan un programa de cambio de expresión temporal de vimentina y GFAP, no excluye la posibilidad de que también existan poblaciones que co-expresen ambas proteínas como un estado diferenciado final, tal como lo hacen las células gliales de Bergmans, las de Müller y otras (Galou *et al* 1996). En concordancia con esta posibilidad, se encontraron CFE planas y extendidas de 10 días de cultivo, que expresaron ambas proteínas en estructuras filamentosas (figura 32). Será interesante demostrar, en el futuro, si la hipófisis anterior de los ratones adultos también tienen células que coexpresen GFAP y vimentina, mientras que las de embriones solo expresan vimentina.



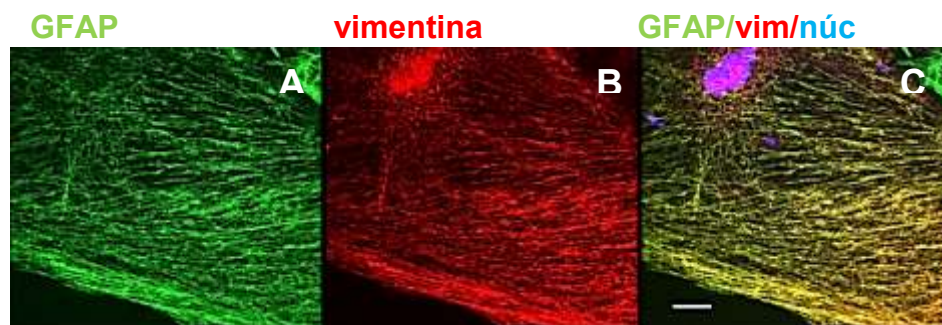
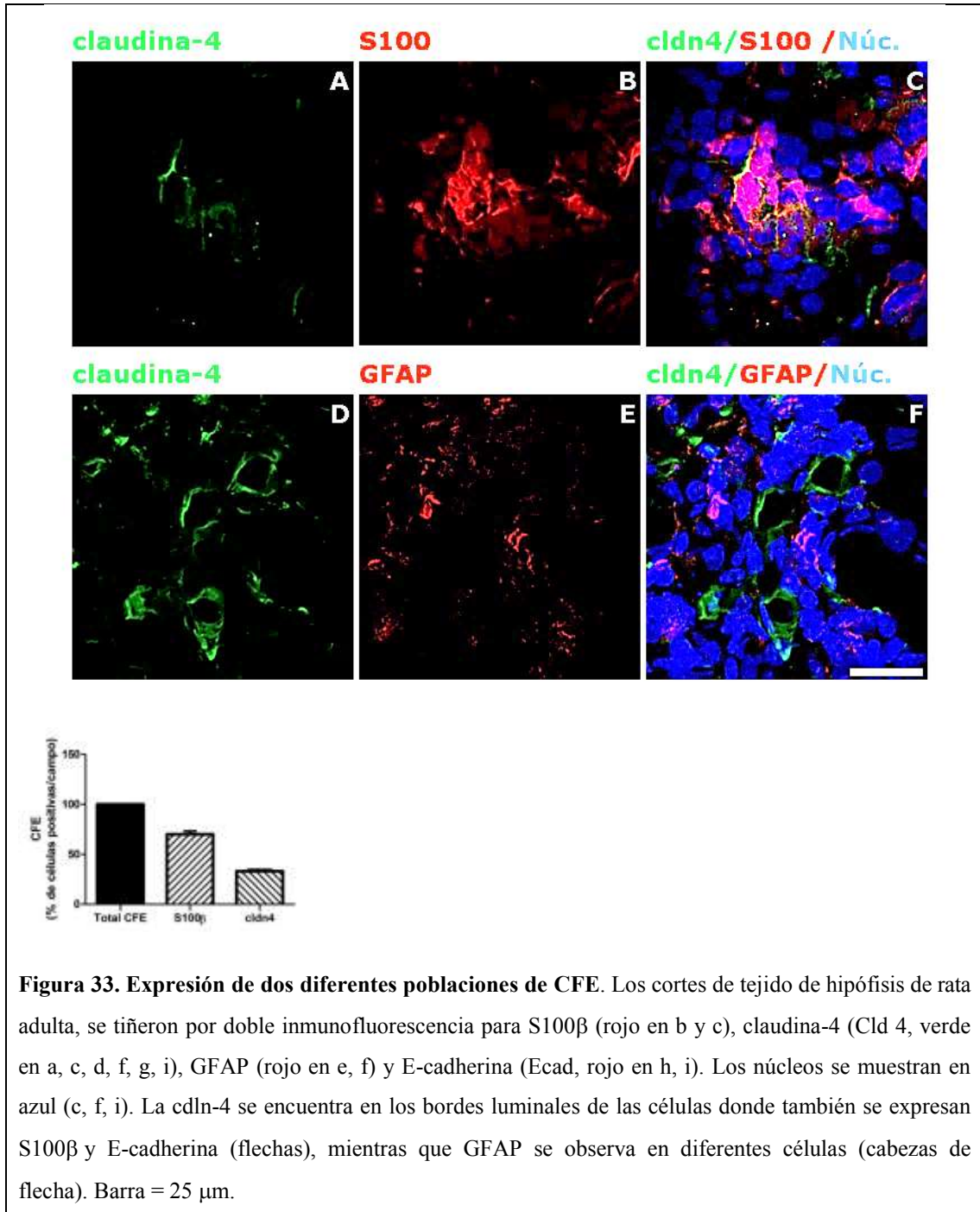


Figura 32: Las CFE pueden expresar simultáneamente GFAP y vimentina. En los cultivos primarios de la hipófisis anterior, se pueden encontrar a los diez días de cultivo, células con forma aplanada que expresan tanto a GFAP (verde, A y C) como a vimentina (rojo, B y C). En amarillo se ve la colocación de ambas proteínas (C). Los núcleos se tiñeron en azul. Barra = 25 μ m.

9.3 Las CFE epiteliales expresan cldn4

Dado que las CFE forman un epitelio de baja permeabilidad y alta resistencia (Wilfinger *et al.* 1984; Ferrara *et al.* 1987), se investigó si las CFE foliculares expresan cldn4, una claudina que confiere estas características (Van Itallie *et al.* 2001). En la figura 33 se observa que los anticuerpos contra cldn4 (verde) marcan células alrededor de lúmenes, que también expresan a la proteína S100 β (rojo). Dado que este patrón de expresión periluminal no se observa en las hipófisis anteriores teñidas con anticuerpos contra GFAP (*vide supra*), se espera que las CFE epiteliales que expresan cldn4, no expresen GFAP. En la figura 33 se demuestra que éste es el caso y que existen dos tipo de poblaciones de CFE: una epitelial que expresa cldn4 y S100 β y otras tres de tipo glial. Se evaluó la proporción de la subpoblación epitelial, encontrando que constituye el 33% de las CFE (figura 33). Cabe esperar que esta

subpoblación sea la misma que Chauvet *et al.* (2009) y Kikuchi *et al.* (2007) demostraron que expresa E-cadherina. Para confirmar dicha expectativa se realizaron dobles tinciones para cldn4 (verde) y E-cadherina (rojo) observándose que colocalizan alrededor de los lúmenes (figura 34).



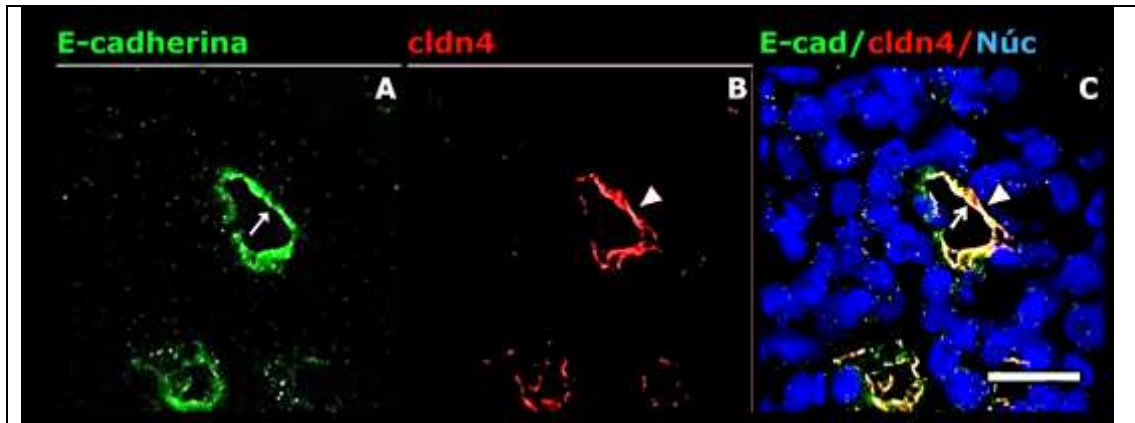


Figura 34. Las CFE epiteliales expresan E-cadherina. Doble inmunotinción para E-cadherina (verde, A y C) y cln4 (rojo, B y C). Los núcleos se muestran en azul (C). Ambas proteínas se observan rodeando lúmenes en las mismas células (amarillo, C). Barra = 20 μ m

Para caracterizar en mayor profundidad a las CFE epiteliales se investigó si expresan proteínas típicas de las microvellosidades y del cilio mayor. Como se observa en la figura 35 las células que expresan cln4 (verde) también expresan DPPIV (rojo), un marcador del borde en cepillo de las células epiteliales (Girardi *et al.* 2001), así como tubulina acetilada (rojo), una proteína presente principalmente en los cilios mayores (Ishikawa *et al.* 2011, Larre *et al.* 2011). Así pues, las CFE epiteliales conforman una subpoblación homogénea que expresa E-Cad, DPPIV, tubulina acetilada y cln4, con fenotipo de epitelio de transporte de alta resistencia.

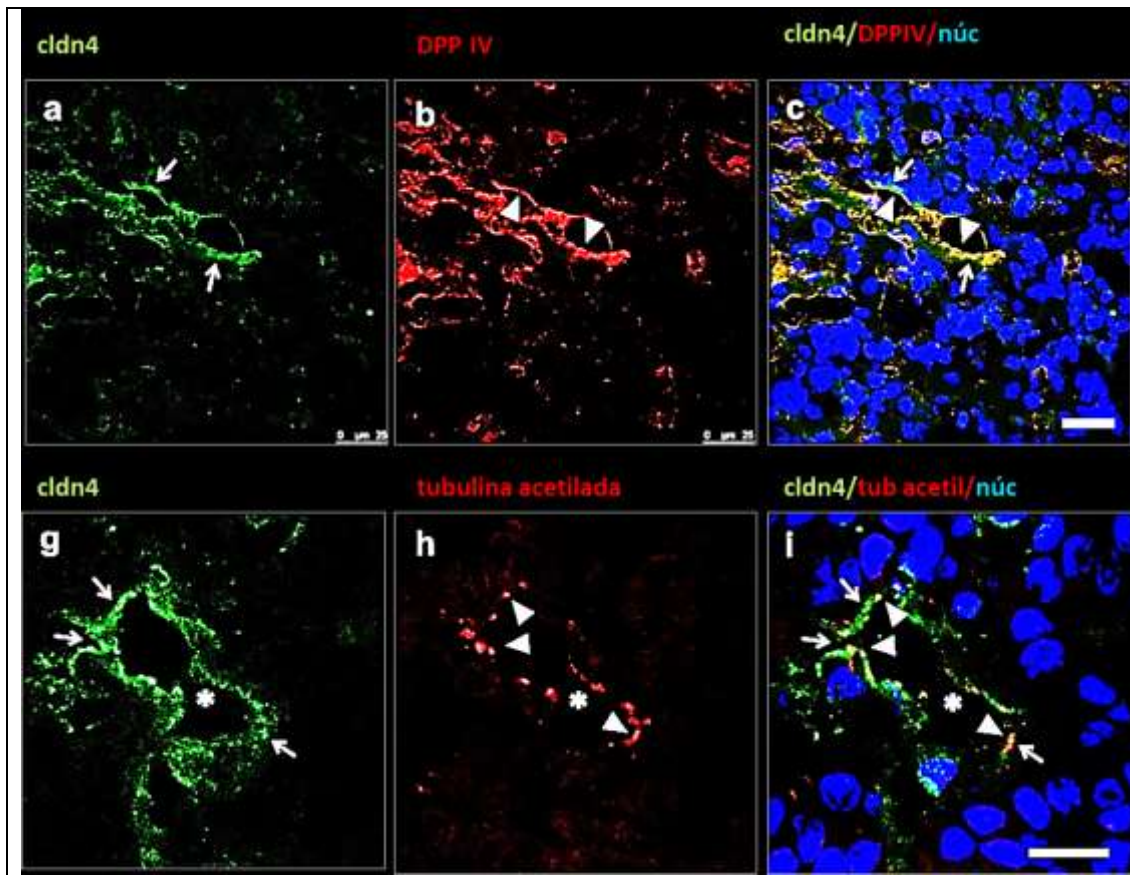
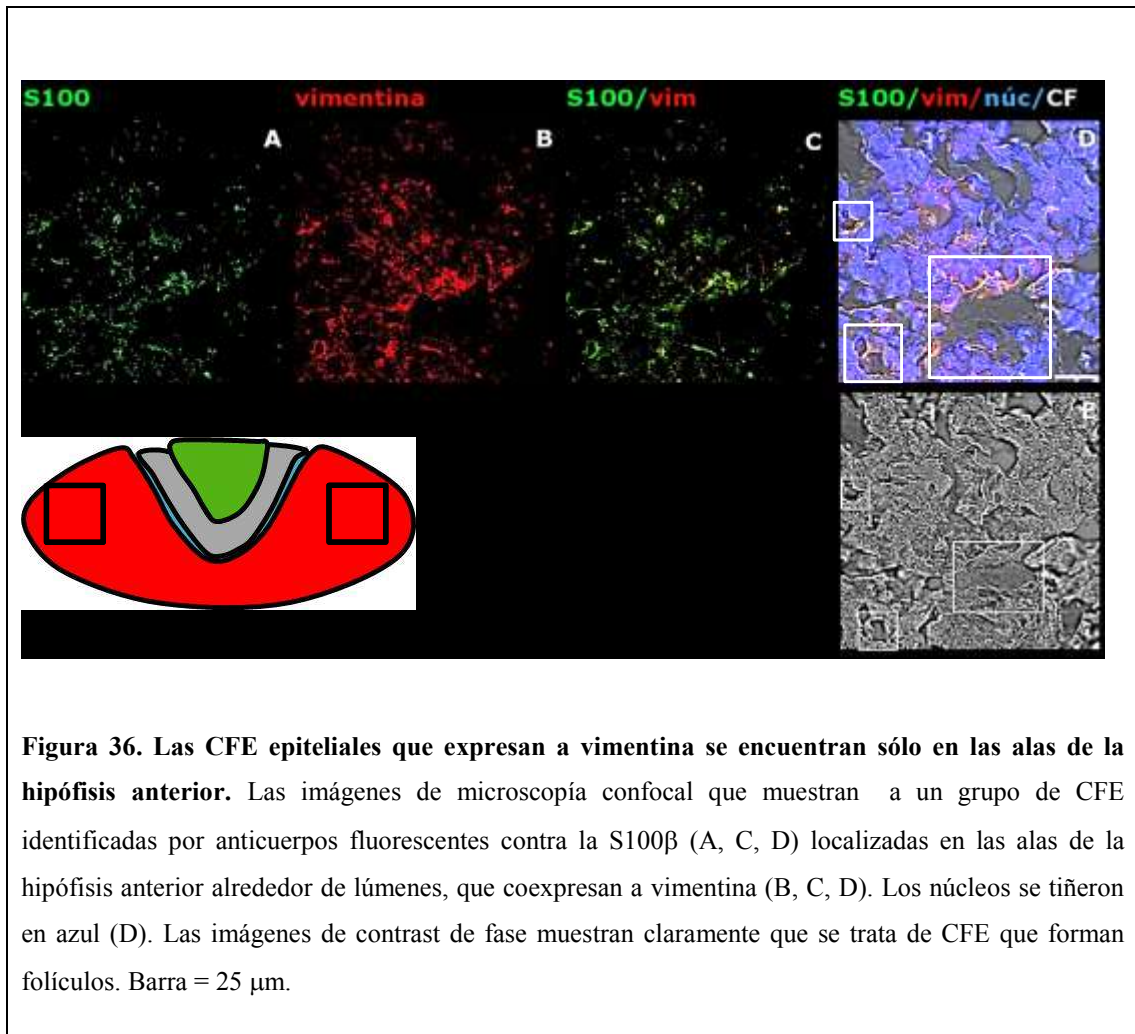


Figura 35. Las CFE epiteliales expresan proteínas típicas de las microvellosidades y el cilio mayor. Los cortes de tejido de la hipófisis anterior se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra cldn4 (verde; a, c, g, i), DPPIV (rojo; b y c) y tubulina acetilada (rojo; h, i). Los núcleos se tiñeron en azul (c,i). La cldn4 se señala con flechas, DPPIV y tubulina acetilada se señalan con cabezas de flecha. Estas proteínas se expresan en las mismas células alrededor de los lúmenes (asterisco en g, h, i). Barra = 25 μ m.

Se sabe que algunas CFE periluminales expresan vimentina y que, como se demuestra en esta tesis, esta proteína sólo se encuentra en las alas de la hipófisis anterior (*vide supra*). De manera que el siguiente experimento se dedicó a demostrar si, en las alas de la hipófisis anterior, las células que expresan vimentina se localizan alrededor de lúmenes. La figura 36 muestra CFE teñidas con anticuerpos fluorescentes contra la proteína S100 β (verde) y la vimentina (rojo). La imagen de

contraste de fases nos permite mostrar que la marca se encuentra, en su mayoría, alrededor de los lúmenes.



9.4 En los vasos sanguíneos de la adenohipófisis se expresan cldn2 y cldn5

En la hipófisis ocurre un flujo de agua y sales muy abundante asociado a la secreción de hormonas (Lafont *et al.* 2010; Schaeffer *et al.* 2010), lo que concuerda con el hecho de que las CFE expresan acuaporina 4 (Matsuzaki *et al.* 2011). Otra proteína que permite el paso de agua y iones, a través de la ruta paracelular, es la cldn2. Dado

que las CFE epiteliales son de alta resistencia y expresan *cldn4*, no se espera que expresen esta claudina. Sin embargo, como se muestra en la tabla de la figura 37, los mensajeros de *cldn2* y *cldn4* (B) se expresan en la hipófisis anterior, así como también lo hacen las proteínas respectivas (C). La doble tinción en rebanadas de hipófisis anterior muestra un patrón en mosaico de la *cldn4* (rojo, A) con la *cldn2* (verde), indicando que se expresan en diferentes células. Las células endoteliales tienen UOs que expresan a la *cldn5* y a la cadherina vascular-endotelial. Ambas proteínas (rojo) colocalizan con la *cldn2* (verde) en la hipófisis anterior e intermedia, pero no en la hipófisis posterior que solo expresa *cldn5* (figura 38). Esto es un hallazgo interesante dado que, hasta donde tenemos conocimiento, *cldn2* y 5 no se expresan en las mismas células.

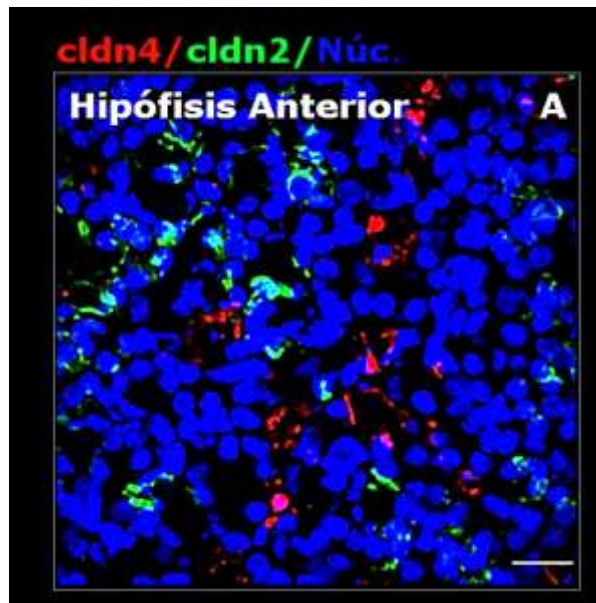
En resumen:

1) S100 β es el marcador que expresan la mayoría de las CFE (75 %), pero que también hay CFE que no la expresan (20 %).

2) Las CFE epiteliales existen en dos subpoblaciones: ambas expresan a la S100 β , la mayor de estas subpoblaciones expresan además a la *cldn4*, E-cadherina, DPPIV y tubulina acetilada y corresponden al 33 % del total de CFE y la segunda, más pequeña, periluminal, localizada en las alas de la hipófisis anterior, expresa vimentina.

3) Las CFE estelares se presentan en tres subpoblaciones gliales: una que expresa solo a GFAP (20 %), otra que expresa GFAP y vimentina, y una tercera que expresa GFAP/ S100 β (15 %).

4) Las CFE estelares que expresan solo a la S100 β (27 %).



B

Muestra	<i>cldn2</i>	<i>cldn4</i>	<i>gapdh</i>
Hipófisis	30.4 ± 0.1	18.9 ± 0.1	14.5 ± 0.1
Riñón	22.9 ± 0.3	18.7 ± 0.3	14.0 ± 0.2

C

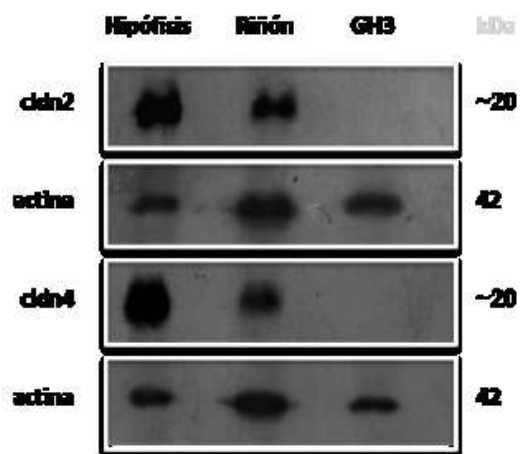
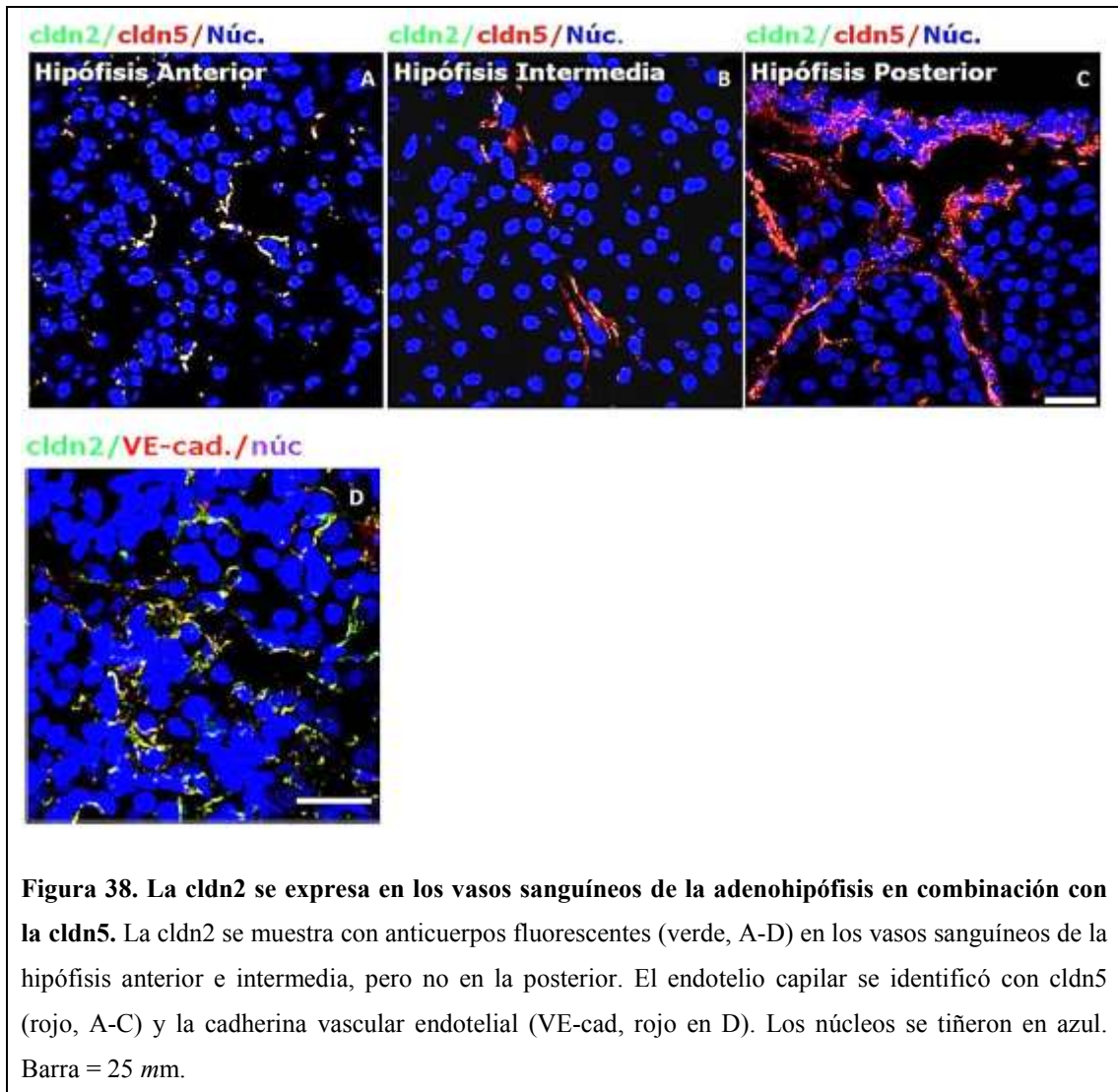
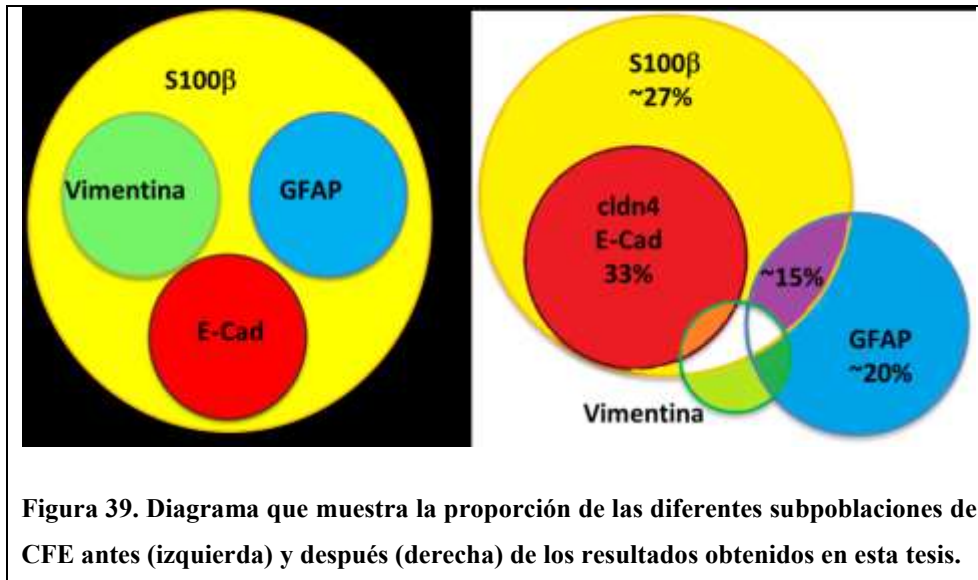


Figura 37. Presencia de *cldn2* en el tejido de la hipófisis anterior. Además de la *cldn4*, se encontró la expresión tanto del mensajero por RT-PCR (B) como de la proteína por Western blot (C, dos diferentes ensayos) de *cldn2* en homogenados de tejido de la hipófisis anterior. En ambos casos se usaron homogenados de riñón como control positivo. La línea celular de adenoma de rata GH3 se utilizó como control negativo para el Western blot. Una doble tinción con anticuerpos fluorescentes en cortes histológicos contra *cldn4* (rojo en A) y *cldn2* (verde en A), muestra un patrón de mosaico, lo que indica que estas proteínas se expresan en células diferentes. Barra = 50 mm. Los datos de la RT-PCR corresponden a la media ± la DE de cuatro diferentes muestras.



Las evidencias indican además que la subpoblación de células gliales que expresan GFAP y vimentina es muy pequeña. No se puede descartar que existan subpoblaciones de CFE que solo expresen vimentina, y de estelares que no expresen ninguno de los marcadores estudiados.



10. Discusión

10.1 Las CFE son una mezcla de subpoblaciones celulares

Inicialmente se había considerado que las las CFE conformaban un tipo celular con dos fenotipos: el estelar y el folicular. Los resultados posteriores demostraron que hay más de estas dos poblaciones iniciales y los de esta tesis amplían el rango a por lo menos cinco subpoblaciones, con la posibilidad de que puedan aumentar en algunas más. De manera que las CFE son en realidad una mezcla de subpoblaciones. Las diferencias entre los tipos de subpoblaciones son notables, el caso más extremo lo representan las estelares y las epiteliales, cuyas diferencias son tan grandes que se puede plantear que son dos tipos distintos de células.

Mientras que las células granulares se clasificaron con base en dos características concretas, si tienen gránulos y en el tipo de hormona que sintetizan, la categoría de las CFE se conformó por su forma (estelares o epiteliales) y por no tener gránulos ni sintetizar hormonas, es decir, se les excluyó del grupo de las granulares.

De hecho no se sabe que subpoblación de CFE sintetiza factores de crecimiento, cuál responde al estrés ni cuál realiza la fagocitosis. Los resultados de esta tesis muestran que ni siquiera hay un marcador molecular universal. Por estas razones puede proponerse que las CFE son, en realidad varios tipos celulares distintos, tal como sucedió con la “neuroglía”, que ahora se sabe se compone de distintas células: microglia, oligodendrocitos, astrocitos y tanicitos (Toledano *et al.* 2016). En la medida que se conozca que función realiza cada subpoblación, se tendrá más evidencia para apoyar esta posibilidad.

10.2 Las CFE se identifican mejor con el doble marcaje de S100 β y GFAP

Tal vez porque la expresión de la proteína S100 β fue la primera en estudiarse y resultó la más abundante, se aceptó que constituía la característica distintiva de todas las CFE. Los resultados de esta tesis llaman la atención al hecho de que la proteína S100 β , si bien marca a la mayoría de las CFE, no es un marcador universal, pues encontramos un 20 % de células que expresan GFAP pero no S100 β . Si bien el uso de anticuerpos contra S100 β garantiza un marcaje del 75 % del total de CFE, una mejor estimación demanda usar, además, anticuerpos contra GFAP, por lo que sugerimos que en los estudios futuros se use la combinación de anticuerpos contra S100 β y GFAP. Sin embargo, los experimentos realizados en esta tesis no descartan que existan células “estelares” que no expresen GFAP ni S100 β y sugieren que una subpoblación pequeña de células “estelares” expresan solo vimentina. Así pues, no existe un marcador universal que caracterice a las CFE.

10.3 Las CFE “estelares” son de fenotipo glial

Las CFE “estelares” se caracterizan por su peculiar forma de estrella, la expresión de la GFAP, el transportador de agua acuaporina 4 (Matsuzaki *et al.* 2011), el transportador de glutamato, la enzima glutamina sintasa (Denef 2008; Shirasawa *et al.* 1999) y la proteína de matriz extracelular fibronectina (figura 14. Liu *et al.*, 1989). En esta tesis proponemos que las células CFE “estelares”, son en realidad de

naturaleza glial por lo que sugerimos el nombre de “CFE gliales”. Argumentamos sobre este punto en los siguientes incisos:

10.4 Las distintas subpoblaciones de CFE “estelares” pueden corresponder a distintos estadios de diferenciación de las CFE gliales

No sabemos cuál es la función de las subpoblaciones de CFE gliales que expresan vimentina en las alas de la hipófisis anterior pero es probable que sean células en proceso de diferenciación o células diferenciadas que se parezcan a la glía de Bergmann del cerebelo. Es decir, al ser células gliales es probable que tengan un origen similar al de los astrocitos del cerebro: una célula progenitora que expresa vimentina y que evoluciona a una célula intermedia que expresa vimentina y GFAP para finalmente obtener su estado diferenciado expresando solo GFAP o manteniendo la coexpresión de GFAP y vimentina (figura 40). En resumen esas subpoblaciones gliales de la hipófisis anterior, podrían ser estados intermedios de diferenciación o bien otro tipo de células gliales diferenciadas con diferentes funciones. Para probar ambas hipótesis, habría que seguir en el tiempo a estas células, ya sea en cortes histológicos o bien en un modelo de cultivo celular como el mostrado en la figuras 30 y 31 dónde observamos células que coexpresan vimentina y GFAP en días de cultivo tempranos o tardíos. En días tempranos de cultivo, las imágenes sugieren la expresión tanto de vimentina como de GFAP filamentosas en diferentes sitios de la misma célula lo cual se puede explicar como un estado de diferenciación intermedio ya que a los diez días de cultivo la expresión de ambas proteínas se observa en diferentes células, sin embargo a los diez días de cultivo, también existen células planas con expresión de ambas proteínas aunque en menor número que las que expresan sólo GFAP, sugiriendo la existencia de una subpoblación de CFE glial.

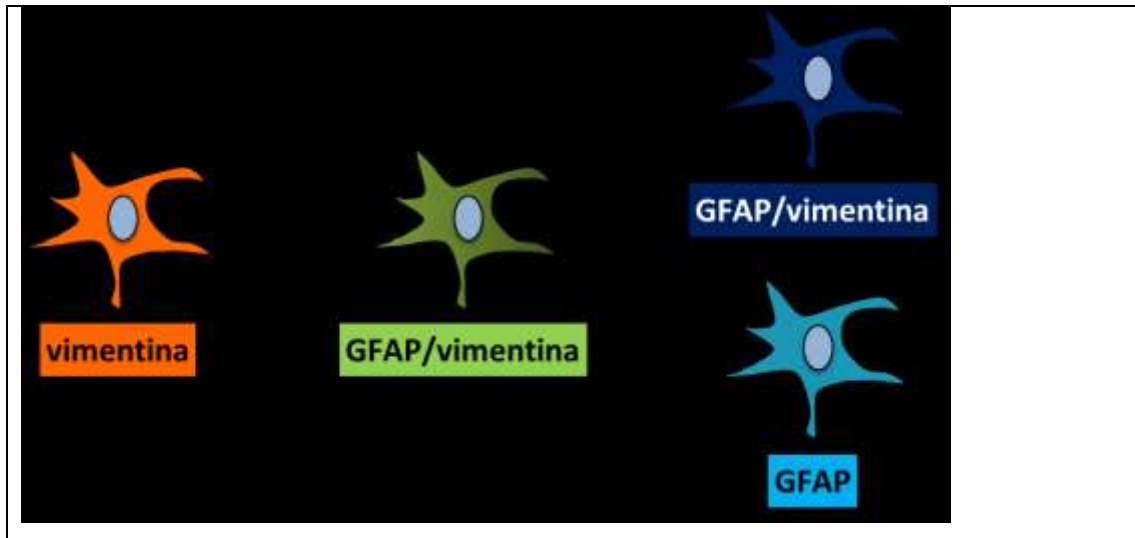


Figura 40. Las CFE estelares tienen un fenotipo glial y un intercambio de las proteínas de los FI durante el desarrollo, similar al de los astrocitos. Los detalles de esta figura se encuentran en el texto.

10.5 Las CFE epiteliales constituyen un epitelio de transporte

Como se muestra en el presente estudio, las UOs de las CFE epiteliales expresan *cldn4*. Este resultado concuerda con que las UOs de las CFE desarrollan de 7 a 11 filamentos (Wilfinger *et al.* 1984) y resistencias transepiteliales de varios cientos de $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Ferrara *et al.* 1987). No se conoce un epitelio que exprese un solo tipo de *cldn*. En el sistema renal, por ejemplo, la *cldn4* se expresa en el túbulo contorneado distal, caracterizado por su baja permeabilidad transepitelial y su alta resistencia eléctrica transepitelial (Reyes *et al.* 2002; Van Itallie *et al.* 2001). La *cldn-2*, por el contrario, se especializa en transportar cationes y agua (Amasheh *et al.* 2002; Rosenthal *et al.* 2010) a través de la ruta paracelular, en el túbulo contorneado proximal (Muto *et al.* 2010; Reyes *et al.* 2002), donde participa en la reabsorción del Na^+ (Furuse *et al.* 2001). Por otro lado, hay un grupo de proteínas de las UOs que son ubicuas, como la *cldn1*, ocludina, ZO1, ZO2 y ZO3, por lo que cabría esperar que estos componentes de las UOs también se expresen en la hipófisis anterior.

Las claudinas suelen expresarse en combinaciones, en parte porque forman canales paracelulares heterogéneos. Así, la *cldn16* forma canales paracelulares de Ca^{2+} junto con la *cldn19* (Hou *et al.* 2005). Un par que suele expresarse es el de la *cldn4* con la *cldn8* (Hou *et al.* 2010; Molina-Jijón *et al.* 2017) por lo que es posible que se exprese también la *cldn8* en la hipófisis anterior. Debe de realizarse una serie de experimentos para detectar por microscopía qué otras claudinas, además de la *cldn4*, se expresan en la hipófisis anterior y si lo hacen de manera regionalizada.

Lo que resta averiguar de las CFE epiteliales, es su distribución en la hipófisis anterior y su capacidad de regular el medio hidroelectrolítico del tejido hipofisiario, así como las implicaciones que lo anterior tiene en la organización funcional de la glándula. Es importante este último punto ya que se sabe que las células granulares no se distribuyen aleatoriamente en la hipófisis anterior, por el contrario, forman cordones homotípicos regionalizados (Mollard *et al.* 2012). Todavía más, tanto una población de CFE como las células somatotropas expresan el mRNA y la proteína de cadherina 18, uniéndose por medio de uniones adherentes entre ellas (Chauvet *et al.* 2009).

10.6 ¿Qué se transporta en el epitelio de la hipófisis anterior y hacia dónde?

En los trabajos estructurales iniciales, se observó una organización de la hipófisis anterior en folículos, donde las células de tipo epitelial rodean pequeños lúmenes (Vila-Porcile 1972, Yoshida 1966). Dentro de esos lúmenes se encontró material coloidal que se sabe está formado por los productos de la degradación de las células granulares (Ciocca y Gonzalez 1978; Claudius *et al.* 2006). El modelo de organización de las CFE que surgió de estos resultados (Vila-Porcile 1972) consideraba a los folículos como cisternas o quistes, pues no se detectaban ni entradas ni salidas de ellos y se creía que su función era la de almacenar productos de desecho. Sin embargo, las imágenes preliminares obtenidas en este laboratorio, muestran la presencia de CFE identificadas por anticuerpos fluorescentes contra la S100 β con forma de tubos, obtenidas de cortes histológicos de hipófisis anterior de rata adulta de

60 μm de ancho. Estas rebanadas de tejido son mucho más gruesas que aquellas con las que se ha estudiado comúnmente a la glándula, permitiendo de este modo el estudio de las estructuras de la hipófisis anterior, así como su distribución y orientación (figura 41). Las CFE tubulares como las de la figura 41 se encuentran en su mayoría en la región ventral de la hipófisis anterior, los tubos son sinuosos y de diferente diámetro, ya sea paralelos al borde de la glándula o en algunos casos perpendiculares. Estos datos concuerdan con el hecho de que las CFEs forman un epitelio de transporte como se mostró en esta tesis. Falta por estudiar si estos tubos expresan *cldn4* como las CFE epiteliales, además de qué material transportan y hacia dónde. Dado que la silla turca donde se aloja la hipófisis, se encuentra cubierta por una doble membrana llamada *diafragma sellae*, misma que se compone por prolongaciones meníngeas (Sage *et al.* 1982) es factible formular la hipótesis de que el *diafragma sellae* y los tubos formados por las CFE transporten líquido cefaloraquídeo, que de comprobarse sería una segunda ruta de comunicación entre la hipófisis y el hipotálamo diferente a la del sistema porta.

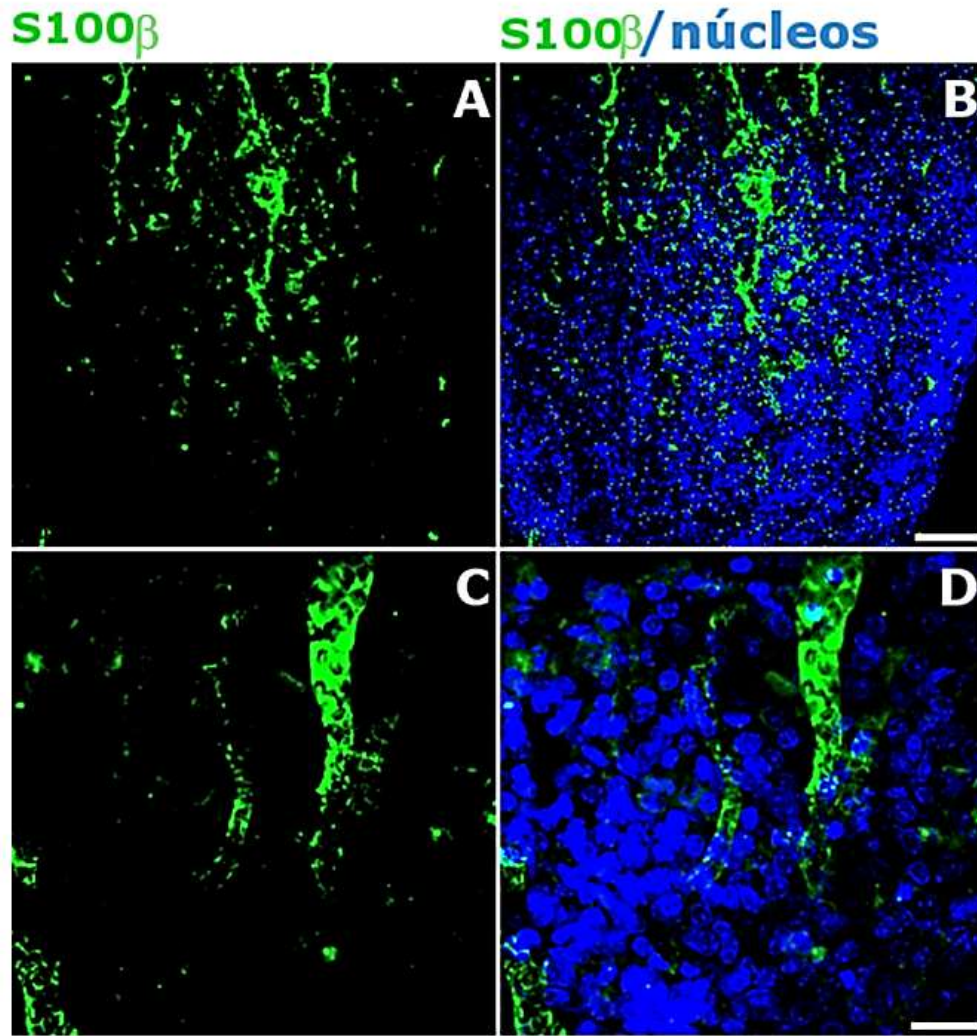


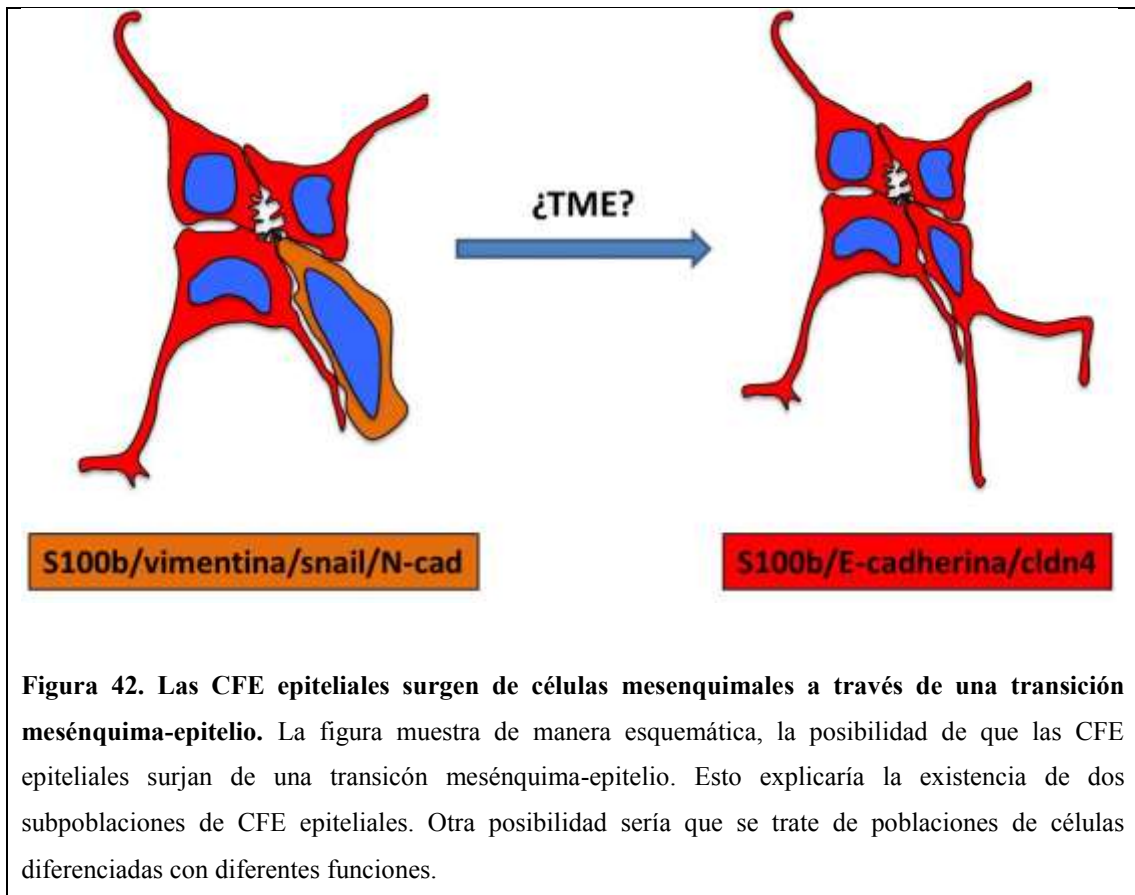
Figura 41. Las CFE epiteliales forman túbulos. En la figura se observa a las CFE identificadas con anticuerpos fluorescentes anti S100 β (verde) en cortes histológicos de la región ventral de la hipófisis anterior, en imágenes panorámicas (A, B) y acercamientos (C, D). Las CFE forman estructuras similares a tubos. Barra = 25 μ m.

10.7 La existencia de dos sub-poblaciones de CFE epiteliales encontradas en este estudio indica que podría haber distintos estadios de diferenciación de estas células

Las células epiteliales pierden sus características durante la transición epitelio mesénquima (TEM), es decir, pierden sus uniones intercelulares porque endocitan y degradan a las moléculas de adhesión, especialmente la E-cadherina, pero también a la ocludina, claudinas, desmoplakinas y plakofilinas. Los genes que codifican a estas proteínas se reprimen y entonces las células adquieren un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la expresión de los factores de transcripción de la familia de Snail, la adquisición de una forma alargada típica, el aumento de la expresión de N-cadherina y de motilidad celular, el desarrollo de la invasividad y la resistencia a la senescencia y a la apoptosis (Huang et al. 2012; Lamouille et al. 2014; Thiery et al. 2009; Vega et al. 2004; Wheelock et al. 2008). Algunas moléculas de las uniones intercelulares, como la β -catenina, se translocan al núcleo, donde funcionan como cofactores de la transcripción de proteínas mesenquimáticas (Lamouille et al. 2014; Lu et al. 2003; Niehrs 2012) y de la progresión al ciclo celular (Lamouille et al. 2014; Yang et al. 2010). Durante la TEM también se activa la expresión de la vimentina siendo el principal FI presente en las células, lo cual permite una mayor motilidad celular (Méndez et al. 2010).

Es probable que las CFE epiteliales con expresión de vimentina, sean células en TME y para probarlo habría que realizar cotinciones para *cldn4* y vimentina, averiguar si expresan N-cadherina y los factores de transcripción típicos de las células mesenquimales como *snail* o *slug*. Esta hipótesis se basa, además de los resultados de esta tesis, en el trabajo de Fu *et al.* 2012 donde se muestra que las células con S100 β localizadas en la zona de transición de la hipófisis anterior y en nichos esparcidos por el parénquima, también expresan Sox2, un factor de transcripción de células troncales. Si las CFE se originan en la zona de transición, es decir, en y alrededor del epitelio remanente de la bolsa de Rathke, tienen que migrar para colonizar el parénquima, de tal forma que se tendrían que transformar en una célula mesenquimal

que al insertarse en el folículo tendría que transformarse a su vez, de célula mesenquimal a epitelial (transición epitelio mesénquima, TME. Figura 42)



10.8 La cldn-2 endotelial

A diferencia de la cldn4 que aumenta la TER en los epitelios que la expresan (Van Itallie *et al.* 2001), la cldn2 hace que las UOs sean de baja resistencia y alta permeabilidad (Furuse *et al.* 2001), en particular al agua y al Na⁺ (Amasheh *et al.* 2002; Rosenthal *et al.* 2010), disminuyendo así la TER de los epitelios. Otro tejido que expresa UOs es el endotelial, donde se expresan principalmente cldn5 en las UOs (Morita *et al.* 1999) y VE-Cadherina en las uniones adherentes (Giannotta *et al.* 2013).

En esta tesis se mostró que las células endoteliales de la hipófisis anterior e intermedia expresan *cldn2* y *cldn5*, lo cual es un hallazgo interesante ya que no se conoce otro tejido que tenga la misma combinación de claudinas y por lo tanto tampoco se conocen las propiedades de permeabilidad que esta combinación le confiere a las UOs. Posiblemente se relacione con el hecho de que en la hipófisis anterior existen grandes flujos de agua y electrolitos entre la red de vasos capilares y el parénquima glandular, lo cual permite el flujo de hormonas (Schaeffer *et al.* 2010). Los vasos sanguíneos de la hipófisis anterior son capilares que se caracterizan por tener una capa de endotelio fenestrado y una membrana basal rodeada de pericitos que modulan el diámetro de estos (Rinehart and Farquhar 1955; Satoh *et al.* 1989; Schaeffer *et al.* 2010). La expresión de *cldn5* y *2* en los capilares de la adenohipófisis, sugiere que estos grandes flujos de agua y Na^+ ocurren por la vía paracelular.

11. Conclusiones

- Existen tres subpoblaciones de CFE gliales, dos epiteliales y otras CFE estelares que no son ni gliales ni epiteliales.
- Las poblaciones de CFE epiteliales y gliales son similares en número.
- Las CFE epiteliales expresan *cldn4*.

Estas conclusiones nos permiten hacer las siguientes afirmaciones:

Para medir a la población total de CFE es necesario marcarlas con S100 β y GFAP.

El número de CFE gliales es más apropiado para las CFE estelares.

Las CFE se distribuyen de manera regionalizada.

Los datos obtenidos sugieren que el transporte de iones en las CFE epiteliales es fundamentalmente transcelular y el transporte de iones y agua en el capilar tiene un componente importante paracelular debido a la presencia de *cldn2*.

11. Perspectivas

Investigar qué otras claudinas se expresan en las células de la hipófisis anterior y que implicaciones tienen en la función endocrina.

Investigar qué distribución tienen en la hipófisis anterior las CFE epiteliales.

Estudiar qué fenotipo celular sintetiza y libera los diferentes factores de crecimiento como FGF2, VEGF y TNF β .

Investigar si son las CFE gliales las que responden a los estímulos inmunológicos.

Investigar cómo surgen las diferentes poblaciones de CFE.

Investigar la existencia de una subpoblación de CFE que sólo expresa vimentina y cuál es su función.

12. Abreviaturas

ACTH. Hormona adrenocorticotropa.

Aqp4. Aquaporina 4.

ARNm. Ácido ribonucleico mensajero.

CFE. Células folículo estelares.

CFTR. Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística.

CG. Células granulares.

Cldn. Claudina.

Cnx43. Conexina 43.

DPPIV. Dipeptidil peptidasa IV.

EL. Espacio lacunar.

ENaC. Canal de sodio epitelial.

FGF. Factor de crecimiento fibroblástico.

FI. Filamentos intermedios.

FSH. Hormona folículoestimulante.

GFAP. Proteína ácida glial fibrilar.

GFP. Proteína verde fluorescente.

GH. Hormona de crecimiento.

HHNF. Hipercalciuria, hipomagnesemia con nefrocalcinosis familiar.

HRP. Peroxidasa de rábano.

IL-6. Interleucina 6.

INF γ . Interferón gama.

iNOS. Óxido nítrico sintetasa inducible.

LH. Hormona luteinizante.

MB. Membrana basal.

MEC. Matriz extracelular.

Mmp. Metaloproteinasa.

Mv. Microvellosidades.

NHE2. Intercambiador de sodio y protones 2.

nNOS. Óxido nítrico sintetasa neural.

NO. Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintetasa.

PCl⁻. Permeabilidad al cloro.

PNa⁺. Permeabilidad al sodio.

Prl. Prolactina.

RET. Resistencia eléctrica transepitelial.

TGF · . Factor de crecimiento tumoral beta.

TSH. Hormona estimulante de la tiroides.

UO. Uniones oclusoras.

VEGF. Factor de crecimiento vascular endotelial.

Vim. Vimentina.

13. Bibliografía

Aberle H, Schwartz H, Kemler R, (1996).

Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function.

J Cell Biochem; 61 (4): 514-523.

Allaerts W, Salomon B, Leenen P J, van Wijngaardt S, Jeucken P H, Ruuls S, Klatzmann D, Drexhage H, (1997).

A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells?

J Neuroimmunol; 78 (1-2): 184-197.

Allaerts W, Vankelecom H, (2005).

History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research.

European J Endo / European Fed Endo Soc; 153 (1): 1-12.

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2001).

Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells.

J Cell Sci; 115 (Pt 24): 4969-4976.

- Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R, (2002).
Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles.
Neuroscience; 109: 371–388.
- Arzt E, Páez Pereda M, Perez Castro C, Pagotto U, Renner U, Stalla GK, (1999).
Pathophysiological Role of the Cytokine Network in the Anterior Pituitary Gland.
Front Neuroendocrinol; 20: 71–95.
- Avila-Rodríguez D, Paisano-Cerón K, Valdovinos-Ramírez I, Solano-Agama C, Ortiz-Plata A, Mendoza-Garrido ME (2016).
Three-dimensional Alginate-bead Culture of Human Pituitary Adenoma Cells.
J Vis Exp; (108): 53637.
- Baudier J, Mochly-Rosen D, Newton A, Lee SH, Koshland DE Jr, Cole RD, (1987).
Comparison of S100b protein with calmodulin: interactions with melittin and microtubule-associated tau proteins and inhibition of phosphorylation of tau proteins by protein kinase C.
Biochemistry; 26 (10): 2886-2893.
- Bhattacharyya A, Oppenheim RW, Prevette D, Moore BW, Brackenbury R, Ratner N, (1992).
S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo.
J Neurobiol; 23 (4): 451-466.
- Bignami A, Raju T, Dahl D, (1982).
Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera.
Dev Biol; 91 (2): 286-295.

Bilezikjian LM, Leal AMO, Blount AL, Corrigan AZ, Turnbull AV, Vale WW, (2003).

Rat anterior pituitary folliculostellate cells are targets of interleukin-1 β and a major source of intrapituitary follistatin.

Endocrinology; 144: 732–740.

Blanco A, Gracia F, Jover A, (1978).

Ultraestructura de células y cavidades foliculares en adenohipófisis de sapo (*Bufo bufo*).

Archivos de zootecnia; 27 (107): 207-215.

Borst JGG, Lodder JC, Roubos EW, Kits KS, (1996).

In situ recordings of presumed folliculo-stellate cells in the intermediate lobe of the pituitary gland of *Xenopus laevis*.

Neurosci Lett; 209 (1): 61-64.

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W, (2006).

Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin.

Curr Opin Genet Dev; 16 (1): 51-59.

Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R, (2009).

S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: Implications For Astrocyte Development, Activation, And Tumor Growth.

J of biol chem; 284 (13): 8797-8811.

Cardin J, Carbajal M, Vitale M, (2000).

Biochemical and Morphological Diversity among Folliculo-Stellate Cells of the Mink (*Mustela vison*) Anterior Pituitary.

General and Comparative Endocrinology; 120: 75–87.

Cardell RR, (1969).

The ultrastructure of stellate cell in the pars distalis of the salamander pituitary gland.
Am J Anat; 126 (4): 429-455.

Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD, (1978).

Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support.

J Cell Biol; 77(3): 853-80.

Cereijido M, Contreras RG, Shoshani L (2004).

Cell Adhesion, Polarity, and Epithelia in the Dawn of Metazoans.
Physiol Rev; 84: 1229–1262.

Chaffer CL1, Thompson EW, Williams ED, (2007).

Mesenchymal to epithelial transition in development and disease.

Cells Tissues Organs; 185 (1-3): 7-19.

Chauvet N, El-Yandouzi T, Mathieu Marie, Schlernitzauer A, Galibert E, Lafont C, Le Tissier P, Robinson I, Mollard P, Coutry N, (2009).

Characterization of adherens junction protein expression and localization in pituitary cell networks.

J endocrinol; 202 (3): 375-387.

Chen L, Maruyama D, Sugiyama M, Sakai T, Mogi C, Kato M, Kurotani R, Shirasawa N, Takaki A, Renner U, Kato Y, Inoue K, (2000).

Cytological characterization of a pituitary folliculo-stellate-like cell line, Tpit / F1, with special reference to adenosine triphosphate-mediated neuronal nitric oxide synthase expression and nitric oxide secretion.

Endocrinology; 141: 3603-3610.

Chou YH, Ngai KL, Goldman R, (1991).

The regulation of intermediate filament reorganization in mitosis. p34cdc2 phosphorylates vimentin at a unique N-terminal site.

J Biol Chem; 266 (12): 7325-7328.

Ciocca D, Gonzalez C, (1978).

The pituitary cleft of the rat: an electron microscopic study.

Tissue & Cell; 10 (4): 725-733

Claude P, Goodenough DA, (1973).

Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia.

J Cell Biol; 58(2): 390-400.

Claudius L, Yoshimi Y, Yoichiro H, Gabriel M, Koichi M, (2006).

Phagocytotic removal of apoptotic endocrine cells by folliculostellate cells and its functional implications in clusterin accumulation in pituitary colloids in helmeted guinea fowl (*Numida meleagris*).

Acta histochemica; 108: 69-80.

Cocchia D, Miani N, (1980).

Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat.

J Neurocytol; 9: 771-782.

Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C, (1994).

Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype.

Cell; 79 (4): 679-694.

Danila DC, Zhang X, Zhou Y, Dickersin GR, Fletcher JA, Hedley-Whyte ET, Selig MK, Johnson SR, Klibanski A, (2000).

A human pituitary tumor-derived folliculostellate cell line.

J Clin Endocrinol Metab; 85 (3): 1180-1187.

Denef C, (2008).

Paracrinicity: The Story of 30 Years of Cellular Pituitary Crosstalk.

Journal of Neuroendocrinology; 20: 1-70

Devnath S, Inoue K, (2008).

An Insight to Pituitary Folliculo-Stellate Cells.

J Neuroendocrinology, 20: 687-691.

Donato R, (2001).

S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles.

I J Biochemistry & Cell Biology, 33 (7): 637-668.

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I, (2009).

S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal.

Biochimica et biophysica acta, 1793 (3): 1008-1022.

Drewett N, Jacobi JM, Willgoss DA, Lloyd HM, (1993).

Apoptosis in the Anterior Pituitary Gland of the Rat: Studies with Estrogen and Bromocriptine.

Neuroendocrinology, 57: 89-95.

Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvé A, Koteliansky V, Babinet C, Krieg T, (1998).

Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts.

J Cell Sci; 111 (Pt 13): 1897-1907.

Eng L F, Ghirnikar R S, Lee Y L, (2000).

Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000)

Neurochemical Research, 25: 1439–1451.

Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD, (2009).

Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments.

J Cell Sci; 117 (Pt 6): 919-932.

Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD, (2009).

Introducing intermediate filaments: from discovery to disease.

J. Clin. Invest., 119: 1763–1771.

Farquhar MG, (1957)

Corticotrophs of the rat adenohypophysis as revealed by electron microscopy.

Anat Rec; 127: 291.

Fauquier T, Guérineau NC, McKinney R, Bauer K, Mollard P, (2001).

Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary.

Proc Natl Acad Sci USA; 98 (15): 8891-8896.

Ferrara N, Fujii DK, Goldsmith PC, Widdicombe JH, Weiner RI (1987).
Transport epithelial characteristics of cultured bovine pituitary follicular cells.
Am J Physiol 252:E304–E312.

Ferrara N, Gospodarowicz D, (1988).
Regulation of ion transport in hypophysial pars intermedia follicular cell monolayer.
Biochem Biophys Res Commun 157:1376–1382.

Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Gonçalves CA, (2004).
S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12.
Neurochemical research; 29 (4): 735-740.

Fu Q, Gremeaux L, Luque RM, Liekens D, Chen J, Buch T, Waisman A, Kineman R, Vankelecom H; (2012).
The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration.
Endocrinology; 153 (7): 3224-3235.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, (1993).
Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.
J Cell Biol; 123(6 Pt 2): 1777-1788.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S, (1998).
Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin.
J Cell Biol; 141(7): 1539-1550.

Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998).

A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts.

J Cell Biol;143 (2): 391-401.

Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001).

Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells.

J Cell Biol; 153 (2): 263-272.

Galou M, Colucci-Guyon E, Ensergueix D, Ridet JL, Gimenez y Ribotta M, Privat A, Babinet C, Dupouey P, (1996).

Disrupted Glial Fibrillary Acidic Protein Network in Astrocytes from Vimentin Knockout Mice.

J Cell Bio; 133(4): 853-863.

García-Godínez A, Contreras RG, González-Del-Pliego M, Aguirre-Benítez E, Acuña-Macías I, de la Vega MT, Martín-Tapia D, Solano-Agama C, Mendoza-Garrido ME, (2014).

Anterior and intermediate pituitary tissues express claudin 4 in follicle stellate cells and claudins 2 and 5 in endothelial cells.

Cell Tissue Res; 357: 309-321.

Giménez Y Ribotta M, Langa F, Menet V, Privat A, (2000).

Comparative anatomy of the cerebellar cortex in mice lacking vimentin, GFAP, and both vimentin and GFAP.

Glia; 31 (1): 69-83.

Giannotta M, Trani M, Dejana E, (2013).

VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity.

Developmental Cell; 26: 441-454.

Girardi AC, Degray BC, Nagy T, Biemesderfer D, Aronson PS, (2001).

Association of Na(+)-H(+) exchanger isoform NHE3 and dipeptidyl peptidase IV in the renal proximal tubule.

J Biol Chem; 276 (49): 46671-46677.

González B, Solano-Agama MC, González Del Pliego M, Mendoza-Garrido ME, (2004).

Differences in cell migration of cultured pituitary cells from infantile and adult rats: participation of the extracellular matrix and epidermal growth factor.

Int J Dev Neurosci; 22 (4): 231-239.

Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL (2000).

Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules.

Kidney Int; 57(6): 2386-2402.

González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003).

Tight junction proteins.

Progress in Biophysics & Molecular Biology; 81: 1-44.

González-Mariscal L, Lechuga S, Garay E, (2007).

Role of tight junctions in cell proliferation and cancer.

Prog Histochem Cytochem; 42(1): 1-57.

Gonçalves DS, Lenz G, Karl J, Gonçalves CA, Rodnight R (2000).
Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures.
Neuroreport; 11 (4): 807-809.

Gospodarowicz D, Lau K, (1989)
Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin.
Biochemical and biophysical research communications; 165 (1): 292-298.

Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW, (2002).
S100 proteins: structure, functions and pathology.
Front Biosci; 7: d1356-d1368.

Hentges S, Boyadjieva N, Sarkar K (2000).
Transforming Growth Factor- β 3 Stimulates Lactotrope Cell Growth by Increasing
Basic Fibroblast Growth Factor from Folliculo-Stellate Cells.
Endocrinology; 141(3): 859-867.

Hirano S, Takeichi M, (2012).
Cadherins in brain morphogenesis and wiring.
Physiol Rev; 92 (2): 597-634.

Hodson DJ, Romanò N, Schaeffer M, Fontanaud P, Lafont C, Fiordelisio T, Mollard
P, (2012).
Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ.
Cell Calcium; 51 (3-4): 222-230.

Höfler H, Walter GF, Denk H, (1984).
Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses
and in pituitary adenomas.
Acta neuropathological; 65(1): 35-40.

- Hong JY, Oh IH, McCrea PD, (2016).
Phosphorylation and isoform use in p120-catenin during development and tumorigenesis.
Biochim Biophys Acta.; 1863 (1): 102-114.
- Horiguchi K, Kikuchi M, Kusumoto K, Fujiwara K, Kouki T, Kawanishi K, Yashiro T, (2010).
Living-cell imaging of transgenic rat anterior pituitary cells in primary culture reveals novel characteristics of folliculo-stellate cells.
J Endo; 204 (2): 115-123.
- Horiguchi K, Fujiwara K, Yoshida S, Higuchi M, Tsukada T, (2014).
Isolation of dendritic-cell-like S100 β -positive cells in rat anterior pituitary gland.
Cell Tissue Res; 357, 301-308.
- Horiguchi K, Fujiwara K, Tsukada T, Yako H, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Yashiro T, Kato T, Kato Y, (2016).
Expression of Slug in S100 β -protein-positive cells of postnatal developing rat anterior pituitary gland.
Cell Tissue Res; 363: 513-524.
- Hou J, Rajagopal M, Yu AS L, (2013).
Claudins and the kidney.
Annu.Rev.Physiol; 75: 479-501.
- Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ, (1996).
S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes.
J Biol Chem; 271 (5): 2543-2547.

- Hang RY, Guilford P, Thiery JP (2012).
Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition.
J Cell Sci; 125 (Pt 19): 4417-4422.
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H (2000).
Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins
through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation.
J Biol Chem; 275 (51): 40096-40105.
- Inagaki M, Nishi Y, Nishizawa K, Matsuyama M, Sato C, (1987).
Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro.
Nature; 328 (6131): 649-652.
- Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N, (1994).
Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation.
Brain Path; 4(3): 239-243.
- Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K, Nakazato Y, Ito A, (1992).
Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a murine thyrotropic pituitary
tumor. Endocrinology; 131: 3110–3116.
- Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S, (1999).
The Structure and Function of Folliculo-Stellate Cells in the Anterior Pituitary Gland.
Arch. Hystol. Cytol. 62(3): 205-218.
- Ishikawa H, Nogami H, Shirasawa N, (1983).
Novel clonal strain from adult rat anterior pituitary producing S-100 protein.
Nature; 303 (23): 711-713.

Ishikawa H, Marshall WF (2011)

Ciliogenesis: building the cell's antenna.

Nat Rev Mol Cell Biol; 12 (4):222-234.

Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ (2005).

PKC epsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility.

EMBO J; 24 (22): 3834-3845.

Iwatsuki H, Suda M, (2010).

Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function.

Acta Histochem Cytochem; 43 (2): 19-31.

Jarry H, Leonhardt S, Schmidt WE, Creutzfeldt W, Wuttke W, (1992).

Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on in vivo and in vitro prolactin and growth hormone release in male rats.

Life Sci; 51: 823–830.

Jin L, Tsumanuma I, Ruebel KH, Bayliss JM, Lloyd RV, (2001).

Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction.

Endocrinology; 142: 1703–1709.

Kalluri R, Weinberg RA, (2009).

The basics of epithelial-mesenchymal transition.

J Clin Invest; 119(6):1420-1428.

Kikuchi M, Yatabe M, Fujiwara K, Takigami S, Sakamoto A, Soji T, Yashiro T, (2006).

Distinctive localization of N- and E-cadherins in rat anterior pituitary gland.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol; 288 (11): 1183-1189.

Kikuchi M, Yatabe M, Kouki T, Fujiwara K, Takigami S, Sakamoto A, Yashiro T, (2007).

Changes in E- and N-cadherin expression in developing rat adenohypophysis.
Anatomical record; 290(5): 486-490.

Kornreich M, Avinery R, Malka-Gibor E, Laser-Azogui A, Beck R, (2015).

Order and disorder in intermediate filament proteins.
FEBS Lett; 589 (19 Pt A): 2464-76.

Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP, (2006).

The desmosome: cell science lessons from human diseases.
J Cell Sci; 119 (Pt 5): 797-806.

Kreplaka L, Aebia U, Herrmann H, (2004).

Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments.
Exp Cell Res; 301(1):77-83.

Lafont C, Desarménien MG, Cassou M, Molino F, Lecoq J, Hodson D, Lacampagne A, Mennessier G, El Yandouzi T, Carmignac D, Fontanaud P, Christian H, Coutry N, Fernandez-Fuente M, Charpak S, Le Tissier P, Robinson ICF, Mollard P, (2010).

Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function.
Proc Natl Acad Sci U S A; 107(9):4465-70.

- Lamacz M, Tonon MC, Louiset E, Cazin L, Vaudry H, (1991).
The intermediate lobe of the pituitary, model of neuroendocrine communication.
Arch Int Physiol Biochim Biophys; 99 (3): 205-219.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R, (2014).
Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.
Nature reviews. Molecular cell biology; 15 (3): 178-196.
- Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB, (1996).
Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase.
Cell Calcium; 20 (3): 279-285.
- Larre I, Castillo A, Flores-Maldonado C, Contreras RG, Galvan I, Muñoz-Estrada J, Cerejido M, (2011).
Ouabain modulates ciliogenesis in epithelial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A; 108 (51): 20591-20596.
- Lerner AB, (1993).
The discovery of the melanotropins. A history of pituitary endocrinology.
Ann N Y Acad Sci; 680: 1-12.
- Liu YC, Tanaka S, Inoue K, Kurosumi K, (1989).
Localization of fibronectin in the folliculo-stellate cells of the rat anterior pituitary by the double bridge peroxidase-antiperoxidase method.
Histochemistry; 92 (1): 43-45.
- Lohrer P, Gloddek J, Nagashima AC, Korali Z, Hopfner U, Paez-Pereda M, Arzt E, Stalla GK, Renner U, (2000).
Lipopolysaccharide Directly Stimulates the Intrapituitary Interleukin-6 Production by Folliculostellate Cells via Specific Receptors and the p38alpha Mitogen-Activated Protein Kinase/Nuclear Factor kappaB Pathway.

Endocrinology; 141: 4457–4465.

Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T, (2003).

Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell*; 4 (6): 499-515.

Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ, (2006).

Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line.

Investigative ophthalmology & visual science; 47 (8): 3644-3655.

Marin F, Boya J, Lopez-Carbonell A, (1989).

Immunocytochemical localization of vimentin in stellate cells (Folliculo-stellate cells) of the rat, cat and rabbit pituitary pars distalis.

Anat Embryol; 179: 491-495.

Marsili V, Mancinelli L, Menchetti G, Fulle S, Baldoni F, Fanò G, (1992).

S-100ab increases Ca²⁺ release in purified sarcoplasmic reticulum vesicles of frog skeletal muscle.

J Muscle Res Cell Motil;13 (5): 511-515.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E, (1998).

Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration.

J Cell Biol; 142(1): 117-127.

Matsuzaki T, Inahata Y, Sawai N, Yang CY, Kobayashi M, Takata K, Ozawa H (2011).

Immunohistochemical Localization of the Water Channels AQP4 and AQP5 in the Rat Pituitary Gland.

Acta histochemica et cytochemica; 44 (6): 259-266.

Meda P, Pepper MS, Traub O, Willecke K, Gros D, Beyer E, Nicholson B, Paul D, Orci L (1993).

Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands.

Endocrinology; 133 (5): 2371-2378.

Mendez MG, Kojima S, Goldman RD (2010).

Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition.

FASEB J; 24 (6): 1838-1851.

Miller ML, Andringa A, Schultheis PJ, Shull GE, (2011).

Loss of the NHE2 Na⁺/H⁺ exchanger in mice results in dilation of folliculo-stellate cell canaliculi.

J Biomed Biotechnol; 2011: 1-14.

Mollard P, Schlegel W, (1996).

Why are endocrine pituitary cells excitable?

Trends Endocrinol Metab; 7(10): 361-365.

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S, (1999).

Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells.

J Cell Biol; 147 (1): 185–194.

Muto S, Furuse M, Kusano E (2011).

Claudins and renal salt transport.

Clin Exp Nephrol; 16: 61–67.

Nakajia T, Yamaguchi H, Takahashi K, (1980).

S 100 Protein in Folliculostellate Cells of the Rat Pituitary Anterior Lobe.

Brain Research, 191: 523-531.

Niehrs, (2012).

The complex world of WNT receptor signalling.

Nat Rev Mol Cell Biol; 13 (12):767-79.

Onions J, Hermann S, Grundström T, (1997).

Basic helix-loop-helix protein sequences determining differential inhibition by calmodulin and S-100 proteins.

J Biol Chem; 272 (38): 23930-23937.

Parry DAD, Strelkovb SV, Burkhardc P, Aebid U, Herrmanne H, (2007).

Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly.

Exp Cell Res; 313 (10): 2204-2216.

Patel S, Peter-Chen C, Bahna F, Shaphiro L, (2006).

Cadherin-mediated cell–cell adhesion: sticking together as a family.

Curr Opin Struct Biol; 13(6): 690-698.

Peinado H1, Ballestar E, Esteller M, Cano A, (2004).

Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex.

Mol Cell Biol; 24 (1): 306-319.

Pinto S, Kachar B (1982).

On tight-junction structure.

Cell; 28 (3): 441-450.

Pixley SK, de Vellis J, (1984).

Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin.

Brain Res; 317 (2): 201-209.

Ralton JE, Lu X, Hutcheson AM, Quinlan RA, (1994).

Identification of two N-terminal non-alpha-helical domain motifs important in the assembly of glial fibrillary acidic protein.

J Cell Sci; 107 (Pt 7): 1935-48.

Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme J-C, (2007).

S100B Expression Defines a State in Which GFAP-Expressing Cells Lose Their Neural Stem Cell Potential and Acquire a More Mature Developmental Stage.

Glia; 55: 165-177.

Reyes JL, Lamas M, Martin D, Namorado MC, Islas S, Luna J, Tauc M, González-Mariscal L, (2002).

The renal segmental distribution of claudins changes with development.

Kidney International; 62 (2): 476–487.

Rinehart JF, Farquhar MG, (1953)

Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland.

J Histochem Cytochem; 1: 93–113.

Rogan MP, Reznikov LR, Pezzulo A, Gansemer ND, Samuel M, Prather RS, Zabner J, Fredericks DC, McCray PB, Welsh MJ, Stoltz D, (2010).

Pigs and humans with cystic fibrosis have reduced insulin-like growth factor 1 (IGF1) levels at birth.

Proc Natl Acad Sci U S A; 107(47):20571-5.

Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich Beibei, Schulzke J-D, Amasheh S, Günzel D, Fromm M, (2010).

Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel.

J Cell Sci; 123 (Pt 11): 1913-1921.

Runembert I, Queffeuilou G, Federici P, Vrtovsnik F, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Trugnan G, Friedlander G, Terzi F, (2002).

Vimentin affects localization and activity of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts.

J Cell Sci; 115 (Pt 4): 713-724.

Sage MR, Blumbergs PC, Mulligan BP, Fowler GW, (1982).

The Diaphragma Sellae: Its Relationship to the Configuration of the Pituitary Gland.

Radiology; 145: 703-708.

Salero-Coca E, Vergara P, Segovia J (1995).

Intracellular increases of cAMP induce opposite effects in glutamic acid decarboxylase (GAD67) and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in C6 cells.

Neurosci Lett; 191 (1-2): 9-12.

- Santamaría-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS (2006).
Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family.
Biochem J, 396: 201-214.
- Satoh H, Inokuchi T, Shimizu M, Obayashi H, Nakashima Y, (1989).
Ultrastructure of the hypophyseal portal vessel in mature rats SEM and TEM
observations.
Kurume Med J; 36 (3): 91-94.
- Schaeffer M, Hodson, DJ, Lafont C, Mollard P, (2010).
Functional importance of blood flow dynamics and partial oxygen pressure in the
anterior pituitary.
Eur J Neurosci; 32 (12): 2087-2095.
- Schtzer J, Franke WW, Schachner M, (1981).
Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of
developing and adult mouse nervous system.
J Cell Biol; 90 (2): 435-447.
- Segovia J, Lawless GM, Tillakaratne NJ, Brenner M, Tobin AJ, (1994).
Cyclic AMP decreases the expression of a neuronal marker (GAD67) and increases
the expression of an astroglial marker (GFAP) in C6 cells.
J Neurochem; 63 (4): 1218-1225.
- Selinfreund RH, Barger SW, Welsh MJ, Van Eldik LJ, (1990).
Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell
morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation.
J Cell Biol; 111 (5 Pt 1): 2021-2028.

Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW, (1984).

Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein.

J Neurochem;42 (6): 1536-1541.

Shirasawa N, Yamanouchi H, (1999).

Glucocorticoids induce glutamine synthetase in folliculostellate cells of rat pituitary glands in vivo and in vitro.

J Anat; 194: 567–577.

Shirasawa N, Mabuchi Y, Sakuma E, Horiuchi O, Yashiro T, Kikuchi M, Hashimoto Y, Tsuruo Y, Herbert DC, Soji T, (2004).

Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: X. Immunohistochemistry of S-100 and connexin 43 of folliculo-stellate cells in the rat anterior pituitary gland.

Anat Rec Part A; 278 (1): 462-473.

Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T, Shea TB, Pant HC, (2007).

Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments.

Exp Cell Res; 313(10): 2098–2109.

Soji T, Herbert DC, (1989).

Intercellular communication between rat anterior pituitary cells.

Anat Rec; 224:523–533.

Soji T, Mabuchi Y, Kurono C, Herbert D C, (1997).

Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland.

Microscopy research and technique; 39 (2): 138-149.

- Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R, (1998).
Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells.
Biochimica et biophysica acta; 1448: 277-289.
- Sosa L, Gutiérrez S, Petiti J, Vaca A, De Paul A, Torres A, (2013).
Cooperative effect of E2 and FGF2 on lactotroph proliferation triggered by signaling initiated at the plasma membrane.
Am J Physiol Endocrinol Metab; 305: E41–E49,
- Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, MacLeod RM (1991).
Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro.
Endocrinology;128(6):2685-2692.
- Staehelin LA (1973).
Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions.
J Cell Sci; 13(3): 763-786.
- Stevenson BR, Anderson JM, Goodenough DA, Mooseker MS, (1988).
Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance.
J Cell Biol; 107(6 Pt 1): 2401-2408.
- Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y (2014).
Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions.
Science; 344 (6181): 304-307.
- Tixier-Vidal A, Gourdji D, Tougard C, (1975).
A Cell Culture Approach to the Study of Anterior Pituitary Cells.
Int Rev Cytol; 41: 173-239.

Toledano A, Álvarez MI, Toledano-Díaz A, Merino JJ, Rodríguez JJ, (2016).
Brain local and regional neuroglial alterations in Alzheimer's Disease: cell types,
responses and implications.
Curr Alzheimer Res;13(4): 321-342.

Toral C, Solano-Agama MC, Luna J, Romano MC, Mendoza-Garrido ME, (2003).
Epidermal growth factor induces an increase in cell adhesion and an arrangement of
actin skeleton in stress fibres in pituitary cultured cells from infantile rats but not
adult rats.
J cel phys; 195: 80-91.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M, (2001).
Multifunctional strands in tight junctions.
Nat Rev Mol Cell Biol; m2(4): 285-293.

Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO Jr. (1991).
Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic
chick and fetal rat.
Brain Res; 542 (2): 280-285.

Van Goor F, Zivadinovic D, Martinez-Fuentes AJ, Stojilkovic SS, (2001).
Dependence of pituitary hormone secretion on the pattern of spontaneous voltage-
gated calcium influx. Cell type-specific action potential secretion coupling.
J Biol Chem; 276(36): 33840-33846.

Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM, (2001).
Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a
selective decrease in sodium permeability.
J Clin Invest; 107(10): 1319-1327.

Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Denef C, (1989).
Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in
a histiotypic cell aggregate culture system.
Neuroendocrinology; 49 (1): 102-106.

Velasco ME, Roessmann U, Gambetti P, (1982).
The presence of glial fibrillary acidic protein in the human pituitary gland.
J Neuropathol Exp Neurol; 41: 150-163.

Vila-Porcile E, (1972).
Le réseau des cellules folliculo-stellaires et les follicules de l'adénohypophyse du rat
(Pars distalis).
Z Zellforsch. 129: 328-369.

Wada I, Sakuma E, Shirasawa N, Wakabayashi K, Otsuka T, Hattori K, Yashiro T,
Herbert DC, Soji T, (2014).
Intercellular communications within the rat anterior pituitary. XVI: postnatal changes
of distribution of S-100 protein positive cells, connexin 43 and LH-RH positive sites
in the pars tuberalis of the rat pituitary gland. An immunohistochemical and elect
Tissue & cell; 46 (1): 33-39.

Wilfinger WW, Larsen WJ, Downs TR, Wilbur DL, (1984).
An in vitro model for studies of intercellular communication in cultured rat anterior
anterior pituitary cells.
Tissue Cell; 16:483-497.

Wu Y, Zhou BP, (2010).
Snail More than EMT.
Cell Adhesion & Migration; 4 (2): 199-203.

Yang MH1, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, Huang CH, Kao SY, Tzeng CH, Tai SK, Chang SY, Lee OK, Wu KJ, (2010).

Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition.
Nat Cell Biol; 12 (10): 982-992.

Yoshida Y, (1966).

Electron microscopy of the anterior pituitary gland under normal and different experimental conditions.

Meth Achiev Exp Path; 1: 439-454.

Zimmer DB, Van Eldik LJ, (1986).

Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase.

J Biol Chem;261 (24):11424-8.