



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Alberto
Pradilla Dieste

Tesis doctoral

PAPEL DEL RECEPTOR GFRA2
EN LA REGULACIÓN DEL
NICHOS DE CÉLULAS MADRE Y
DESARROLLO DE ENANISMO
HIPOFISARIO

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Endocrinología

TESIS DE DOCTORADO

**PAPEL DEL RECEPTOR GFRA2 EN LA
REGULACIÓN DEL NICHO DE
CÉLULAS MADRE Y DESARROLLO DE
ENANISMO HIPOFISARIO**

Alberto Pradilla Dieste

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2023

D./Dña. **Clara Álvarez Villamarín**

En condición **Director/a**
de:

Título de la **PAPEL DEL RECEPTOR GFR α 2 EN LA REGULACIÓN DEL**
tesis: **NICHO DE CÉLULAS MADRE Y DESARROLLO DE ENANISMO**
HIPOFISARIO

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña Alberto Pradilla Dieste, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **SANTIAGO DE COMPOSTELA, 21 de Mayo de 2023**

Firma electrónica

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

El doctorando declara que no existe ningún tipo de conflicto de interés en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

Este estudio ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación y Fondo Social Europeo, mediante los proyectos BFU2016-76973-R, titulado: “Implicaciones fisiopatológicas de los mecanismos de recambio y proliferación, benigna y maligna, de las células foliculares tiroideas humanas y de glándulas endocrinas” y PID2019-110437RB-I00, titulado: “Mecanismos de proliferación y recambio de células endocrinas normales y cancerosas de la tiroides e hipófisis”, siendo investigadora principal la Prof. Dra. Clara V Álvarez.

El doctorando Alberto Pradilla Dieste ha sido financiado por una beca FPI adscrita al proyecto BFU2016-76973-R, con el código BES-2017-081331.

RESUMEN

La hipófisis es un órgano de gran relevancia en el organismo cuya función principal es en control del sistema endocrino. Regula procesos fundamentales como la pubertad, el crecimiento, el metabolismo o la reproducción. Estos procesos requieren de un grado de plasticidad importante para poder satisfacer la demanda hormonal de cada momento. Para ello la hipófisis cuenta con las células madre hipofisarias, que suponen el 10% del total de células de esta glándula. Estas células madre la conforman dos poblaciones diferentes, la primera de ellas es el nicho de células madre hipofisarias, que constituye la última línea de células de la adenohipófisis y del lóbulo intermedio. Estas células poseen unos marcadores específicos como son $GFR\alpha 2$, $PROP1$, $SOX2$, $SOX9$, $OCT4$ o $KLF4$. La segunda población celular está compuesta por los progenitores comprometidos dispersos por la adenohipófisis, que dan lugar a las células endocrinas diferenciadas. La población celular mayoritaria en la hipófisis son las células somatotropas, encargadas de la producción y liberación de GH. El control de este tipo celular esta mediado por la vía del receptor RET, que en presencia de su ligando GFL y su co-receptor $GFR\alpha$ promueve la supervivencia y proliferación celular, y en ausencia del éste induce apoptosis. Alteraciones en la población de células somatotropas pueden llevar a la aparición de estados como el gigantismo, por exceso de hormona de crecimiento, o el enanismo, causado por bajos niveles de hormona de crecimiento.

En este trabajo hemos querido profundizar en la implicación de $GFR\alpha 2$ en la fisiología hipofisaria y su implicación en el enanismo. Para ello, nos fue amablemente cedido un modelo de ratón KO para $Gfr\alpha 2$. Se realizaron estudios para demostrar la validez del modelo para su estudio en la hipófisis. Posteriormente, se estudiaron las características físicas de estos ratones relacionadas con la función de GH e IGF-1 y se evaluaron los niveles de las hormonas producidas en la adenohipófisis, así como las secretadas en tejidos diana, como IGF-1 y T4. Además, se llevaron a cabo análisis moleculares a nivel de

genes y proteínas de la vía de señalización de RET, de sus co-receptores y ligandos y de marcadores clave de células madre. Finalmente se estudiaron *in vivo* los procesos celulares de proliferación y senescencia. También se realizaron cultivos primarios de células madre hipofisarias para evaluar la capacidad clonogénica de las mismas y analizar la expresión de todos los marcadores previamente estudiados. Además, estudiamos la eficacia del trasplante de células madre hipofisarias en animales KO para *Gfra2*. Finalmente, estandarizamos protocolos de clarificado y tinción para la visualización de muestras en 3 dimensiones mediante microscopía *Light-Sheet*.

Nuestros resultados han permitido validar el modelo KO para *Gfra2* para su uso en el estudio de la hipófisis. Hemos evaluado que se trata de un modelo de enanismo hipofisario en el que las características físicas asociadas al efecto de GH e IGF-1 están reducidas en tamaño, y además en estos animales se produce una disminución de la liberación de GH, así como encontramos niveles más bajos de IGF-1 en sangre. La liberación del resto de hormonas no está alterada. En cuanto al análisis molecular, hemos observado que no hay alteraciones en la vía de supervivencia mediada por RET ni en la expresión de sus ligandos y co-receptores. No obstante, sí que hay un aumento en la activación de PKC δ y Caspasa-3, que se traduce en una mayor tasa de apoptosis. En cuanto a las células madre, en el ratón KO para *Gfra2* existe una sobreactivación de la proliferación de nicho y de las células de la adenohipófisis a día 10 de desarrollo postnatal, que produce un aumento en el reclutamiento de las células Sox2⁺ del nicho y un aumento de los progenitores dispersos por la adenohipófisis. Sin embargo, este aumento de la proliferación no se mantiene en la edad adulta, aunque sí que existe un mayor número de células en la hipófisis con marcadores de células madre (Sox2 o Klf4). Esta proliferación exacerbada en el desarrollo postnatal da lugar a una hipófisis envejecida en la edad adulta, en la que tanto en las células madre del nicho como las de la adenohipófisis existe un aumento

generalizado de la expresión de p21 y una disminución de la longitud de los telómeros. Los cultivos de células madre hipofisarias confirmaron todo lo observado *in vivo*. Demostramos que es posible el trasplante de células madre hipofisarias, ya que la implantación de éstas en la hipófisis de ratones KO para *Gfra2* consiguió revertir parcialmente el fenotipo de enanismo provocado por la ausencia de esta proteína. Además, las células implantadas proliferaron y se diferenciaron en la hipófisis receptora. Finalmente, hemos estandarizado un protocolo de clarificado y tinción basado en X-CLARITY que permite la obtención de muestras con elevado grado de transparencia para el estudio de la hipófisis en tres dimensiones.

Palabras clave: Hipófisis, células madre, *GFR α 2*, SOX2 reclutamiento, GH, enanismo.

ABSTRACT

The pituitary gland has a key role in the control of the endocrine system. This organ regulates important functions such as puberty, growth, metabolism, and reproduction. Those processes require a high plasticity from pituitary to satisfy varying hormonal demands. To do so, pituitary possesses pituitary stem cell, which account for the 10% of the total cells of this organ. Those stem cells are classified in two different populations. The first one is considered the stem cell niche, which is composed by just two cell rows in the adenopituitary and the intermediate lobe, surrounding the marginal zone. Stem cells from the niche express specific markers: $GFR\alpha 2$, PROP1, SOX2, SOX9 OCT4 or KLF4. The second stem cell population are the committed progenitors scattered through adenopituitary. The principal cell population in pituitary gland are somatotropes, that produce and secrete growth hormone. Control in number of those cells is mediated by RET receptor, its GFL ligands and $GFR\alpha$ co-receptors. In presence of ligand, RET induces proliferation and survival. On the other hand, in absence of ligand, RET promotes cell death via apoptosis. Alterations in the number of somatotropes may lead to altered states related with growth, such as gigantism (excess of GH) or dwarfism (low GH levels).

In this work we aimed to deepen in the knowledge of $GFR\alpha 2$ and its implication in physiology of the pituitary gland and the relation of this protein with dwarfism. To do so, a mouse model KO for $Gfra2$ was kindly provided to us. We performed molecular studies to validate this model to be used in our project. Then we studied physical characteristics related to GH and IGF-1 function. Moreover, we studied hormonal levels of the six hormones produced in adenopituitary, IGF-1 and T4. We performed molecular analysis at gene and protein level to study the implications of the RET pathway, RET ligands and co-receptors. We also studied expression of key stem cell markers. After that we also investigate crucial processes such as cell proliferation and senescence. The next step was to evaluate the

potential therapeutical implications of a stem cell transplantation into pituitaries of newborn mice KO for $Gfra2$. Finally, we standardized clearing and staining protocols to be used combined with Light-Sheet microscopy to study pituitary in three dimensions.

Our results validated the mouse model KO for $Gfra2$ to be used in pituitary studies. We have demonstrated the dwarf phenotype of the KO mouse, which has decreased physical characteristics associated with the GH and IGF-1 action. Besides, those animals have decreased production of GH and lower levels of serum IGF-1. However, we did not find alterations in the rest of the adenopituitary hormones. Regarding molecular analysis, there are no changes in RET expression, neither its ligands nor co-receptors. Despite that fact, there is an increased activation of PKCd and Caspase-3, which indicates increased cell death via apoptosis. There is an increased proliferation in stem cells from the niche and in the adenopituitary in KO animals at postnatal day 10. This increased proliferation leads to Sox2+ cells accumulation in stem cell niche and adenopituitary, suggesting a failure in recruitment and differentiation processes. Proliferation rates in adults remain normal, but there is an accumulation of stem cells in the niche and adenopituitary (Sox2+ or Klf4+). The increased proliferation during young ages lead to a senescent adult pituitary associated with a generalized expression of the protein p21 and telomere shortening, affecting both stem cells and differentiated cells. Stem cells cultures confirmed previous *in vivo* studies. We demonstrated that pituitary stem cells transplants is viable, and we achieved a partial recover in dwarfism phenotype. Moreover, those stem cells were implanted in newborn pituitaries and they proliferate and differentiate during development. Finally, we standardized a X-CLARITY based clearing and staining protocol, obtaining high quality transparent samples that can be used to study pituitary in three dimensions by Light-Sheet microscopy.

Key words: Pituitary gland, stem cells, $GFR\alpha2$, SOX2, recruitment, turnover, GH, dwarfism.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XV
INTRODUCCIÓN	I
1. LA HIPÓFISIS	3
1.1. ANATOMÍA DE LA HIPÓFISIS	3
1.1.1. La adenohipófisis	3
1.1.2. El lóbulo intermedio	8
1.1.3. La neurohipófisis	9
1.2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE HORMONAS	11
1.2.1. Liberación de oxitocina y ADH	11
1.2.2. Liberación de hormonas producidas en la adenohipófisis	11
1.2.2.1. Regulación de la secreción de GH	14
1.3. ACCIONES DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO	15
2. EL RECEPTOR RET	17
2.1. LIGANDOS Y CO-RECEPTORES DE RET	18
2.2. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RET	20
2.3. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RET EN LAS CÉLULAS SOMATOTROPAS DE LA ADENOHIPÓFISIS	21
3. GFRα2	22
3.1. EXPRESIÓN DE GFR α 2	25
4. LAS CÉLULAS MADRE	26
4.1. CÉLULAS MADRE ADULTAS (ASCs).....	29
4.1.1. Principales marcadores de las células madre adultas.....	29
4.1.1.1. SOX2	30
4.1.1.2. OCT4	31
4.1.1.3. KLF4	32
4.1.1.5. NANOG	33
4.2. NICHOS DE CÉLULAS MADRE	34
4.2.1. Nichos de células madre en diferentes tejidos	34
4.2.1.1. El nicho de células madre hematopoyéticas.....	34
4.2.1.2. El nicho de células madre intestinales.....	35
4.2.1.3. El nicho de células madre neuronales	35
4.2.1.4. El nicho de células madre de la piel.....	36
5. LAS CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS	36
5.1. PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS	38
5.1.1. La vía de señalización de SHH/PTCH	38
5.1.2. La vía de señalización de WNT.....	40

5.1.3. La vía de señalización de NOTCH	41
5.1.4. La vía de señalización de YAP/TAZ (Hippo).....	41
5.2. El CO-RECEPTOR GFR α 2 Y SU RELEVANCIA EN LAS CÉLULAS MADRE	43
5.2.1. GFR α 2 en la hipófisis	43
5.2.2. Expresión y relevancia de GFR α 2 en células madre presentes en otros tejidos	46
6. ENANISMO	49
6.1. ETIOLOGÍA DEL ENANISMO	50
6.1.1. Variantes normales de crecimiento que causan enanismo	50
6.1.2. Causas patológicas del enanismo.....	51
6.2. ENANISMO HIPOFISARIO.....	53
6.2.1 Enanismo por déficit del eje GH/IGF1 en humanos	53
6.2.2. Modelos animales de enanismo hipofisario	54
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	65
1.1. ASPECTOS ÉTICOS EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	65
1.2. ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES	66
1.3. MODELOS ANIMALES UTILIZADOS	67
1.3.1. Modelo de ratón <i>Knockout</i> (KO) para <i>Gfra2</i>	67
1.3.2. B6;129S-Sox2 ^{tm1(cre/ERT2)} Hoch/J.....	69
1.3.3. B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(EYFP)} Cos/J.....	70
1.3.4. Gfra2-KO; B6;129S-Sox2 ^{tm1(cre/ERT2)} Hoch/J; B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(EYFP)} Cos/J.....	71
1.4. GENOTIPADO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE 73	
1.4.1. Genotipado de la cepa transgénica GFR α 2-KO	73
1.4.2. Genotipado de la cepa B6;129S-Sox2 ^{tm1(cre/ERT2)} Hoch/J	75
1.4.3. Genotipado de la cepa B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(EYFP)} Cos/J.....	76
1.5. ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFENO	77
1.6. ADMINISTRACIÓN DE 5-ETINIL-2'-DEOXIURIDINA (EdU)	78
1.7. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	79
1.8. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	80
1.8.1. Obtención de suero	80
1.8.2. Obtención de tejido fresco	81
1.8.3. Perfusión intracardiaca y obtención de tejido fijado.....	82
1.9. EXPERIMENTO DE RESCATE DEL FENOTIPO DE ENANISMO	84
1.9.1. Generación de animales donantes y receptores de células <i>Gfra2</i> ^{+/+} ...	84

1.9.2. Obtención de células $Gfra2^{+/+}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$	86
1.9.3. Inyección de las células $Gfra2^{+}$ en ratones $Gfra2^{-/-}$ neonatos.....	88
2. CULTIVOS CELULARES.....	90
2.1. CULTIVO DE COLONIAS DE CÉLULAS MADRE	90
2.2. PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS	92
2.2.1. Preparación de los cultivos para el conteo del número de colonias..	92
2.2.2. Adición de EdU al medio de cultivo	93
3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS	93
3.1. WESTERN BLOT	93
3.1.1. Extracción de proteína de tejido de ratón	93
3.1.2. Cuantificación de la concentración de proteína.....	94
3.1.3. Electroforesis y transferencia de proteínas	95
3.1.4. Inmunodetección	99
3.2. NIVELES HORMONALES	102
3.2.1. Hormonas hipofisarias en tejido y suero	102
3.2.2. IGF-1 en suero.....	103
3.2.3. Hormona T4 libre en suero.....	103
3.3. INMUNOFUORESCENCIA	104
3.3.1. Preparación de muestras de tejido fijado.....	104
3.3.2. Inmunofluorescencia en tejido de ratón.....	106
3.3.3. Inmunofluorescencia en cultivos celulares	107
3.3.4. Inmunohistoquímica en tejido de ratón	109
3.4. MICROSCOPIA	110
3.4.1. Microscopía óptica	110
3.4.2. Microscopía confocal	111
4. ESTUDIO DE ARN.....	111
4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN	111
4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN	112
4.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	113
5. DETECCIÓN DE MARCAJE CON EDU	115
6. TELOMAPING	116
7. MICROSCOPIA <i>LIGHT-SHEET</i> APLICADA AL ESTUDIO DE LA HIPÓFISIS	118
7.1. VISIKOL®	119
7.2. iDISCO	121
7.3. X-CLARITY	123

7.3.1. Adaptación de la preparación de las muestras al protocolo X-CLARITY	126
7.4. OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	126
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	128
8.1. TEST DE NORMALIDAD	128
8.2. TEST PARAMÉTRICOS	129
8.3. TEST NO PARAMÉTRICOS	129
8.4. TEST DE MÚLTIPLES FILAS	129
RESULTADOS.....	131
1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO <i>Gfra2</i>-KO.....	133
1.1. EXPRESIÓN DEL GEN <i>Gfra2</i> EN EL RATÓN KO PARA <i>Gfra2</i>	135
1.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>Gfra2</i> EN EL RATÓN KO	136
2. FENOTIPO GENERADO EN ANIMALES KO PARA <i>Gfra2</i> ...	141
2.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS EN EL MODELO <i>Gfra2</i> -KO.....	141
2.2. LA HIPÓFISIS EN EL MODELO KO PARA <i>Gfra2</i> CON FONDO GENÉTICO C57BL/6.....	148
2.3. CONFIRMACIÓN DEL MODELO KO PARA <i>Gfra2</i> COMO ENANO HIPOFISARIO.....	150
3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TODAS LA HORMONAS HIPOFISARIAS EN EL MODELO KO PARA <i>GFRα2</i>	152
3.1. NIVELES HORMONALES EN SUERO	152
3.2. NIVELES HORMONALES EN LA HIPÓFISIS	155
4. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS HIPÓFISIS DEL MODELO <i>Gfra2</i>-KO	159
4.1. <i>Gfra2</i> Y LA FAMILIA DE CO-RECEPTORES <i>Gfra</i>	159
4.2. <i>GFRα2</i> Y LAS CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS	164
4.2.1. Expresión génica de los marcadores de células madre	164
4.2.2. Expresión de las proteínas que definen las células madre hipofisarias	165
4.2.3. Incremento de la población Sox2+ en la adenohipófisis de los ratones con genotipo KO.....	166
4.2.4. La adenohipófisis de los ratones KO para <i>Gfra2</i> está enriquecida en células Klf4+	170
4.2.5. Proteínas relevantes en las vías de señalización de las células madre adultas.....	173

4.3. LA VÍA DE RET EN LAS CÉLULAS SOMATOTROPAS DEL RATÓN KO PARA <i>Gfra2</i>	175
4.3.1. Supervivencia mediada por la activación de la vía de RET.....	175
4.3.2. Apoptosis mediada por el receptor RET en las células somatotropas de la adenohipófisis del ratón KO para <i>Gfra2</i>	179
4.4. LA HIPÓFISIS DEL RATÓN <i>Gfra2</i> -KO DURANTE EL DESARROLLO	182
5. PROLIFERACIÓN CELULAR	185
5.1. PROLIFERACIÓN EN LA HIPÓFISIS DE RATONES ADULTOS....	185
5.2. PROLIFERACIÓN EN LA HIPÓFISIS DE RATONES WT Y KO PARA <i>Gfra2</i> DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL	189
6. ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA EN LA HIPÓFISIS DE LOS RATONES KO PARA <i>Gfra2</i>.....	194
6.1. SENESCENCIA CELULAR EN LA HIPÓFISIS DEL RATÓN KO PARA <i>Gfra2</i>	194
6.2. ACORTAMIENTO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA	199
7. CULTIVOS DE CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS.....	203
7.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS OBTENIDAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS.....	207
7.2. PROLIFERACIÓN DENTRO DE LAS COLONIAS DE CÉLULAS MADRE.....	210
7.3. SENESCENCIA EN LAS COLONIAS DE CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS	211
8. EXPERIMENTO DE RESCATE DEL FENOTIPO DE ENANISMO.....	212
8.1. DESCRIPCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO..	212
8.2. EFECTOS DE LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS <i>Gfra2</i> ⁺ / <i>Sox2</i> ⁺ / <i>LoxP</i> -EYFP EN RATONES KO PARA <i>Gfra2</i>	215
8.3. DETECCIÓN DE CÉLULAS GFP ⁺ EN LA HIPÓFISIS DE LOS DOS RATONES <i>Gfra2</i> ^{-/-}	224
9. MICROSCOPIA 3D EN LA HIPÓFISIS: ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA OBSERVACIÓN CON EL MISCROSCOPIO LIGHT-SHEET	227
9.1 VISIKOL	229
9.2. iDISCO	230
9.3. X-CLARITY	233

DISCUSIÓN.....	239
Estado actual de las células madre hipofisarias	241
Posible <i>splicing</i> alternativo del gen <i>Gfra2</i> en la hipófisis	244
Fenotipo de enanismo hipofisario en el ratón KO para <i>Gfra2</i>	247
Poblaciones endocrinas en la hipófisis del ratón <i>Gfra2</i> -KO.....	253
Funcionalidad de las células madre en el ratón KO para <i>Gfra2</i>	257
Estudios in vitro de la población de células madre Sox2+	266
¿Son las células madre una potencial terapia para el tratamiento de enfermedades como el hipopituitarismo?	270
La tecnología <i>Light-Sheet</i> en el estudio de la hipófisis.....	275
CONCLUSIONES.....	279
BIBLIOGRAFÍA.....	283
ÍNDICE DE FIGURAS	311
ÍNDICE DE TABLAS.....	319
ANEXOS.....	323

ABREVIATURAS

A	Amperio
ACTH	Hormona adenocorticotropa
ADH	Hormona antidiurética o vasopresina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
ALS	Subunidad ácida lábil
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AP	Adenohipófisis
ARN	Ácido ribonucleico
ARNlnc	ARN largo no codificante
ARTM	Artemina
ASCs	Células madre adultas
ATACseq	<i>Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>
bFGF	Factor de crecimiento básico para fibroblastos
BHE	Barrera hematoencefálica
BMP	Proteína morfogénica ósea
BRB	Barrera hematorretiniana
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
CD34	Cúmulo de diferenciación 34
CDGP	Retraso constitutivo en el crecimiento y la pubertad
CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEBEGA	Centro de Biomedicina Experimental de Galicia
cEBPa	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
CiMUS	Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas
CK	Citoqueratinas
cm	centímetro

CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CSCs	Células madre columnares de la base de la cripta
CXCL12	<i>C-X-C Motif chemokine ligand 12</i>
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBE	Dibencil éter
DHH	<i>Desert hedgehog</i>
DLL1	<i>Delta like canonical Notch ligand 1</i>
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNTPs	Dioxinucleótidos trifosfato
Dok1	<i>Docking protein 1</i>
Dok4/5	<i>Docking protein 4/5</i>
Dok6	<i>Docking protein 6</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
ERK8	<i>Extracellular signal-regulated kinases 8</i>
ESCs	Células madre embrionarias
EYFP	Proteína fluorescente amarilla
FGD1	<i>FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR-3	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos
FOXA2	<i>Forkhead box A2</i>
FRS2	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
FS	Células foliculoesteladas
FSH	Hormona foliculoestimulante

FSS	Baja estatura familiar
FZD	<i>Frizzled</i>
g	Fuerza centrífuga
GDF15	<i>Growth differentiation factor 15</i>
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFLs	Familia de ligandos de GDNF
GFP	Proteína fluorescente verde
GFRAL	<i>GDNF family receptor alpha like</i>
GFR α	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α</i>
GFR α 1	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α1</i>
GFR α 2	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α2</i>
GFR α 3	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α3</i>
GFR α 4	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α4</i>
GH	Hormona de crecimiento
GHBP	Proteína de unión a GH
GHR	Receptor de GH
GHRH	Hormona liberadora de GH
GKLF	<i>Gut-enriched Krüppel-like factor</i>
GLI1	<i>GLI family zinc finger 1</i>
GLI2	<i>GLI family zinc finger 2</i>
GLI3	<i>GLI family zinc finger 3</i>
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GPS	Células madre del nicho hipofisario
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GST	Test de estimulación con glucagón
HFSCs	Células madre del folículo piloso

HH	<i>Hedgehog</i>
HMG	Grupo de alta movilidad
HRP	Peroxidasa de rábano
HSCs	Células madre hematopoyéticas
Hz	Hercio
IBD	Síndrome del colon irritable
IC-RET	Fragmento intracelular de RET
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IGFBP	Proteínas de unión a IGF-1
IgG	Inmunoglobulina G
IGHD	Deficiencia aislada de GH
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
IL	Lóbulo intermedio
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas
IRS1/2	<i>Insulin receptor substrate 1/2</i>
ISS	Baja estatura idiopática
ITT	Test de tolerancia a insulina
JAG1	<i>Jagged 1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kDa	kiloDalton
KLF4	<i>Krüppel-Like Factor 4</i>
KO	<i>Knockout</i>
LATS1/2	<i>Large tumor suppressor kinase 1</i>
LH	Hormona luteinizante
LHX3	<i>LIM Homeobox 3</i>
LHX4	<i>LIM Homeobox 4</i>
M	Molar
mA	miliamperio
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MDM2	<i>Murine doble minute 2</i>
mg	miligramo

mL	militro
mM	milimolar
mm	milimetro
MSCs	Células madre mesenquimales
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
NaCl	Cloruro de sodio
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
nM	nanomolar
nm	nanometro
NP	Neurohipófisis
NRTN	Neurturina
NRTN α	Receptor de neurturina α
NSCs	Células madre neuronales
O/N	<i>Overnight/Toda la noche</i>
°C	Centígrado
OCT3/4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OMG	Organismo modificado genéticamente
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) Polymerases</i>
PAX8	<i>Paired Box 8</i>
pb	pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCP	Polaridad celular planar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	<i>Fosfatidilinositol 3-quinasa</i>
PKCa	Proteína quinasa C alpha
PKCd	Proteína quinasa C delta
POMC	Proopiomelanocortina
POU1F1	<i>POU Domain class 1, transcription factor 1, PIT1</i>
POU5F1	<i>POU Domain class 5, transcription factor 1</i>
pPKCd	Proteína quinasa C delta fosforilada
PRL	Prolactina
PROKR2	<i>Prokineticin Receptor 2</i>

PROP1	<i>PROP paired-like homeobox 1</i>
PSPN	Persefina
PTCH	<i>Patched</i>
PTPN11	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qFISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente cuantitativa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RAF	<i>Raf-1 proto-oncogene, Serine/Threonine kinase</i>
RET	<i>Rearranged during transfection/ RET proto-oncogene</i>
RNAseq	Secuenciación de ARN
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
sc	<i>single-cell</i>
SCF	<i>SKP1-Cullin-F-box</i>
SCG	Ganglios cervicales superiores
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	<i>Smoothed</i>
sn	<i>single-nuclei</i>
snATACseq	<i>single-nuclei Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing</i>
SNC	Sistema nervioso central
snRNAseq	<i>single-nuclei</i> secuenciación de ARN
SOX2	<i>Sex determining Region Y-box 2</i>
SOX3	<i>Sex determining Region Y-box 3</i>
SOX9	<i>Sex determining Region Y-box 9</i>
SRIF	<i>Somatotropin release-inhibiting factor</i>

SST2	Receptor de somatostatina 2
SST5	Receptor de somatostatina 5
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
T4	Tiroxina
TAD	Dominio de transactivación
TAZ	<i>Tafazzin</i>
TBP	<i>TATA Binding protein</i>
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Triton X-100
TCF7L1	<i>Transcription factor 7 like 1</i>
TRH	Hormona liberadora de TSH
TRNR2	<i>TGF-beta-related neurotrophic factor receptor 2</i>
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
U	Unidad
WT	<i>Wild type</i> o alelo salvaje
YAP	<i>Yes-associated protein 1</i>
ZBTB20	<i>Zinc finger and BTB domain containing 20</i>
α GSU	<i>α-Glycoprotein subunit</i>
μ L	microlitro
μ M	micromolar

INTRODUCCIÓN

1. LA HIPÓFISIS

La hipófisis es una glándula neuroendocrina que actúa como el principal controlador del sistema endocrino. La regulación de procesos fisiológicos fundamentales como pueden ser el crecimiento, la pubertad, el metabolismo, la reproducción o el estrés, entre muchos otros, se encuentra bajo el control hormonal de la hipófisis.

Este órgano se encuentra situado en la silla turca, que es una pequeña cavidad que se localiza en la parte superior del hueso esfenoides. La hipófisis está recubierta por la duramadre (la capa más externa de las meninges) y rodeada lateralmente por los senos cavernosos. De esta manera la hipófisis se encuentra separada de todos los tejidos que la rodean salvo del hipotálamo, con el que está conectada por el tallo hipofisario (*I*).

1.1. ANATOMÍA DE LA HIPÓFISIS

La hipófisis es un órgano de pequeño tamaño que puede compararse al de un guisante, tiene un volumen de unos 0,8 cm³ y pesa menos de un gramo. En mamíferos y más concretamente en ratones se trata de un órgano muy conservado, aunque presenta algunas diferencias morfológicas. En ratón la hipófisis tiene un volumen de unos 0,6 mm³ y pesa alrededor de 1,5-2 mg. Esta glándula está formada por cuatro partes principales, que se conocen como adenohipófisis (AP), neurohipófisis (NP), lóbulo intermedio (IL) y tallo hipofisario (*I*).

1.1.1. La adenohipófisis

La adenohipófisis tiene su origen en el ectodermo bucal a partir de una evaginación de la bolsa de Rathke. La adenohipófisis a su vez puede dividirse en tres partes diferentes que son el lóbulo anterior (*pars distalis*), que a su vez está dividido en los lóbulos derecho e

izquierdo de la hipófisis, y un anillo que recubre la parte inferior del tallo hipofisario (*pars tuberalis*) (2).

La adenohipófisis está compuesta principalmente por 5 tipos de células epiteliales endocrinas diferentes que son las encargadas de la producción y secreción de 6 hormonas. Estas células secretoras de hormonas se denominan según la función clave de la hormona que secretan, y son las siguientes (1):

- Somatotropas, encargadas de la producción y liberación de la somatotropina, o también conocida como hormona de crecimiento (GH).
- Lactotropas, que producen y liberan la hormona prolactina (PRL)
- Tirotropas, cuya función es la producción y liberación de la tirotropina, que también se denomina hormona estimulante de la tiroides (TSH)
- Corticotropas, a partir del precursor proopiomelanocortina producen la hormona adrenocorticotropa (ACTH).
- Gonadotropas, que en este caso liberan las gonadotropinas, que son dos hormonas dimericas diferentes, pero con una subunidad en común: la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH).

En humanos, se conocen los porcentajes aproximados de los cinco tipos de células endocrinas. Las células somatotropas son las más abundantes en la hipófisis, ya que suponen en torno al 40-50% del número total de células que conforman la glándula. El siguiente tipo celular más importante son las lactotropas, que abarcan entre el 25-35% de células de la adenohipófisis. Estos dos tipos celulares mayoritarios presentan variaciones en el porcentaje entre el sexo masculino y femenino, siendo en el sexo femenino el porcentaje de somatotropas más cercano al 40% y el de lactotropas al 35%. También cambian las proporciones en algunos momentos en los que la necesidad hormonal cambia, como la lactancia. Respecto al resto de

células productoras de hormonas, las células corticotropas suponen en torno al 15% del total, porcentaje muy similar al de las gonadotropas, que oscila en torno al 10%. Y finalmente encontramos las células tirotropas que suponen menos de un 5% de las células presentes en la adenohipófisis (2).

La distribución de cada tipo celular en la hipófisis se da de una manera concreta. La mayoría de las células somatotropas y lactotropas se agrupan hacia las alas laterales de los dos lóbulos de la adenohipófisis. Las células corticotropas, por su parte, se encuentran en la parte más central de la hipófisis anterior cerca de la hendidura del lóbulo intermedio. Continuando con las células tirotropas, éstas se encuentran agrupadas en la parte central, pero en la parte inferior alejadas de la hendidura. Por otro lado, las células gonadotropas no siguen un patrón tan definido y se encuentran dispersas por la adenohipófisis (1).

Además de estos cinco tipos de células, es posible encontrar las células mamosomatotropas. Se considera que durante la etapa embrionaria estas células con producción dual de hormonas corresponden a un estadio transitorio en el que no se ha llegado al estado final de diferenciación a células lactotropa o somatotropa. Por otro lado, en adultos estas células podrían responder a una conversión de células somatotropa a célula lactotropa o viceversa en función de la demanda hormonal del organismo (3).

Además de las células productoras de hormonas, se pueden encontrar otros tipos diferentes de células en la adenohipófisis. Entre estos grupos destacan las células madre hipofisarias, que se encuentran agrupadas formando un nicho en la hendidura entre el lóbulo anterior y el lóbulo intermedio. La extensión del nicho es de tan solo dos capas de células que bordean la hendidura, formada a partir de la bolsa de Rathke, que limita ambos lóbulos de la adenohipófisis (4-6).

La existencia de este nicho de células madre fue descrita en 2009, y se demostró que está conservado tanto en humano como en dos de los modelos animales más utilizados: la rata y el ratón (5). Además, existen prolongaciones de células madre que parten del nicho hacia el lóbulo anterior. La estructura y distribución de estas prolongaciones no está completamente definida y se desconoce la función exacta de las mismas (5). Las células madre hipofisarias y el nicho en el que se encuentran está descrito en mayor profundidad en el apartado 4 de la sección “*Introducción*”.

Otro de los tipos de células presentes en la hipófisis son las células foliculoesteladas (FS). Se trata de células poco estudiadas cuya función principal todavía se desconoce. Originalmente se pensó que podían tratarse de las células madre hipofisarias, aunque estas postulaciones fueron previas a la descripción del nicho hipofisario (5). Otras de las funciones que se atribuyen a las células foliculoesteladas son la de soporte y andamiaje para el resto de las células productoras de hormonas y guía de las prolongaciones celulares que parten del nicho de células madre o implicaciones en la comunicación intercelular (7).

Gracias al reciente auge de la secuenciación de ARN *single-cell* (sc) y *single-nuclei* (sn) se ha avanzado en el conocimiento de las diferentes poblaciones, y los porcentajes anteriormente mencionados quedan obsoletos gracias a trabajos como el de Ruf-Zamojski (8) y Hou (9), aunque los trabajos de estos autores están realizados en hipófisis de ratón. La secuenciación *single-cell* además ha permitido clasificar todas las células de la hipófisis, no solo las células endocrinas como está hecho en humano (2).

La secuenciación de Ruf-Zamojski fue realizada a partir de muestras congeladas de hipófisis, a partir de estas muestras se disociaron las hipófisis y posteriormente se aislaron los núcleos de estas células. Realizaron dos tipos de secuenciación *single-nuclei* diferentes, snRNAseq (secuenciación de ARN) y snATACseq (*Assay*

for *Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*, secuenciación del ensayo de cromatina accesible por la transposasa) (8).

En la **tabla 1** están recogidos los porcentajes (promedio de los datos obtenidos mediante scRNAseq y scATACseq) de las células endocrinas diferenciadas de ratones hembra y macho, las poblaciones de células madre, las melanotropas (comentadas posteriormente en la sección del lóbulo intermedio), y en el grupo “Resto” se encuentran agrupadas poblaciones minoritarias de la hipófisis como son pericitos, pituiticos, células endoteliales y macrófagos (8). Al igual que ocurre en humanos, en ratones es posible encontrar una proporción más elevada de células somatotropas en machos y mayor porcentaje de células lactotropas en hembras.

Tabla 1. Porcentajes de los diferentes tipos celulares en la hipófisis de ratones hembra y macho adultos.

	Ratones ♀	Ratones ♂
Somatotropas	29.63	49.725
Lactotropas	36.705	19.85
Melanotropas	6.9	7.35
Gonadotropas	3.64	5.875
Corticotropas	3.795	3.45
Tirotropas	1.98	1.425
Células madre	9.945	7.32
Resto	8.73	6.32

Estudios más recientes de snRNAseq y snATACseq en hipófisis humanas obtenidas *post-mortem* reflejan unos valores de porcentajes similares a los recogidos en la tabla 1, aunque los autores no especifican los valores (10).

Por otra parte, en el grupo de Hou estudiaron mediante snRNAseq las diferencias de expresión de multitud de marcadores durante el desarrollo postnatal en ratón y las diferencias de estos marcadores

entre sexos (9). Estos datos les permitieron estimar los porcentajes de los tipos celulares a diferentes días de desarrollo postnatal (9).

En la **tabla 2** están recogidos los porcentajes de los tipos de células endocrinas diferenciadas, células madre y el grupo “Resto” en el que se incluyen los mismos tipos celulares que en los resultados de Ruf-Zamojski (8). En esta tabla se incluyen también las células mamosomatotropas, que son abundantes durante el desarrollo postnatal pero más raras en la edad adulta (3).

Tabla 2. Porcentajes de los diferentes tipos celulares en la hipófisis de ratones hembra y macho a días postnatal 12 y 32.

	P12		P32	
	♀	♂	♀	♂
Somatotropas	18	18	20	28
Lactotropas	0	0	18	5
Mamosomatotropas	20	25	27	30
Melanotropas	16	16	12	12
Gonadotropas	12	7	3	8
Corticotropas	3.5	5	2.5	4
Tirotropas	1	1.5	0.3	0.3
Células madre	10	8.5	5	5
Resto	20	18	16	12

1.1.2. El lóbulo intermedio

En humanos, el lóbulo intermedio ocupa un pequeño volumen entre la adenohipófisis y la neurohipófisis durante el desarrollo, y el tamaño de esta parte de la hipófisis se reduce hasta ser casi inexistente en la edad adulta. Sin embargo, en roedores esta parte de la hipófisis está mucho más desarrollada en todas las etapas, tanto embrionaria como postnatal y en adultos (11, 12). El lóbulo intermedio está menos estudiado que las adenohipófisis. Esta parte de la glándula posee una fuerte inervación por parte de terminales axónicos. El tipo celular mayoritario en el lóbulo intermedio son las células melanotropas.

Estas células procesan la proopiomelanocortina (POMC) y liberan las melanocortinas, entre las que se encuentran las β -endorfinas y la hormona estimulante de melanocitos (MSH) (2).

1.1.3. La neurohipófisis

Por su parte, la neurohipófisis tiene su origen embriológico en el infundíbulo, una extensión del ectodermo neural que se genera desde la parte inferior del diencefalo. Una vez desarrollada, la neurohipófisis se divide en el lóbulo posterior (*pars nerviosa*) y la *pars infundibularis* (1).

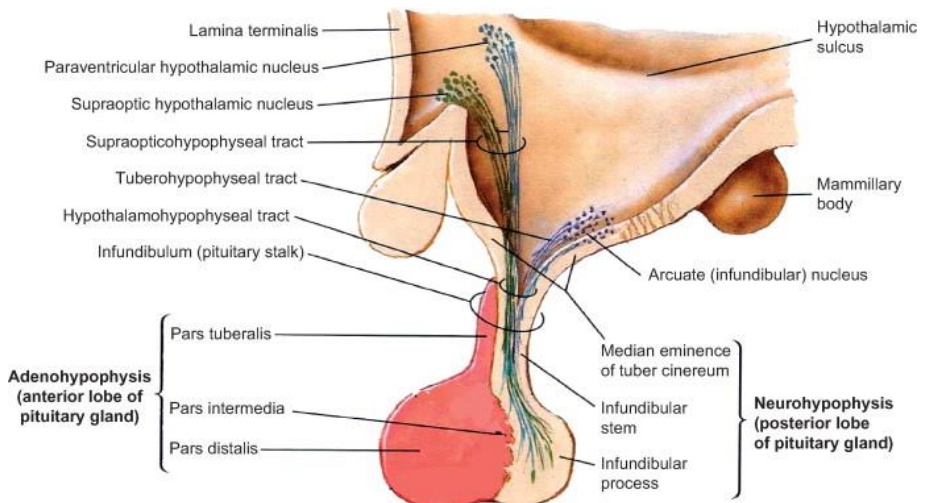


Figura 1. Representación esquemática de la anatomía de la hipófisis humana. Original de Maurice Goodman, 2009 (13) Reproducido con el permiso de Elsevier, Copyright© 2023.

La mayor parte de las células presentes en la neurohipófisis son terminales axónicos de neuronas magnocelulares que parten desde los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. En el lóbulo posterior también se encuentran los pituicitos, un tipo celular de origen glial que da soporte a los terminales axónicos y que además están implicados en la liberación de dos hormonas secretadas por los dos tipos de neuronas diferentes diferentes, la oxitocina y la vasopresina u hormona antidiurética (ADH) (14).

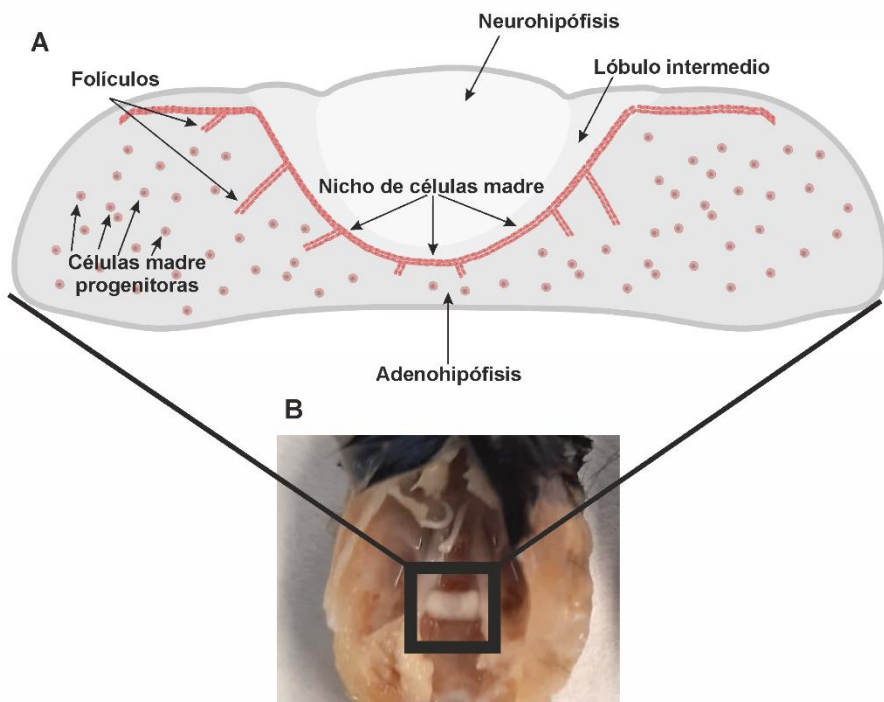


Figura 2. Figura 2. La hipófisis del ratón. A) Esquema de una sección coronal de hipófisis de ratón en la que se pueden observar las diferentes partes de la hipófisis. Imagen producida por el doctorando Alberto Pradilla Dieste utilizando el programa Biorender. **B)** Fotografía de la hipófisis de ratón en la silla turca. Imagen tomada por Alberto Pradilla Dieste.

1.2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE HORMONAS

La regulación de la liberación de hormonas en la hipófisis viene mediada principalmente por el hipotálamo. La conexión entre ambos órganos se da gracias al tallo hipofisario, que está compuesto por fibras nerviosas y vasos sanguíneos que conforma el sistema vascular porta hipofisario.

1.2.1. Liberación de oxitocina y ADH

La oxitocina y la vasopresina (ADH) son producidas por neuronas de gran tamaño (magnocelulares) en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo. Desde allí son transportadas por los axones de dichas neuronas hasta la neurohipófisis, unidas a neurofisinas, que son pequeños péptidos sin actividad derivados de la propia hormona precursora que actúan como transportadores de hormonas. Una vez alcanzada la glándula, las hormonas son directamente liberadas a los capilares que rodean a la neurohipófisis y enviadas a la circulación venosa general (14, 15).

1.2.2. Liberación de hormonas producidas en la adenohipófisis

En el caso de las hormonas de la adenohipófisis, éstas son producidas como gránulos en cada célula endocrina, donde se almacenan hasta que se reciben los estímulos para su liberación.

La liberación de las hormonas de la adenohipófisis se produce en respuesta a factores liberadores o inhibitorios que se producen en los núcleos inferiores del hipotálamo. Estos factores son liberados al sistema porta hipofisario, el cual irriga todo el lóbulo anterior. El sistema porta hipofisario consta de dos partes, un entramado de capilares que se encuentra en la parte inferior del infundíbulo y, por otro lado, vasos sanguíneos más largos que recorren el tallo hipofisario hasta la hipófisis. Ambas partes están implicadas en el transporte de factores hipotalámicos hasta la adenohipófisis (16).

Cada hormona estimulante o inhibitoria del hipotálamo tiene como diana principal una de las 5 células productoras de hormonas presentes en la adenohipófisis (16).

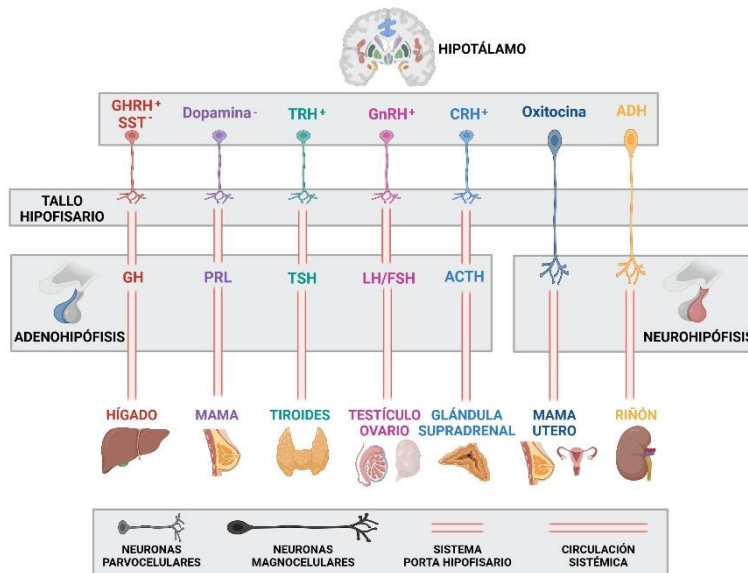


Figura 3. Esquema representativo de la estimulación e inhibición de las hormonas producidas en la adenohipófisis y la neurohipófisis. Figura producida en el programa BioRender por el doctorando Alberto Pradilla Dieste.

La secreción de GH está regulada por la hormona liberadora de GH (GHRH), que estimula su liberación. Y de forma contraria, la somatostatina inhibe la liberación de GH a través de la unión a su receptor (SST), una familia de receptores que posee 5 miembros y los más expresados en la hipófisis son el SST2 y el SST5 (17). La producción de TSH viene mediada por la hormona libradora de tirotropina (TRH). En el caso de la ACTH, su liberación está estimulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y finalmente la liberación de FSH y LH es debida a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (16). Finalmente, se conoce que la liberación de prolactina está inhibida por la dopamina.

Los niveles de hormonas en sangre deben mantenerse en torno a unos valores fisiológicos y para ello además de la existencia de factores estimuladores o inhibitorios, existen otros mecanismos. Estos sistemas de control se denominan de retroalimentación.

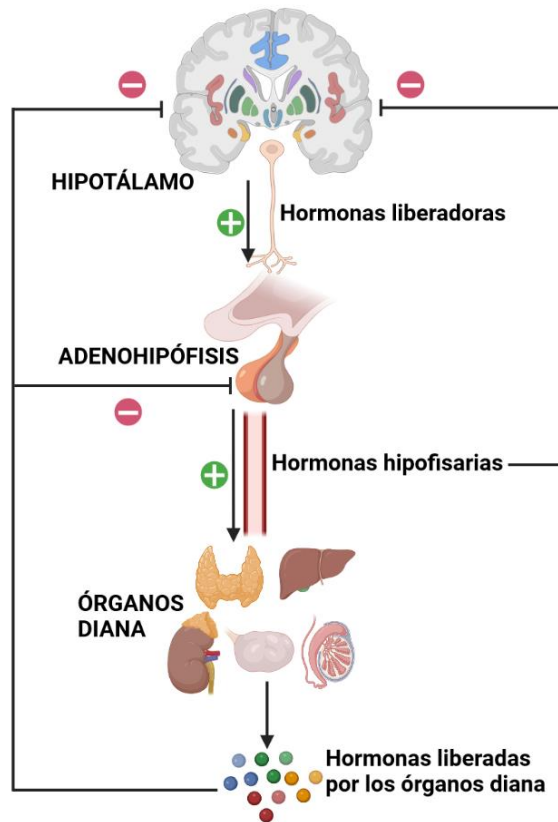


Figura 4. Esquema representativo de los mecanismos de retroalimentación negativa. Figura producida en el programa BioRender por el doctorando Alberto Pradilla Dieste.

Estos mecanismos de retroalimentación son en su mayoría inhibitorios (o también denominados negativos) y se dan en respuesta a los niveles de las hormonas producidas por los órganos diana en respuesta a las hormonas hipofisarias (16). Cuando se alcanzan unos niveles específicos de estas hormonas en sangre, se produce una inhibición de la función hipotalámica e hipofisaria para esa hormona concreta (lo que puede implicar tanto la inhibición de la liberación de la hormona como del factor que la estimula). En algunas ocasiones se puede dar también un mecanismo de retroalimentación por el cual las hormonas hipofisarias inhiben la liberación de su factor estimulante en el hipotálamo. Los mecanismos de retroalimentación son robustos, pero su sensibilidad puede verse modificada en situaciones en las que el aporte hormonal cambie o en diferentes etapas de la vida (16).

1.2.2.1. Regulación de la secreción de GH

La GH se produce en la hipófisis de forma pulsátil (18, 19). Su regulación directa está mediada por el factor activador GHRH e inhibida por la somatostatina. A su vez, el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) está implicado en el mecanismo de retroalimentación negativa de la liberación de GH (16).

Una vez liberada en el torrente sanguíneo, la GH puede encontrarse libre o acoplada a proteínas de unión a GH (GHBP). En sus tejidos diana, la GH activa de forma directa a su receptor (GHR) y se estimula la producción de IGF-1, proteínas de unión a IGF-1 (IGFBP), especialmente la IGFBP3 (20), y subunidad ácida lábil (ALS). IGF-1, IGFBP3 y ALS forman un complejo ternario para favorecer el transporte de IGF-1 en suero, de tal forma que se prolonga la vida media de este último y al mismo tiempo se evitan situaciones de hipoglucemia por la concentración excesiva de IGF-1 (21). La mayor parte de IGF-1 en sangre se encuentra unido a IGFBP. Sin embargo, una pequeña parte se encuentra en su forma libre, denominada IGF-1 libre, y que se considera la forma metabólicamente activa de esta hormona (20, 21).

1.3. ACCIONES DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento tiene multitud de tejidos diana en el organismo, sobre los que ejerce diferentes efectos. Los estos efectos producidos por la GH como tal se consideran directos, y otros causados por la IGF-1, se denominan efectos indirectos. Una de las principales dianas de la GH es el músculo esquelético, donde se considera una hormona anabólica ya que genera un balance de nitrógeno positivo, favoreciendo la captación de aminoácidos hacia el músculo y por consiguiente estimulando la síntesis de proteínas (22). Otra importante diana de la GH, y también ampliamente relacionada con el crecimiento, son los huesos. La hormona de crecimiento promueve la activación y proliferación de los osteoblastos, y por lo tanto la formación de hueso, al mismo tiempo que estimula la diferenciación y actividad de los osteoclastos, los cuales promueven la reabsorción del hueso. El resultado de esta acción dual es promover la remodelación del hueso (23). La formación de nuevo hueso se da en las epífisis de estos, gracias a la proliferación y diferenciación de los condrocitos. Esta formación de nuevo hueso no se da exclusivamente por el efecto de la GH, ya que está mediado también de forma indirecta por IGF-1. Deficiencia en los niveles de GH dan lugar a una progresiva pérdida de la mineralización del hueso por la baja tasa de remodelación, al tiempo que se produce una disminución en la generación de hueso (23).

La GH también tiene importantes efectos en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos. Respecto al metabolismo de los lípidos, la hormona de crecimiento actúa en el tejido adiposo y favorece el aumento de la concentración de ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos en sangre, lo que permite afirmar que esta hormona favorece la lipólisis y la cetogénesis. Además, también se ha observado que la GH produce un aumento en los niveles de glicerol en sangre (24). En resumen, la GH promueve la movilización y oxidación de los lípidos, activando un cambio en el sustrato principal del metabolismo

muscular que va de la glucosa y las proteínas a la utilización de los lípidos (24).

Respecto al metabolismo de la glucosa, la GH disminuye la captación de glucosa en los músculos y reduce drásticamente la oxidación de esta molécula (24). Sin embargo, se cuestiona si las causas de este fenómeno son por acción directa de la hormona de crecimiento, o por el aumento en la lipólisis (24). La disminución de la captación de glucosa lleva a un aumento de la glucosa en sangre, hecho que, sumado a una lipólisis aumentada, dan lugar a su vez a un aumento de la gluconeogénesis en el hígado por la acción de la GH (24).

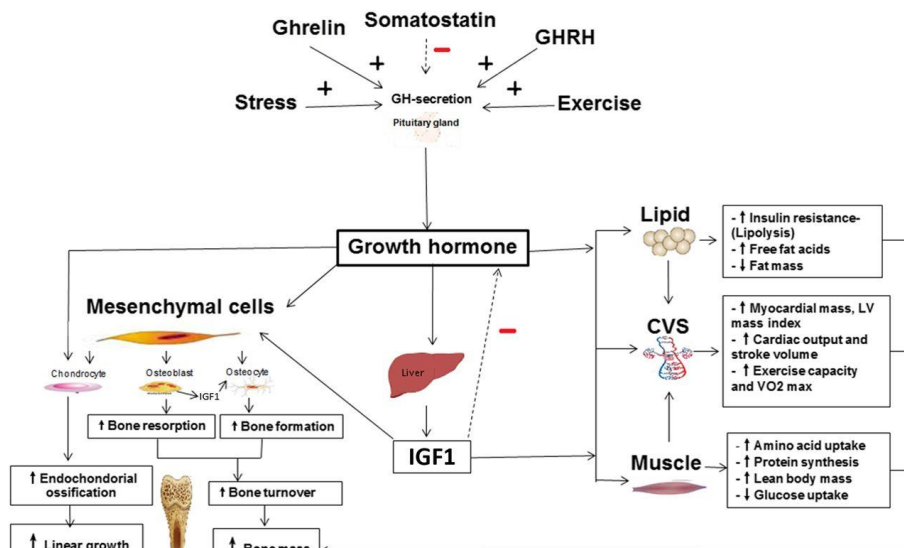


Figura 5. Efectos biológicos de la hormona de crecimiento. Original de Ahmid et al, 2016. Reproducido con permiso de Bioscientifica Limited, Copyright© 2023 (25).

2. EL RECEPTOR RET

RET es una proteína de la superfamilia de los receptores tipo tirosina quinasa, que inicia señales que promueven tanto la proliferación como la diferenciación y la supervivencia celular. La expresión de este receptor se da principalmente en la paratiroides, el sistema nervioso central (SNC) y las glándulas adrenales, pero también puede encontrarse en otros tejidos en los que posee gran relevancia, como la hipófisis, la retina o el colon (Human protein atlas: <https://www.proteinatlas.org/> (26-28)).

La estructura de la proteína RET está conformada por tres dominios diferentes. El primero de ellos es un dominio extracelular más largo que contiene en su extremo N-Terminal cuatro repeticiones de tipo cadherina y después una región rica en cisteínas (28 residuos) más cerca de la membrana plasmática. Esta región rica en cisteínas se considera relevante en la formación de puentes disulfuro que permiten el plegamiento final del receptor y que le permite alcanzar su estructura ternaria. El segundo dominio es una porción hidrófoba transmembrana. El tercer dominio está compuesto por la parte intracelular de la proteína, y posee un dominio con actividad tirosina quinasa compuesto por dos fragmentos que se encuentran separados por 27 aminoácidos; este dominio termina en el extremo C-terminal con una cola donde encontramos tirosinas fosforilables por el receptor (29).

RET se sintetiza en su forma inmadura, una proteína de 120 kDa. A su paso por el retículo endoplásmico la forma inmadura de RET se glucosila hasta alcanzar un peso de 150 kDa. La forma madura final se logra tras pasar por el aparato de Golgi, donde de nuevo se modifica la glucosilación de RET, adquiriendo así un peso de 170 kDa y lográndose la forma madura que se encuentra anclada a la membrana plasmática (30).

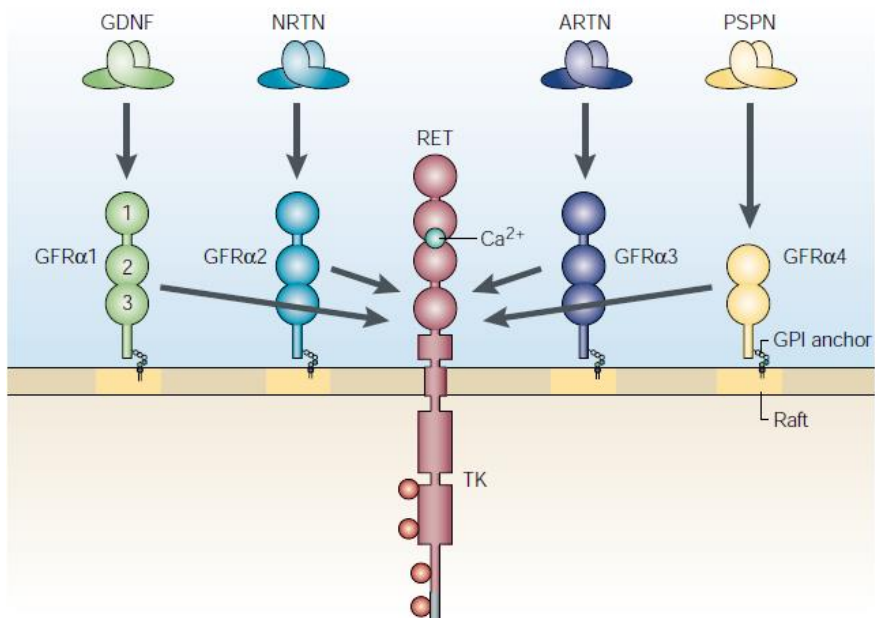
El receptor RET posee dos isoformas de proteína principales que dependen del splicing alternativo que se da en la parte 3' del gen *RET*. Estas dos variantes de splicing son RET9 o isoforma corta y RET51 o isoforma larga, y el nombre es debido al número de aminoácidos diferentes que conforman la cadena C-Terminal de la proteína. De esta forma, la parte C-Terminal de RET9 tiene una secuencia de 9 aminoácidos, mientras que la de RET51 posee 51 aminoácidos (31).

2.1. LIGANDOS Y CO-RECEPTORES DE RET

RET actúa como receptor de los factores neurotróficos derivados de la línea celular de la glía (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*, *GDNF*), conocidos como ligandos de la familia de GDNF (GFLs). Dentro de esta familia de factores, encontramos que GDNF es el principal, pero existen 3 más: Neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) (32). La unión a los diferentes ligandos necesita de un co-receptor de la superfamilia de receptores de GDNF, GFR α . De esta forma, GDNF tiene mayor afinidad por GFR α 1, siendo esta pareja de ligando-receptor la más importante y estudiada. Neurturina por su parte posee mayor afinidad por el co-receptor GFR α 2 (33-35). Y finalmente, artemina y persefina son los ligandos de los co-receptores GFR α 3 (36) y GFR α 4 (37), respectivamente. Más recientemente, se descubrió un nuevo receptor de la familia GFR α : GFRAL. Este co-receptor de RET media la activación del receptor tras la unión al ligando GDF15 (38-40).

La afinidad de los co-receptores con un ligando específico está demostrada, sin embargo, se ha visto que pese a que la señalización mediada por el ligando principal de cada co-receptor es la más potente, existe reacción cruzada entre los diferentes GFR α y GFLs. Estudios *in vitro* con neuronas permitieron determinar que la unión de RET y GFR α 1 no requiere siempre de la unión del ligando GDNF, ya que también puede estar modulado en algunas situaciones por

neurturina (34, 36) y en mucha menor medida con artemina (36). La señalización mediada por $GFR\alpha 2$ requiere del ligando neurturina, pero también se ha descubierto que esta función puede ser desempeñada casi de la misma manera por GDNF (33, 35, 41). $GFR\alpha 4$ por su parte, media su acción principalmente tras unir el ligando persefina, pero también es capaz de unir neurturina, aunque de una manera muchísimo menos potente que $GFR\alpha 2$ (37). El otro de los miembros



de la familia $GFR\alpha$, $GFR\alpha 3$, solo puede unir su ligando principal, artemina (36), y no se ha demostrado reactividad cruzada con ninguno de los otros tres ligandos.

Figura 6. Co-receptores de la familia $GFR\alpha$ y sus ligandos GFLs principales. La estructura de los 4 miembros de la familia $GFR\alpha$ es muy similar, poseen 3 dominios globulares ricos en cisteínas (excepto $GFR\alpha 4$ que solo tiene 2) y un dominio C-terminal con una secuencia GPI que les permite anclarse a la capa externa de la membrana plasmática. Imagen reproducida con el permiso de Airaksinen y Saarna, 2002 (32).

2.2. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RET

El primer paso en la activación de la vía es la formación de un complejo heterodimérico entre un dímero de GDNF y un miembro dimérico de la superfamilia GFR α , debido a que RET no puede unir GDNF por sí mismo. El complejo formado GDNF-GFR α recluta a un dímero de RET a las balsas lipídicas de la membrana citoplasmática (42). Las balsas lipídicas son plataformas móviles dentro de la bicapa lipídica, enriquecidas en colesterol y esfingolípidos, que se consideran como un compartimento de la membrana esencial en la señalización intracelular (43). Esta traslocación de RET a las balsas lipídicas promueve que se forme el complejo GDNF-GFR α -RET, que se unirá al dímero GDNF-GFR α gracias a los dominios de tipo cadherina. La formación de este complejo da lugar a la forma activa y a su vez a la fosforilación de RET en diferentes residuos de la parte C-Terminal de la proteína. La fosforilación en estos residuos reclutará a proteínas adaptadoras implicadas en vías de señalización con multitud de funciones dentro de la célula: Proliferación, diferenciación y supervivencia (42).

Los puntos de fosforilación en ambas isoformas de RET son muy parecidos, sin embargo, existen pequeñas diferencias entre RET9 y RET51, por la presencia de más tirosinas fosforilables en la isoforma larga. El principal residuo fosforilable es la tirosina 1062 (Y1062), que actúa como punto de anclaje de una gran variedad de proteínas con dominio SH2, entre las que se encuentran Shc, ShcC, FRS2, IRS1/2, Dok1, Dok4/5, Dok6, PKCa, dependiendo de donde se haya estudiado (44-49). Además, la fosforilación de la tirosina 1062 sirve de punto de unión a Enigma y Shank3, pero solo en la isoforma corta RET9 (30).

La señalización mediada por estos adaptadores activa a las vías de señalización de Ras/RAF, que da lugar a la activación de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) ERK1 y ERK2. Por otro lado, activa la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que activa a AKT,

por fosforilación en residuos de serina y treonina, y ERK8 (49). Además, STAT3 une RET y lo transactiva a su forma pro-oncogénica (30).

2.3. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RET EN LAS CÉLULAS SOMATOTROPAS DE LA ADENOHIPÓFISIS

La presencia del sistema RET-GFR α 1-GDNF en hipófisis fue demostrada por primera vez en el año 2000 (50), cuando se describió la expresión de estos tres elementos en hipófisis de rata. La presencia de RET, GFR α 1 y GDNF fue demostrada tanto a nivel de expresión de los genes como de las proteínas para las que codifican. Además, fue posible determinar que estos componentes de la vía de señalización de RET solo se co-expresan en células somatotropas de la adenohipófisis de la rata. Posteriormente, se descubrió que esta expresión conjunta de RET con su co-receptor y su ligando, también se da en humanos (51), tanto en tejido normal como en adenomas somatotropos.

En la adenohipófisis RET funciona como un receptor de dependencia (52, 53). Este tipo de receptores son aquellos que se procesan intracelularmente en ausencia de ligando y producen apoptosis. La célula muere que los expresa muere si no une ligando constantemente.

En presencia de GDNF, el complejo RET-GFR α 1-GDNF induce la dimerización de RET, y su activación de forma cruzada como sucede en todos los receptores tirosina quinasa. Como consecuencia, se fosforilan las tirosinas de la cola C-terminal, lo que a su vez activa mayoritariamente la vía de señalización de PI3K-AKT (52-54), pero también otras vías como RAS-MAPK o PKC. Por el contrario, en ausencia de ligando, RET se une a la proteína quinasa C delta (PKC δ) y Caspasa 3. Lo que producirá una escisión en la secuencia de RET entre los aminoácidos 707 y 1017, mediada por Caspasa 3. De esta

forma se libera un fragmento de 310 aminoácidos que corresponde con la secuencia C-Terminal de la parte intracelular de RET (IC-RET). Este fragmento tiene función pro-apoptótica. IC-RET activa a PKC δ , fosforilándola, y ésta a su vez activa mediante fosforilación a las proteínas JNK, cEBP α y también a CREB. Estos factores van a promover una fuerte expresión de PIT1 (52, 55).

El exceso de PIT1, sobre los niveles habituales de este factor de transcripción esencial de la célula somatotropa, se une al promotor alternativo de *CDKN2A* isoforma 4 (*p19Arf* o *p14ARF*) y potencia la expresión de la proteína p19ARF (p14ARF en humano). Ésta, a su vez, se une a MDM2 (*Murine doble minute 2*). MDM2 es la enzima E3 ubiquitin ligasa que une p53, induciendo su degradación. ARF desplaza a p53 en MDM2, lo que estabilizará la expresión de p53, promoviendo su acumulación y finalmente produciendo la muerte celular por apoptosis mediada por caspasas (52, 53). Este sistema dual promovido por la activación de la vía GDNF/RET/AKT para inducir la supervivencia, y el conformado por RET/Pit1/Arf/p53 con efecto contrario, permite mantener el balance en el número de células somatotropas en la adenohipófisis y por consiguiente controla que no se produzcan y liberen niveles demasiado elevados de GH, lo que daría lugar a problemas conocidos como gigantismo (55). Esta doble vía de control de la población somatotropa se mantiene en tumores hipofisarios somatotropos de los pacientes, reflejando quizás que son adenomas secretores y mantienen su diferenciación (52, 54).

3. GFR α 2

GFR α 2 (*GDNF family receptor alpha-2*) originalmente conocido como NRTN α (*Neurturin receptor alpha*) o TRNR2 (*TGF-beta-related neurotrophic factor receptor 2*) (34).

En humanos, el gen que codifica para *GFR α 2* se encuentra localizado en el cromosoma 8, en posición 8p21.3 y posee 9 exones

(56). Están descritas 8 variantes transcripcionales de este gen, de las cuales, 6 codifican para las diferentes isoformas de la proteína GFR α 2. *GFR α 2* es un gen muy conservado en diferentes especies y que posee 278 genes ortólogos y 4 parálogos. Con relación a los modelos animales más utilizados en el laboratorio, el gen *GFR α 2* tiene una homología del 93,75% con su ortólogo *Gfra2* en ratón (*Mus musculus*) y un 85,18% con el de rata (*Rattus norvegicus*). En ratón, el gen *Gfra2* está codificado en el cromosoma 14 y da lugar a tres transcritos mediante splicing alternativo, cada uno de los cuales codifica para una isoforma (57).

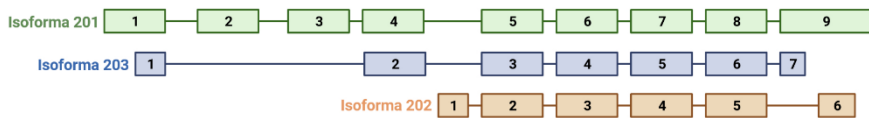
La isoforma principal es la 201, y está conservada en humano y en ratón, se trata de una proteína de 464 aminoácidos (51,727 kDa) que se origina a partir de un transcrito de 4991 pb (3472 pb en ratón) (57). Sin embargo, el splicing alternativo puede dar lugar a la isoforma 203, común también a humano y ratón, que es una isoforma más corta a la cual le faltan los aminoácidos del 14 al 118 (equivalente a parte del primer exón y los exones dos y tres completos de la isoforma 201) (57). La otra isoforma existente en ratón es la 202, también se produce por splicing alternativo, y se trata de una isoforma más corta, de 309 aminoácidos, y con una secuencia diferente a la de la isoforma canónica (solo presenta homología en los exones que van del cuatro al ocho) (57).

Las proteínas codificadas en el gen *Gfra2* de ratón corresponden con las isoformas que pueden encontrarse en humano. La expresión de GFR α 2 está extendida a todos los tejidos del organismo, aunque esta expresión es más abundante en el sistema nervioso central, órganos endocrinos, gónadas y la médula ósea.

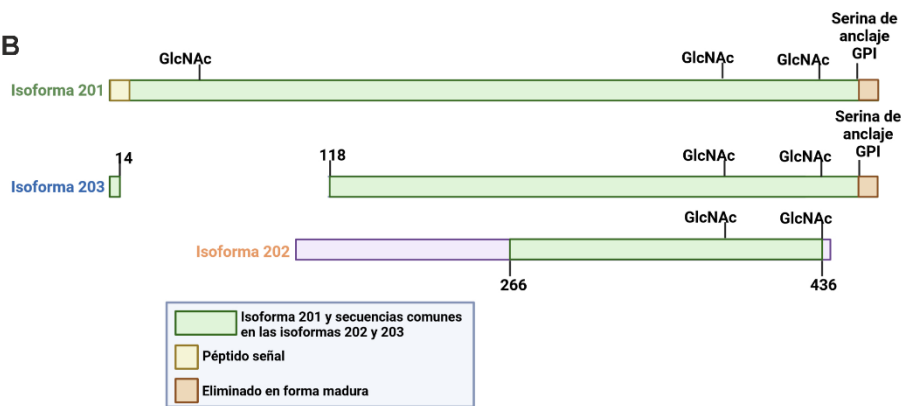
La isoforma canónica de GFR α 2 se sintetiza como una forma inmadura de 464 aminoácidos, de los cuales los 21 primeros corresponden al péptido señal de entrada al retículo endoplasmático, del 22 al 444 corresponden con la cadena principal y del 445 al 464 (58) es el fragmento final procesado dentro del retículo

endoplasmático para dar lugar a la forma madura de la proteína que va a quedar desde entonces unida covalentemente al fosfatidil inositol de la cara luminal de la membrana del retículo endoplasmático, en un enlace GPI, mientras se lleva a cabo su translocación a la membrana

A



B



plasmática (34, 59).

Figura 7. Esquema de las isoformas del gen Gfra2 y la proteína Gfra2 en ratón. A) Esquemas de los exones de las tres isoformas del gen Gfra2 descubiertas en ratón. B) Esquema de las tres isoformas de la proteína Gfra2 de ratón, incluyendo las secuencias del péptido señal y la eliminada en la secuencia madura, así como las modificaciones post-traduccionales. Esquema realizado por el doctorando Alberto Pradilla Dieste utilizando el programa BioRender. Los datos del esquema están basados en la información recogida en las bases de datos Ensembl y Uniprot (57, 58).

En la proteína madura se encuentran tres dominios ricos en cisteínas, D1 que va de los aminoácidos 40 al 113, D2 que va de los aminoácidos 161 a 241 y D3, que abarca de los aminoácidos 251 al 347. Los dominios D2 y D3 son los encargados de la unión GFR α 2-NRTN, mientras que la función del dominio 1 se postula que es la de unión a RET (60). Se ha propuesto que GFR α 2 también puede actuar

como co-receptor para NCAM para ligar la señal mediada por el ligando neurturina (60, 61).

Respecto a las modificaciones post-traduccionales, GFR α 2 posee tres sitios de N-glicosilación en las asparaginas 52, 357 y 413 (58). Y en la serina 444 se produce la unión de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (58) que sirve como punto de anclaje covalente en la cara externa de la membrana plasmática(59), localización subcelular final de la proteína GFR α 2 madura (34).

3.1. EXPRESIÓN DE GFR α 2

Tras el descubrimiento de la proteína GFR α , se describió que se expresaba principalmente en sistema nervioso, testículo, bazo y pulmón (62). Sin embargo, con la reciente expansión de la secuenciación masiva de ARN de tejidos y de poblaciones *single-cell* se ha avanzado en el conocimiento sobre la distribución de esta proteína y las células en las que se encuentra. Actualmente se conoce que las localizaciones en el organismo en las que se ha detectado una mayor expresión de GFR α 2 son principalmente el testículo, la tiroides, el SNC, el bazo y la placenta (Human protein atlas: <https://www.proteinatlas.org/> (26-28)). Por tipo celular, GFR α 2 puede encontrarse abundantemente expresado en las espermátidas, neuronas excitatorias del SNC, epitelio folicular tiroideo y en macrófagos y células de Langerhans (Human protein atlas: <https://www.proteinatlas.org/> (26-28)), estos últimos confirmando la elevada expresión de GFR α 2 que fue originalmente descrita en algunos órganos como bazo y pulmón, donde hay abundantes células del sistema inmune entre las que se encuentran los macrófagos..

El principal campo de estudio de GFR α 2 ha sido el de la neurociencia. Este co-receptor se expresa principalmente en la etapa postnatal en los ganglios de las raíces dorsales (63). También se ha detectado su expresión en los ganglios cervicales superiores (SCG)

(64). Dentro del sistema nervioso central (SNC), las localizaciones principales de GFR α 2 son la corteza cerebral y los lóbulos frontal y occipital (64). Dentro del SNC, GFR α 2 también puede encontrarse en la sustancia negra, asta dorsal de la médula espinal, bulbo olfatorio, tálamo e hipotálamo (64).

Se han desarrollado dos modelos de ratón KO para Gfra2 para el estudio de esta proteína en el sistema nervioso intestinal. El primero de ellos es un ratón *Knockout* (KO) para Gfra2 generado en el grupo de Airaksinen, el cual tiene el primer exón interrumpido por una secuencia de neomicina (65), este ratón posee un fondo genético mixto 129X1/SvJ * C57BL/6. En el laboratorio de Paus, se generó un ratón con la misma mutación que el de Airaksinen pero en un fondo genético puro 129S1/Sv (66). El otro de los modelos de ratón KO para Gfra2 fue desarrollado por Millbrandt unos años después, incluyendo en este caso una mutación para EGFP también interrumpiendo el primer exón. Estos animales tenían un fondo genético 129X1/SvJ * C57BL/6. En las neuronas del plexo mientérico y las parasimpáticas que inervan el páncreas también está presente GFR α 2 representando un papel importante (65). La deficiencia de Gfra2 *in vivo* produce una disminución significativa de la inervación parasimpática de los islotes del páncreas, además, se observó en ese mismo modelo *in vivo Knockout* (KO) para Gfra2 que existían alteraciones en la inervación colinérgica del sistema digestivo, incluyendo el intestino (65), el páncreas (67) y las glándulas salivares (65, 68).

4. LAS CÉLULAS MADRE

La definición de célula madre incluye las características de autorrenovación y capacidad de diferenciación a otros tipos celulares. Estas células son muy importantes durante el desarrollo y la formación de todos los tejidos y órganos del cuerpo, pero también poseen relevancia en la regeneración del tejido en individuos adultos. El campo de las células madre y su aplicación en la medicina es muy prometedor (69).

No todas las células madre son iguales, y pueden ajustarse en diferentes categorías dependiendo de la característica que se utilice para clasificarlas.

Una de las posibilidades se basa en la capacidad de estas células para dar lugar a diferentes tipos de linajes celulares. Y se pueden dividir en los siguientes grupos (69):

- Totipotenciales: Son aquellas células madre capaces de dar lugar a un organismo completo. Algunos autores consideran que la única célula totipotente es el cigoto.
- Pluripotenciales: Son las células madre que tienen capacidad de dar lugar a células de los tres orígenes embrionarios (mesodermo, ectodermo y endodermo), pero que no pueden por sí mismas dar lugar a todos los tipos celulares, ya que por ejemplo no pueden dar lugar a un trofoblasto.
- Multipotenciales: Células madre que pueden autorreplicarse y dar lugar a un linaje celular completo, como las de la médula ósea que pueden producir todos los tipos de células sanguíneas.
- Unipotenciales: Son las células madre que solo pueden dar lugar a un tipo de célula concreto.

Además, las células madre también pueden clasificarse en diferentes categorías en base a la etapa vital del individuo (69):

- Células madre embrionarias (ESCs)
- Células madre neonatales
- Células madre adultas (ASCs)

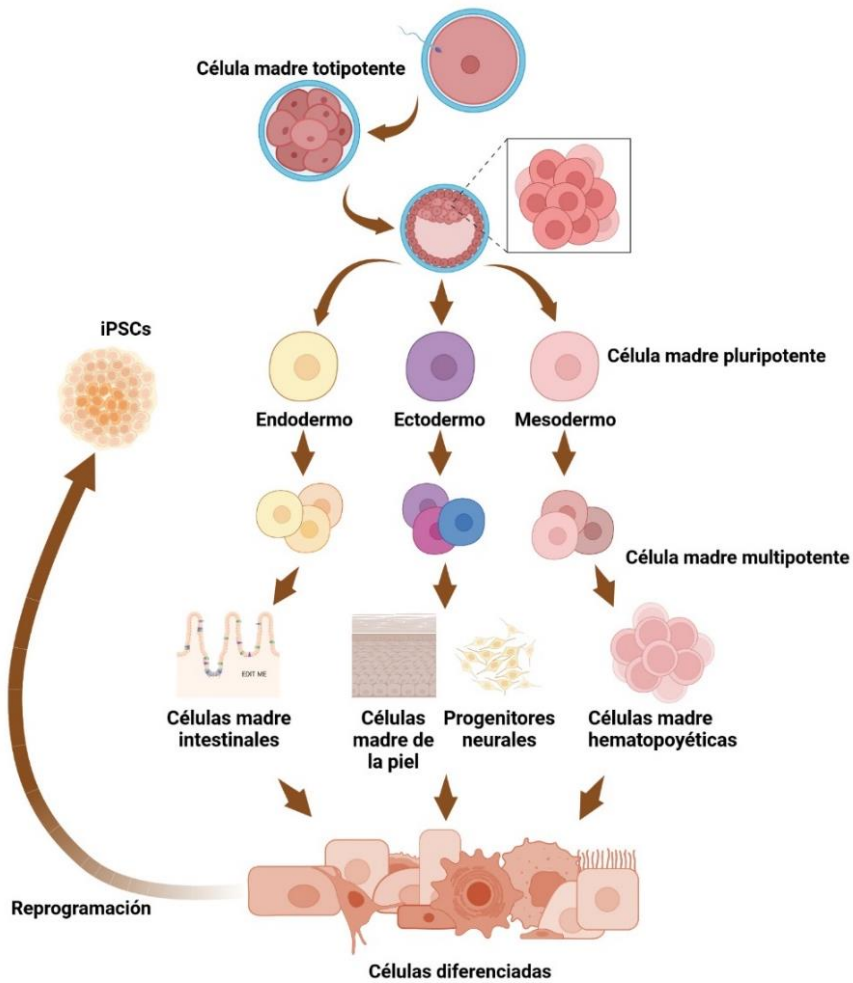


Figura 8. Clasificación de las células madre. Figura producida en el programa BioRender por el doctorando Alberto Pradilla Dieste.

4.1. CÉLULAS MADRE ADULTAS (ASCs)

Las células madre adultas (o también conocidas como células madre somáticas) conforman una población singular de células que se encuentran en la mayoría de los tejidos después del nacimiento y que pueden dar lugar a algunos tipos concretos de células específicas del tejido en el que éstas se encuentran. Las células descendientes de las ASCs permiten mantener el recambio tisular durante la vida, pero también regenerar el tejido en caso de daños y remodelación de ese tejido. Para que pueda atribuirse la capacidad de ASC, las células deben cumplir las siguientes características (70, 71):

- Autorrenovación. Deben poder dividirse de forma simétrica para asegurar que se mantiene la población de células madre en el tejido, al tiempo que se garantiza la generación de nuevas células.
- Diferenciación. Las células madre adultas deben ser capaces de reaccionar a los estímulos que permitan activar su maquinaria intracelular y de esta forma diferenciarse en función de las necesidades del tejido.
- Quiescencia. La activación del ciclo celular en las ASCs está muy controlada, de esta forma se evitan excesivas replicaciones y se reduce la probabilidad de que se acorten los telómeros hasta el límite donde la célula madre dejaría de poder contribuir con nuevas divisiones (71).

4.1.1. Principales marcadores de las células madre adultas

Dadas las características previamente comentadas de las células madre adultas, se trata de un tipo de célula con unas condiciones muy específicas que las separan de las células diferenciadas presentes en todos los tejidos del organismo. Durante el proceso que lleva a una célula madre adulta a convertirse en una célula diferenciada, se producen activaciones y represiones en el perfil genético de la célula

en cuestión. En base a estos cambios de la expresión de diferentes genes es posible diferenciar algunos de ellos que son de gran relevancia en el mantenimiento del estado de las células madre.

En 2006, Yamanaka y colaboradores fueron capaces de reprogramar fibroblastos, células consideradas diferenciadas terminales, aunque con capacidad de división, induciendo un estado de célula madre pluripotente. Estas células se denominaron células pluripotentes inducidas (iPSCs). Para revertir el estado diferenciado en fibroblastos, se utilizó un cóctel de 4 factores que se conocen como factores de Yamanaka (72), y son SOX2, OCT4, KLF4 y c-Myc.

4.1.1.1. SOX2

SOX2, también conocida como SRY-Box2 (*Sex Determining Regions Y-box 2*) pertenece a la familia de proteínas SOX. Las proteínas de esta familia, y por lo tanto también SOX2 (73), presentan conservado un dominio de alta movilidad (*High Mobility Group, HMG*) de unión al ADN (74). SOX2 resulta fundamental en todas las etapas de la vida, desde los primeros pasos durante la embriogénesis, hasta la edad adulta (75). Incluso se ha demostrado en ratones que la delección del gen que codifica para Sox2 resulta en letalidad temprana del embrión, que no llega siquiera a desarrollarse (76).

Durante el desarrollo temprano, SOX2 se encuentra expresado en las células madre embrionarias que dan lugar al origen de la formación del embrión. Posteriormente, a medida que el desarrollo embrionario progresa, la expresión de SOX2 se mantiene en células comprometidas, principalmente de linaje neuronal y epitelial. Finalmente, en la etapa postnatal, SOX2 se encuentra expresado en las ASCs y en progenitores comprometidos presentes en los diferentes órganos, teniendo gran relevancia en la homeostasis y regeneración de los tejidos en la edad adulta (75, 77). SOX2 es uno de los marcadores que definen las células madre del nicho hipofisario, y, además, también se encuentra expresado en células progenitoras dispersas en la adenohipófisis (4).

SOX2 está muy relacionado con el desarrollo y la progresión del cáncer, y se considera un potente oncogen. Esta proteína está ampliamente relacionada con el mantenimiento de las propiedades de células madre en las células tumorales, y les confiere una mayor capacidad tumorigénica, clonogenicidad, transición epitelio-mesénquima (EMT), movilidad y diseminación de las células tumorales, metástasis, resistencia a la quimioterapia y relapso (77).

4.1.1.2. OCT4

OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) o también conocido como POU5F1 (*POU domain, class 5, transcription factor 1*). Los miembros de la familia POU pueden activar la expresión de sus genes diana gracias a su unión a la secuencia octamérica consenso AGTCAAAT. OCT4 se encuentra expresado en todas las células que conforman el blastómero, sin embargo, su expresión va perdiéndose durante el desarrollo. Se pensaba que la expresión de OCT4 estaba restringida a las células madre embrionarias (78), pero posteriormente se descubrió que también puede encontrarse en las células germinales y en las células madre adultas de algunos órganos concretos, como puede ser la hipófisis (5), los folículos pilosos (79) o el endometrio (80).

La expresión de OCT4 resulta fundamental para el mantenimiento del estado de pluripotencia. El control de este estado no depende exclusivamente de la expresión o no expresión de OCT4, ya que ésta está regulada de forma cuantitativa. Elevados niveles de OCT4 guían la diferenciación a células de linajes endodérmicos y mesodérmicos. Bajos niveles de expresión de OCT4 dan lugar a células del trofoectodermo. Y finalmente, “niveles normales” de expresión de OCT4 son los que mantienen el estado de célula madre pluripotente (81).

4.1.1.3. *KLF4*

KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) o también denominado *GKLF* (*gut-enriched Krüppel-like factor*). Es un gen que codifica para un factor de transcripción que se encuentra muy conservado en vertebrados. *KLF4* pertenece a la familia *SP/KLF* (82), cuyos miembros se caracterizan por tener tres dedos de zinc en la parte C-terminal de la secuencia. En su secuencia N-Terminal posee un dominio de transactivación (TAD) junto a un dominio de represión que determinan la interacción de *KLF4* con otros factores de transcripción y el ADN (83). Entre las funciones de *KLF4* destacan la inhibición del ciclo celular mediante la interacción con p53, lo que produce un arresto en fase G1/S del ciclo (84). Además, aumentos en la expresión de *KLF4* también están relacionados con un aumento en la expresión de *CDKN1A* (p21), otro inhibidor del ciclo celular (85). Por otra parte, *KLF4* promueve la diferenciación celular mediante la activación de promotores de diferentes genes y en diferentes tejidos (86). Además, *KLF4* también está involucrado en la supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis dependiente de p53 (87). Sin embargo, en cáncer, *KLF4* puede actuar promoviendo la apoptosis, presentando un papel dual en la regulación de este proceso celular (88, 89). Por otra parte, *KLF4* posee un importante papel en el mantenimiento del estado de pluripotencia de las células madre, para ello inhibe la diferenciación en respuesta a diferentes factores y se une a *SOX2* y *OCT4*, favoreciendo la expresión de *NANOG* (90).

La expresión de este factor de transcripción está muy extendida en muchos tejidos del organismo. En la hipófisis la expresión de *KLF4* es muy marcada en el nicho de células madre (5), donde promueve el mantenimiento de su estado pluripotente. Debido a las funciones que presenta *KLF4* en tejido adulto, su expresión también puede estar implicada en el desarrollo de algunas enfermedades como el cáncer (91).

4.1.1.5. *NANOG*

Este factor de transcripción resultó innecesario en la reprogramación de fibroblastos de ratón llevada a cabo por Yamanaka (72). Sin embargo, sí que se incluye en el cóctel de Thomson, que es otra combinación de 4 factores (*SOX2*, *OCT4*, *LIN28* y *NANOG*) que permitió la desdiferenciación de células somáticas humanas en células madre pluripotentes (92). *NANOG* es fundamental en la etapa embrionaria, su ausencia provoca que el desarrollo embrionario no progrese más allá de la etapa de blastocisto (93).

La implicación de *NANOG* en el mantenimiento de células madre está muy ligado a *SOX2* y *OCT4*, ya que el complejo que forman estos 3 factores de transcripción regula la expresión de multitud de genes (94). A diferencia de *SOX2*, *KLF4* y *OCT4*, *NANOG* pudo ser detectado en las células madre del nicho hipofisario. En la hipófisis *NANOG* está limitado al lóbulo intermedio (5), por lo que se postula que la relevancia de este factor de transcripción en las células madre hipofisarias es nula.

Los cinco marcadores de células madre comentados en el presente apartado son solo una minúscula fracción de una lista que va engrosándose más con el paso de los años. Toda la señalización previa y posterior a estos cinco factores de transcripción, también es relevante en la activación de la maquinaria intracelular que permite el mantenimiento del estado de célula madre adulta pluripotente. Cabe destacar que es posible encontrar células madre adultas en multitud de tejidos dentro del organismo, lo que complica todavía más establecer una lista de marcadores clave que sea común a todas las células madre adultas. Del mismo modo, no todas las células adultas presentes en los tejidos se encuentran en el mismo estado de diferenciación, factor que también altera el programa genético de esa célula, y cuya consecuencia radica en un cambio en los marcadores expresados (95).

4.2. NICHOS DE CÉLULAS MADRE

Se ha descrito en diferentes tejidos que las células madre adultas presentes en los mismo se encuentran agrupadas en una estructura denominada nicho, el cual puede poseer unas características diferentes en función del órgano en el que se encuentran (71). El componente principal de estos nichos son las células madre adultas, pero para que estas puedan mantener su estado son necesarios otros tipos de células como las células madre mesenquimales (MSCs) (96). Las MSCs dan soporte y protección a las ASCs, al tiempo que interactúan con ellas. Estas interacciones pueden darse gracias a la liberación de factores por parte de las MSCs o incluso a interacciones directas entre ambos tipos celulares. Además, también son importante las interacciones entre las ASCs y la matriz extracelular (96).

Se han descrito nichos de células madre dentro de multitud de tejidos dentro del organismo. Cada uno de ellos presenta una disposición y unos marcadores específicos, así como unas rutas de señalización diferentes, que dependen del propio tejido y de las necesidades de autorrenovación que presenta (71).

4.2.1. Nichos de células madre en diferentes tejidos

4.2.1.1. *El nicho de células madre hematopoyéticas*

Este nicho se encuentra en la médula ósea, en contacto estrecho tanto con las arteriolas como con los capilares sinusoidales, y presenta todas las condiciones para el control de la proliferación, diferenciación y migración de las células madre que finalmente dan lugar a todo el linaje sanguíneo (97). La regulación de las HSCs viene mediada principalmente por dos factores, CXCL12 y SCF, producidos en las células endoteliales y el estroma. Pero la regulación de este nicho es mucho más compleja, ya que está en contacto con multitud de células sanguíneas como macrófagos, megacariocitos o monocitos (98), además de presentar una fuerte inervación (99). El conocimiento del

nicho de células madre hematopoyéticas abre un prometedor abanico de aplicaciones en la medicina.

4.2.1.2. El nicho de células madre intestinales

El nicho de células madre intestinales se encuentra en las criptas del intestino, y está compuesto por las células columnares de la base de la cripta (CSCs) (100, 101) y por las células epiteliales y mesenquimales adyacentes que actúan como soporte. Las células madre intestinales migran desde la base de las criptas hasta las microvellosidades, desde donde proliferan y se diferencian para dar lugar a las células progenitoras comprometidas y a todos los tipos de células que forman el epitelio intestinal. El epitelio intestinal está muy expuesto a agentes biológicos y químicos, así como a un desgaste mecánico muy fuerte, forzando a las células madre a estar continuamente dividiéndose y siendo reclutadas para garantizar el recambio celular que necesita el intestino y que de esta forma pueda continuar cumpliendo sus funciones de absorción de nutrientes y barrera ante patógenos (101).

4.2.1.3. El nicho de células madre neuronales

Durante muchos años prevaleció el dogma de que el tejido nervioso es estático y no puede regenerarse, sin embargo, esta idea se tambalea gracias a las células madre neuronales (NSCs). La localización de estas (NSCs) se limita a dos localizaciones en el cerebro, que son la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado, en la corteza. Durante el desarrollo, estas NSCs son las encargadas de la generación de todo el sistema nervioso central (SNC) (102, 103), pero en la edad adulta son las encargadas de mantener una mínima actividad neurogénica en respuesta a daños en el SNC. Al igual que en otros nichos de células madre, este nicho no está conformado exclusivamente por las NSCs. Acompañando a las NSCs se encuentran células endoteliales, astrocitos, microglía y pericitos (104). Se conocen multitud de marcadores que se expresan en las células madre neurales, como

algunos miembros de la familia SOX, DCX, Nestina, PRC2, OLIG2 o BASP1 (105).

4.2.1.4. *El nicho de células madre de la piel*

Al igual que ocurre en el epitelio intestinal, la piel es un órgano muy extenso que se encuentra en contacto con el exterior y por consiguiente expuesto a agentes dañinos. Es importante que la piel sufra un constante recambio para que su función de barrera protectora e impermeable se mantenga. Al hablar de células madre de la piel, hay que referirse a dos tipos diferentes: las células madre melanocíticas y las células madre del folículo piloso (HFSCs) (106). Estos dos tipos celulares se encuentran en el bulbo del folículo piloso. Cada uno de estos tipos de células da lugar a un linaje diferente, las HFSCs satisfacen la necesidad de células que regeneran el folículo piloso y permiten el crecimiento del vello. Las células madre melanocíticas dan lugar a las células que producen melanina (107).

5. LAS CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS

La hipófisis es un órgano que posee gran plasticidad para poder regular el número y la proporción de todos los tipos celulares que la conforman en respuesta a requerimientos fisiológicos o la adaptación a etapas de la vida en las que las necesidades hormonales del organismo cambian, como son la pubertad, el embarazo o la lactancia. Esta plasticidad depende de la proliferación de las propias células diferenciadas de la hipófisis y también de la replicación y diferenciación de las células madre adultas de la hipófisis.

Al comienzo del siglo XXI el conocimiento de las células madre de la hipófisis era muy reducido y todo lo que se podía hacer era postular sobre su existencia (108). Lo único que se tenía claro es que tenían que ser células que no producen hormonas. Las primeras candidatas fueron las células cromóforas, que son todas las que no poseen gránulos y por lo tanto son negativas para las tinciones de

Schiff (108). A diferencia de las células cromófobas, las productoras de hormonas se denominan cromófilas ya que sí que retienen dicha tinción distribuyéndose en acidófilas y basófilas dependiendo de si el tipo de hormona que producen está glucosilado o no. Otro de los tipos celulares que se postularon son las células de la zona marginal (109-111). Posteriormente se pensó que las células foliculares (112) y foliculoesteladas (7) eran las encargadas de representar el papel de células madre dentro de la hipófisis. Ambos tipos celulares se encuentran dispersos por la adenohipófisis y tienen características diferentes a aquellas exhibidas en las células productoras de hormonas (113, 114). Por último, se consideró que existía una población dispersa por la adenohipófisis (que no correspondía con células foliculares o foliculoesteladas) y que poseían rasgos atribuibles a células madre (115).

Actualmente se conoce que en la hipófisis postnatal las células madre se encuentran agrupadas en el **nicho hipofisario**, que consiste en una estructura compuesta por la última línea de células de la adenohipófisis y el lóbulo intermedio, bordeando la zona marginal (4-6). Estas células madre del nicho hipofisario expresan conjuntamente los marcadores de células madre SOX2 y SOX9 (4-6). Además, la definición de estas células viene determinada también por la expresión de GFR α 2, que solo se expresa en el nicho, y PROP1 (5). Estas células madre del nicho hipofisario se bautizaron como GPS, por la expresión de GFR α 2, PROP1 y marcadores propios de células madre (*Stemness*) como SOX2, SOX9, OCT4 y KLF4 (5, 116).

Recientemente también se ha demostrado que el nicho de células madre no solo expresa el receptor RET (5), sino que también todos sus co-receptores de la familia GFR α (117). Sin embargo, la distribución de estos no es la misma a lo largo de todo el nicho. GFR α 1 puede encontrarse en los polos apical y basolateral de la membrana citoplasmática de todas las células que componen el nicho hipofisario. Mientras que GFR α 3, y en menor medida GFR α 4, están presentes en algunas células consecutivas, pero su expresión está limitada al polo

apical que delimita la zona marginal (117). Estos descubrimientos están conservados tanto en humano como en ratas (117).

Estrechamente en contacto con las células madre hipofisarias, es posible encontrar una población celular positiva para los marcadores nestina y vimentina, pero negativas para todos los marcadores que definen a las células madre del nicho. Estas células actuarían como apoyo y soporte de las células GPS (5).

Se postula también la existencia de un segundo nicho de células madre, que aparecería como agrupaciones de células SOX2+ y/o SOX9+ en el parénquima de la adenohipófisis, y que además también son positivas para el marcador S100 β (que define también las células foliculoesteladas) (118, 119). Ambos nichos estarían conectados, creando un microambiente específico que sugiera un mecanismo por el cual las células madre de la zona marginal pueden alcanzar el parénquima de la adenohipófisis y de esta forma son capaces de la remodelación y la regeneración de la hipófisis (120, 121). No obstante, la estructura y el funcionamiento de estas prolongaciones de células madre todavía no se conocen en profundidad.

5.1. PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS

5.1.1. La vía de señalización de SHH/PTCH

La vía de Hedgehog (HH) posee gran relevancia en la formación de muchos órganos durante la etapa del desarrollo embrionario. La familia HH está conformada por 3 ligandos solubles, IHH, DHH y SHH, siendo este último el más relevante de todos. Estos ligandos se unen y activan al receptor Patched (PTCH) en la membrana plasmática de la célula (122). Cuando SHH se une a PTCH, SMO se vuelve activo. SMO es un receptor de la familia GPCR, con 7 dominios transmembrana. Mucho se ha estudiado sobre el mecanismo

de activación de SMO tras la retención de PTCH, su inhibidor, por SHH. De los dos mecanismos propuestos destacan: 1) que en presencia de SHH, SMO difunde de la membrana plasmática lateral, a la del cilio primario donde es realmente activo, mientras que PTCH difunde en sentido contrario al unirse a SHH (123); 2) que PTCH esté inhibiendo la accesibilidad de SMO al colesterol, que sería su verdadero ligando activador, y que además se encuentra en más alta concentración en la membrana del cilio primario (124, 125). Por cualquiera de los dos mecanismos, simple localización o unión a un ligando derivado del colesterol, una vez en el cilio primario SMO impide la degradación de los factores de transcripción de la familia GLI, formada por tres miembros, GLI1 y GLI2 que son activadores y GLI3 que es inhibidor (122). La regulación mediada por SHH es fundamental durante el desarrollo embrionario, ya que es necesaria para inducir la expresión de LHX3 y LHX4, marcadores específicos implicados en la formación de la bolsa de Rathke (126).

Una supresión total de la expresión de SHH en los primeros días del desarrollo embrionario se traduce en un importante freno al desarrollo que provoca la pérdida del tejido hipofisario antes del día 13 de desarrollo (126). Sin embargo, la formación de la bolsa de Rathke requiere de la activación de otras vías de señalización, entre las que se encuentran las mediadas por la proteína morfogénica ósea (BMP) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (127).

Por todo ello, la señalización mediada por SHH es de gran relevancia en las primeras etapas de la formación de la hipófisis y la regulación de las células madre progenitoras (128, 129). Aunque la regulación mediada por SHH es más relevante durante el desarrollo embrionario, también se ha observado que los miembros de esta ruta están expresados en la hipófisis postnatal, principalmente en el nicho de células madre (130).

Tanto en la hipófisis en desarrollo como en la postnatal, los miembros de la vía de SHH se expresan más en las células del nicho y

las progenitoras en respuesta a daños causados al órgano para promover su recuperación (131).

5.1.2. La vía de señalización de WNT

La vía de WNT/ β -catenina está involucrada en multitud de procesos relevantes para la célula, tales como regulación de la expresión de genes, supervivencia, proliferación o adhesión, tanto en la edad adulta como en el desarrollo, desde el momento en que se produce la fecundación del óvulo. En esta vía los ligandos de la familia WNT (existen 19 y todos están expresados en la hipófisis) se unen a un receptor de la familia Frizzled (FZD) (132).

En esta vía es posible encontrar dos variantes diferentes, la canónica (dependiente de β -catenina) y la no canónica (independiente de β -catenina) (133). La unión de WNT a FZD en la vía canónica impide la fosforilación y la consiguiente degradación de la β -catenina, permitiendo que esta sea importada al núcleo (134). Por otra parte, en la vía no canónica intervienen dos posibles rutas, de Ca^{2+} y de polaridad celular planar (PCP) (135).

Algunos miembros de las familias de WNT y FZD están relacionados con la activación de una de las dos vías, pero es la unión de la pareja ligando-receptor concretos la que determina la activación de una vía u otra (133). Un ejemplo es WNT4 que se cree que favorece la activación de PROP1 (136). Existen muchas otras proteínas implicadas en la vía de WNT que modulan procesos en el desarrollo hipofisario. Esta vía de transducción de señales es profundamente compleja e implica la participación de multitud de proteínas con diferentes funciones, pero como compendio de todas ellas se puede considerar que la vía de WNT está involucrada en procesos importantes en la hipófisis en desarrollo, modulando el mantenimiento o diferenciación de los progenitores (133, 136). En la hipófisis postnatal, WNT y el resto de los miembros de la vía no están restringidos solamente a las células madre, aunque su actividad en el

nicho aumenta en momentos en los que existe una reorganización de la glándula, como la pubertad (122).

5.1.3. La vía de señalización de NOTCH

La vía de señalización de NOTCH está mediada por los receptores NOTCH y los ligandos JAG1 y DLL1, que se encuentran presentes tanto en las células madre embrionarias como en los progenitores de la hipófisis postnatal (137, 138). Además, los ligandos de NOTCH también se encuentran en células diferenciadas (somatotropas, lactotropas y tirotropas), lo que sugiere que podrían tener un papel diferente en estos tipos de células (139). La mayor implicación de la vía de NOTCH en la hipófisis postnatal es el mantenimiento del estado de célula madre (embrionaria y adulta).

Alteraciones en la expresión de NOTCH conllevan una disminución de la expresión de PROP1, y, por consiguiente, fallos en la diferenciación a las células productoras de hormonas del linaje de PIT1 (140). Además, una pérdida completa de la expresión de los receptores NOTCH o de las proteínas implicadas en la ruta, conlleva una progresiva disminución en el número de estos progenitores (140). Por otra parte, las células diferenciadas de la adenohipófisis no parecen estar afectadas por la ausencia de NOTCH (140).

5.1.4. La vía de señalización de YAP/TAZ (Hippo)

La vía de señalización de Hippo mediada por los factores de transcripción YAP y TAZ está muy conservada en el mantenimiento del tamaño de múltiples órganos, controlando para ello procesos celulares entre los que se encuentran la proliferación, la apoptosis o el mantenimiento de las células madre (141). En esta vía de señalización se produce inactivación mediada por las quinasas MST1/2 y LATS1/2 que fosforilan e inactivan a los efectores YAP/TAZ, lo que provoca su retención en el citoplasma y su degradación (142). Existen multitud de activadores de la vía de Hippo, entre los que se encuentran el receptor RET junto con su co-receptor GFR α 1 (143).

En la hipófisis esta ruta de señalización está implicada en el proceso del desarrollo, pero también en la hipófisis postnatal, en la que los factores de transcripción YAP y TAZ se expresan en las células progenitoras SOX2+ (tanto en humanos como en ratones). La expresión constitutiva de YAP en etapas tempranas después del nacimiento da lugar a una mayor proliferación de las células SOX2+, promoviendo el enriquecimiento de estos progenitores (142). MST y LATS no parecen ser fundamentales en la regulación de la vía de YAP/TAZ en la hipófisis, sin embargo, su ausencia promueve la formación de tumores hipofisarios muy agresivos compuestos por células SOX2+ con elevada tasa de proliferación (144).

Todavía no se conoce por completo la implicación de la vía de YAP/TAZ en la hipófisis, ni los mecanismos que la regulan, por lo que es necesario ahondar en su investigación para entender mejor la implicación de esta vía (145).

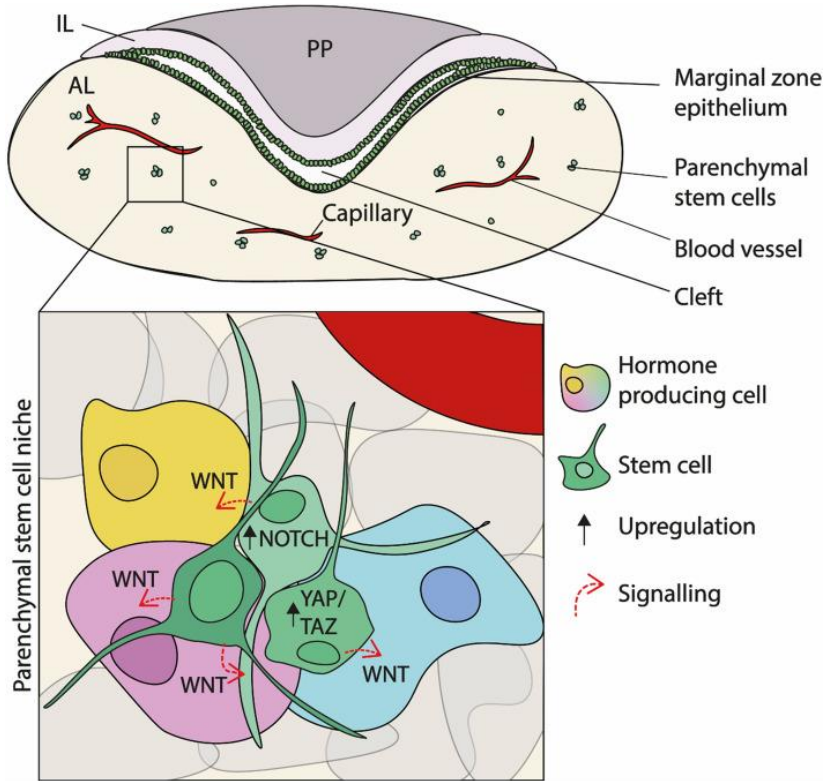


Figura 9. Resumen de las vías de señalización implicadas en el control de las células madre. Original de Willis et al., 2022 (145). Licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (CC by 4.0).

5.2. EL CO-RECEPTOR $GFR\alpha 2$ Y SU RELEVANCIA EN LAS CÉLULAS MADRE

5.2.1. $GFR\alpha 2$ en la hipófisis

La expresión de $GFR\alpha 2$ en la hipófisis fue descubierta en 2009 (5), tanto en hipófisis humana como de rata y ratón. La presencia de este marcador está delimitada exclusivamente al nicho de células madre que bordea la zona marginal entre la adenohipófisis y el lóbulo intermedio. Lo que en humanos adultos supone menos de un 1% del número total de células de la hipófisis (5). La expresión de $GFR\alpha 2$ no

se encuentra en ninguno de los cinco tipos de células productoras de hormonas que se encuentran en la adenohipófisis. La función de $GFR\alpha 2$ en las células del nicho hipofisario se desconoce todavía, pero se postuló que esta proteína resulta clave en el mantenimiento del estado de célula madre pluripotencial con capacidad de dar lugar a los diferentes tipos de células diferenciadas presentes en este órgano (5).

A partir de una dispersión celular de hipófisis de rata fue posible seleccionar las células $Gfra2+$ y cultivarlas *in vitro*. Bajo condiciones específicas, sin suero y con factores demostrados que promovían el crecimiento de células madre de otros tejidos en forma de esferas flotantes, estas células crecen en suspensión formando agregados y con estructura de esferoides (5). La fracción $Gfra2-$ cultivada en las mismas condiciones no dio lugar a esferoides, y estas células crecieron adheridas al material de cultivo. La amplificación celular de ambas poblaciones es muy diferente, el número de colonias formadas por las células $Gfra2-$ fue muy reducido en comparación al número de esferoides que se aparecen en los cultivos de células $Gfra2+$, cuando esta población *in vivo* es minúscula (5). Los esferoides mantienen la expresión de otros de los marcadores con los que co-expresan en las células madre del nicho. Además, la adición de Neurturina (el ligando de $Gfra2$) al medio de cultivo de los esferoides provoca un aumento del número de éstos, demostrando una posible implicación del sistema RET- $GFR\alpha 2$ -Neurturina en las células del nicho (5). Por último, se puede inducir la diferenciación de los esferoides a los cinco tipos de células productoras de hormonas al añadir los suplementos correspondientes al medio de cultivo. Pese a que la función exacta de $GFR\alpha 2$ en las células GPS todavía es una incógnita, estos estudios *in vitro* permitieron demostrar que efectivamente se trata de un marcador relevante en células que mantienen un estado de pluripotencia (5).

Se ha demostrado en ratas gestantes que la expresión de $Gfra2$, junto con otros marcadores específicos de las células madre del nicho está aumentada en hembras a término, pero esta expresión se reduce a niveles basales en los primeros días de lactancia (146). Otro hallazgo

relevante es que la tasa de división celular de las células del nicho en estas hembras a término estaba aumentada. Estos estudios permiten postular que *GFR α 2* podría estar implicado en la proliferación de las células del nicho durante etapas de la vida que requieren de un aporte hormonal adicional, como es el fin de la gestación y el comienzo de la lactancia (146).

La implicación de *GFR α 2* en patología hipofisaria es un campo de estudio prácticamente inexplorado. Dentro del poco conocimiento existente, se sabe que, en comparación con la hipófisis normal, los adenomas hipofisarios funcionantes (producen hormonas) tienen disminuida la expresión del gen *GFR α 2*, y, por el contrario, se incrementa considerablemente la expresión de *GFR α 2* en adenomas hipofisarios no funcionantes (no producen hormonas) (147). Dentro de los adenomas funcionantes, aquellos que ven más reducida la expresión de *GFR α 2* son los relacionados con el linaje dependiente de PIT1 (adenomas somatotropos, lactotropos y tiotropos), mientras que los adenomas corticotropos no ven disminuida la expresión de *GFR α 2* (147). Este descubrimiento también apoya la relevancia de *GFR α 2* en la definición de célula madre hipofisaria, debido a que en situaciones patológicas sigue encontrándose principalmente en células indiferenciadas. Y pese a todo, la función de *GFR α 2* en el nicho sigue sin esclarecerse.

No obstante, se ha demostrado en ratas que *Gfr α 2* podría estar relacionada con la formación de tumores hipofisarios (148). El modelo se basó en la capacidad de los estrógenos exógenos de producir tumores hipofisarios lactotropos, y para ello se utilizaron implantes que liberasen benzoato de estradiol. En relación con *Gfr α 2*, la expresión de esta proteína aumentó tras 5 días de tratamiento con estrógenos, pero su expresión recuperaba el nivel basal a los 10 días. Sorprendentemente, se producía un aumento del número de células *Gfr α 2+* en la adenohipófisis de estas ratas tras 30 días de exposición a los estrógenos (148). Los autores sugieren que es posible que se produce un aumento del número de células *Gfr α 2+* en el nicho de

células madre durante el inicio del tratamiento, y que posteriormente éstas sean reclutadas a la adenohipófisis. La caracterización de estas células se realizó mediante el cultivo de pituesferas, en las cuales se encontraron células madre en diferentes estadios (diferente combinación de marcadores específicos de células madre del nicho y/o célula diferenciada) (148).

Este hecho es comparable a lo que sucede con otro de los co-receptores $GFR\alpha$, en este caso $GFR\alpha3$, cuya expresión en craneofaringiomas se pierde, mientras que sí que es posible encontrar el resto de los marcadores que definen las células madre del nicho hipofisario (116). Por lo que es posible postular que $GFR\alpha2$ también podría ver modulada su expresión en adenomas hipofisarios humanos.

5.2.2. Expresión y relevancia de $GFR\alpha2$ en células madre presentes en otros tejidos

$GFR\alpha2$ posee una importancia bastante relevante en el corazón, desde el desarrollo embrionario hasta la edad adulta. Puede encontrarse principalmente en los vasos sanguíneos coronarios más grandes, como son la arteria aorta y la arteria pulmonar. Además, $GFR\alpha2$ también se encuentra en las válvulas cardíacas. La inervación del corazón también está bajo el control de $GFR\alpha2$, que puede encontrarse en los nervios de los ganglios linfáticos y las fibras nerviosas del tejido cardíaco. La ausencia de $GFR\alpha2$ conlleva limitaciones en la inervación colinérgica del corazón, demostrando de esta manera la relevancia del sistema RET- $GFR\alpha2$ -NTRN en esta parte del sistema nervioso (149).

Dejando a un lado las células nerviosas y los grandes vasos, las únicas células que expresan $GFR\alpha2$ en el propio tejido del miocardio son los progenitores cardíacos. La expresión de este marcador es muy elevada en estos progenitores y va disminuyendo a medida que van comenzando a expresarse marcadores de posteriores estadios de diferenciación o de célula diferenciada. La implicación de $GFR\alpha2$ en

cardiomiocitos no sigue la señalización canónica en la que está implicado el receptor RET (150). Los precursores cardíacos expresan tanto GFR α 2 como GFR α 1, siendo predominante la señalización mediada por GFR α 2. Sin embargo, GFR α 1 responde a los estímulos mediados por NTRN en ausencia de GFR α 2. Este es un ejemplo claro de la promiscuidad entre los receptores de la familia GDNFR y la familia de GDNF (150).

En el nicho de células madre hematopoyéticas Gfra2 es necesario para la supervivencia de las neuronas colinérgicas. La ausencia de Gfra2 produce una disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa, produciéndose un aumento importante en la noradrenalina en orina por la noche, que correlaciona con una deficiencia parasimpática, y un aumento del tono simpático por la noche (151). El aumento de la actividad noradrenérgica en el ratón KO para Gfra2 aumenta el tráfico bidireccional de células madre hematopoyéticas y leucocitos que salen de la médula ósea y retornan a ella. Además, el retorno durante el día se encuentra aumentado por un aumento de la adhesión vascular debida a la pérdida de inervación colinérgica (151). Las células de la médula ósea del ratón KO para Gfra2 que se acumulan en circulación en estos animales poseen una señalización β 3-adrenérgica que promueve la salida de las células madre hematopoyéticas durante la noche (151).

En cuanto al mantenimiento del estado quiescente de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea, la ausencia de Gfra2 disminuye en un factor de 5 el número de células que mantienen este estado en la médula ósea amarilla, aunque no existen cambios en la médula ósea roja. Este aumento de la proliferación en la médula ósea amarilla se debe a que las señales colinérgicas, disminuidas en ausencia de Gfra2, inhiben la proliferación localmente en la médula amarilla (152). Un 5% de las células madre hematopoyéticas expresa Gfra2, y se conoce que este co-receptor promueve la renovación de las HSCs y su expansión *ex vivo* a través de RET (153, 154). Para ahondar en el conocimiento *in vivo* de la señalización mediada por Gfra2 en el

grupo de Méndez-Ferrer trasplantaron HSCs de ratones KO para $Gfra2$ en ratones WT (el modelo de ratón utilizado es el anteriormente presentado que había sido desarrollado en 1999 en el grupo de Airaksinen (65)) y observaron que la disminución de la quiescencia de las HSCs del ratón KO se mantenía en el WT, demostrando que esta quiescencia está regulada por señales colinérgicas del microambiente (152). En relación a la quiescencia disminuida en las HSCs que del ratón KO para $Gfra2$, estas células tienen reducida la expresión de la quimioquina CXCL12, implicada en la regulación de la senescencia de las células madre hematopoyéticas (152). Finalmente, la secuenciación de RNA permitió demostrar que en las HSCs del ratón KO para $Gfra2$ tienen disminuida la expresión de los genes diana de RET que promueven la expansión y autorrenovación de las HSC, al mismo tiempo que las HSCs de la médula ósea amarilla del ratón KO tienen aumentada la expresión de genes asociadas a la proliferación de este tipo de células, los mismo que están más expresados en las HSCs movilizadas fuera de la médula ósea (152).

En el timo también se detectó la expresión de $GFR\alpha2$, tanto en el desarrollo embrionario como en la edad adulta. La expresión de este receptor se da principalmente en timocitos indiferenciados, y a medida que los timocitos van madurando, es decir, va cambiando los marcadores del clúster de diferenciación (CD), también va perdiéndose la expresión de $GFR\alpha2$ (155). Su función en este órgano es dependiente del sistema RET- $GFR\alpha2$ -NTRN, pero esta vía no resulta indispensable en el proceso de diferenciación de los timocitos, debido a que en ausencia de $GFR\alpha2$, el proceso de diferenciación puede completarse (155).

El sistema RET- $GFR\alpha$ posee gran relevancia en las células del sistema inmune, tanto linfocitos (B y T) como monocitos. De los co-receptores de RET el más abundante en este tipo de células es $GFR\alpha2$, seguido de lejos por $GFR\alpha1$. Además, neurturina (el ligando de $GFR\alpha2$) se postula como una proteína importante en la comunicación de las células que conforman sistema inmune (156).

La barrera hematorretiniana (BRB) es una estructura similar a la barrera hematoencefálica (BHE) conformada por células estrechamente unidas entre sí que separan el sistema ocular de la circulación sanguínea, y actúa como barrera protectora (157). En este sistema, $GFR\alpha 2$ se encuentra exclusivamente en las células que expresan el factor de von Willebrand, por otra parte, neurturina se expresa en las células de Muller. Estas evidencias permiten proponer que la correcta función de la barrera hematorretiniana está influenciada por la señalización mediada por neurturina y posiblemente por GDNF (158).

Otro órgano en el que $GFR\alpha 2$ juega un papel importante es la piel, donde está muy expresado en la dermis papilar y en las glándulas sudoríparas del cuero cabelludo, y en menor medida en la epidermis. Este receptor presenta expresión diferencial en las células mesenquimales y epiteliales del folículo piloso durante la fase del crecimiento del pelo (anagen). Sin embargo, la presencia de $GFR\alpha 2$ es prácticamente nula en las fases de transición (catagen) o de reposo (telogen) (159). En la piel, la señalización de neurturina mediada por $GFR\alpha 2$ está implicada en la respuesta fisiológica a diferentes factores externos como el dolor (160), la presión (161) y los cambios de temperatura, así como la sensibilidad al frío y el calor (160, 161).

6. ENANISMO

El enanismo es una condición médica que se define como un trastorno en el crecimiento de un individuo caracterizado por una altura y peso significativamente inferiores a los valores medios para esas características físicas encontrados en individuos del mismo sexo y edad (162).

La clasificación más simple del enanismo puede hacerse en dos tipos diferentes: enanismo proporcionado y enanismo desproporcionado, que se basan en la apariencia física del individuo.

Enanismo proporcionado es aquel que puede encontrarse en individuos de corta estatura que tienen los miembros y el tronco con un tamaño disminuido, pero de forma proporcionada. Y, por otra parte, el enanismo desproporcionado es una condición en la que algunas partes corporales del individuo tienen un tamaño reducido y otras se encuentran en valores en torno a la media o incluso superándola, aunque siempre va a ser un factor común la baja estatura (162).

6.1. ETIOLOGÍA DEL ENANISMO

La baja estatura asociada al enanismo puede deberse a multitud de factores. Algunas de estas causas se consideran variantes normales del crecimiento, pero otras sin embargo están clasificadas como patológicas (162).

6.1.1. Variantes normales de crecimiento que causan enanismo

Dentro del grupo de variantes normales de enanismo se pueden encontrar las tres siguientes:

- Baja estatura familiar (FSS). Se da en casos en los que los progenitores también presentan baja estatura. Para determinar los casos de FSS, se compara la estatura del individuo con la estatura media de sus progenitores. Aquellos casos en los que haya antecedentes de baja estatura en la familia y no se conozcan causas genéticas, se consideran baja estatura familiar. En esta condición, el crecimiento del individuo es la esperada para su edad y no se dan retrasos en el crecimiento óseo (163).
- Retraso constitutivo en el crecimiento y la pubertad (CDGP). La estatura en la edad infantil y adolescente es se encuentra dentro de la definida en el enanismo, pero se alcanza la altura esperada en la edad adulta. Individuos con

CDGP tienen un desarrollo óseo inferior al esperado para su edad, lo que permite diferenciarlos de individuos con FSS. La principal causante de esta sintomatología es la malnutrición durante la etapa gestante y la infancia (164, 165).

- Baja estatura idiopática (ISS). Originalmente se definió la baja estatura idiopática como aquella en la que no se conocen las causas del enanismo. Sin embargo, esta clasificación cada vez se encuentra más en desuso debido a los avances en secuenciación y estudios genómicos (166).

6.1.2. Causas patológicas del enanismo

- Origen endocrino.
 - Deficiencia de hormona de crecimiento. Bajos niveles de GH están directamente relacionados con bajos niveles de IGF-1, que a su vez se asocian con la baja estatura debido a falta de crecimiento del esqueleto y un menor desarrollo en musculatura y cartílagos. Este es el desorden endocrino más frecuente relacionado con el enanismo (167). Los casos de enanismo derivados del efecto de la hormona de crecimiento se conocen como enanismo hipofisario (168, 169).
 - Hipotiroidismo congénito (170, 171)
 - Síndrome de Cushing. La enfermedad de Cushing cursa con elevados niveles de producción y liberación de ACTH. Sin embargo, hay estudios que indican que en la enfermedad de Cushing puede perderse la respuesta a la GH en algunos tejidos (172).
- Causas genéticas. Existen diferentes síndromes que cursan con el enanismo como síntoma. Algunos de los más frecuentes son el síndrome de Turner (monosomía en el cromosoma X) (173), síndrome de Noonan (que puede deberse a mutaciones en diferentes genes: *KRAS*, *PTPN11*, *RAF1* y *SOS1*) (174) o el

síndrome de Aarskog (cuya mutación principal se da en el gen *FGD1*) (175).

- Afecciones óseas. Las afecciones óseas más frecuentes relacionadas con el enanismo son:
 - Acondroplasia: La acondroplasia es una enfermedad genética dominante en la que se produce una mutación en el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR-3*) (176). Este gen está implicado en la remodelación del hueso a partir de cartílago, principalmente en los huesos largos. Individuos con acondroplasia poseen una activación excesiva de *FGFR-3* que produce alteraciones en la formación del hueso en las extremidades. (176)
 - Displasia espondiloepifisaria: Se trata de una enfermedad genética que cursa con displasia en el hueso debido a mutaciones en el colágeno tipo 2 de la matriz extracelular, y que cursa con talla reducida y un crecimiento anormal de la columna vertebral y los huesos de la cadera y las extremidades (177).
- Desórdenes sistémicos, algunas enfermedades que pueden provocar la condición de enanismo son la mala nutrición, artritis juvenil, síndrome del intestino irritable (IBD), enfermedad celíaca, enfermedades crónicas renales, cáncer o terapia con glucocorticoides (178-180).

6.2. ENANISMO HIPOFISARIO

6.2.1 Enanismo por déficit del eje GH/IGF1 en humanos

Los casos de enanismo hipofisario son aquellos que están relacionados directamente con la hormona de crecimiento (GH). Dentro de estos se pueden distinguir 4 clases (168, 169):

- Tipo I, deficiencia aislada de GH o enanismo primordial (IGHD), este tipo de enanismo hipofisario es debido a mutaciones en el gen GH1 que altera la producción y liberación de la hormona de crecimiento, con niveles reducidos o indetectables en el suero de los pacientes de IGHD (181).
- Tipo II o síndrome de Laron, en el que existen mutaciones y deleciones en el gen que codifica para el receptor de la hormona de crecimiento (GHR), lo que produce elevados niveles de GH en sangre al mismo tiempo que baja concentración de IGF-1 en suero. Este enanismo está causado por la imposibilidad de producir IGF-1 en respuesta a GH (182).
- Tipo III, panhipopituitarismo o deficiencia combinada de hormonas hipofisarias. Es un tipo de enanismo hipofisario heredable causado por alteraciones genéticas que afectan al desarrollo y maduración embrionaria de las células endocrinas de la hipófisis. Se produce enanismo derivado del déficit de GH asociado a déficits de una o varias del resto de hormonas hipofisarias. El mayor porcentaje de casos, >10%, es causado por mutaciones en el gen que codifica para *PROPI*, un factor de transcripción específico de las células madre hipofisarias durante el desarrollo embrionario (183). Pero también son causantes en menores porcentajes, algunas mutaciones en los genes *POU1F1/PIT1*, *LHX4*, *LHX3*, y *HESX*. Mutaciones en otros genes, entre otros *SOX2*, *BRAF*, o *FOXA2*, asocian

panhipopituitarismo a otros síndromes como Displasia septo-óptica (184, 185) o diabetes (186, 187).

- **Tipo IV**, se consideran aquellos defectos por mutaciones puntuales o splicing alternativos del gen de GH, donde hay inconsistencias entre las analíticas de medición de GH, y los datos clínicos de su acción. En algunos de estos defectos, la GH mutada se detecta en suero, pero tiene acción defectiva en el receptor, como en el Síndrome de GH normal con baja IGF-1; en otros defectos, no se detecta GH en inmunoensayos habituales, pero no hay déficit real de IGF-1 ni talla baja, como en el síndrome de Kowarski (188, 189).

6.2.2. Modelos animales de enanismo hipofisario

El estudio in vivo del enanismo hipofisario ha podido estudiarse en gran medida gracias a la contribución de diferentes modelos animales. Los modelos iniciales consistían en mutaciones espontáneas del gen en el ratón entero, los denominados modelos globales, entre los que destacan principalmente el ratón enano de Ames (*df/df*) que posee mutaciones en *Prop1* (190), el ratón enano de Snell (*dw/dw*) (191) que posee mutaciones en el gen *Pit1* (192, 193), el ratón lit/lit, que presenta un defecto genético en el gen GHRHR, receptor de la GHRH hipotalámica (194).

Después de estos modelos espontáneos, se realizaron modelos genéticos con inserciones o deleciones de fragmentos de exones, los modelos *targeted*. Un ejemplo es el ratón GHRKO, modelo de enanismo de Laron, que reproduce el síndrome de Laron y tiene mutado el gen del receptor de la hormona de crecimiento (GHR) (195, 196). Y precisamente a este grupo pertenece el ratón *Gfra2-KO* estudiado en la presente tesis doctoral (65, 68)

Estos son los modelos más utilizados en el estudio del enanismo hipofisario, sin embargo, alteraciones en muchos otros genes

relacionados con el desarrollo embrionario de la bolsa de Rathke, la fisiología de la hipófisis, o la acción del eje GH/IGF-1 pueden estar ligados a la condición de enanismo (183). Entre ellos, como hemos visto más arriba, los modelos genéticos de alteración de *Sox2*, *Braf*, *Lhx3*, *Lhx4*, *Foxa2* y muchos otros genes ligados a panhipopituitarismo asociado a otros defectos. Estos modelos reproducen el fenotipo complejo encontrado en humanos, donde además de defectos en la hipófisis, que afectan a las células endocrinas somatotropas, se pueden encontrar malformaciones septo-ópticas, craneofaciales, y defectos en otras glándulas como el páncreas. Estos modelos genéticos permiten elegir la población donde se induce la expresión del gen mutado, mediante recombinación de elementos genéticos STOP, como loxP o Fl. Por ejemplo, se puede inducir expresión en la población de células madre iniciales de la bolsa de Rathke, usando el promotor de SOX2 para que exprese la Cre-recombinasa; o la población más madura ya progenitora, usando el promotor de Hex1, o de Prop1 para expresar la Cre-recombinasa (185, 197, 198).

OBJETIVOS

Las células madre de la hipófisis son las encargadas de dar lugar a los cinco tipos de células endocrinas diferenciadas que producen las seis hormonas de la adenohipófisis. Existen dos poblaciones de células madre en la hipófisis, una primera población corresponde con el nicho de células madre, la última línea de células de la adenohipófisis y el lóbulo intermedio que bordea la zona marginal. De este nicho nacen prolongaciones con forma tubular de células hacia la adenohipófisis. Y la segunda población de células madre son los progenitores comprometidos que se encuentran dispersos por la adenohipófisis. Las células de ambas poblaciones presentan diferentes marcadores que las definen. Las células madre del nicho expresan *Gfra2*, *Prop1*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf4* y *Oct4*. Y por otro lado los progenitores comprometidos expresan principalmente los marcadores *Sox2/Sox9* y *YAP1*.

Existen dos modelos de ratón KO para *Gfra2*, uno desarrollado en la Universidad de Helsinki en el grupo de Airaksinen y otro en la Universidad de Richmond, en el grupo de Millbrandt. El fenotipo de ambos animales puede resumirse en los siguientes puntos:

- Crecimiento postnatal retardado
- Falta de inervación colinérgica en el lagrimal y las glándulas salivares
- Inervación colinérgica deficiente en el plexo mientérico
- Baja actividad contráctil en el intestino delgado
- Falta de inervación en páncreas exocrino
- Mala absorción de las grasas
- Aumento del consumo de agua y comida, así como del gasto metabólico
- Disminución de la composición de grasa corporal

Pero desde estos dos grupos no han estudiado la implicación de la hipófisis en el modelo *Gfra2*-KO. En base a que *Gfra2* es una proteína que en la hipófisis solo se expresa en el nicho de células madre, y que los modelos de ratón KO para *Gfra2* presentan un tamaño reducido, nuestra hipótesis es que *Gfra2* posee un papel relevante en las células

madre del nicho hipofisario y en las prolongaciones de células madre que nacen el mismo regulando procesos clave de las células madre como son el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación. Las alteraciones ocasionadas en este tipo de células podrían estar detrás de los problemas de crecimiento encontrados en el ratón KO para $Gfra2$, que debido a los problemas de reclutamiento y diferenciación de las células madre pueda tener una hipófisis con un número de células somatotropas disminuido y que la falta de hormona de crecimiento sea una de las causas que llevan al tamaño reducido de los animales KO para $Gfra2$.

Por todo ello, el objetivo general de esta tesis doctoral es determinar el papel de $Gfra2$ y su involucración en el fenotipo generado en el ratón $Gfra2$ -KO.

Del objetivo general se derivan los siguientes objetivos específicos:

1. Validar el modelo $Gfra2$ -KO para su uso en el estudio de la hipófisis
2. Estudiar el fenotipo presentado por el ratón $Gfra2$ -KO y determinar si se trata de un modelo de enanismo hipofisario.
3. Comprobar la implicación de la vía de RET y $GFR\alpha$ en la hipófisis en ausencia de $Gfra2$.
4. Estudiar el comportamiento de las células del nicho hipofisario y los progenitores de la adenohipófisis en ausencia de $Gfra2$, tanto en animales adultos como en desarrollo.

5. Valorar la relevancia de $Gfr\alpha 2$ como marcador de células madre hipofisarias y explorar el posible uso de estas como terapia para el enanismo.
6. Estandarización de nuevas técnicas de microscopia que permitan ahondar en el estudio del nicho hipofisario y las condiciones que le afectan, como el enanismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

1.1. ASPECTOS ÉTICOS EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Los procedimientos realizados con animales fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité de bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (procedimientos de la Profesora Clara Álvarez Villamarín: 15010/14/005 y 15012/2020/008), financiados por los siguientes proyectos BFU2016-76973-R y PID2019-110437RB-I00 y siguiendo la normativa vigente:

- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Real decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Real Decreto 1386/2018, de 19 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Orden de 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el Comité de Bioética de la Consellería del Medio Rural.

- Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.

Durante el desarrollo de este trabajo se ha tenido en cuenta el bienestar animal, intentando reducir el estrés, el dolor o el daño duradero en los animales. De acuerdo con el artículo 4 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, se implementa el Principio de las 3Rs, es decir, reemplazo, reducción y refinamiento de los procedimientos. De esta manera se ha intentado reducir el número de experimentos realizados con animales y evitar el uso innecesario de animales dentro de los mismos, sin que afecte o comprometa el resultado de los experimentos.

Para poder llevar a cabo los experimentos con animales se obtuvo el título correspondiente: Curso de Experimentación Animal Categoría b, c y d según el Real Decreto Catalán 214/1997 del 30 de julio, acreditado por el Departamento de Territorio y Sostenibilidad de la Generalitat de Cataluña.

Todos los procedimientos con animales de experimentación realizados durante la presente tesis doctoral se llevaron a cabo en el Centro de Biomedicina Experimental de Galicia (CEBEGA), con número de registro REGA ES150780292901.

1.2. ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los animales se estabularon en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*) en racks con cubetas individualmente ventiladas (IVC- GM500; Tecniplast) y viruta (SAFE® select fine) autoclavada.

La sala de alojamiento se mantuvo con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz: 08:00- 20:00 h), a una temperatura de 22°C y un 55 % de humedad relativa.

Los ratones se alimentaron *ad libitum* con una dieta estándar irradiada (2918 Teklad Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet, Inotiv) y agua autoclavada.

Además, se les proporcionó enriquecimiento ambiental tipo túneles de cartón, *nestlets*, *cocoon* y *sizzlenest* (Datesand) para satisfacer sus necesidades etológicas.

La estabulación fue colectiva teniendo en cuenta las dimensiones de la cubeta y el peso corporal de los animales para garantizarles un espacio adecuado durante los procedimientos, siguiendo la legislación vigente (cuadro 1.1 de la sección B del Anexo II del RD 53/2013, de 1 de febrero).

1.3. MODELOS ANIMALES UTILIZADOS

La investigación desarrollada en la presente tesis doctoral ha sido posible gracias a la utilización de diferentes modelos de ratón modificados genéticamente (OMG). Los cuales se encuentran detallados a continuación:

1.3.1. Modelo de ratón *Knockout* (KO) para *Gfra2*

Este modelo de animal fue cedido amablemente por Matti M. Airaksinen de la Universidad de Helsinki, en Finlandia. Esta cepa de ratón modificado genéticamente se generó mediante la eliminación de la parte final del primer exón y la parte inicial del segundo exón, dando lugar a un modelo en el que no se expresa la proteína codificada en el gen *Gfra2*. Al tratarse de un modelo de ratón *Knockout* (KO) para *Gfra2*, todas las referencias a este modelo de animal se harán de la siguiente forma: *Gfra2*-KO (65, 68). El fondo

genético de este animal es C57Bl/6 x 129Sv/J, sin embargo, una vez estabulado en el CiMUS, y posteriormente en CEBEGA, se cruzó exclusivamente con animales de la cepa pura C57Bl/6, generando un modelo KO para *Gfra2* con fondo genético C57Bl/6.

Como *Gfra2* es una proteína que en la hipófisis se expresa exclusivamente en las células madre del nicho hipofisario, se plantea la posibilidad de que esta proteína sea relevante en la función de las células madre hipofisarias y en la fisiología de este órgano. Este modelo animal va a ser utilizado precisamente para estudiar la implicación de *Gfra2* en la fisiología hipofisaria.

En el modelo *Gfra2*-KO pueden encontrarse tres genotipos diferentes:

- Alelo salvaje (*wild type*, WT) el cual no tiene ninguno de los alelos mutados (*Gfra2*^{+/+})
- Heterocigotos, que presentan un alelo salvaje y uno mutado (*Gfra2*^{+/-})
- *Knockout* (KO), que presenta los dos alelos mutados (*Gfra2*^{-/-})

Para estudiar la implicación de *Gfra2* en la hipófisis se comparan los resultados obtenidos en animales *Gfra2*^{-/-} (KO) respecto a animales *Gfra2*^{+/+} (WT). En la medida de lo posible se ha intentado que la comparación sea siempre entre animales hermanos de camada.

La estrategia de cruce seguida para la generación de animales tanto *Gfra2*^{-/-} como *Gfra2*^{+/+} ha consistido en el establecimiento de tríos (un macho y dos hembras) en los que todos los progenitores poseen el genotipo heterocigoto (*Gfra2*^{+/-}), siendo posible encontrar los tres genotipos en la descendencia. Para favorecer la generación de nuevas camadas y aprovechar el celo postparto, las hembras gestantes no se separan del macho tras la cópula. Los cruces se mantienen durante un máximo de 6 meses o 6 camadas por hembra progenitora, de esta forma se evita seleccionar caracteres ajenos al propio fenotipo producido por la mutación en *Gfra2*.

La elevada demanda de animales *Gfra2*^{-/-} en algunos experimentos hizo que fuera necesario plantear una estrategia de cruce distinta. En estos casos los cruces se establecen también en forma de tríos en los que el progenitor macho tiene genotipo *Gfra2*^{-/-} y las progenitoras hembras poseen genotipo *Gfra2*^{+/-}. Las hembras con genotipo *Gfra2*^{-/-} son estériles, por lo que no pueden ser utilizadas para la generación de nuevas camadas. En estos experimentos se utilizan los animales con genotipo *Gfra2*^{+/-} como controles, ya que el fenotipo presentado es el mismo que en animales *Gfra2*^{+/+}.

1.3.2. B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}

En este modelo modificado genéticamente, uno de los dos alelos del gen *Sox2* se sustituye por un marco de lectura abierto para un gen de fusión CreER^{T2}, codificante para una enzima Cre-recombinasa. Se trata de un modelo de Cre-recombinasa inducible, lo que significa que, aunque las células del ratón sintetizan la encima, esta va a permanecer inactiva hasta la administración del compuesto que induce su actividad, en este caso el Tamoxifeno. La enzima Cre-recombinasa reconoce las secuencias LoxP presentes en el genoma y en función de la localización y orientación de éstas, esta herramienta puede ser usada para diferentes funciones como pueden ser la delección o la inserción de fragmentos de ADN en el modelo animal.

Sox2 se expresa junto a *Gfra2* en las células del nicho hipofisario, aunque en este caso, la expresión de *Sox2* no es exclusiva de las células del nicho ya que también se expresa en las células progenitoras dispersas en la adenohipófisis. Seleccionamos este modelo debido a que nos permite activar la Cre-recombinasa en las células madre del nicho y en todas aquellas que han sido reclutadas desde el mismo y que todavía no se han diferenciado a célula productora de hormonas.

La mutación introducida en estos animales produce una alteración importante en el gen *Sox2*, y dada la relevancia que tiene la proteína

Sox2 en el desarrollo, hace que los animales homocigotos para la mutación no sean viables y no lleguen siquiera a término. Debido a la letalidad observada en ausencia de Sox2, la estrategia de cruce que se sigue para esta línea transgénica consiste siempre en el cruce de un progenitor heterocigoto con otro que presente el alelo salvaje (WT). La dificultad que presenta este sistema de cruce es que en la descendencia solo aparecen dos genotipos $Sox2^{CreERT2+/-}$ y $Sox2^{CreERT2-/-}$, de los cuales solo los que presenten el genotipo $Sox2^{CreERT2+/-}$ pueden ser utilizados en experimentos.

1.3.3. B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J}

Estos ratones R26-stop-EYFP poseen dos secuencias LoxP flanqueando un codón de STOP al que se le ha insertado el gen de la proteína EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescence Protein*) en el locus *Gt(ROSA)26Sor*. Este gen es expresado en multitud de tejidos, entre los que se encuentra la hipófisis. *Gt(ROSA)26Sor* produce un ARN largo no codificante (ARNInc) que se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo. De esta forma, cuando estos ratones se cruzan con otras cepas que expresan la Cre-recombinasa, se elimina la secuencia STOP y se comienza a expresar EYFP.

Las mutaciones introducidas en este cruce no producen ningún fenotipo, por lo que en la estrategia de cruce se pueden utilizar todos los genotipos en ambos progenitores. En este caso se fijó el alelo $R26^{YFP+/+}$ en todos los cruces establecidos para generar animales que van a utilizarse en experimentos, ya que de esta manera se asegura de que siempre van a tener la secuencias LoxP y el gen codificante para EYFP.

1.3.4. Gfra2-KO; B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)}Hoch/J; B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)}Cos/J

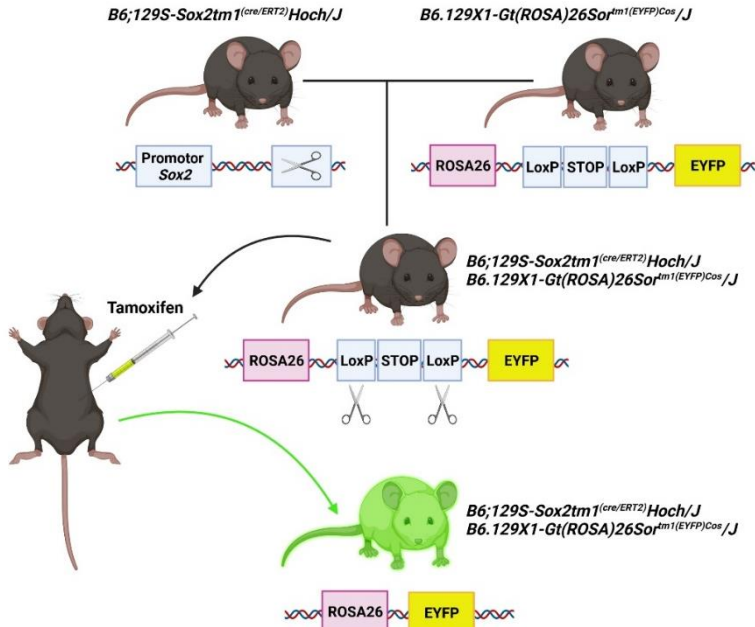


Figura 10. Estrategia seguida para obtener ratones que expresen EYFP. Establecimiento de un cruce parental que permite obtener descendencia Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{EYFP+/+} y administración de Tamoxifeno para activar la Cre-recombinasa y activar la expresión de EYFP. Diseño realizado por Alberto Pradilla Dieste utilizando el programa BioRender.

Este modelo animal es el resultado del cruce entre los tres modelos animales previamente explicados. Tras la administración de la dosis correspondiente de Tamoxifeno, las células que expresan Sox2 comienzan también a expresar EYFP, y quedan marcadas permanentemente con esta proteína fluorescente. Al producirse este corte mediado por la Cre-recombinasa, las células madre del nicho hipofisario y las progenitoras comienzan a expresar EYFP de forma constitutiva que no se pierde tras la división celular ni en las células que sufren el proceso de diferenciación a célula productora de hormonas.

Esta línea transgénica de animales fue generada durante la realización de la presente tesis doctoral y la estrategia de cruce seguida fue la siguiente:

1. Generación de animales $Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$. Estos animales se obtuvieron mediante el cruce de progenitores $Sox2^{CreERT2-/-}; R26^{YFP+/+}$ con $Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP-/-}$. Obteniendo en las primeras generaciones filiales animales con genotipo con $Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/-}$, que posteriormente serían cruzados con otros $Sox2^{CreERT2-/-}; R26^{YFP+/+}$, permitiendo de esta forma fijar el alelo homocigoto mutado $R26^{YFP}$ al tiempo que se obtienen ratones $Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$.
2. Generación de animales $Gfra2^{+/-}; R26^{YFP+/+}$. Estos animales se obtienen a través de cruces con progenitores $Gfra2^{+/-}; R26^{YFP-/-}$ y $Gfra2^{+/+}; R26^{YFP+/+}$. En las primeras generaciones filiales se obtienen animales doble heterocigotos $Gfra2^{+/-}; R26^{YFP+/-}$. Que posteriormente serán cruzados entre sí para fijar el alelo homocigoto mutado $R26^{YFP}$ y obtener ratones $Gfra2^{+/-}; R26^{YFP+/+}$.
3. Generación de animales $Gfra2^{+/-}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$, estos ratones se obtienen de cruces en los que un progenitor es $Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$ y el otro progenitor tiene el genotipo $Gfra2^{+/-}; R26^{YFP+/+}$. De la descendencia de estos cruces se seleccionan animales $Gfra2^{+/-}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$ y $Gfra2^{+/-}; Sox2^{CreERT2-/-}; R26^{YFP+/+}$ que son los utilizados en cruces para la obtención de animales que van a ser utilizados en experimentos.

Sin embargo, la generación de animales triples mutantes $Gfra2^{-/-}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$ conlleva una gran complejidad debido a las propias dificultades de cruzamiento que presentan las cepas $Gfra2$ -KO y $B6;129S-Sox2tm1(cre/ERT2)Hoch/J$.

1.4. GENOTIPADO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Como ya se ha explicado en cada uno de los modelos genéticamente modificados que han sido utilizados, la descendencia puede tener diferentes genotipos en función de la cepa. Para poder incluir cada ratón en su grupo correspondiente, seleccionar aquellos que expresan el sistema de Cre-LoxP o saber que animales son más favorables para ser utilizados en cruces, es fundamental conocer el genotipo de cada animal. Según el animal, puede ser necesario el genotipado para una, dos o incluso las tres mutaciones que se les han provocado.

Para el genotipado de los ratones se precisa una muestra de tejido de la que se extrae el ADN. La muestra de tejido que se utiliza es el fragmento de oreja que se obtiene tras realizar una muesca que permite la identificación de cada animal. Para aquellos animales que deban ser genotipados en más de una ocasión, tanto vivos como sacrificados, se corta el fragmento final de la cola y es este el tejido que se utiliza para obtener el ADN.

La extracción del ADN se lleva a cabo utilizando el kit DNeasy Blood & tissue (QIAGEN, 69504), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se mide la concentración de ADN en el extracto mediante un nanodrop (ThermoFisher, NanoDrop ONE, ND-ONE-W). Para el genotipado son necesarios 100ng de ADN de cada muestra.

1.4.1. Genotipado de la cepa transgénica $GFR\alpha 2$ -KO

La mezcla de reacción para esta cepa fue la siguiente:

- 4 μ L de tampón 10X
- 0,4 μ L de DNTPs 10 mM
- 0,4 μ L Polimerasa Phire Hot Start II (Thermofisher, F122S)

- 13,4 μ L de agua destilada
- 0,4 μ L cebador directo WT P1 10 μ M
- 0,4 μ L cebador directo KO P2 10 μ M
- 0,8 μ L cebador directo WT-KO P3 10 μ M

Tabla 3. Cebadores utilizados en la PCR de genotipado de la cepa GFR α 2-KO.

Nombre	Cebador	Secuencia 5'-3'
P1	Directo WT	CACATACACACAAAACCTGTGGG
P2	Directo KO	ATTTCGACGCGCATCGCCTTC
P3	Reverso WT-KO	ATGTTGGAAGTCTCCTTCTCG

Para la PCR, la mezcla de reacción se coloca en tubos independientes y se añade 1 μ L del ADN extraído de la oreja de los ratones. Estos tubos se llevan a un termociclador (T100TM Thermal Cycler, BIORAD, 1861096). La configuración del programa de amplificación en el termociclador para genotipado de la cepa GFR α 2-KO está recogida en la **tabla 4**.

Tabla 4. Configuración del termociclador para genotipado de la línea GFR α 2-KO.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 seg	1
Desnaturalización	98	5 seg	35
Hibridación	58	5 seg	
Extensión	72	15 seg	
Extensión final	72	1 min	

Una vez finalizada la amplificación del ADN, se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% para separar los constructos amplificados y determinar el genotipo de cada animal. Para esta línea, el genotipo WT produce una banda de 326 pb, el KO una banda de 500 pb y el heterocigoto, ambas bandas de 326 pb y 500 pb.

1.4.2. Genotipado de la cepa B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}

Para el genotipado de la línea B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J} se utiliza la siguiente mezcla de reacción:

- 4 µL de tampón 10X
- 0,4 µL de DNTPs 10 mM
- 0,4 µL Polimerasa Phire Hot Start II (Thermofisher, F122S)
- 13,4 µL de agua destilada
- 0,4 µL cebador directo
- 0,4 µL cebador reverso

Tabla 5. Cebadores utilizados en la PCR de genotipado de la cepa B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}.

Cebador	Secuencia 5'-3'
Directo	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
Reverso	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT

Para la PCR, la mezcla de reacción se coloca en tubos independientes y se añade 1 µL del ADN extraído de la oreja de los ratones. Estos tubos se llevan a un termociclador (T100TM Thermal Cycler, BIORAD, 1861096). La configuración del programa de amplificación en el termociclador para genotipado de la cepa B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J} está recogida en la **tabla 6**.

Tabla 6. Configuración del termociclador para genotipado de la línea B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	40
Hibridación	52	30 seg	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	

Una vez finalizada la amplificación del ADN, se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 3% para separar los constructos amplificados y determinar el genotipo de cada animal. En este caso

solo es posible detectar una banda de 100 pb en aquellos animales que posean el constructo transgénico, es decir, los animales heterocigotos. Los animales en los que su ADN no haya dado lugar a la amplificación tienen el genotipo WT, sin mutación.

1.4.3. Genotipado de la cepa B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J}

En el genotipado de la cepa B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J} se utiliza la siguiente mezcla de reacción:

- 4 µL de tampón 10X
- 0,4 µL de DNTPs 10 mM
- 0,4 µL Polimerasa Phire Hot Start II (Thermofisher, F122S)
- 13,6 µL de agua destilada
- 0,4 µL cebador directo
- 0,4 µL cebador reverso

Tabla 7. Cebadores utilizados en la PCR de genotipado de la cepa B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J}.

Cebador	Secuencia 5'-3'
Directo WT	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
Directo mutado	AAGACCGCGAAGAGTTTGTC
Reverso común	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT

Para la PCR, la mezcla de reacción se coloca en tubos independientes y se añade 1 µL del ADN extraído de la oreja de los ratones. Estos tubos se llevan a un termociclador (T100TM Thermal Cycler, BIORAD, 1861096). La configuración del programa de amplificación en el termociclador para genotipado de la cepa B6;129S-Sox2tm1(cre/ERT2)Hoch/J está recogida en la **tabla 8**.

Tabla 8. Configuración del termociclador para genotipado de la línea B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 seg	1
Desnaturalización	98	5 seg	35
Hibridación	58	5 seg	
Extensión	72	15 seg	
Extensión final	72	1 min	

Tras la amplificación del ADN, se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% para separar los constructos amplificados y determinar el genotipo de cada animal. En los animales que no posean la mutación es posible detectar una banda de 600 pb, en el animal que presenta los dos alelos mutados aparece una banda de 320 pb, Y finalmente en los animales que solo presentan un alelo mutado se detecta la doble banda de 320 pb y 60 0pb.

1.5. ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFENO

El Tamoxifeno (Sigma, T5648) se disuelve en aceite de girasol (Sigma, S5007) a una concentración final de 20 mg/ml. La pauta y vía de administración depende de la edad del animal al que se le va a inyectar el tamoxifeno. En ratones adultos (de entre 90 y 100 días) la administración se hace por vía intraperitoneal y la pauta recomendada son 5 días consecutivos a una dosis de 0,075 mg/g de peso, lo que equivale a 100 microlitros por dosis y un volumen final de 0,5 mililitros. Una acumulación de 0,5 mililitros de aceite en el peritoneo de los animales no resulta dañina. Para la administración del Tamoxifeno disuelto en aceite de girasol es conveniente liberar lentamente el contenido de la jeringuilla en el peritoneo de los ratones, ya que el aceite es muy denso y una liberación rápida puede producir que la aguja se suelte, dañando los órganos internos. Además, es recomendable esperar unos segundos antes de retirar la aguja y de esta forma evitar que haya reflujo y no se pueda ajustar bien la dosis.

En animales de entre 10 y 15 días se utiliza también una solución de Tamoxifeno disuelto en aceite de girasol a una concentración final de 20 mg/ml. La administración es también por vía intraperitoneal, pero en este caso solo son dos dosis en días consecutivos con un volumen de 50 microlitros por dosis.

En animales neonatos (o hasta día postnatal 4, P4), la inyección se hace por vía subcutánea en la región interescapular. En este caso la solución de Tamoxifeno se prepara a una concentración de 2 mg/ml y se administran dos dosis de 50 microlitros cada una en días no consecutivos. Dosis mayores resultan en efectos negativos, principalmente en el hígado, y produce la muerte de estos animales.

1.6. ADMINISTRACIÓN DE 5-ETINIL-2'-DEOXIURIDINA (EdU)

La 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) es un compuesto similar a la 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), y ambos son análogos de la timidina. Las células que entran en fase S del ciclo celular captan estos compuestos y los utilizan para sintetizar las nuevas hebras de ADN, quedando intercalados entre el resto de los nucleótidos. De esta forma es posible estudiar la proliferación celular en animales o en cultivos celulares. A diferencia de la BrdU, que se detecta mediante el uso de anticuerpos, la detección de la EdU es más sencilla ya que se realiza mediante reacciones de oxidación y reducción que se conocen como química Click.

La EdU (Sigma, 900584) se disuelve en agua destilada a una concentración de 10 mM. En ratones adultos la administración de EdU se hace 24 horas antes del sacrificio inyectando 200 microlitros por vía intraperitoneal. En ratones de 10 días se realiza también una única inyección de 50 microlitros 24 horas antes del sacrificio. En cultivos celulares, la EdU se añade al medio de cultivo a una concentración de 10 μ M 24 horas antes del final del experimento.

1.7. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Una vez los ratones alcanzan la edad necesaria para ser destetados (P21-P28), se les realiza un seguimiento semanal de peso y longitud del cuerpo (desde la nariz hasta la base de la cola) hasta la edad adulta, 90-100 días. La medición de los ratones se realiza bajo anestesia. Para ello se les mantiene en una cámara de inducción a una concentración constante de isoflurano (Isoflutek 1000 mg/g, Karizoo) durante 5 minutos. Posteriormente los ratones se sujetan verticalmente de los incisivos superiores sobre papel milimetrado para medir la longitud del cuerpo. Inmediatamente después, se pesan en una balanza de precisión (Fisher Scientific, PSS602) y se devuelven a la cubeta para que puedan recuperarse del efecto de la anestesia.

Para el objetivo de estudiar el fenotipo de enanismo que parece estar asociado a la ausencia de *Gfra2*, se midieron algunas características físicas de los ratones una vez estos alcanzan la edad adulta. De esta forma se pretende estudiar el tipo de enanismo que presentan estos animales, si se trata de un enanismo proporcionado en el que los rasgos físicos tienen un tamaño reducido, pero en una tendencia similar a la del cuerpo, o si por el contrario se trata de un fenotipo de enanismo desproporcionado, en el que el cuerpo tiene un tamaño normal pero los miembros de tamaño reducido, como ocurre en la acondroplasia. Algunos de los rasgos que pueden estar relacionados con el enanismo son el peso corporal, el tamaño de las extremidades o diferencias en el tamaño craneofacial. Para ello, una vez el animal llega a la edad adulta se sacrifica y se le realizan las siguientes medidas:

- Peso corporal
- Longitud del cuerpo y de la cola, como se ha explicado anteriormente para realizar el seguimiento de los animales
- Longitud de la tibia. Para realizar esta medición se apoya la planta del pie sobre una superficie, permitiendo que la

articulación de la rodilla se doble en un ángulo de 90 grados. Se utiliza un calibre.

- Longitud de pies y manos. Se apoyan sobre una superficie plana y se miden con un calibre.
- Longitud de la oreja. Se utiliza un calibre para medir la distancia desde la apertura del canal auditivo hasta el punto más distal de la circunferencia de la oreja.
- Longitud de la cabeza. Se utiliza un calibre para medir la distancia entre la nariz y la base del cráneo.
- Anchura de la cabeza. Se utiliza un calibre para medir la distancia entre las dos orejas.
- Longitud de la mandíbula inferior. Se utiliza un calibre para medir desde la base de los incisivos inferiores hasta la parte posterior del cráneo.
- Longitud de los incisivos inferiores y superiores. Se utiliza también un calibre.

1.8. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1.8.1. Obtención de suero

Una vez los ratones han completado el seguimiento hasta la edad adulta, se les realizan extracciones de sangre durante 3 semanas consecutivas para medir la concentración de diferentes hormonas en suero. Las muestras de sangre se obtienen un día a la semana, entre las 16 y las 17 horas para interferir lo menos posible con los ciclos de los animales. La extracción de sangre se realiza en el plexo submandibular:

- Se realiza una ligera punción (aguja de 25G x 5/8”) en la mejilla del animal en el punto en el que convergen dos líneas imaginarias, una desde el canto del ojo hasta el inicio del hombro y otra desde la boca hasta la base de la oreja. Si el animal está correctamente inmovilizado, y la piel

de la cara está estirada, es posible reconocer al tacto donde se encuentra la vena temporal superficial, ya que al ejercer una leve presión con la punta de la aguja la resistencia de la vena es menor que la de la musculatura de la mejilla del ratón.

- Una vez la sangre comienza a fluir fuera de la vena, se recoge en tubos específicos para la obtención de suero (Sarstedt, Microvette®200, 20.1291). El volumen máximo que puede extraerse son 100 microlitros por cada 10 gramos de peso. Como se realizan extracciones en semanas consecutivas, es recomendable que el volumen obtenido en cada extracción sea menor al máximo para favorecer la recuperación de los ratones.
- Se cierran los tubos y se invierten dos veces para mezclar bien la sangre recogida.
- Los tubos con la sangre se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos para favorecer la coagulación.
- Se centrifugan los tubos a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se recoge el sobrenadante y se guarda a -20°C hasta que vaya a ser analizado.

Esta vía de extracción de sangre permite obtener muestras de suero limpias y de gran calidad. Sin embargo, en algunas ocasiones es posible que alguna de las muestras esté hemolizada o tenga restos de células sanguíneas. Como se realizan varias extracciones de sangre de cada ratón, los sueros hemolizados se descartan para evitar posibles interferencias en las mediciones que se van a realizar.

1.8.2. Obtención de tejido fresco

Para el estudio de la expresión de proteínas y ácidos nucleicos son necesarias muestras de hipófisis frescas de ratones adultos de entre 90 y 120 días.

Para la obtención de tejido fresco, los animales son sacrificados mediante inhalación de dióxido de carbono. Una vez confirmada la

ausencia de reflejo podal, se secciona el cuello lo más cerca posible de los hombros para evitar dañar la silla turca. Posteriormente se utiliza una tijera para cortar por los dos laterales de la cabeza y poder abrir el cráneo del ratón. Para evitar romper los huesos del cráneo, se utiliza el foramen magnum como guía para el filo de la tijera y se corta por las suturas de las crestas frontoparietales. Cuando el cerebro queda libre, se retira cuidadosamente. Primero se seccionan los nervios ópticos y posteriormente se utilizan unas pinzas de punta curva para retirar el cerebro hacia la parte posterior del cráneo, dejando visible la hipófisis sobre la silla turca.

Como la neurohipófisis está formada principalmente por terminaciones nerviosas, se retira para enriquecer la muestra en las células de interés, que son las presentes en la adenohipófisis y el nicho de células madre. La neurohipófisis es una estructura redondeada que se encuentra en la parte central del órgano y es fácilmente distinguible del resto de la hipófisis ya que posee un tono grisáceo más oscuro.

Finalmente, para retirar la adenohipófisis se utilizan unas pinzas finas para romper las meninges que recubren la hipófisis y de esta manera poder recogerla sin que se fragmente. Las hipófisis extraídas se guardan en tubos eppendorf de 2 mililitros y se mantienen en hielo seco hasta que vayan a extraerse. En caso de no realizar la extracción de proteínas o ARN en el momento en el que se extrae el tejido, este se guarda a -80°C hasta que vaya a ser utilizado.

1.8.3. Perfusión intracardiaca y obtención de tejido fijado

Las técnicas de microscopia requieren de tejido fijado que va a ser teñido y posteriormente observado al microscopio. Como gran parte de las técnicas de microscopia que se han realizado incluyen la observación de las muestras en microscopio de fluorescencia, es importante eliminar toda la sangre posible. Esto es debido a que la sangre del ratón contiene inmunoglobulinas, que posteriormente pueden ser reconocidas por los anticuerpos secundarios,

secuestrándolos y provocando tinciones inespecíficas y falsos positivos. Además, los glóbulos rojos presentan una elevada autofluorescencia en múltiples longitudes de onda.

Debido a que la fijación por perfusión es un procedimiento agresivo, ha de realizarse bajo anestesia profunda sin recuperación. Para ello se administra por vía intraperitoneal una mezcla de ketamina y xilacina. La composición de la solución anestésica se encuentra detallada en la **tabla 9**. La dosis en ratón es de 100 microlitros por cada 10 gramos de peso.

Tabla 9. Composición de la mezcla anestésica inyectable para ratón.

Componentes	Volumen	Concentración inicial	Referencia
Suero fisiológico	6 mL	0,9% NaCl	Vitulia
Ketamina	1 mL	100 mg/ml	Richterpharma
Hidrocloruro de Xilacina	0,250 mL	20 mg/ml	Bayer

Una vez el ratón está anestesiado, se verifica la ausencia de reflejo podal, lo que confirma que el animal está en un plano anestésico profundo y ya puede realizarse el procedimiento que se llevará a cabo en la cabina de extracción de gases.

Para la perfusión, animal se coloca en posición decúbito supino sobre una superficie plana, estirando y sujetando las extremidades anteriores con la ayuda de cinta adhesiva. Es importante que el cuerpo del animal se mantenga inmóvil pero que la piel y la musculatura del torso no queden completamente estiradas. Una vez el ratón queda fijado, se abre la caja torácica para dejar al descubierto el corazón. Es conveniente que siga latiendo cuando se va a comenzar la perfusión para favorecer el bombeo del suero. Para iniciar la perfusión, se introduce una cánula (conectada a una bomba peristáltica (New Era Pump Systems, Inc. Modelo: NE- 9000B)) en el ventrículo izquierdo (por el ápex) y se realiza una incisión profunda en la aurícula derecha, de esta forma se abre el circuito para permitir la salida de la sangre y del líquido de perfusión. Un ratón adulto se perfunde con 70 mililitros

de suero glucosado al 5% a una velocidad constante de 0,35 mL/segundo. Una vez se ha administrado todo el volumen de suero, se pasan 70 mililitros de formalina tamponada al 10% para fijar los tejidos. Para ratones P10 se utilizan 30 mililitros de suero, seguidos de 30 mililitros de formalina tamponada, a una velocidad constante de 0,15 mL/segundo.

Para completar la fijación, la cabeza del ratón (a la cual se le ha extraído el cerebro como se explica en el apartado 1.8.2) se guarda en un tubo con formalina tamponada al 10% durante toda la noche, pero sin sobrepasar las 16 horas. Ya que el tejido sufre exceso de fijación y se pueden producir alteraciones en la integridad de este. Para evitar esta sobrefijación, el tejido se pasa a un tubo con PBS y se mantiene a 4°C hasta que vaya a ser utilizado.

1.9. EXPERIMENTO DE RESCATE DEL FENOTIPO DE ENANISMO

El objetivo de este experimento consiste en revertir el fenotipo de enanismo causado en animales de la cepa *Gfra2*-KO mediante una inyección de células de ratones *Gfra2*^{+/+} directamente en la hipófisis de ratones neonatos con genotipo *Gfra2*^{-/-} y estudiar si estas células de ratones *Gfra2*^{+/+} eran capaces de proliferar y diferenciarse hasta recuperar el tamaño de los ratones *knockout*.

1.9.1. Generación de animales donantes y receptores de células *Gfra2*^{+/+}

Para este experimento se van a utilizar ratones donantes de aproximadamente 15 días. Estos ratones se encuentran en etapas iniciales de la pubertad, en la que se dispara el crecimiento y las células tienen una proliferación activa. Además, la exposición de estas células a las hormonas sexuales es mínima. Como ratones receptores se utilizan neonatos, los cuales tienen el canal auditivo abierto y es

posible llegar a la hipófisis a través de este.

Se planteó que los animales donantes fuesen *Gfra2*^{+/+} (WT) y que además expresasen EYFP, para poder hacer el seguimiento de las células que se implantasen en la hipófisis de los ratones receptores. Para asegurar que las células expresan EYFP es necesario que los ratones donantes tengan el genotipo *Sox2*^{CreERT2+/-}; *R26*^{YFP+/+}. Por lo que todos ellos van a tener el mismo genotipo: *Gfra2*^{+/+}; *Sox2*^{CreERT2+/-}; *R26*^{YFP+/+}.

Por otro lado, es importante que los animales receptores tuvieran el genotipo mutado para *Gfra2*, es decir, *Gfra2*^{-/-} (KO) y que por lo tanto presentasen el fenotipo enano. Sin embargo, es fundamental que estos ratones no expresen EYFP, y por lo tanto que no tengan ninguna de las otras dos mutaciones. Su genotipo tiene que ser: *Gfra2*^{-/-}; *Sox2*^{CreERT2-/-}; *R26*^{YFP-/-}.

Para maximizar el número de animales de los genotipos deseados, se plantearon los cruces detallados en la **tabla 10**.

Tabla 10. Genotipos de los progenitores implicados en los cruces para la obtención de camadas donantes con genotipo *Gfra2*^{+/+}; *Sox2*^{CreERT2+/-}; *R26*^{YFP+/+} y camadas receptoras con genotipo *Gfra2*^{-/-}; *Sox2*^{CreERT2-/-}; *R26*^{YFP-/-}.

Cruces donantes			
Macho	<i>Gfra2</i> ^{+/+}	<i>Sox2</i> ^{CreERT2+/-}	<i>R26</i> ^{YFP+/+}
Hembra 1	<i>Gfra2</i> ^{+/+}	<i>Sox2</i> ^{CreERT2-/-}	<i>R26</i> ^{YFP+/+}
Hembra 2	<i>Gfra2</i> ^{+/+}	<i>Sox2</i> ^{CreERT2-/-}	<i>R26</i> ^{YFP+/+}
Cruces receptores			
Macho	<i>Gfra2</i> ^{-/-}	<i>Sox2</i> ^{CreERT2-/-}	<i>R26</i> ^{YFP-/-}
Hembra 1	<i>Gfra2</i> ^{+/-}	<i>Sox2</i> ^{CreERT2-/-}	<i>R26</i> ^{YFP-/-}
Hembra 2	<i>Gfra2</i> ^{+/-}	<i>Sox2</i> ^{CreERT2-/-}	<i>R26</i> ^{YFP-/-}

Para poder disponer del mayor número posible de animales donantes y receptores, es necesario establecer los cruces en días concretos. Teniendo en cuenta que el periodo de gestación medio de los ratones de laboratorio es de 21 días, se toma como día 0 el momento en el que las células son inyectadas en los animales

receptores, los cruces donantes se establecen 36 días antes de empezar el experimento (día -36) y los cruces receptores se establecen 24 días antes de empezar el experimento (día -24).

1.9.2. Obtención de células $Gfra2^{+/+}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$

Una vez que las camadas generadas por los cruces donantes llegan a los 10 días, se administra Tamoxifeno a todas las crías (2 dosis en días consecutivos, 50 microlitros de solución de Tamoxifeno disuelto en aceite de girasol a una concentración de 20 mg/ml). Y se procede al marcaje en las orejas para el genotipado y la identificación de aquellos animales que posean el genotipo $Gfra2^{+/+}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$. Los ratones que tengan el genotipo $Sox2^{CreERT2-/-}$ se descartan, ya que, aunque sus células si expresan $Gfra2$, no expresan la Cre-recombinasa y por lo tanto tampoco van a poder expresar EYFP y va a ser imposible saber si se han implantado o si se han dividido y diferenciado.

A día 0, se sacrifican por decapitación todas las crías con genotipo $Gfra2^{+/+}; Sox2^{CreERT2+/-}; R26^{YFP+/+}$ y se extrae la hipófisis (ya explicado en el apartado 1.8.2), pero en lugar de guardarse en hielo seco, estas se llevan a un tubo de polipropileno (Corning, 430052) con 5 mL (volumen para hipófisis de 11 animales) de medio de cultivo DMEM/F12 (Sigma, D6421) suplementado al 20% con suero de caballo (Invitrogen, 16050-122).

Una vez han sido recolectadas las hipófisis de todos los animales válidos como donantes, se centrifuga el tubo durante 5 minutos a 300 g. El siguiente paso es incubar las células en una mezcla de enzimas para dispersar el tejido a célula única. Los componentes de esta mezcla de enzimas están recogidos en la **tabla 11**. Después de centrifugar se elimina el medio con suero por aspiración y se añaden al tubo 5 mL de la mezcla de enzimas previamente precalentada a 37°C. Para asegurar una buena dispersión, se incuba el tejido con las

enzimas 25 minutos a 37°C, y durante este tiempo se realiza una dispersión mecánica cada 5 minutos con la micropipeta de 1mL, cargando la punta con 800 µL de medio y soltándolo con fuerza sobre la superficie del líquido.

Tabla 11. Mezcla de enzimas utilizada en la dispersión del tejido a célula única.

Compuesto	Referencia
0,01% Deoxyribonucleasa I	Sigma, DN-25
0,4% Colagenasa IA	Sigma C3891
DMEM/F12	Sigma, D6421

Cuando el tiempo de dispersión finaliza, las células se centrifugan durante 5 minutos a 300 g, se decanta el sobrenadante y se añaden 5 mL de DMEM/F12 suplementado con suero de caballo para lavar los restos de enzimas que puedan quedar. Posteriormente se vuelve a centrifugar 5 minutos a 300 g y se elimina el sobrenadante.

El siguiente paso consiste en la selección mediante anticuerpos de únicamente las células Gfr α 2+ (5). Para ello se añaden 120 µL de medio DMEM/F12 con suero a las células y se dispersan bien para que no vayan al fondo ni formen agrupaciones. Posteriormente se añaden 5 µL de anticuerpo antiGfr α 2 (Invitrogen, PA5-19874, anticuerpo policlonal de conejo) y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se utiliza un anticuerpo que reconozca específicamente Gfr α 2 porque es una proteína de membrana que en la hipófisis solo se encuentra en el nicho de células madre, las cuales también expresan Sox2, por lo que indirectamente se están seleccionando las células EYFP+ sin necesidad de someterlas a un proceso de citometría de flujo, que puede ser mucho más agresivo para estas células.

Tras la incubación con el anticuerpo primario anti-Gfr α 2, se añade 1mL de tampón MACS (0,5% BSA; 2 mM EDTA pH8 en PBS) frío y se centrifugan las células para lavar el anticuerpo. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µL de Buffer MACS frío, se resuspenden las células y se añaden ahora 25

μL de anticuerpo secundario MACS conjugado con partículas metálicas (Milteny, 130-048-602). Este anticuerpo secundario está diseñado para reconocer inmunoglobulinas de conejo, y, por lo tanto, las células $\text{Gfr}\alpha 2^+$ van a quedar también marcadas con estas partículas metálicas. La incubación con el anticuerpo secundario se realiza en hielo a 4°C , durante 15 minutos. Una vez acabada la incubación las células se lavan con 1 mL de tampón MACS y se centrifuga de nuevo 5 minutos a 300 g. En este caso las células se resuspenden en 500 μL de tampón MACS y se pasan por una columna de separación (Milteny, 130-042-201) colocada en un imán (Miltenyi, 130-042-102; 130-042-303). De esta forma, las células $\text{Gfr}\alpha 2^+$ van a quedar retenidas en la columna de separación, mientras que la fracción $\text{Gfr}\alpha 2^-$ va a ser eluida. Para maximizar la recolección de células $\text{Gfr}\alpha 2^+$, la fracción eluida vuelve a pasarse por la columna. Una vez todo el volumen añadido a la columna es eluido, se añaden 1,5 mL de DMEM/F12 (Sigma, D6421) y se separa la columna del imán. Las células $\text{Gfr}\alpha 2^+$ de la columna se sacan de la columna haciendo presión con un émbolo, y se llevan a un tubo con 10mL de medio de células madre.

1.9.3. Inyección de las células $\text{Gfr}\alpha 2^+$ en ratones $\text{Gfr}\alpha 2^-/-$ neonatos

La dispersión celular $\text{Gfr}\alpha 2^+$ positiva obtenida anteriormente se centrifuga 5 minutos a 300 g, y, tras eliminar el sobrenadante, se vuelve a suspender en un volumen final de 80 μL de DMEM/F12 (Sigma, D6421). A este volumen se le añaden 20 μL de matrigel (Sigma, E1270) para que una vez inyectadas las células en la hipófisis de los animales receptores, éste solidifique y las células inyectadas queden retenidas. Para favorecer la supervivencia de las células inyectadas y de las propias células del animal receptor, se añade GDNF (Calbiochem, PF039) a una concentración final de 25 ng/mL, ghrelina (Sigma, G8903) a una concentración final de 10^{-8} M y GHRH (Sigma, G6771) a una concentración final de 10^{-7} M. Una vez la

dispersión enriquecida en células $Gfra2+$ está preparada, se mantiene a 4°C hasta que vaya a inyectarse en los ratones neonatos.

Antes de manipular ningún animal, es necesario tocar la viruta de la cubeta en la que están estabulados los ratones neonatos, de esta forma el olor queda impregnado en los guantes y se reduce la posibilidad de que las madres rechacen a las crías al devolverlas a la cubeta. Posteriormente las crías ya pueden separarse de la madre y se anestesian en hielo durante 5 minutos. Para evitar quemaduras y daño en la piel por el contacto directo y prolongado con el hielo, se cubre con papel de aluminio y se colocan encima las crías.

Los animales neonatos se posicionan en posición decúbito lateral sobre el flanco izquierdo y las células se inyectan directamente en la hipófisis a través del canal auditivo derecho (199). Para ello se utiliza una jeringa Hamilton de $10\ \mu\text{L}$ con aguja terminada en pico de loro (Hamilton, 701N 1011869). La inyección se realiza con la aguja a 90°C en posición completamente vertical y se introduce 4 mm a través del canal auditivo derecho. El volumen de dispersión celular inyectado en cada animal receptor es de $4\ \mu\text{L}$, y esta inyección ha de hacerse de forma lo más rápida y cuidadosa posible para evitar dañar al ratón al mismo tiempo que se evita que el matrigel se caliente en la aguja y solidifique antes de ser depositado en la hipófisis de la cría. Para comprobar que el efecto de la inyección en la hipófisis no produce ninguna alteración en el desarrollo de las crías, y de esta forma asegurar que el efecto es debido a las células $Gfra2+$, se inyecta también una camada de neonatos con el medio que contiene matrigel, GDNF, ghrelina y GHRH.

Una vez las crías han sido inyectadas con las células, se colocan sobre una manta térmica para que recuperen la temperatura corporal. Y posteriormente ya pueden ser devueltas a la cubeta con su progenitora, con la que se mantienen hasta el día 25, en el que aseguramos que el periodo de lactancia está terminado y las crías pueden ser destetadas.

A partir del destete se monitoriza el peso y la longitud de estos animales hasta la edad adulta. Momento en el que se toman todas las medidas del fenotipo explicadas en la sección 1.7 y posteriormente se perfunden para confirmar que estás células Gfr α 2+/EYFP+ han quedado retenidas en la hipófisis de los ratones y valorar su posible contribución al rescate del fenotipo de enanismo.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. CULTIVO DE COLONIAS DE CÉLULAS MADRE

Los cultivos primarios se establecieron a partir de una hipófisis individual de un ratón con genotipo WT o KO.

Los animales se anestesian con una mezcla de ketamina-xilacina (**tabla 7**) y cuando se les ha inducido el estado de anestesia profunda se decapitan con unas tijeras y rápidamente se extrae la adenohipófisis como se indica en la sección 1.8.2. La adenohipófisis obtenida de cada animal se lleva a un tubo eppendorf de 2 mL que contiene 200 μ L de mezcla de enzimas (**Tabla 12**) previamente precalentada a 37°C.

Tabla 12. Composición de la mezcla de enzimas utilizada en la dispersión para el cultivo de colonias.

Compuesto	Referencia
0,01% Deoxyribonucleasa I	Sigma, DN-25
0,4% Colagenasa II	Gibco, 17101-015
Tripsina 1X	Sigma, 594227C
2,5 ng/mL Anfotericina B	Sigma, P9528
DMEM/F12	Sigma, D6421

Para la dispersión a célula única, el tejido se mantiene en la mezcla de enzimas por 4 horas, a 37°C. Durante este tiempo se realizan dispersiones mecánicas para favorecer la acción de las enzimas:

- En las dos primeras horas, se utiliza una pipeta P1000 para aspirar parte del volumen y expulsarlo sobre el fondo del tubo. Se repite 10 veces cada 15 minutos.
- En las dos horas finales se utiliza una pipeta P200 para aspirar parte del volumen y expulsarlo sobre el fondo del tubo. Se repite 10 veces cada 15 minutos.

Pasadas las 4 horas de incubación con las enzimas, se añade a cada dispersión celular 1 mL de medio de cultivo de colonias con suero (**Tabla 13**), para parar el efecto de la tripsina. Y se centrifuga durante 5 minutos a 300g.

Tabla 13. Composición del medio de cultivo de colonias.

Compuesto	Referencia	Concentración final
DMEM/F12	Sigma, D6421	
Suero fetal bovino	Corning, 35-079-CV	5%
Penicilina/Streptomocina	Sigma, P4333	100 IU/mL
Anfotericina B	Sigma, P9528	2,5 ng/mL
bFGF	Gibco, 13256029	20 ng/ml
Toxina del cólera	Sigma, C8062	1 µg/ml

Posteriormente, se añade a cada tubo 1mL de medio de cultivo de colonias (**Tabla 13**) y se agita para que las células queden en suspensión. De este volumen se retiran 10 µL para contar el número de células en una placa de Neubauer.

Finalmente, las células se siembran en una placa multipocillo a la que previamente se le ha añadido la cantidad correspondiente de medio de cultivo de colonias (1 mL para placa de 6 pocillos y 300 µL para placa de 48 pocillos). A las placas de 6 pocillos se les añade el volumen de dispersión celular necesario que contenga 8000 células. Para las placas de 48 pocillos, se siembran 2000 células por pocillo (200).

Una vez se han establecido los cultivos, éstos se mantienen en el incubador en unas condiciones de 37°C y un 5% de CO₂ durante una semana. En el segundo día tras la siembra, se añade medio de cultivo

fresco a todos los pocillos (500 μ L a cada pocillo de las placas de 6, y 200 μ L a cada uno de los pocillos de las placas de 48). El cuarto y el sexto día después del establecimiento del cultivo se retira el medio completamente y se añade de colonias fresco (1,5 mL para los pocillos de las placas de 6 y 500 μ L para las placas de 48 pocillos).

2.2. PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS

2.2.1. Preparación de los cultivos para el contaje del número de colonias

Para la observación de las células se realiza una tinción con hematoxilina y eosina.

- Se lava 2 veces con PBS para eliminar todos los remanentes de medio de cultivo que pudieran interferir con el marcaje con anticuerpos.
- Se incuban los pocillos 10 minutos con formalina neutra tamponada al 10%.
- Se lava 3 veces con PBS.
- Se lavan las células con agua destilada 3 veces durante 5 minutos cada vez.
- Se incuban las células con hematoxilina (Bio-Optica, 05-06002) durante 10 minutos.
- Los pocillos se lavan de nuevo con agua destilada hasta que cambie de color (viraje).
- Se incuba con eosina (Bio-Optica, 05-11007) durante 5 minutos.
- Se vuelven a lavar los pocillos con agua destilada hasta viraje.

2.2.2. Adición de EdU al medio de cultivo

La EdU (Sigma, 900584) se disuelve en agua destilada a una concentración de 10 mM. El compuesto se añade a los cultivos a una concentración final de 10 μ M 24 horas antes del final del experimento (día 6 de cultivo).

3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS

3.1. WESTERN BLOT

3.1.1. Extracción de proteína de tejido de ratón

La extracción de proteína se realiza partir de las hipófisis extraídas como se indica en la sección 1.8.2. Para evitar que se degrade el tejido, los tubos se mantienen a 4 grados durante todo el proceso de extracción.

- Se añaden 300 μ L de tampón de lisado (**Tabla 14**) completo a cada tubo.
- A cada tubo se le coloca una esfera de acero que previamente ha sido esterilizada por calor.
- Se realiza la disgregación y homogenización mediante acción mecánica en un *TissueLyser II* (Qiagen, 85300) a 30 r.p.m. durante 3 minutos.
- Las muestras ya homogenizadas se mantienen en hielo a 4°C durante 20 minutos para que el tampón de lisado haga efecto.
- Se centrifugan los tubos a 15000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.
- Finalmente, se retiran las esferas de acero y se recoge el sobrenadante, que se guarda a -20°C hasta el momento de ser utilizado.

- Se separan 10 μL de extracto para la cuantificación de la concentración de proteína.

Tabla 14. Componentes utilizados en la preparación del tampón para extracción de proteína a partir de muestras de tejido.

	Reactivos	Concentración	Referencias
Tampón de lisado	Tris-HCl pH 7.5	50 mM	Sigma, H3375
	EGTA pH 8	0, 2 M	Sigma, E3889
	EDTA p	0,2 M	Sigma, E9884
	Tritón X-100	1%	Sigma, T8787
	Sacarosa	0,27 M	Sigma S7903
	Agua destilada	Hasta completar volumen	
Inhibidores de proteasas y fosfatasa	Cocktail <i>complete</i> -EDTA-free	1 pastilla por cada 50 ml de tampón de lisis	Roche 11873580001
	NaF	10 mM	Sigma, S7920
	Na ₃ VO ₄	0, 1M	Sigma, S6508
	Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM	Sigma, S9515

3.1.2. Cuantificación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de la concentración de proteína en los extractos extraídos previamente se utiliza el Kit *DC*TM Protein Assay Kit II (Bio-Rad, 5000112). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en el método de Lowry en el cual existe baja o nula interferencia por parte de detergentes y compuestos reductores a las concentraciones que se suelen utilizarse.

- El primer paso es la preparación de la recta patrón. Para ello se parte de una solución de BSA (concentración 1,4mg/ml) a partir de la cual se preparan diluciones seriadas en agua destilada. Las concentraciones de los demás patrones son 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml y 0 mg/ml.
- Las muestras se diluyen 5 veces en agua destilada (5 μL de extracto en 20 μL de agua destilada).
- Se añaden 25 μL del correspondiente estándar o muestra a cada tubo.

- Se añaden 125 μL de *Reagent I*, se mezcla bien el contenido del tubo y se incuba 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se añaden 125 μL de *Reagent II*, se mezcla bien y se centrifuga 5 minutos a 15000 g. La centrifugación ha de llevarse a cabo a temperatura ambiente para que las proteínas precipiten.
- El sobrenadante se elimina por inversión de los tubos en papel de filtro y posteriormente estos se dejan secar al aire a temperatura ambiente.
- Se añaden 127 μL de *Reagent A'* a cada tubo, (El *Reagent A'* se prepara mezclando *Reagent A* y *Reagent S* a la proporción de 1 μL de *Reagent S* por cada 50 μL de *Reagent A*). Se mezcla bien hasta que el precipitado quede completamente disuelto
- Se añade 1ml de Reagent B a cada tubo, se mezcla bien y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Se pasa el contenido de los tubos a una placa de 96 pocillos, en la medida de lo posible se hacen 3 o 4 replicados de cada uno de los estándares y muestras.
- Se mide la absorbancia a 750 nm.

Para calcular la concentración de cada muestra se genera una recta patrón a partir de las absorbancias obtenidas de los estándares cuya concentración se conoce y posteriormente se interpolan los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras.

3.1.3. Electroforesis y transferencia de proteínas

La electroforesis SDS-PAGE se basa en la desnaturalización de las proteínas debido al SDS, lo que produce que pierdan su conformación tridimensional y que estas sean capaces de separarse en un gel de acrilamida en función de su peso y la longitud de la cadena cuando se le aplica una corriente eléctrica.

Los geles de poli(acrilamida) constan de dos partes diferentes. La parte superior (*stacking*) (**Tabla 15**), tiene un porcentaje fijo de acrilamida/bis-acrilamida, que va a ser siempre del 4%. En esta parte las muestras se compactan para que todas entren en la segunda parte del gel al mismo tiempo, y que de esta forma no haya diferencias en la posterior migración de las proteínas. La parte inferior del gel (*resolving*) (**Tabla 16**) es la que permite la separación de las proteínas en función de su peso. Este gel puede tener un porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida diferente en función de las proteínas que se pretenden detectar. Los geles que se han utilizado han variado desde el 8% (proteínas de peso molecular superior a 100 kDa) hasta el 15% (proteínas de peso molecular inferior a 30 kDa).

Tabla 15. Composición del gel *stacking* SDS-PAGE para la electroforesis de proteínas.

<i>Stacking</i>	5%	Referencias
Agua destilada	2,7 mL	
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0,67 mL	Sigma, A3574
1,5M Tris pH 6,8	0,5 mL	
SDS 10%	40 μ L	Sigma, L4509
10% Persulfato de amonio	40 μ L	Sigma, A3678
TEMED	6 μ L	Sigma, T9281

Tabla 16. Composición del gel *resolving* SDS-PAGE para la electroforesis de proteínas.

<i>Resolving</i>	8%	10%	12%	15%	Referencias
Agua destilada	4,6 mL	4 mL	3,3 mL	2,7 mL	
Acrilamida-bisacrilamida 30%	2,7 mL	3,3 mL	4 mL	4,6 mL	Sigma, A3574
1M Tris pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	
SDS 10%	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	Sigma, L4509
10% Persulfato de amonio	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	Sigma, A3678
TEMED	6 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L	Sigma, T9281

Los geles se preparan en el sistema GE Healthcare miniVE Vertical Electrophoresis System (Fisher Scientific, 80-6418-77.). Como marcador de peso molecular se utiliza el Page Ruler Prestained Protein Ladder (26616, Thermo Fisher Scientific).

Para preparar las muestras, estas se diluyen en tampón de lisado de tal forma que en cada muestra haya los mismos microgramos de proteína. Posteriormente se añaden tampón de carga 1X (a partir de stock 5X: 50% glicerol, 10% β -Mercaptoetanol, 0,5% azul de bromofenol, 0,4 M Tris-HCl pH 6,8 y 10% SDS) y se calientan las muestras 10 minutos a 95°C. Una vez las muestras están cocidas, se cargan en el gel. El máximo volumen de muestra que puede cargarse en un gel de 10 pocillos es de 35 μ L.

El gel se coloca en la cubeta con 1L de tampón de electroforesis 1X (Stock 10X 2 L: 60 g Tris-Base, 288 g de Glicina y 20 g SDS) y se procede con la electroforesis en el gel a 15 mA durante 45 minutos para compactar la muestra en la parte superior del gel y posteriormente se sube el amperaje a 20 mA para separar las proteínas en la parte inferior del gel durante 2 horas.

El siguiente paso es transferir las proteínas retenidas en el gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Immun-Blot PVDF 0,2 μ m, Bio-rad, 162-0177). Para ello se utiliza el sistema de transferencia semiseco (Sigma, Z34 050-2).

Tabla 17. Tampones de transferencia

Tampón	Reactivos	Concentración
A	Ácido 6-Aminocaproico (Sigma, A7824)	0,4 M
	Tris-Base	0,25 M
	Isopropanol	20%
	Agua destilada	
B	Tris-Base	1,25 M
	Isopropanol	20%
	Agua destilada	
C	Tris-Base	0,25 M
	Isopropanol	20%
	Agua destilada	

Los geles del sistema elegido para la electroforesis tienen unas dimensiones de 10x8 cm, por lo que previo paso a la transferencia es necesario cortar y preparar una membrana y papeles Whatman® de este tamaño.

Para la transferencia, el primer paso es la activación de la membrana de PVDF, que se incuba 1 minuto en metanol y posteriormente se hidrata 5 minutos en agua destilada, para finalmente equilibrarla en tampón B. El gel por su parte se equilibra en tampón A. Los papeles Whatman® han de sumergirse en los tampones de transferencia.

El montaje de la transferencia se lleva a cabo de la siguiente manera: 3 papeles mojados en C, 2 papeles mojados en B, membrana, gel y finalmente 3 papeles mojados en A. Una vez colocados, se retiran con cuidado el exceso de tampón de transferencia y se cierra el sistema de transferencia. Se dejan transferir las proteínas durante 2 horas a un amperaje constante que depende de la superficie de la membrana, en este caso 64mA.

3.1.4. Inmunodetección

- Una vez terminada la transferencia, se lava la membrana durante 5 minutos en agitación con TBS 1X, para eliminar los restos de sales de los tampones de transferencia.
- Posteriormente se bloquea la membrana a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación. La solución de bloqueo utilizada depender del anticuerpo primario que vaya a ser utilizado posteriormente. Las soluciones de bloqueo utilizadas están recogidas en la **tabla 18**.

Tabla 18. Soluciones de bloqueo utilizadas en inmunodetección

Solución de bloqueo	Reactivos	Referencias
i-Block™	2g/L i-Block™	ThermoFisher, T2015
	TBS 1X	
BSA	5% BSA	Sigma, A7906
	TBS 1X	

- Una vez boqueada la membrana se incuba con el anticuerpo primario. Cada anticuerpo posee unas características y unas condiciones de incubación diferentes. Todos los anticuerpos utilizados para la inmunodetección en western blot están recogidos en la **tabla 19**.

Tabla 19. Anticuerpos primarios utilizados en inmunodetección en western blot.

Proteína	Referencia	Especie	[]	Incubación
GFRα2	R&D Systems, AF429	G	1:700	BSA 3% +0,1% Tween20 >8h a 4°C
SOX2	Seven Hills Bioreagents, WRAB-1236	R	1:2.000	i-Block™ >8h a 4°C
SOX9	Atlas Antibodies, HPA001758	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
KLF4	Atlas Antibodies, HPA002926	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
SHH	Abcam, Ab53281	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C

β-catenina	Calbiochem, C2206	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
GFRα1	Santa Cruz Biotechnology (SCBT) sc-271546	M	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
GFRα3	SCBT, sc-9340	G	1:250	BSA 5% >8h a 4°C
GFRα4	Signalway Antibody, 31272	R	1:250	i-Block™ >8h a 4°C
GDNF	SCBT, sc-13147	M	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
Neurturina	R&D Systems, AF477	G	1:500	BSA 5% >8h a 4°C
RET	Atlas Antibodies, HPA008356	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
AKT	Cell Signaling Technology (CST), 5625	R	1:1000	i-Block™ >8h a 4°C
pAKT	CST, 5413	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
PIT1	Atlas Antibodies HPA041646	R	1:1000	i-Block™ >8h a 4°C
Arf	SCBT, sc-32748	M	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
IC-RET	SCBT, sc-101422	M	1:1000	i-Block™ >8h a 4°C
Caspasa-3 activa	CST, 9664	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
cPARP	CST, 5625	R	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
PKCδ	SCBT, sc-213	M	1:1000	i-Block™ >8h a 4°C
pPKCδ	CST, 9376	R	1:500	i-Block™ +0,1% Tween >8h a 4°C
p21	B&D Biosciences, 556431	M	1:500	i-Block™ >8h a 4°C
Tubulina	Abcam, Ab4074	R	1:10.000	i-Block™ >8h a 4°C

R: conejo; **M:** ratón; **G:** cabra

- Una vez terminada la incubación con el anticuerpo primario, se lava la membrana 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con solución de lavado (TBS 1X con 0,3% Tween20® (Sigma, P9416)).
- Posteriormente se incuba la membrana con el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario utilizado depende de la especie en la que se haya generado el anticuerpo primario. Todos los anticuerpos secundarios se diluyen en solución i-Block™ y se incuban en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Los anticuerpos secundarios están conjugados con la enzima peroxidasa de rábano.

Tabla 20. Anticuerpos secundarios utilizados en western blot.

Anticuerpo secundario	Referencia
Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Sigma, A0545
mAb Rabbit Anti-Mouse IgG-HRP	Cell Signaling Technology, 58802
Donkey anti-Goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, sc-2020

- Después de incubar con el anticuerpo secundario, se lavan las membranas 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con solución de lavado y en agitación
- La membrana se coloca sobre una superficie lisa y se le añade por encima el volumen adecuado de sustrato quimioluminiscente Pierce ECL Western (ThermoFisher, 32106). Este es el sustrato de la enzima conjugada al anticuerpo secundario. El volumen de ECL depende de la superficie de la membrana y se utilizan 0,125 mL de ECL por cada cm² de membrana.
- Se incuba la membrana 1 minuto con el ECL a temperatura ambiente.
- Se retira el exceso de ECL y se coloca la membrana entre dos transparencias dentro de un casete de autoradiografía.
- Para el revelado de la señal se utilizan películas radiográficas (FUJI Medical X-Ray Film n°8U), y se revela la señal de cada anticuerpo a diferentes tiempos en función de la señal que se

va obteniendo. Se utilizan líquidos reveladores y fijadores para este proceso. El revelado ha de hacerse en una sala oscura con luz roja para evitar que las películas radiográficas se velen.

3.1.3.1. Incubaciones múltiples de las membranas de western blot

- Se lava la membrana 3 veces, durante 5 minutos cada vez, con solución de lavado.
- Se incuba la membrana en 50 mL de solución de estriado (62,5 mM Tris-HCl pH6,8; 2% SDS; 100 mM β -Mercaptoetanol) durante 30 minutos en un baño de agua caliente a 55°C.
 - En este paso se rompe los enlaces de los anticuerpos y de esta forma se elimina la señal. Es un proceso agresivo que puede afectar a las proteínas transferidas a la membrana.
- Se lava la membrana 10 veces, durante 5 minutos cada vez, en solución de lavado.
- Se continua con la etapa de bloqueo y sucesivas. Es recomendable alternar la especie del anticuerpo primario entre incubaciones consecutivas para evitar detectar posibles remanentes de anticuerpo de incubaciones previas.

3.2. NIVELES HORMONALES

3.2.1. Hormonas hipofisarias en tejido y suero

Se utiliza el kit *MILLIPLEX MAP Mouse Pituitary Magnetic Bead Panel* (Millipore, MPTMAG-49K) para medir la concentración de las 6 hormonas producidas en la hipófisis (GH, PRL, ACTH, LH, FSH y TSH) en muestras de suero e hipófisis de ratón. La extracción de proteína de las muestras de tejido se lleva a cabo como está recogido en la sección 3.1.1.

Para el ensayo las muestras de suero se diluyen 5 veces y las muestras de tejido 20 veces.

El protocolo se lleva a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La etapa de incubación con los anticuerpos se realiza durante toda la noche, ya que aumenta la sensibilidad del ensayo. Para evitar interacciones entre los diluyentes de las muestras de suero y tejido se ensayan dos curvas patrón diluidas cada una en el medio correspondiente.

Al tratarse de un ensayo Multiplex fluorescente, la placa se lee en un sistema MAGPIX© (Luminex) que permite la lectura simultánea de los 6 analitos.

3.2.2. IGF-1 en suero

La medición de IGF-1 en suero se realiza mediante el kit Quantikine ELISA Mouse/Rat IGF-I/IGF-1 (R&D Systems, MG100). Los sueros se diluyen 500 veces con *Calibrator Diluent RD5-38* suministrado en el kit. El protocolo llevado a cabo se basa en las recomendaciones del fabricante.

3.2.3. Hormona T4 libre en suero

La medición de la hormona T4 libre en suero se realiza mediante el kit Free T4 ELISA (DRG Instruments, EIA-3775). No fue necesario diluir los sueros previamente a la realización del ensayo. El protocolo seguido fue el detallado por el fabricante con la salvedad de que la placa fue preincubada media hora antes de empezar el análisis para aumentar la sensibilidad del ensayo y favorecer que las muestras puedan entrar en la curva estándar.

3.3. INMUNOFLUORESCENCIA

3.3.1. Preparación de muestras de tejido fijado

La preparación de los tejidos para la inclusión de estos en parafina es llevada a cabo en el Servicio de Histología del CiMUS. El procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Como las cabezas de los ratones se encuentran en PBS para evitar una excesiva deshidratación, se pasan a tubos con etanol al 70% y se mantienen durante 24 horas.
- Posteriormente se extraen las hipófisis de la silla turca y se colocan en los correspondientes *cassettes*.
- La inclusión en parafina se hace mediante el sistema *Semi-Enclosed Benchtop Tissue Processor* (Leica, TP1020). En este sistema hay varias cubetas con los medios necesarios para la inclusión en parafina. Los pasos que se siguen dentro del sistema son:
 - Deshidratación
 - Etanol al 70%, 60 minutos
 - Etanol al 96%, 90 minutos
 - Etanol al 96%, 90 minutos
 - Etanol al 96%, 90 minutos
 - Etanol al 100%, 90 minutos
 - Etanol al 100%, 90 minutos
 - Etanol al 100%, 90 minutos
 - Lavado: Dos incubaciones de 120 minutos cada una con xileno
 - Inclusión en parafina: Dos incubaciones de 120 minutos cada una en parafina líquida
 - Una vez termina el programa del TP1020, se retiran los *cassettes* y se forman los bloques de parafina utilizando el *Modular Tissue Embedding Center* (Leica, EG1150H).

Una vez los bloques están formados se pueden guardar a temperatura ambiente hasta que vayan a ser utilizados. Unas horas antes de que los cortes vayan a ser llevados al microtomo es recomendable colocar los bloques de parafina en hielo para que se mantengan hidratados y se facilite el corte en el microtomo y de esta manera se mantenga mejor la estructura del tejido.

Se preparan secciones de 4 μm cortando los bloques en un microtomo giratorio (Leica, RM1255). Estas secciones se llevan a un baño de agua destilada a 55°C para rehidratarlas y estirarlas antes de colocarlas sobre los portaobjetos. Se utilizan portaobjetos recubiertos (DAKO, K802021-2) para facilitar la adhesión de los cortes de muestras parafinadas y que de esta forma no se pierdan en los siguientes pasos de la preparación.

Tras colocar los cortes en los portaobjetos, y permitir que los mismos queden secos para asegurar la adhesión, se colocan en una estufa a 52°C para desparafinar las muestras. Para asegurar que el proceso de desparafinado es completo, los portaobjetos se dejan en la estufa hasta el día siguiente. Para terminar el desparafinado, los portaobjetos se sumergen durante 5 minutos en xileno. Este paso se repite 3 veces. El siguiente paso es la rehidratación de las muestras, que consiste en incubaciones de 5 minutos en concentraciones de etanol decrecientes (100%, 96%, 70%, 50%) y finalmente agua destilada.

El último paso en la preparación de las muestras es la recuperación antigénica, que se lleva a cabo en la estación PT-Link (DAKO). Este proceso sirve para devolver a las proteínas la forma que habían perdido debido a los procesos de fijación y deshidratación. Para este proceso pueden utilizarse dos tampones diferentes. En la mayoría de los casos se utiliza el tampón Tris-EDTA (pH 7,4) pero para algunas proteínas es necesario el tampón citrato (pH 6).

3.3.2. Inmunofluorescencia en tejido de ratón

Para la mayoría de los anticuerpos que se han utilizado en la presente tesis el protocolo de inmunofluorescencia que se ha seguido es el siguiente:

- Se coloca el portaobjetos en una cámara húmeda y se añade el anticuerpo primario de tal forma que todos los cortes tengan líquido encima. La incubación con el anticuerpo primario (**Tabla 21**) se deja al menos durante 8 horas.
- Se lavan los portaobjetos en PBS por inmersión. Se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Se vuelven a colocar los portaobjetos en la cámara húmeda y se añade el anticuerpo secundario (**Tabla 22**). Todas las incubaciones con anticuerpos secundarios son de una hora a temperatura ambiente en oscuridad.
- Se lavan los portaobjetos en PBS por inmersión. Se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Se enjuaga en agua destilada para eliminar las sales.
- Finalmente se añade medio de montaje Fluoro-Gel (Electron Microscopy Science, 17985-10) con 2 mg/ml de DAPI (Sigma, D9542) y se coloca el cubreobjetos encima.
- El medio de montaje se deja secar durante al menos 4 horas y posteriormente las preparaciones se guardan a 4°C hasta que vayan a ser fotografiadas en el microscopio.

Sin embargo, aquellos anticuerpos monoclonales que han sido producidos en ratón suelen requerir de algunos pasos adicionales. El protocolo para estos anticuerpos resulta más complejo:

- Se lava por inmersión durante 5 minutos en TBS 1X + Tritón X-100 al 0,025%. Este paso se repite dos veces.
- Los portaobjetos se colocan en cámara húmeda y se bloquean con TBS 1X + BSA al 1% + suero de caballo al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- Se vuelve a lavar por inmersión durante 2 minutos en TBS 1X + Tritón X-100 al 0,025%. Este paso se repite dos veces.
- Se vuelven a colocar los portaobjetos en la cámara húmeda y se vuelve a bloquear con inmunoglobulina de burro anti-ratón (Jackson Immunoresearch, 715-005-151) diluida 1:100 en TBS 1X.
- Se lava por inmersión durante 2 minutos en TBS 1X + Tritón X-100 al 0,025%. Este paso se repite dos veces.
- Se coloca el portaobjetos en una cámara húmeda y se añade el anticuerpo primario (**Tabla 21**) de tal forma que todos los cortes tengan líquido encima. La incubación con el anticuerpo primario se deja al menos durante 8 horas.
- Se lavan los portaobjetos en TBS 1X + Tritón X-100 al 0,025% por inmersión. Se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Se vuelven a colocar los portaobjetos en la cámara húmeda y se añade el anticuerpo secundario (**Tabla 22**). Todas las incubaciones con anticuerpos secundarios son de una hora a temperatura ambiente en oscuridad.
- Se lavan los portaobjetos en TBS 1X + Tritón X-100 al 0,025% por inmersión. Se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno.
- Se enjuaga en agua destilada para eliminar las sales.
- Finalmente se añade medio de montaje Fluoro-Gel (Electron Microscopy Science, 17985-10) con 2 mg/ml de DAPI (Sigma, D9542) y se coloca el cubreobjetos encima.

3.3.3. Inmunofluorescencia en cultivos celulares

Los cultivos establecidos en las placas de 48 pocillos se utilizan para realizar tinciones inmunofluorescentes. Y para ello primero han de ser fijados y permeabilizados:

- Se lava 2 veces con PBS para eliminar todos los remanentes de medio de cultivo que pudieran interferir con el marcaje con anticuerpos.
- Se incuban los pocillos 10 minutos con formalina neutra tamponada al 10%
- Se lava 3 veces con PBS
- Se incuban las células 30 minutos con metanol 100% frío
- Se lava 3 veces con PBS
- Se incuban los pocillos 1 horas con Tritón X-100 al 0,3% en PBS
- Finalmente se lava 3 veces con PBS
- Los pocillos se mantienen en PBS a 4°C hasta el momento en el que va a realizarse la tinción con anticuerpos.

Los pasos de incubación con anticuerpos son los mismos que en la tinción de secciones de parafina. La diferencia es que las tinciones de células no se hacen sobre portaobjetos, si no en el pocillo de la placa de cultivo.

Tabla 21. Relación de anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.

Proteína	Referencia	Especie	[]	Incubación
GFRα2	Invitrogen, PA5-19874	R	1:1.000	PBS >8h a 4°C
GFRα2	Atlas Antibodies, HPA024704	R	1:50	PBS >8h a 4°C
AECK	DAKO, IR053	M	Listo para usar	>8h a 4°C
GH	NIDDK, AFP-C11981A	R	1:1.000	PBS >8h a 4°C
GH	SCBT, sc-10365	G	1:200	BSA 5% >8h a 25°C
PRL	NIDDK, AFP425_10_91	R	1:500	PBS >8h a 4°C
TSH	NIDDK, AFP-1274789	R	1:1.000	PBS >8h a 4°C
ACTH	DAKO, 02A3	M	1:500	PBS >8h a 4°C

LH	NIDDK, AFP-C697071P	R	1:500	PBS >8h a 4°C
SOX2	Seven Hills Bioreagents, WRAB-1236	R	1:2.000	PBS >8h a 4°C
SOX2	Invitrogen, MA1-014	M	1:200	TBS >8h a 4°C
KLF4	Atlas Antibodies, HPA002926	R	1:500	PBS >8h a 25°C
GFRα1	SCBT, sc-271546	M	1:200	PBS >8h a 4°C
GFRα3	SCBT, sc-9340	G	1:100	BSA 5% >8h a 25°C
GFRα4	Signalway Antibodies, 31272	R	1:50	PBS >8h a 4°C
RET	Atlas Antibodies, HPA008356	R	1:500	PBS >8h a 4°C
p21	B&D Biosciences, 556432	M	1:100	BSA 3% >8h a 25°C
PIT1	Atlas Antibodies, HPA041646	R	1:1000	PBS >8h a 4°C
GFP	Novus Biologicals, NB100-1614	C	1:500	PBS >8h a 4°C

R: conejo; M: ratón; G: cabra; C: Pollo

Tabla 22. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpos secundarios fluorescentes	Referencia
Donkey Anti-Rabbit IgG Cy3	Jackson IR, 711-166-152
Donkey Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488	Jackson IR, 715-546-151
Donkey Anti-Goat IgG Alexa Fluor® 488	Jackson IR, 705-546-147
Donkey Anti-Goat IgG Alexa Fluor® 647	Jackson IR, 705-606-147
Donkey Anti-Chicken IgG Alexa Fluor® 488	Jackson IR, 703-546-155

3.3.4. Inmunohistoquímica en tejido de ratón

- Las muestras se lavan una vez con PBS y se bloquean con peroxidasa al 3% durante 10 minutos.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS.
- Se colocan los portaobjetos en cámara húmeda y se incuban con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

- Los anticuerpos primarios utilizados fueron:
 - Anti-Sox2 (Seven Hills Bioreagents, WRAB-1236) producido en conejo, y utilizado a una dilución 1:1000.
 - Anti-Caspasa-3 activa (CST, 9664) producido en conejo y utilizado a una dilución 1:200.
- Se vuelve a lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos.
- Se colocan los portaobjetos en cámara húmeda y se incuban con anticuerpo secundario (Agilent, DAKO EnVision™ System, HRP) durante media hora a temperatura ambiente.
- Se lavan los portaobjetos 3 veces con PBS durante 5 minutos.
- Se añade DAB (3,3-Diaminobencidina), que actúa como sustrato de la peroxidasa unida al anticuerpo secundario y de esta forma se produce la señal.
- Para el marcaje de los núcleos, se realiza una contratinción con Hematoxilina durante 10 minutos.
- Por último, se dejan secar las muestras al aire y se añade medio de montaje Fluoro-Gel.

3.4. MICROSCOPIA

3.4.1. Microscopia óptica

Para la observación de las placas de cultivo se utilizó un microscopio Olympus IX73 con objetivos de 4X, 10X y 20X. Las fotografías fueron adquiridas con una cámara Olympus DP74 acoplada al microscopio. El programa informático utilizado es *CellSens Standard* con el módulo de inteligencia artificial *TruAI*.

3.4.2. Microscopía confocal

Se utilizó un microscopio confocal de banda ancha modelo TC SP5-AOBS (Leica) con láser blanco (470-670 nm) y láser ultravioleta. Las fotografías se tomaron con un objetivo seco de 20X y un objetivo de inmersión en aceite de 63X. El programa informático utilizado para la obtención de las fotografías fue Las AF (Leica). Las imágenes se captaron a una resolución de 1024x1024 píxeles, a 600 Hz, de forma bidireccional, dejando una distancia entre planos de entre 0,8 y 1,2 μm . Los planos se recogen secuencialmente en el orden especificado en la **tabla 23**. La detección de la señal se realizó mediante un detector híbrido, potencia del láser entre 15 y 25% y con entre 2 a 4 pasadas por plano en función de la relación señal/fondo de cada canal en cada tinción específica.

Tabla 23. Canales utilizados en microscopía confocal.

Canal	Fluoróforo	λEx (nm)	λEm (nm)
Ch1	DAPI	405	414-479
Ch2	A488	492	499-547
Ch3	Cy3	552	565-624
Ch4	Cy5	594	609-648

4. ESTUDIO DE ARN

4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

La extracción de ARN de tejido de ratón se realiza mediante el kit TRIzolTM (Invitrogen, 15596026) y se siguen las indicaciones descritas por el proveedor. El ARN obtenido se trata con 1U de ADNsaI libre de ARNasas (ThermoFisher EN0521) durante 30 minutos a 37°C. Después se purifica mediante el kit GeneJET ARN Cleanup and Concentration Micro kit (ThermoFisher, K0842).

Una vez extraído, se determina la cantidad de ARN presente en la muestra y se procede a su cuantificación con la ayuda de un

espectrofotómetro (ThermoFisher Nanodrop 2000) (ratio deseable A260/280=2-2,2).

4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN

En primer lugar, se realiza un pretratamiento de la muestra con ADNasa, (este paso es independiente del ya realizado en la etapa de extracción, para asegurar que la muestra queda completamente libre de ADN):

- Se incuba 1 μg de ARN con 1U de ADNasa I libre de ARNasas, 1 μL de tampón 10X con MgCl_2 y agua hasta un volumen final de 10 μL , a 37°C durante 30 minutos.
- Posteriormente se añade 1 μL de EDTA y se incuba durante 10 minutos a 65°C, de esta forma se inactiva la ADNasa I.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se lleva a cabo mediante una transcripción inversa (RT-PCR) del ARN. Para ello:

- Se añaden 1,5 μL de dNTPs 10 mM, 0,1 μL de un combinado de cebadores aleatorios y agua destilada hasta llegar a un volumen final de 30 μL
- Posteriormente se incuba durante 10 minutos a 65°C.
- En el siguiente paso se añaden 6 μL de tampón 5X First-Strand, 3 μL de DTT 0,1 M, 1 μL de *RNAseOUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (40 U/ μL) y se incuba a 37°C durante 2 minutos.
- Se añaden 1,5 μL de 300UI MMLV (Invitrogen, 28025-013).
- Finalmente se colocan los tubos en un termociclador y se aplica el protocolo de retrotranscripción como se detalla en la **tabla 24**.

Tabla 24. Protocolo utilizado en la RT-PCR

Tiempo	Temperatura
10 min	25°C
50 min	37°C
30 min	42°C
5 min	95°C

4.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Para cuantificar la expresión de ARN una vez sintetizado el ADNc, se realiza una PCR cuantitativa (qPCR); las cantidades de reactivos varían dependiendo de si los cebadores son comerciales o diseñados por el grupo (Tabla 25).

Se añaden los reactivos a una multiplaca de 96 pocillos y se realiza la qPCR en un 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 4351105). Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 26, tanto los comerciales como los diseñados.

Tabla 25. Reactivos utilizados en la reacción de qPCR

Reactivos	Ensayo TAQMAN®		Ensayo Syber®	
Cebador directo	Mix 1 µL	0,3 µM	0,18 µL (stock 10 µM)	0,15 µM
Cebador reverso		0,3 µM	0,18 µL (stock 10 µM)	0,15 µM
Sonda		0,3 µM		
Agua		4 µL		4,64 µL
MasterMix			6 µL	
Muestra (ADNc)			1 µL	

Tabla 26. Cebadores utilizados para la detección de cada gen.

Gen	Secuencia	Tamaño del fragmento amplificado	Tº de hibridación
<i>Gfra2</i> Isoforma 201	D: GGGAGAAAGACACATACACACA	114 pb	60°C
	R: GAAGGGCTGGCCAAAGAG		
<i>Gfra2</i> Isoforma 202	D: GCAGGCATCCTAAGCTTTTC	248 pb	60°C
	R: CAGCATAGGAGCCCAGACAT		
<i>Gfra2</i> Isoforma 203	D: GGGAGAAAGACACATACACACA	101 pb	60°C
	R: GAAGGGCTGGCCAAAGAG		
<i>Sox2</i>	D: GGAAAACCAAGACGCTCATGAA	84 pb	60°C
	R: CGCTCGCCATGCTGTTC		
	Sonda: AAGGATAAGTACACGCTTCCCGAGGCT		
<i>Sox9</i>	D: CAGTACCCGCATCTGCACAA	94 pb	60°C
	R: CCTCCACGAAGGGTCTCTTCT		
	Sonda: CAAGCTCTGGAGGCTGCTGAACGAG		
<i>Klf4</i>	D: GCTGTGGCAAACCTATACGAAGA	76 pb	60°C
	R: TGGTAAGGTTTCTCGCCTGTGT		
	Sonda: TTCTCATCTCAAGGCACACCTGCGAACT		
<i>Oct4</i>	D: GGTGGAGGAAGCTGACAACAAC	107 pb	60°C
	R: ACCTCACACGGTTCTCAATGCT		
	Sonda: CCTTCAGGAGATATGCAAATCGGAGACCCT		
<i>Prop1</i>	D: GCCTTTGGGAGGAACCAGTATC	140 pb	60°C
	R: TGGAGTAGTGACCGCTCTTGCT		
	Sonda: TCAGCGAAGCCAGAATCCAGGTCT		
<i>Tubulina</i>	D: TTGGAACCTGGAACCATGGA	117 pb	60°C
	R: ATAGTGCCCTTTGGCCAGTT		
	Sonda: CTTTATCTTTGGTCAGAGTGGTGCTGGCAA		
<i>Thp</i>	ThermoFisher: Mm01277042_m1	65 pb	60°C

D: Directo; R: Reverso

La MasterMix utilizada en los ensayos TAQMAN® fue 2X TaqMan Gene Expression MasterMix (Applied Biosystems, 4369016). La MasterMix usada en los ensayos Syber® fue PrecisionPLUS qPCR MasterMix (Eligen Diagnóstica, PPLUS-LR-SY).

Cada multiplaca de 96 se utiliza para una sola reacción y en cada una se miden las muestras por duplicado. Además, se incluyen controles positivos, controles negativos (llevan todos los reactivos a excepción del MMLV) y blancos (que llevan todos los reactivos, pero no se añade ningún ADNc).

Para expresar los resultados de expresión de cada gen se utiliza el método de la diferencia de umbral de ciclos o DCt ($DCt = Ct_{gen} - Ct_{control}$) (201).

5. DETECCIÓN DE MARCAJE CON EDU

La detección de EdU se puede hacer tanto en secciones de tejido animal como en cultivos celulares a los que previamente se les ha administrado el compuesto.

Las secciones de parafina o los pocillos de las placas de cultivo se incuban 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con la mezcla de detección de EdU:

- Tris-EDTA 100 mM (Sigma, H3375)
- CuSO₄ 1 mM (Sigma, C1297)
- Sulfo-Cyanine2 10 μM (ThermoFisher, A10266)
- Ascorbato de sodio 10 mM (Sigma, A7631)
- PBS 1X

Una vez ha pasado la media hora de incubación, los portaobjetos o los pocillos de las placas de cultivo se lavan 3 veces, durante 5 minutos cada vez.

Posteriormente al paso de la detección de la EdU es posible realizar una tinción con anticuerpos como la detallada en el apartado 3.3. de esta sección.

6. TELOMAPING

El telomapping es una técnica que permite determinar la longitud de los telómeros mediante hibridación fluorescente in situ utilizando para ellos sondas que hibridan las repeticiones ricas en citosinas presentes en los extremos de los telómeros (5, 202). Las muestras usadas en este experimento son secciones de parafina de 4 μm , preparadas como se indica en el apartado 3.3.1.

- Primero se fijan las secciones en formalina tamponada al 10% durante 2 minutos. Y después se lavan las muestras 3 veces con PBS durante 5 minutos cada vez.
- Posteriormente se digieren las secciones con pepsina acidificada (200 mg de pepsina, 168 μL de HCl puro y 200 mL de agua destilada) previamente calentada a 37°C. La digestión se realiza cubriendo las secciones con pepsina acidificada e incubando 10 minutos a 37°C.
- Se lavan los portaobjetos con PBS, dos veces durante 5 minutos.
- Se vuelven a fijar las secciones con formalina tamponada al 10% durante 2 minutos. Y después se lavan las muestras 3 veces con PBS durante 5 minutos cada vez.
- El siguiente paso consiste en la deshidratación de las secciones. Se realizan 3 incubaciones consecutivas de 5 minutos en concentraciones crecientes de etanol (70%, 90% y por último 100%). Y después se dejan secar al aire durante media hora.
- Se prepara la mezcla de hibridación tal y como se recoge en la **tabla 27**.

Tabla 26 Componentes de la mezcla de hibridación.

Compuesto	Concentración	Referencia
TRIS 1M pH7.2	10 mM	Sigma, H3375
Tampón hibridación: 9mM Ácido cítrico 25mM MgCl ₂ 82mM Na ₂ HPO ₄	15,3 μM 42,5 μM 139,4 μM	Sigma, 251275 Sigma, 442611-M Panreac, 122507
Formamida	70%	Sigma, 295876
Tampón de bloqueo SuperBlock	5%	Thermofisher, 37580
Sonda Cy3-Tel	200 nM	Kaneka Eurogentec, PN-TC050-005
Agua destilada		

- Se enciende el horno de hibridación y se calienta a 75°C. Se coloca papel absorbente en la bandeja y se añaden 50 mL de agua destilada para humedecerlo.
- Se colocan los portaobjetos en los soportes adecuados de la bandeja del horno de hibridación y se añaden 100 μL de mezcla de hibridación que tal forma que cubra todas las secciones. Se colocan encima un cubreobjetos de 24x60.
- Se desnaturalizan las muestras a 75°C durante 5 minutos. Y posteriormente se sacan del horno y se colocan en una cámara húmeda en oscuridad y con el cubreobjetos hacia abajo. Se incuban los portaobjetos en estas condiciones durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Posteriormente se lavan las muestras por inmersión en buffer formamida (formamida al 70%; 0,01 M Tris-Base; BSA al 0,01%; en agua destilada), durante 8 minutos en agitación. Este paso se repite dos veces para favorecer que los cubreobjetos caigan. Es importante no arrastrar el cubreobjetos por encima de las secciones ya que éstas pueden dañarse.
- En el siguiente paso se lavan las muestras 3 veces con tampón TBST (TBS 1X + 0,08% de Tween®20). Y

posteriormente vuelven a lavarse de nuevo 3 veces más con PBS.

- Posteriormente se realizan 3 incubaciones consecutivas de 5 minutos en concentraciones crecientes de etanol (70%, 90% y por último 100%) para deshidratar las muestras. Y después se dejan secar al en oscuridad durante 10 minutos.
- Finalmente se añade medio de montaje Fluoro-Gel con 2 mg/ml de DAPI y se coloca el cubreobjetos encima.

La adquisición de las imágenes se realiza en microscopio confocal Leica TC SP5-AOBS, con un láser blanco. Se recogen 4 campos por sección con un objetivo de 63X utilizando el programa LAS AF (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence*). El análisis de las imágenes se realiza con el módulo *TruAI deep-learning technology* del programa *CellSens* (Olympus). Las redes neuronales del programa reconocen los núcleos del ratón en fotografías a 63X, y de esta manera se genera una máscara binaria de forma automática. Posteriormente se cuantifica la intensidad de la señal del canal rojo para cada uno de los núcleos y en base a estos valores de intensidad se generan imágenes que representan la longitud de los telómeros de cada célula individual.

7. MICROSCOPIA *LIGHT-SHEET* APLICADA AL ESTUDIO DE LA HIPÓFISIS

La tecnología *Light-Sheet* permite la observación de muestras en tres dimensiones marcadas con señal fluorescente. Estas muestras pueden ir desde órganos pequeños de ratón (como es la hipófisis) hasta embriones de ratón o fragmentos de tejido humano.

La base sobre la que se apoya la tecnología *Light-Sheet* radica en la consecución de muestras completamente transparentes, ya que es necesario el paso de la luz láser a través del volumen total del tejido y la opacidad produce refracción de la luz. Para conseguir muestras

transparentes existen dos tipos de protocolos diferentes: Acuosos y orgánicos. Cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes.

Los medios orgánicos utilizan una serie de disolventes orgánicos para intentar alcanzar el grado de transparencia. La ventaja de estos protocolos es que son reversibles. Sin embargo, al deshidratarse la muestra se reduce en tamaño y aumenta su fragilidad, siendo más difícil su manejo.

Por su parte, los métodos acuosos se basan en la eliminación de los lípidos presentes en las membranas de las células. Si bien estos protocolos no son reversibles, el manejo de las muestras es mucho más sencillo, ya que éstas ven aumentado su tamaño durante el proceso y además mantienen una consistencia blanda similar a la propia de un gel de acrilamida. Otras de las grandes ventajas de la mayoría de estos métodos es que permiten el mantenimiento de la fluorescencia endógena.

7.1. VISIKOL®

VISIKOL® HISTO™ es un protocolo de clarificado de órganos englobado en el grupo de métodos orgánicos. Se trata de un sistema comercial, que posee la ventaja de una mayor facilidad de uso. Además, ofrecen protocolos personalizados que pueden ajustarse a diferentes tipos de muestras.

El protocolo ajustado a muestras de ratón de pequeño tamaño es el siguiente:

- Etapa 1: Permeabilización: (todos los pasos de esta etapa se llevan a cabo en rotación a temperatura ambiente)
 - Permeabilization buffer (VISIKOL), 90 minutos
 - PBS, O/N (overnight)
 - PBS, 30 minutos
 - Metanol al 50% en PBS, 45 minutos

- Metanol al 70% en agua destilada, 45 minutos
- Metanol al 100%, 120 minutos
- Metanol al 80% en DMSO, 60 minutos
- Metanol al 80% en DMSO, 60 minutos
- Metanol al 80% en agua destilada, 45 minutos
- Metanol al 50% en PBS, 45 minutos
- PBS, 30 minutos
- PBS + 1% de Tritón X-100, 45 minutos
- PBS + 1% de Tritón X-100, 45 minutos
- Tampón de permeabilización (PBS; 0,2% Tritón X-100; 0,3 M Glicina; 20% DMSO), O/N (*overnight*)
- Etapa 2: Marcaje con anticuerpos: (Todos los pasos de esta etapa se llevan a cabo en rotación)
 - Bloqueo (en tampón de bloqueo: PBS; 0,2% Tritón X-100; 6% suero de caballo; 10% DMSO), 12 horas a 37°C
 - Incubación con anticuerpo(s) primarios (en tampón de anticuerpos: PBS; 0,2% Tween®20; 3% suero de caballo; 5% DMSO), 72 horas a 37°C
 - Anti-Sox2 (Seven Hills Bioreagents, WRAB-1236).
 - 5 lavados de 45 minutos a temperatura ambiente. Se utiliza tampón de lavado: PBS + 0,2% Tween®20.
 - Incubación con anticuerpo(s) secundarios (en tampón de anticuerpos), 72 horas a 37°C
 - 5 lavados de 45 minutos a temperatura ambiente. Se utiliza tampón de lavado.
- Etapa 3: Clarificado: (Todos los pasos de esta etapa se llevan a cabo en oscuridad, con rotación y a temperatura ambiente)
 - Metanol al 50% en PBS, 45 minutos
 - Metanol al 70% en PBS, 45 minutos
 - Metanol 100%, 45 minutos
 - VISIKOL® HISTO1™, O/N

- VISIKOL® HISTO2™, al menos durante 6 horas. La muestra se conserva en este medio hasta su visualización en el microscopio.

7.2. iDISCO

iDISCO está englobado dentro de los métodos orgánicos. Se trata de una adaptación de otros protocolos para facilitar el trabajo relativo a los procesos de clarificado y tinción con anticuerpos, además de acelerar la obtención de la muestra completamente preparada (203).

iDISCO presenta variaciones en su protocolo en función del tipo de muestra con la que se está trabajando. En nuestro caso se eligió el protocolo aplicable a muestras de tamaño igual o menor al de un embrión de ratón en E15, que es el siguiente:

- Etapa 1: Permeabilización y bloqueo:
 - Las muestras se incuban en tampón PBSG-T durante 48 horas a temperatura ambiente y en agitación (Tampón PBSG-T: PBS 1X; 0,2% gelatina; 0,5% Tritón X-100).
- Etapa 2: Marcaje con anticuerpos:
 - Las muestras se incuban con los anticuerpos primarios en tampón PBSG-T + saponina 10 mg/ml. Esta incubación se realiza durante 7 días a 37°C en rotación.
 - Anti-Sox2 (Seven Hills Bioreagents, WRAB-1236).
 - Posteriormente, las muestras se lavan con tampón PBSG-T durante 24 horas, a temperatura ambiente y en rotación. Es recomendable cambiar el tampón PBSG-T al menos 6 veces durante la etapa de lavado.
 - Las muestras se incuban con los anticuerpos secundarios en tampón PBSG-T + saponina 10 mg/ml.

Esta incubación se realiza durante 2 días a 37°C en rotación.

- Posteriormente, las muestras se lavan con tampón PBSG-T durante 24 horas, a temperatura ambiente y en rotación. Es recomendable cambiar el tampón PBSG-T al menos 6 veces durante la etapa de lavado.

- Etapa 3: Inclusión en agarosa:

Esta etapa es totalmente opcional y depende del tipo de muestra con la que se está trabajando. Como la hipófisis es un órgano muy pequeño, sí que se implemente esta etapa en el protocolo. Para ello se genera un gel de agarosa al 1% en TAE 1X en el que se sumerge la muestra cuando la agarosa no está todavía gelificada, pero sí que se haya enfriado y al tacto no queme. Si la agarosa está muy caliente en el momento de incluir el órgano, puede afectar a la fluorescencia.

- Etapa 4: Clarificado (Basado en el uso de metano, adaptado de iDISCO+):

- La muestra se deshidrata pasándola por las siguientes soluciones (todas las incubaciones son de una hora a temperatura ambiente):
 - Metanol al 20% en PBS
 - Metanol al 40% en PBS
 - Metanol al 60% en PBS
 - Metanol al 80% en PBS
 - Metanol 100%
 - Metanol 100%
- Posteriormente las muestras se incuban hasta el día siguiente en una solución compuesta por 1/3 de metanol y 2/3 de diclorometano (Sigma, 34856).
- Para eliminar los restos de metanol, se incuba en diclorometano 100% durante 30 minutos.
- Finalmente, la muestra se incuba en Dibenzyl Ether (Sigma, 108014) 100% hasta que la muestra este

completamente transparente. Este paso puede durar varias horas, por lo que es recomendable incubar mínimo hasta el día siguiente.

7.3. X-CLARITY

El método acuoso X-CLARITY permite obtener órganos y tejidos transparentes tras eliminar los lípidos gracias a un flujo constante de una solución de detergente a la que se aplica una corriente eléctrica. La estructura tisular no se altera debido a la generación de una matriz de hidrogel que permite mantener la arquitectura celular gracias a que las macromoléculas se mantienen unidas en la matriz. Se trata de un método de clarificado comercial, rápido y reproducible.

El protocolo de clarificado mediante X-CLARITY es el siguiente:

- Etapa 1: Generación de la matriz de hidrogel:
 - Se lavan las muestras en un tubo eppendorf de 2 mL (2 veces, 60 minutos)
 - Incubación de las hipófisis en solución de hidrogel a 4°C durante 24 horas.
La solución de hidrogel se prepara añadiendo una solución al 25% de iniciador de polimerización VA-044 (Logos Biosystems, C13106) en proporción 1:100 a la solución de hidrogel X-CLARITY (Logos Biosystems, C13103). En este paso es importante llenar el tubo completamente con la solución de hidrogel, ya que el aire dificulta la posterior polimerización.
 - Polimerización del hidrogel durante 3 horas a 37°C.
 - Se agitan las muestras para favorecer la correcta distribución del gel dentro del tejido.
 - Como el hidrogel X-CLARITY solo contiene acrilamida (y no bis-acrilamida), no polimeriza fuera

de la muestra. Por lo que este se retira y se enjuaga la muestra 3 veces con PBS 1X.

- Etapa 2: Clarificado:
 - Para esta etapa las hipófisis se trasladan a un soporte de muestras adaptado para el sistema X-CLARITY y se introducen en el sistema de clarificado X-CLARITY™ *Tissue Clearing System II* (Logos Biosystems, C30001)
 - El clarificado se realiza en dos etapas diferentes:
 - Clarificado activo: Bombeo constante de solución *Clearing solution* (Logos Biosystems, C13001) a 40 r.p.m. durante 36 horas a 37°C. Se aplica una corriente eléctrica constante de 1,2 A.
 - Clarificado pasivo: Bombeo constante de solución *Clearing solution* a 40 r.p.m. durante 12 horas.
 - Una vez el paso de clarificado ha terminado, las muestras se devuelven al tubo eppendorf de 2 mL y se enjuagan 5 veces con PBS 1X.
 - Es fundamental eliminar los restos de SDS que puedan quedar, ya que este compuesto dificulta el marcaje con anticuerpos. Para ello las muestras se incuban en agitación suave durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Etapa 3: Marcaje con anticuerpos:
 - Permeabilización durante 24 horas a 37°C con agitación suave. (Tampón de permeabilización: PBS + 0,1% Tritón X-100).
 - Incubación con anticuerpo primario en tampón de anticuerpos, 72 horas a 37°C con agitación suave. (Tampón de anticuerpos: 6% BSA, 0.1% Tritón X-100, 0.01 Azida de sodio en PBS).

- Anti-Sox2 (Seven Hills Bioreagents, WRAB-1236) 1:2000.
 - Anti-GH (NIDDK, AFP-C11981A) 1:500.
- Las muestras se lavan con tampón de lavado un total de 5 veces durante una hora cada vez, a temperatura ambiente y en agitación (Tampón de lavado: PBS + 0,1% Tritón X-100).
- Incubación con anticuerpo secundario en tampón de anticuerpos, 72 horas a 37°C con agitación suave.
 - Durante las últimas 24 horas de incubación con el anticuerpo secundario se añade DAPI (1 µg/ml).
- Las muestras se lavan con tampón de lavado un total de 5 veces durante una hora cada vez, a temperatura ambiente y en agitación (Tampón de lavado: PBS + 0,1% Tritón X-100).
- Para eliminar sales, las muestras se enjuagan 3 veces con agua destilada.
- Etapa 4: Montaje e igualación del índice de refracción:
 - Se incuban las muestras en *X-CLARITY mounting solution* (Logos Biosystems, C13101) durante 2 horas a 37°C.
 - Se retira el medio de montaje y se añade medio fresco, incubar *O/N* a 37°C
 - Las muestras se pueden mantener en esta solución durante una semana a 4°C. Exposiciones más largas pueden provocar pérdida de fluorescencia.

7.3.1. Adaptación de la preparación de las muestras al protocolo X-CLARITY

El protocolo de X-CLARITY incluido en la sección 7.3. utiliza muestras que han sido perfundidas como se explica en la sección 1.7.3. Modificaciones en la etapa de perfusión de los ratones pueden llevar a conseguir muestras de mayor consistencia. Todas las modificaciones que se probaron están asociadas al paso de la fijación, y son las siguientes:

- Fijación con formalina tamponada al 10%, acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0,05% e iniciador de la polimerización al 0,25%.
- Fijación con formalina tamponada al 10%, acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0,025% e iniciador de la polimerización al 0,25%.
- Fijación con formalina tamponada al 10%, acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0,0125% e iniciador de la polimerización al 0,25%.
- Fijación con formalina tamponada al 10%, acrilamida al 4% e iniciador de la polimerización al 0,25%.

7.4. OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Una vez las muestras han sido teñidas y se ha completado el clarificado, estas se incuban en la solución en la que van a ser observadas y de esta forma se iguala el índice de refracción de la muestra con el del líquido y se reduce la refracción de la luz. Para la observación muestra se ha de sumergir en una cubeta con 200mL del líquido.

El paso final en el protocolo de iDISCO consiste en la incubación del compuesto en DBE, el cual tiene índice de refracción de 1,56. La observación de las muestras se realiza también en este medio, por lo

que la muestra puede ser observada en el microscopio *Light-Sheet* sin necesidad de añadir ningún paso adicional en el protocolo.

En el caso de las muestras clarificadas con VISIKOL, el último paso es una incubación en el medio VISIKOL® HISTO2™, pero no es posible rellenar la cubeta con este medio. El índice de refracción del medio de VISIKOL es 1,53 y un compuesto con un índice de refracción parecido es el DBE, cuyo índice de refracción es 1,56. No es el medio óptimo, pero se puede disminuir el efecto de esa diferencia en el índice de refracción incubando la muestra en DBE antes de ser llevada al microscopio *Light-Sheet*.

La incubación final en el protocolo X-CLARITY se hace en un medio de montaje específico de este método, pero llenar la cubeta con este medio dispara los costes de la técnica. En lugar de utilizar el medio de montaje de X-CLARITY, que tiene un índice de refracción de 1,46, se utilizó una mezcla de 2,2'-Tiodietanol (Sigma, 166782) al 63% (peso/peso) en PBS 1X. El índice de refracción de esta solución es 1,459, una diferencia mínima que puede solventarse sin dificultades incubando la muestra en esta mezcla un mínimo de 6 horas antes de ser visualizada en el microscopio.

El microscopio *Light-Sheet* es un Ultramicroscope II (Miltényi) con dos posibles configuraciones:

- Objetivo 2X (Olympus MVPLAPO) con un sistema macro (Olympus MVX-100 zoom) y una cámara CMOS (Andor Neo NEOCM), con rango de magnificación de 0,63X hasta 6,3X.
- Objetivo 12X MI PLAN con corrector del índice de refracción y una cámara CMOS (Andor Neo NEOCM) con rango de magnificación desde 7,2X hasta 30X.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utiliza el programa de análisis Graphpad Prism 8.0.1. (San Diego, USA, www.graphpad.com). Los datos que, por fallos durante el proceso experimental, o aquellos cuya desviación es superior al doble de la desviación estándar son excluidos del análisis estadístico. En todos los análisis se considera una diferencia estadísticamente significativa cuando la probabilidad es $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ y $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$.

Para los experimentos *in vivo* se ha intentado reducir al mínimo el número de animales utilizados en los procedimientos, aplicando el principio de las 3R en la medida de lo posible. Por ello se ha procurado incluir entre 3 y 5 animales por grupo. En los experimentos que conllevan un seguimiento en peso y talla del animal, los que permiten la obtención de muestras (suero) antes del sacrificio o aquellos que implican la medida de las diferentes características físicas, se han utilizado entre 8 y 12 animales por grupo. Los experimentos *in vitro* se realizan como mínimo 3 veces con al menos 3 replicados por cada grupo o condición. Los datos obtenidos tras los procedimientos se representan como la media de los grupos \pm error estándar de la media (SEM).

8.1. TEST DE NORMALIDAD

Para analizar los datos, es necesario en primer lugar conocer qué tipo de análisis se ha de utilizar, y para ellos los datos se someten a un test de normalidad. En función del tamaño de muestra es necesario aplicar un test de normalidad específico. Para un grupo de menos de 6 muestras se utiliza el test de Kolgomorov-Smirnov, y para tamaños muestrales más grandes (de entre 7 y 20) se utiliza el test de Shapiro-Wilk. Si la población se ajusta a una distribución normal o Gaussiana,

se utilizan test paramétricos. Y si por el contrario no se ajusta, se utilizan test no paramétricos.

8.2. TEST PARAMÉTRICOS

Para aquellos datos que se ajustan a la normalidad, se utiliza el t-test o t de Student. Que permite compara las medias de poblaciones independientes incluso en aquellos casos en los que el tamaño muestral es reducido (menor de 5). En los análisis llevados a cabo en este trabajo se ha utilizado el contraste de hipótesis bilateral (o de 2 colas).

Para las comparaciones entre más de dos grupos se utilizó el test estadístico *One Way Anova* (Anova de una vía), seguido del test de Tukey que compara todas las medias entre sí.

8.3. TEST NO PARAMÉTRICOS

Para aquellos conjuntos de datos cuya distribución no se ajusta a la normalidad se utiliza el test de Mann-Whitney, para comparar la media o la mediana.

Para las comparaciones de múltiples grupos de datos cuya distribución no se ajusta a la normalidad se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples.

8.4. TEST DE MÚLTIPLES FILAS

En las curvas de crecimiento se utilizó el análisis de la t de Student para comparaciones múltiples corregido con el método de Bonferroni-Dunn.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO *Gfra2*-KO

Las células madre de la hipófisis postnatal se encuentran agrupadas en dos líneas alrededor de la zona marginal, en la última capa de células de la adenohipófisis y del lóbulo intermedio. Estas células están definidas por la expresión de uno marcadores específicos, que son *Gfra2*, *Prop1* y marcadores de células madre como *Sox2*, *Sox9* o *Klf4*, y recibieron el nombre de GPS. Además, también existe una población de células positivas para *Sox2* y *Sox9* dispersa por la adenohipófisis. También se conoce que en el nicho de células madre están expresados *Ret* y el resto de los co-receptores de la familia *Gfra*. La vía de señalización mediada por *Ret* es de gran relevancia en la adenohipófisis para mantener el balance entre la supervivencia y apoptosis de las células somatotropas, que son las más abundantes.

La relevancia de esta proteína en la hipófisis no se conoce más allá de su relevancia como marcador de las células del nicho hipofisario. Por ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral es dilucidar la importancia de *GFR α 2* en la fisiología de la hipófisis.

Se han publicado dos modelos de ratón KO para *Gfra2* global. El primero de ellos en el grupo de Matti Airaksinen, (Universidad de Helsinki, Finlandia) y el segundo de ellos en el grupo de Jeffrey Milbrandt (en la Universidad de Richmon, Virginia, Estados Unidos). La estrategia seguida por ambos grupos es diferente, ya que el ratón generado en el grupo de Airaksinen tiene su primer exón interrumpido por una secuencia de neomicina (65) y el ratón KO de Milbrandt tiene el primer exón interrumpido por un gen que codifica para EGFP (204). Sin embargo, los dos coinciden en un fenotipo de disminución de la inervación colinérgica en el aparato gastrointestinal (plexo mientérico), y las glándulas salivares (68). Un segundo fenotipo en común entre ambos modelos es la diferencia en peso corporal, ya detectada en el trabajo original de 1999 donde también se midió longitud del cuerpo y se encontró que había una diferencia descriptiva

de un 10-15%, sin mostrar los datos. Esta diferencia fue estudiada más en detalle, desde 3 gramos al comienzo de la pubertad (día postnatal 19), hasta más de 8 gramos en adulto joven (día 62) (68), certificando los datos originales en adulto (día 150) (65). La diferencia detectada en peso solo mejora muy ligeramente con una dieta blanda y húmeda que compensaría la falta de peristaltismo (68, 205).

Los dos grupos, especialistas en el estudio del sistema RET-GFR α en el sistema nervioso explicaron el fenotipo de crecimiento-peso por la afectación del sistema parasimpático mientérico (65, 68), con ausencia de las neuronas mientéricas inervadas por el vago en el intestino y páncreas exocrino por falta de respuesta a la Neurturina (204). Esto llevaría a peristaltismo reducido, y déficit de la secreción exocrina del páncreas. Se estudiaron algunos parámetros metabólicos como metabolismo basal (aumentado en el KO), que está asociado a un mayor consumo de alimento y agua, y menor grasa gonadal en hembras (68).

Hay una cierta diferencia entre los dos grupos con relación a la inervación enteroendocrina. El grupo de Airaksinen no encuentran diferencias (65, 68), mientras que el grupo de Brubaker encuentra diferencias significativas en la población positiva Sinaptofisina, y falta de respuesta peristáltica al GLP1 y GLP2 en el ratón KO (205).

La hipótesis que se plantea en la presente tesis doctoral es que la ausencia de Gfra2 de las células del nicho hipofisario (población GPS) tenga un efecto en el desarrollo postnatal de la hipófisis, dando lugar a un fenotipo de enanismo hipofisario.

En consecuencia, el primer paso que se dio fue determinar la validez del modelo para el estudio de Gfra2 en la hipófisis. Y para ello, se estudió la expresión de *Gfra2* y la proteína Gfra2 en extractos de hipófisis de animales de cepa Gfra2-KO criada en un fondo genético C57BL/6 exclusivamente, frente a los establecido anteriormente en un fondo C57BL/6 y 129/Sv.

1.1. EXPRESIÓN DEL GEN *Gfra2* EN EL RATÓN KO PARA *Gfra2*

Se comenzó estudiando la expresión del ARN de *Gfra2* mediante PCR. Se diseñaron cebadores que permitían amplificar secuencias de ARN exclusivas de cada una de las 3 isoformas (**Figura 11A**). Para ello, se amplificó el final del exón 1 y el final del exón 2 para la detección de la isoforma 201 o canónica. La isoforma 203 o mediana se detectó mediante amplificación del exón 1 y principio del exón 2 propio de esta isoforma (que coincide con el exón 4 de la primera, pero no se produce amplificación) y finalmente la isoforma 202 (o corta) se amplificó utilizando cebadores que hibridasen en el primer exón de esta isoforma (exclusivo de la isoforma 202) y un cebador reverso que hibrida con el exón 2 de esta isoforma, aunque es común para las isoformas 201 y 203.

La isoforma 201 se detectó única y exclusivamente en el ratón con genotipo WT, pero no fue posible detectarla en el ratón KO. La secuencia de unión del cebador directo coincide con la parte *knockeada* del gen, por lo que no se produce hibridación de este cebador (**Figura 11B**). Al igual que ocurre con la isoforma principal, la isoforma 203 o mediana solo se puede detectar en el ratón WT, pero no se detecta banda amplificada en el KO (Figura 1B). Finalmente, la isoforma 202 (corta) fue detectada en el control positivo de esta isoforma (muestra de testículo de ratón) en el peso esperado, 152 pares de bases. Sin embargo, esta banda no se detecta ni en el ratón WT ni en el ratón KO, pero sí que se encontró una banda de un peso superior (387pb) en ambos genotipos.

Con estos resultados es posible afirmar que las isoformas 201 y 203 no están presentes en el ratón KO, y que aparece una isoforma alternativa a la 202 en ambos genotipos.

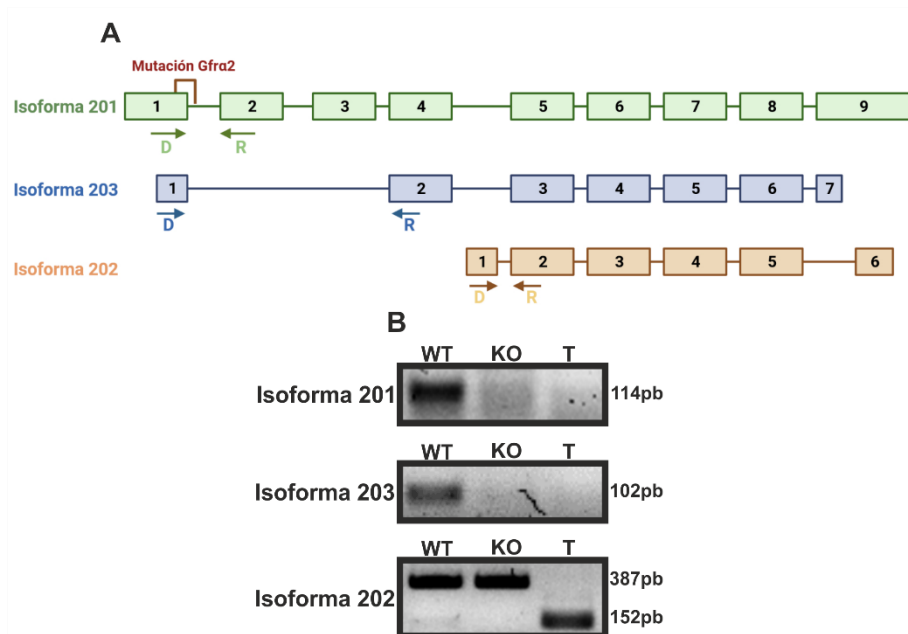


Figura 11. Isoformas del gen *Gfra2*. A) Esquema de la secuencia de DNA de las diferentes isoformas del gen *Gfra2*. Imagen creada por Alberto Pradilla utilizando el programa BioRender B) Detección del ARNm de las diferentes isoformas de *Gfra2* en hipófisis de ratones WT y KO de la cepa KO para *Gfra2*. n=1.

1.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA *Gfra2* EN EL RATÓN KO

El siguiente paso fue determinar la expresión de la proteína *Gfra2* en nuestro modelo animal. Para ello se analizó su expresión mediante Western Blot y se determinó la distribución de esta en la hipófisis mediante inmunofluorescencia.

Las 3 isoformas de *Gfra2* se diferencian en parte de la secuencia correspondiente a la región N-Terminal. Mientras que la isoforma 201 tiene una longitud total de 464 aminoácidos, la isoforma 202 está

formada por una cadena de 309 aminoácidos (la cadena varía respecto a la isoforma principal, tienen una homología del 40%, que va del aminoácido 266 hasta el 436 de la isoforma canónica) y la isoforma 203 tiene una longitud de 331 aminoácidos (carece de la secuencia que va del aminoácido 14 al 118).

Para la detección de las diferentes isoformas de Gfra2 mediante Western Blot se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo policlonal de cabra (*R&D Biosystems, AF249*) que fue producido contra un epítipo que abarca desde los aminoácidos 22 hasta el 441 de la proteína canónica. Este anticuerpo reconoce la isoforma 201, pero la homología del epítipo con las otras isoformas es del 40% con la 203 y del 70% con la 202.
- Anticuerpo policlonal de conejo (*Invitrogen, PA5-19874*) (5) que reconoce una secuencia de aminoácidos localizada en la parte C-Terminal de Gfra2, este epítipo consta de 50 aminoácidos que van del 360 hasta el 410, y es común a las 3 isoformas.

Ambos anticuerpos son válidos para detectar la isoforma 201, tal y como se demuestra en **Figura 12A y 12B**. Con el anticuerpo policlonal de cabra fue posible detectar Gfra2 exclusivamente en las muestras de ratones con genotipo WT, pero no aparece banda para los ratones KO (**Figura 12A**). Del mismo modo, el anticuerpo policlonal de conejo solo reconoce a Gfra2 en las muestras de ratones WT, pero no hay señal para los KO (**Figura 12B**). Estos resultados demuestran que la expresión de la isoforma canónica de Gfra2 está totalmente anulada en el ratón KO.

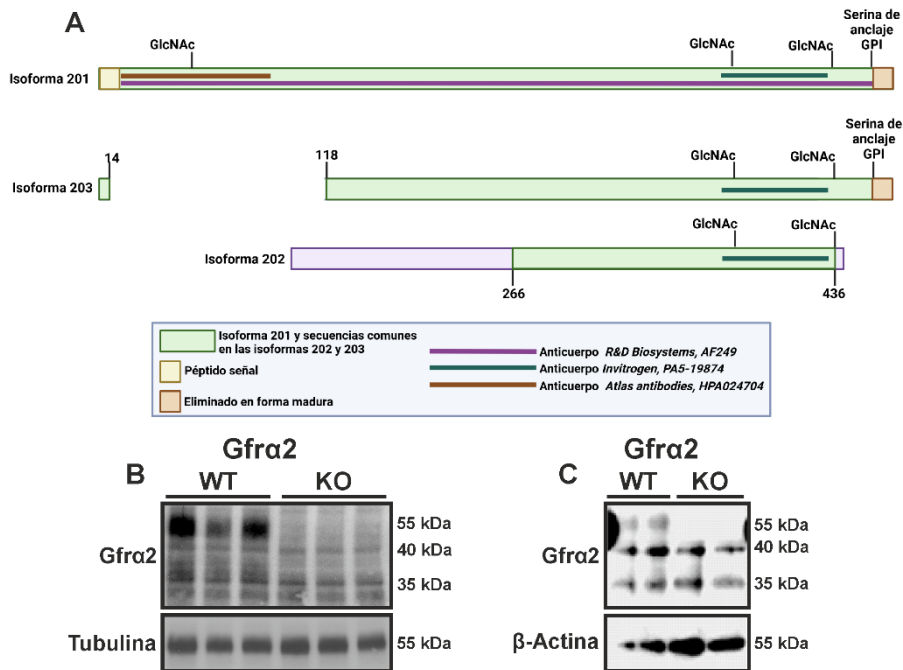


Figura 12. Isoformas de Gfra2. A) Esquema de las 3 isoformas de la proteína Gfra2 que incluye las diferencias en la secuencia de las 3 isoformas, los lugares de corte y de modificaciones post-traduccionales y finalmente la secuencia reconocida por los 3 anticuerpos anti-Gfra2 utilizados. Imagen realizada por Alberto Pradilla utilizando el programa BioRender. B) y C) Imágenes representativas de la detección de la isoforma canónica de Gfra2 en animales WT y KO mediante Western Blot. B) Detección mediante el anticuerpo policlonal de cabra, como control de carga se utilizó tubulina, n=3. C) Detección mediante el anticuerpo policlonal de conejo. Estos resultados fueron obtenidos en un set de datos anterior y se utilizó β -Actina como control de carga, n=2.

El siguiente paso fue estudiar si existe una diferencia en la distribución de Gfra2 en el ratón KO. Para ello se realizaron tinciones en secciones de hipófisis de ratón incluidas en parafina. El anticuerpo policlonal de cabra empleado en la detección de las isoformas en Western Blot no está validado para ser usado en inmunofluorescencia, pese a ello, se decidió probarlo en diferentes condiciones en secciones de parafina, pero se comprobó que no era válido puesto que no se detectó Gfra2 ni siquiera en el ratón WT. Por ello los anticuerpos

utilizados para estudiar la distribución de Gfra2 en el modelo Gfra2-KO fueron los siguientes:

- Anticuerpo policlonal de conejo (*Invitrogen, PA5-19874*), previamente descrito.
- Anticuerpo policlonal de conejo (*Atlas antibodies, HPA024704*) que reconoce una secuencia de aminoácidos localizada en la parte N-Terminal de Gfra2. El epítipo reconocido por este anticuerpo es una secuencia de 73 aminoácidos que va del 22 al 94, que solo está presente en la isoforma principal.

Debido a que Gfra2 es una proteína que en hipófisis está expresada exclusivamente en el nicho de células madre, se realizó una tinción doble para detectar la proteína de interés y citoqueratinas, cuya expresión en las células epiteliales está demostrada. Se utilizó el anticuerpo de DAKO validado para diagnóstico clínico (IVD), que es una mezcla de dos anticuerpos monoclonales de ratón, AE1 y AE3, que son capaces de detectar un amplio rango de citoqueratinas, CK1-8 y 10, 13-16 y 19. No detecta las CK12,17 y 18.

El anticuerpo C-Terminal marca Gfra2 en la población de células madre del nicho tanto en el ratón WT como en el KO (**Figura 13A**), y su expresión está restringida exclusivamente a la última línea de células que bordea la zona marginal, co-expresando citoqueratinas (5). Por el contrario, el anticuerpo N-Terminal solo detecta Gfra2 en nicho del ratón WT y no se detectó señal en los animales KO (**Figura 13B**). También está reconociendo Gfra2 solo en células positivas para citoqueratinas (5).

Combinando los resultados obtenidos a partir de las tinciones observadas con ambos anticuerpos, se confirma lo previamente visualizado mediante Western Blot. La isoforma canónica está completamente eliminada en el ratón KO, ya que no la detecta el anticuerpo N-Terminal (**Figura 13B**), pero la expresión de las isoformas no canónicas se mantiene en el nicho de células madre de

estos animales (el anticuerpo N-Terminal no las reconoce, pero sí que pueden detectarse con el anticuerpo C-Terminal).

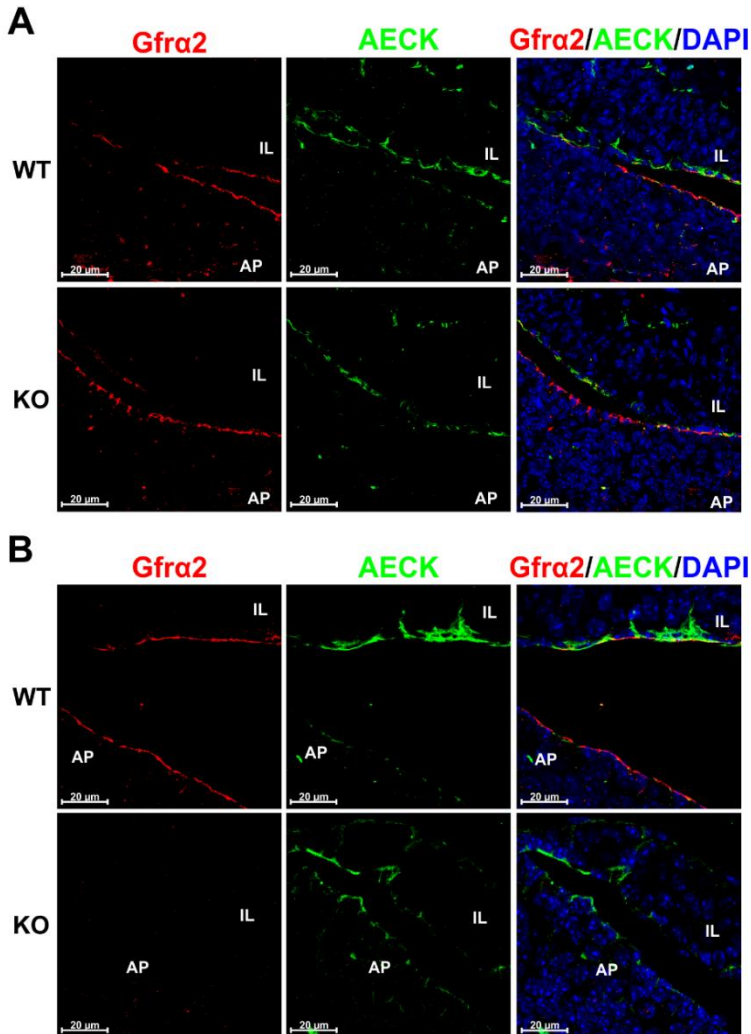


Figura 13. Tinción para Gfra2 en secciones de parafina de ratones WT y KO para Gfra2. Co-expresión de Gfra2 (rojo) y citoqueratinas (verde) en el nicho de células madre. A) Detección de Gfra2 utilizando un anticuerpo que reconoce parte de la secuencia C-Terminal. B) Detección de Gfra2 utilizando un anticuerpo que reconoce la parte N-Terminal de Gfra2. n=2. (AP: Adenohipófisis, IL: Lóbulo intermedio).

Los resultados previamente obtenidos confirman que el ratón KO para *Gfra2* no expresa la proteína canónica en el nicho de células madre. Esta proteína canónica es la única que contendría la señal en el retículo endoplasmático para unirse al fosfatidil inositol en el enlace GPI, y, por lo tanto, localizarse en la capa lipídica extracelular de la membrana plasmática para funcionar como co-receptor de Ret. Por lo que la hipófisis podría estar implicada parcial o directamente en el fenotipo de este ratón.

2. FENOTIPO GENERADO EN ANIMALES KO PARA *Gfra2*

2.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS EN EL MODELO *Gfra2*-KO

Una de las características que se habían descrito anteriormente sobre el ratón KO para *Gfra2* es que tiene un fracaso en el crecimiento a partir de la segunda semana postnatal (65) debido a un déficit de la innervación intestinal parasimpática y los consiguientes problemas en el peristaltismo y la absorción de nutrientes (68). Otro modelo de animal KO para *Gfra2*, en el cual el alelo está sustituido por EGFP, comparte el fenotipo de fracaso en el crecimiento y alteraciones en el sistema nervioso autónomo (205). Sin embargo, en ninguna de las publicaciones llevadas a cabo por estos grupos de investigación se planteó la posibilidad de estudiar un posible fenotipo hipofisario.

Las mediciones fenotípicas iniciales consistieron en el peso y la longitud de los animales una vez han alcanzado la edad adulta. La maduración sexual de los ratones se completa en hembras en torno a los 35-40 días de edad, aunque en machos este proceso puede llegar a extenderse hasta el día 78-80 (206-209). El crecimiento longitudinal acompaña a la maduración sexual con un ligero retardo. Por eso se ha considerado en este trabajo a los ratones de al menos 3 meses de ida

como adultos jóvenes. Debido a ello, pero se considera que llegan a la edad adulta una vez cumplen los 3 meses de vida. Por ello, las medidas se realizaron en animales de entre 90 y 100 días para asegurar que el crecimiento longitudinal había alcanzado su máximo.

En la **figura 14** se muestra que existe una reducción del peso y la longitud tanto en machos como en hembras una vez alcanzan la edad adulta. La longitud media en hembras adultas es de 94,75mm para las WT y 87,25mm en hembras KO (**Figura 14A**), lo que supone una reducción del 8,6% de la talla. En machos esta reducción es del 10,1%, ya que la media de longitud es 99mm para los animales WT y 89,9mm para los KO (**Figura 14B**). La reducción en el peso es más acusada, ya que la media en las hembras KO está reducido en un 25,7% respecto al de las WT (WT: 22,25g; KO: 17,7g). En machos esta reducción en el peso es del 23% (WT: 29,12g; KO: 23,67g).

Se compararon también las medidas del peso de los ratones con genotipo heterocigoto (HZ) con los WT y los KO, encontrando que estos animales poseen un peso y longitud como los WT (no se encontraron diferencias significativas) ni en machos ni en hembras (**Figura 14A y 14B**). Si que existen diferencias significativas en peso y longitud de los ratones HZ cuando se comparan con los KO (**Figura 14A y 14B**).

Las medidas recogidas no parecen indicar que se esté produciendo un retraso en el crecimiento de los ratones, ya que una vez alcanzada la edad adulta siguen existiendo diferencias significativas en la longitud de los animales KO respecto a los WT, incluso cuando el crecimiento longitudinal ya se ha detenido.

Sin embargo, para valorar si se produce un retraso en el crecimiento, se realizó un seguimiento del peso y la longitud de los ratones desde la tercera semana hasta la edad adulta. Estos datos de monitorización permitieron completar las curvas de crecimiento de los animales (**Figura 15**).

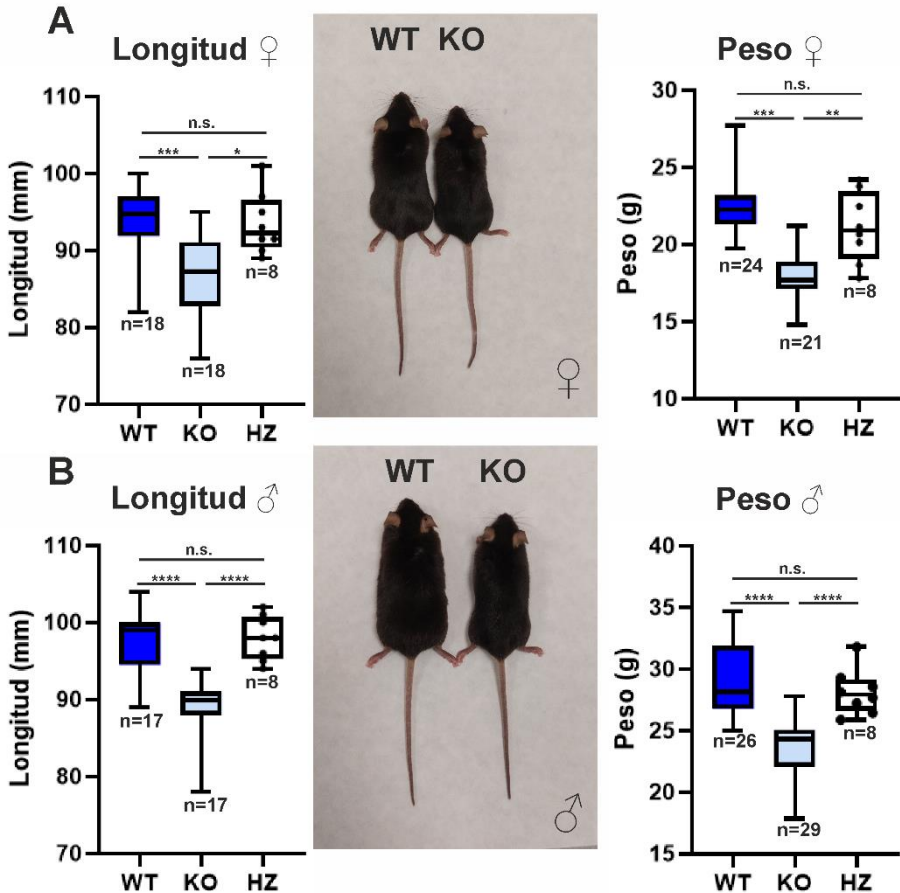


Figura 14. La ausencia de *Gfra2* resulta en una disminución significativa de la talla y el peso en ratones adultos mantenidos en fondo C57BL/6. Las gráficas muestran la comparación de la longitud y el peso entre animales WT, KO y HZ, tanto en hembras (A) como en machos (B) entre 90 y 120 días. Los datos están representados en un diagrama de cajas (media, percentiles 25% y 75% y los valores individuales). n=17-18 para longitudes y n=21-29 para pesos, n=8 para heterocigotos. El método estadístico utilizado en la comparación de los valores medios entre WT y KO es *One Way Anova* ordinario seguido de un test de Tukey (para las medidas del peso), o el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn para comparaciones múltiples. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

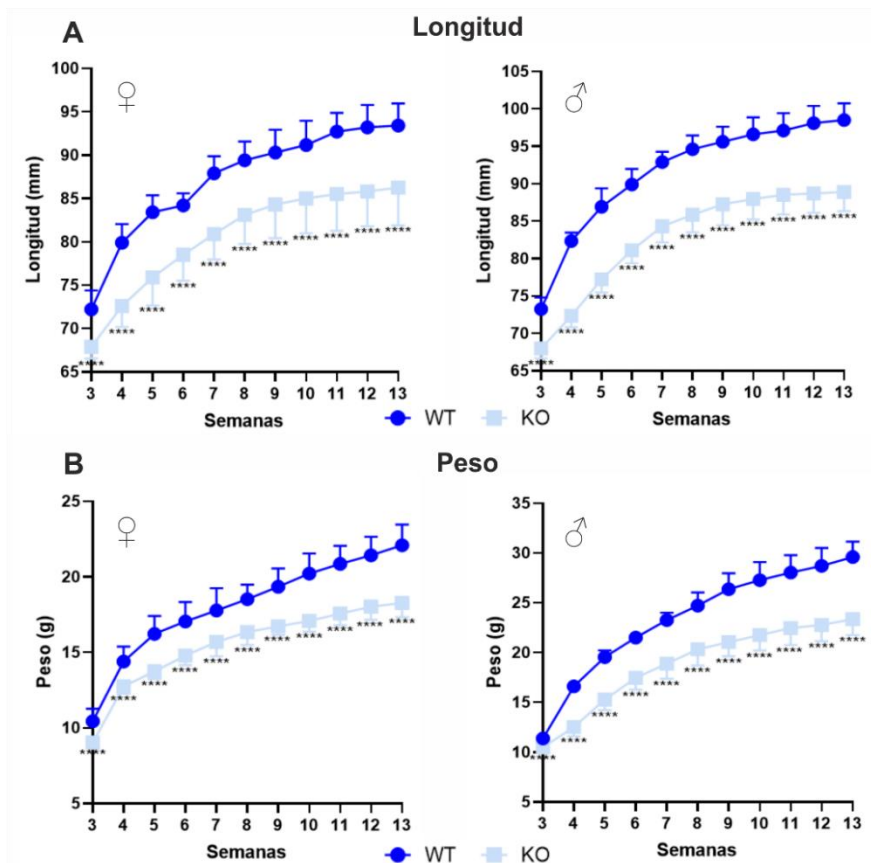


Figura 15. Curvas de crecimiento en ratones WT y KO para *Gfra2* con fondo genético C57BL/6 desde el destete hasta la edad adulta. Medidas de longitud (A) y peso (B) en ratones WT y KO de ambos sexos desde la tercera semana hasta la edad adulta. Los datos están representados como la media \pm SD. $n=10$ para longitudes y $n=15$ para pesos. El análisis estadístico utilizado es la t de Student para comparaciones múltiples corregido con el método de Bonferroni-Dunn. **** $p\leq 0,0001$.

Estos resultados indican que la diferencia en el tamaño comienza a establecerse desde las primeras fases del crecimiento longitudinal dependiente de la GH hipofisaria (en torno a la semana 2 postnatal) y se acentúa durante la maduración sexual manteniéndose hasta en la edad adulta. No hay un retraso en el desarrollo, si no que se observa que las curvas de crecimiento no llegan a converger nunca. En bases a

estos resultados se observa que, en estos ratones, la ausencia no de *Gfra2* no produce un crecimiento retardado y en su lugar se genera un fenotipo de *Enanismo*. El enanismo tiene varias causas de origen que incluyen afectación de genes relacionados con talla baja gestacional, el desarrollo músculo esquelético, causas endocrinas hipofisarias y no hipofisarias como el hipotiroidismo primario, y alteraciones cromosómicas (210). Al tratarse de un modelo genético criado en camadas de heterocigotos, se pueden descartar las alteraciones cromosómicas. Y al comenzar a establecerse a partir de la semana 2 postnatal, se descarta un fenotipo de talla baja gestacional. El hecho de que la dieta húmeda sólo recuperase un pequeño porcentaje del valor del peso (68), nos llevaba a pensar que la causa real pudiera ser endocrina y no digestiva.

Se realizaron medidas de diferentes características físicas que están establecidas como marcadores del eje GH/IGF-1 en roedores (199, 211, 212).

Una de las características que define el enanismo y que además permite clasificarlo es la longitud de las extremidades y su proporción al tronco. Se midió la longitud de la tibia, las manos y los pies en el modelo KO para *Gfra2*, y en todas las mediciones se puede observar una reducción del tamaño en comparación a sus congéneres WT, tanto en hembras (**Figura 16**), como en machos (**Figura 17**).

Otros rasgos dependientes del eje GH/IGF-1 son la longitud y anchura de la cabeza, longitud de la mandíbula, diámetro de la oreja e incisivos (tanto inferiores como superiores). El tamaño de todos ellos presenta una disminución significativa en los animales KO al compararlos con los compañeros de camada WT (**Figuras 16 y 17**).

La reducción proporcionada de todos los rasgos estudiados, sumada a las diferencias en talla y peso que pueden observarse cuando se comparan animales de ambos genotipos caracterizan un fenotipo de enanismo proporcionado, reafirmando la hipótesis de que se trata de un fenotipo endocrino.

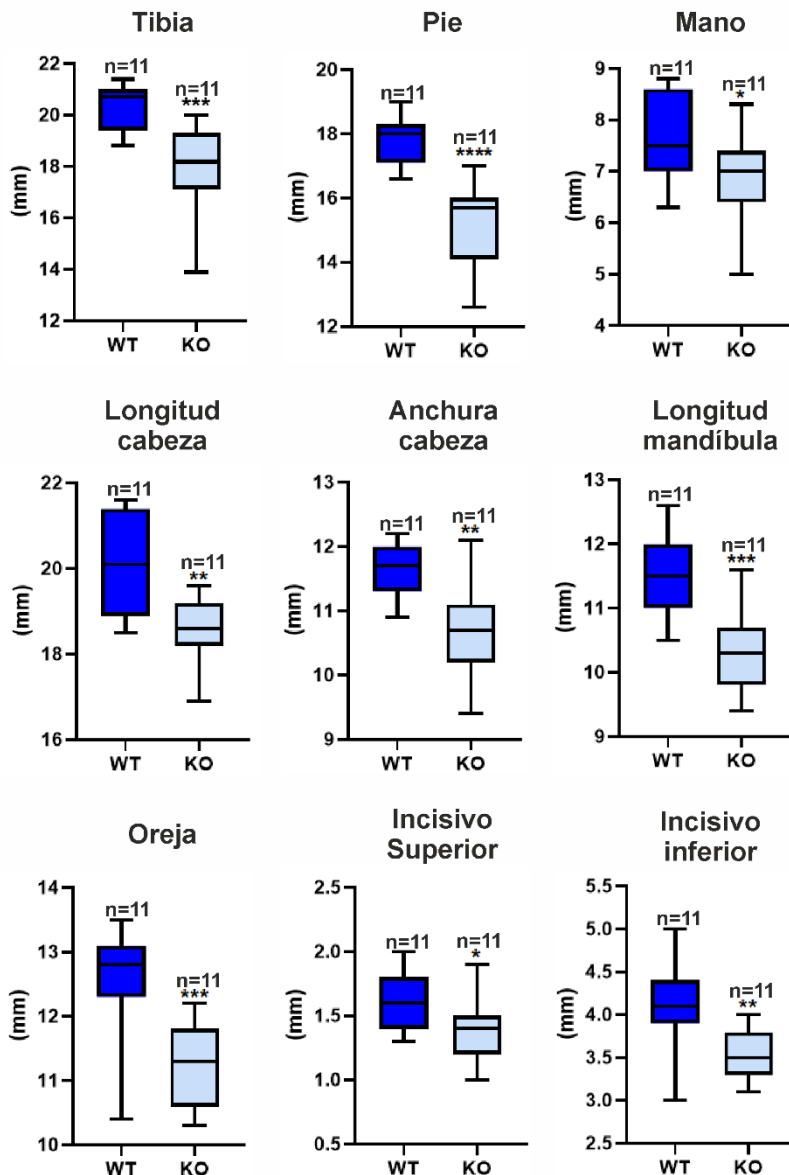


Figura 16. Comparación en ratones hembra WT y KO para Gfra de las características físicas relacionadas con la acción del eje GH/IGF-1. Los datos están representados en diagramas de cajas (media, percentiles 25% y 75% y los valores individuales). n=12 para todos los grupos. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

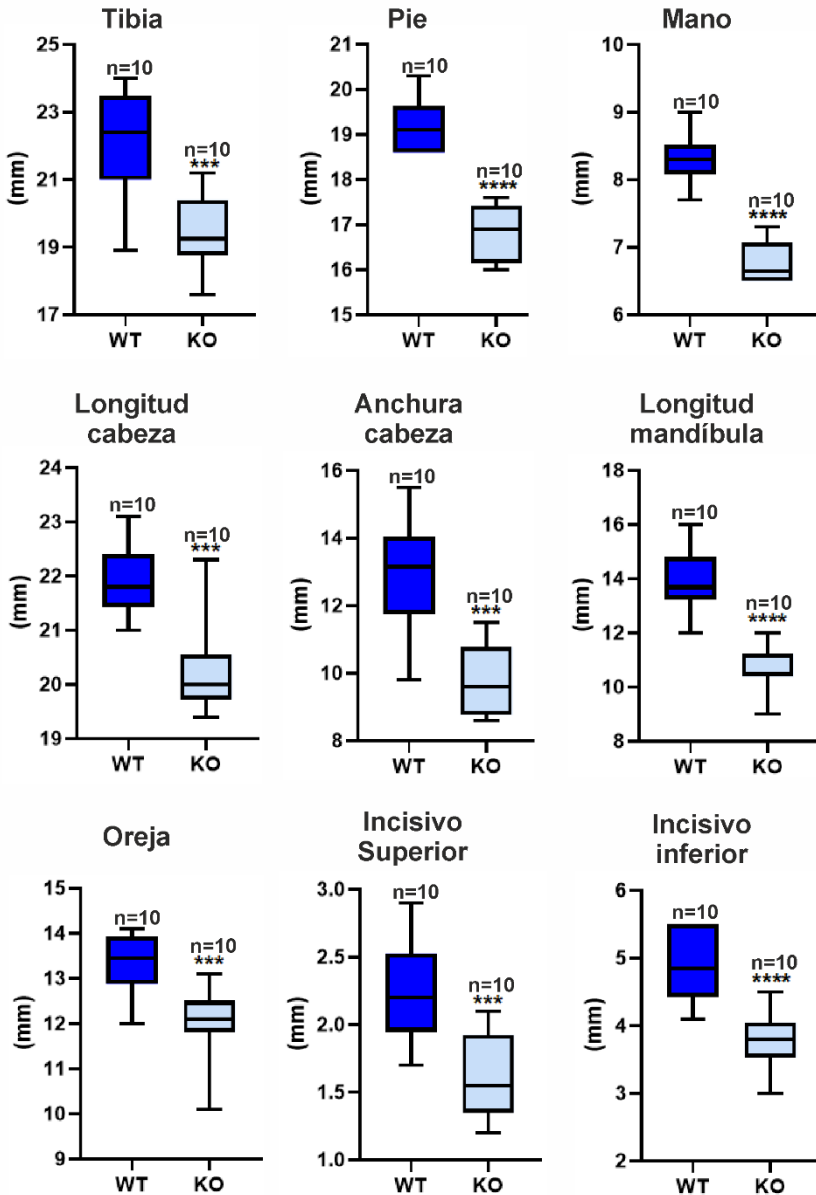


Figura 17. Comparación en ratones macho WT y KO para Gfra de las características físicas relacionadas con la acción del eje GH/IGF-1. Los datos están representados en diagramas de cajas (media, percentiles 25% y 75% y los valores individuales). n=12 para todos los grupos. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. ***p<0,001; ****p<0,0001.

2.2. LA HIPÓFISIS EN EL MODELO KO PARA *Gfra2* CON FONDO GENÉTICO C57BL/6

El fenotipo encontrado era compatible con un enanismo endocrino. Las causas principales son etiología hipofisaria, déficit del eje GH/IGF-1 o hipopituitarismo general, o etiología tiroidea. Se estudió entonces, el órgano de interés en este proyecto, la hipófisis.

El tamaño de la hipófisis de los animales KO presenta una reducción significativa del tamaño de este órgano respecto a sus hermanos de camada WT, esta reducción del tamaño se mantiene en ambos sexos (**Figura 18A**).

A partir de secciones centrales de hipófisis incluidas en parafina y cortadas de forma coronal se calcularon las áreas de las 3 partes que componen este órgano tanto en hembras como machos de genotipo WT y KO. Se encontró que se produce una disminución proporcionada del área de las 3 partes en hembras (**Figura 18B**) y en machos (**Figura 18C**) KO respecto a sus compañeros de camada WT.

Se calculó también el volumen (53) de la adenohipófisis de ratones WT y KO de ambos sexos, y el resultado obtenido es el mismo que el previamente observado en las áreas, los ratones con genotipo KO tienen una hipófisis de tamaño reducido respecto a los WT (**Figura 18D**).

En la **figura 18E** se incluye la diferencia en el número de células por adenohipófisis de ratones adultos (hembras y machos juntos) de ambos genotipos. El tamaño reducido de la hipófisis de los ratones KO para *Gfra2* se traduce en una disminución en el número de células de esta glándula (**Figura 18E**).

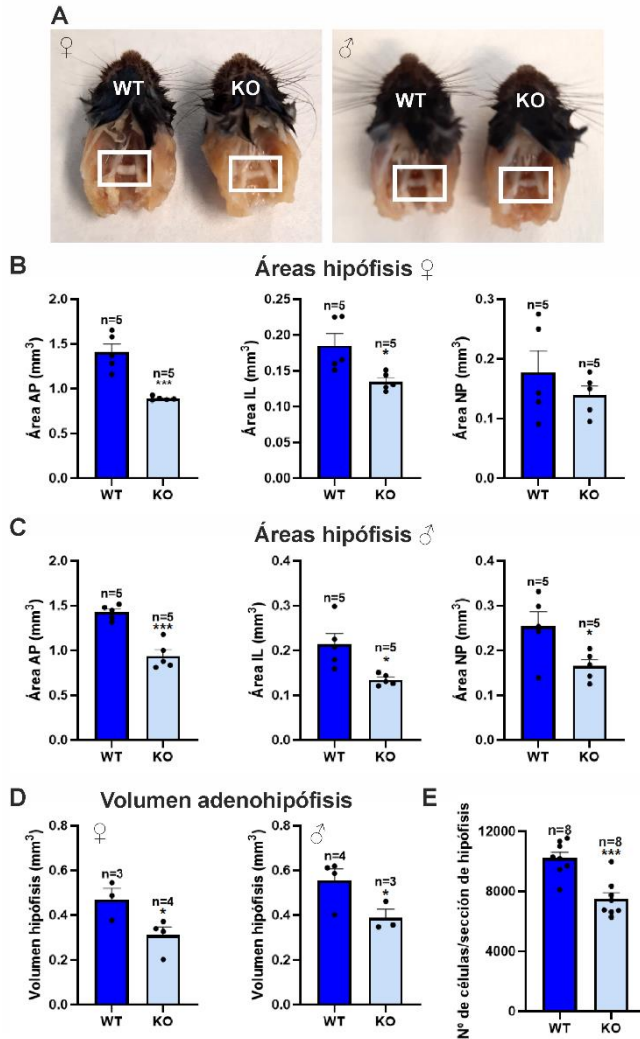


Figura 18. Diferencia en el tamaño de la hipófisis entre ratones WT y KO. **A)** Fotografía de la cabeza en la que se puede observar la hipófisis en la silla turca. En la fotografía de la izquierda están comparadas las hipófisis de una hembra WT y una KO y a la derecha la comparación entre machos en ambos genotipos. Representación del valor medio del área de la AP, IL y NP de hembras (**B**) y machos (**C**) de ambos genotipos, n=5. **D)** Representación del valor medio del volumen de la adenohipófisis de ratones WT y KO. n=3-4 **E)** Contaje del número de células de secciones de hipófisis de ratón WT y KO adultos (hembras y machos) n=8. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p≤0,05, ***p≤0,001. (AP: Adenohipófisis, IL: Lóbulo intermedio, NP: Neurohipófisis)

2.3. CONFIRMACIÓN DEL MODELO KO PARA *Gfra2* COMO ENANO HIPOFISARIO

El siguiente paso fue medir los niveles de IGF-1 en el suero de los ratones. El IGF-1 circulante es la hormona diana de la GH y su medición refleja la actividad del eje GH/IGF-I. IGF-1 se libera en el hígado en respuesta a GH, y por consiguiente cambios en IGF-1 estarían proporcionados a cambios en la producción y liberación de GH.

Se observó una reducción estadísticamente significativa de los niveles de IGF-1 en suero cuando se comparan los valores obtenidos en animales WT y KO (**Figura 19**). Diferencia que es evidente tanto en hembras como en machos.

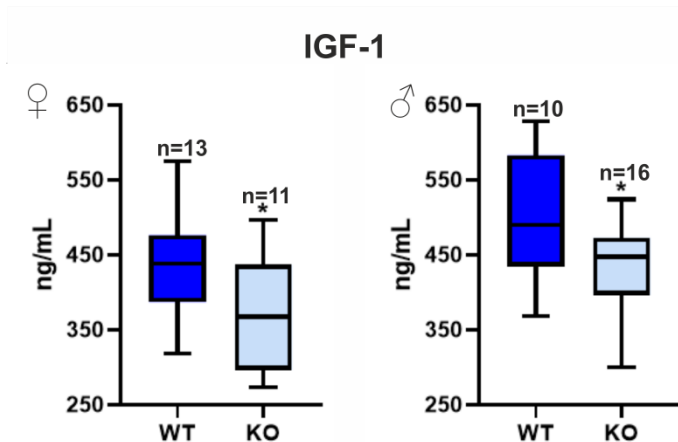


Figura 19. Medida de los niveles de IGF-1 en suero de ratones de ambos sexos WT y KO para *Gfra2*. Los datos están representados en diagramas de cajas (media, percentiles 25% y 75% y los valores individuales). n=10-16. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. * $p \leq 0,05$.

Una reducción en los niveles de IGF-1 en suero (**Figura 19**), sumada a las diferencias en las mediciones de todas las características físicas presentadas anteriormente confirman que el ratón KO para *Gfra2* posee un fenotipo de enanismo hipofisario. Una de las causas más comunes de enanismo es la deficiencia de la hormona de

crecimiento, pero también pueden darse casos de hipopituitarismo, en los cuales está afectada la producción y liberación de otro u otros de los seis tipos de hormonas que se secretan en la adenohipófisis (210).

Otra hormona esencial para el crecimiento postnatal que está muy relacionada con el metabolismo es la tiroxina o T4. Esta hormona es el producto final de la tiroides en respuesta a la TSH, y por consiguiente está involucrada en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

Los valores de la hormona T4 libre en suero se mantienen en unos niveles muy similares en animales de ambos genotipos, y no se apreciaron diferencias significativas ni en machos ni en hembras (Figura 20). De esta forma se puede descartar la existencia de un hipopituitarismo primario como causa del enanismo, pero también un hipopituitarismo múltiple, ya que solo se ha detectado una disminución aislada de IGF-1.

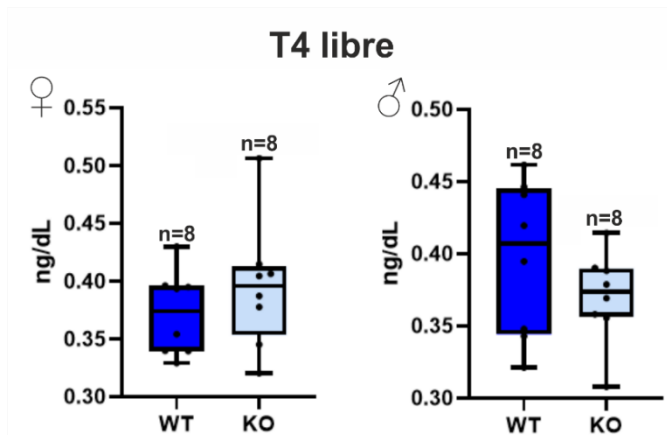


Figura 20. Medida de los niveles de T4 libre en suero de ratones de ambos sexos WT y KO para *Gfra2*. Los datos están representados en diagramas de cajas (media, percentiles 25% y 75% y valores mínimo y máximo). n=8. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. * $p \leq 0,05$.

3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TODAS LA HORMONAS HIPOFISARIAS EN EL MODELO KO PARA GFR α 2

El siguiente pasó tras la confirmación del fenotipo de enanismo hipofisario consistió en el análisis de las hormonas producidas en la adenohipófisis (GH, PRL, ACTH, TSH, FSH y LH). Para ello, se midieron los niveles de estas seis hormonas suero obtenido a partir de sangre extraída de la vena facial y en extractos de tejido de hipófisis. Además, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para cada hormona en una primera serie de ratones (imágenes no mostradas), y de inmunofluorescencia para comprobar si existen alteraciones en la distribución de los cinco tipos de células productoras de hormonas en la adenohipófisis.

3.1. NIVELES HORMONALES EN SUERO

Las hormonas hipofisarias se secretan en picos, con distinta frecuencia y amplitud para cada una de ellas. No en todas las hormonas es relevante fisiológicamente una medición en suero. Algunas hormonas mantienen una concentración en sangre cuya medición es proporcional al funcionamiento hipofisario, por ejemplo, la TSH, pero otras hormonas como la GH tienen unos picos con máximos muy elevados seguidos por áreas de muy baja concentración. Es bien conocida la dificultad de diagnóstico de la patología secretora de la GH, ya que sus picos no siguen ritmo, y su frecuencia y amplitud varía en función del sexo o los ciclos diarios (18).

De entre todas las medidas de las hormonas en suero todos los datos obtenidos (**Figura 21A y 21B**), no se ha encontrado ninguna diferencia significativa en PRL, ACTH, TSH o LH, ni en machos ni en hembras. En FSH encontramos una tendencia a niveles mayores en

las hembras KO, que pudieran estar en relación con la infertilidad de estas hembras en el fondo C57BL/6 comentada anteriormente.

La diferencia más destacable se encuentra en la GH en machos, donde se puede observar que los niveles de esta hormona en animales KO presentan una reducción estadísticamente significativa de un factor de 10 respecto al WT (**Figura 21B**). Por otra parte, la medida de GH en ratones KO hembras (**Figura 21A**). Es bien conocido el dimorfismo sexual en el patrón de secreción en machos, picos muy intensos y separados en el tiempo, frente a hembras, picos largos de menor intensidad y menos separados (18). Esta podría ser la explicación a la diferencia en los datos, y la concordancia sólo en machos con lo obtenido para IGF-1 en ambos sexos (**Figura 19**).

En este ensayo de medición múltiple, el factor de dilución aplicado a las muestras de suero fue el adecuado para la mayoría de las hormonas, sin embargo, algunos de los valores obtenidos eran menores que el punto de menor concentración de la recta patrón. Esta complicación es muy limitante en la medida de TSH en hembras, ya que ninguno de los valores puede ser considerado como válido. Asimismo, algunos de los valores de las hormonas gonadotropas (FSH y LH) tampoco pueden validarse por este mismo motivo. La naturaleza pulsátil de la hormona de crecimiento también presenta dificultades para ser medida directamente en suero, pero en el caso de la GH, aunque el rango de valores obtenido es muy amplio, la mayoría de las mediciones pueden interpolarse en la recta patrón (**Figura 21A y 21B**).

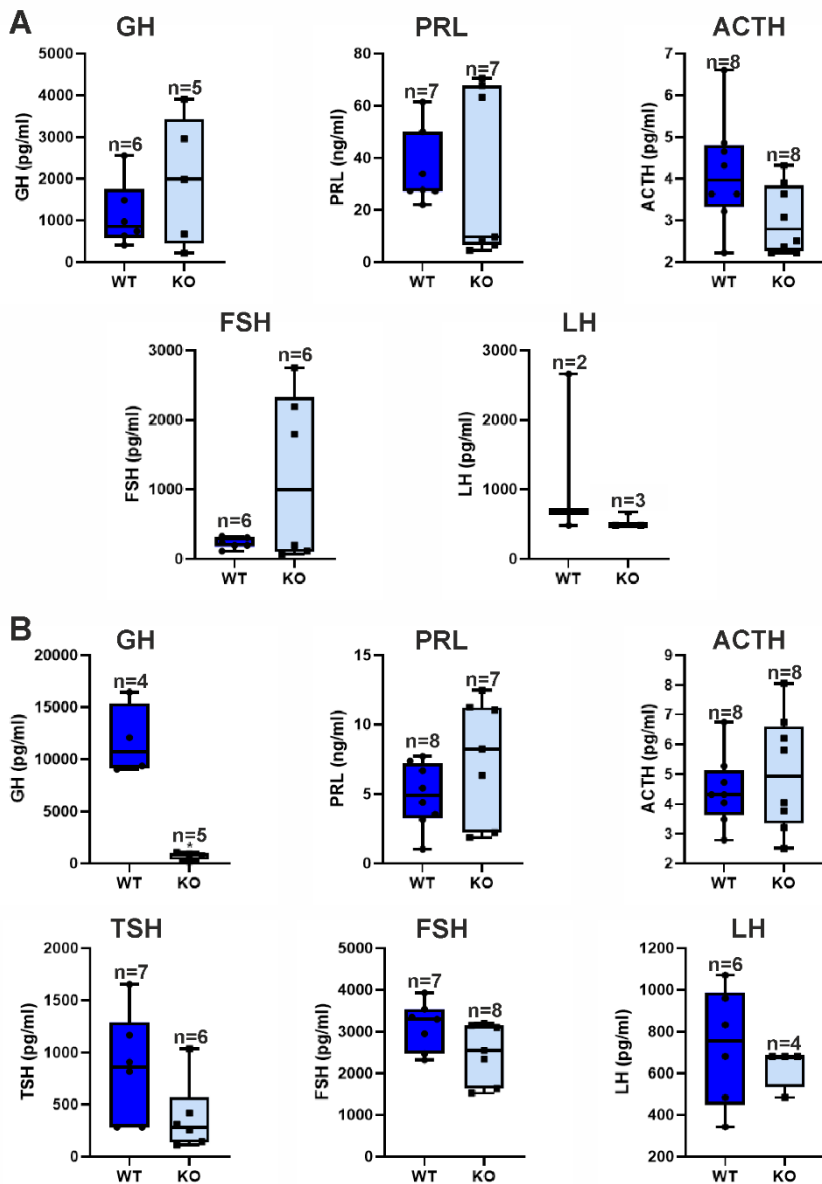


Figura 21. Niveles de las seis hormonas hipofisarias medidas en suero de ratones de ambos sexos WT y KO para *Gfra2*. Los niveles hormonales se midieron en hembras (A) y machos (B). Los datos están representados en diagrama de cajas (media, percentiles 25% y 75% y los valores individuales). n=3-8. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p≤0,05.

3.2. NIVELES HORMONALES EN LA HIPÓFISIS

Además de medir la liberación de hormonas, también se estudió la producción de éstas por parte de las células de la adenohipófisis y para ello se utilizó el mismo ensayo multiplex que el empleado con las muestras de suero. En este caso, las muestras se diluyeron 20 veces. Se evaluaron extractos de adenohipófisis de 6 animales dentro de cada uno de los 4 grupos, pero el factor de dilución limitó en gran medida la validez de algunas medidas, ya que no todos los valores de las diferentes hormonas están en el mismo rango y no todos los valores pueden ser interpolados en la recta patrón.

La GH en machos presenta una diferencia más pronunciada que aquella que puede observarse en el resto de las hormonas. Sin embargo, la dispersión de los resultados y el hecho de que solo dos medidas de animales WT pudieran interpolarse en la recta patrón, no permitieron aplicar un análisis estadístico (**Figura 22 B**). La mayoría de los valores de GH quedan por encima del punto más alto de la recta debido a la dilución de las muestras.

Por el contrario, todos los valores de TSH y LH en machos, quedaron por debajo del punto más bajo de la recta patrón. En hembras, sí fue posible obtener resultados para TSH y LH (**Figura 22A y 22B**).

Respecto al resto de hormonas, la diferencia de medias es ligeramente inferior en los animales KO para todas las hormonas (**Figura 22A y 22B**). Las únicas que no siguen esta tendencia son la TSH y la LH en hembras, que además de estar ligeramente aumentadas en el genotipo KO, poseen una muy elevada dispersión en los datos (**Figura 22A**). En el caso de TSH y LH en machos, todos los valores obtenidos para estas dos hormonas quedaron por debajo del punto más bajo de la recta patrón y por tanto no aparecen en las gráficas.

También se realizaron tinciones por inmunofluorescencia para estudiar la distribución de los cinco tipos de células endocrinas de la adenohipófisis. Los marcadores elegidos son: GH (somatotropas), PRL (lactotropas), subunidad beta de la TSH (tirotropas), ACTH (corticotropas) y subunidad beta de la LH (gonadotropas) (**Figura 23**). Se puede observar, como se había indicado anteriormente, que el número total de células (DAPI+) es menor en los ratones KO para $Gfr\alpha 2$. Además, entre la distribución de los cinco tipos celulares se puede observar la mayor proporción de células somatotropas en machos y mayor proporción de células lactotropas en hembras (**Figura 23**). No se observan variaciones sustanciales en la distribución y proporción de cada uno de los cinco tipos endocrinos cuando se comparan las fotografías representativas de los grupos WT y KO (**Figura 23**).

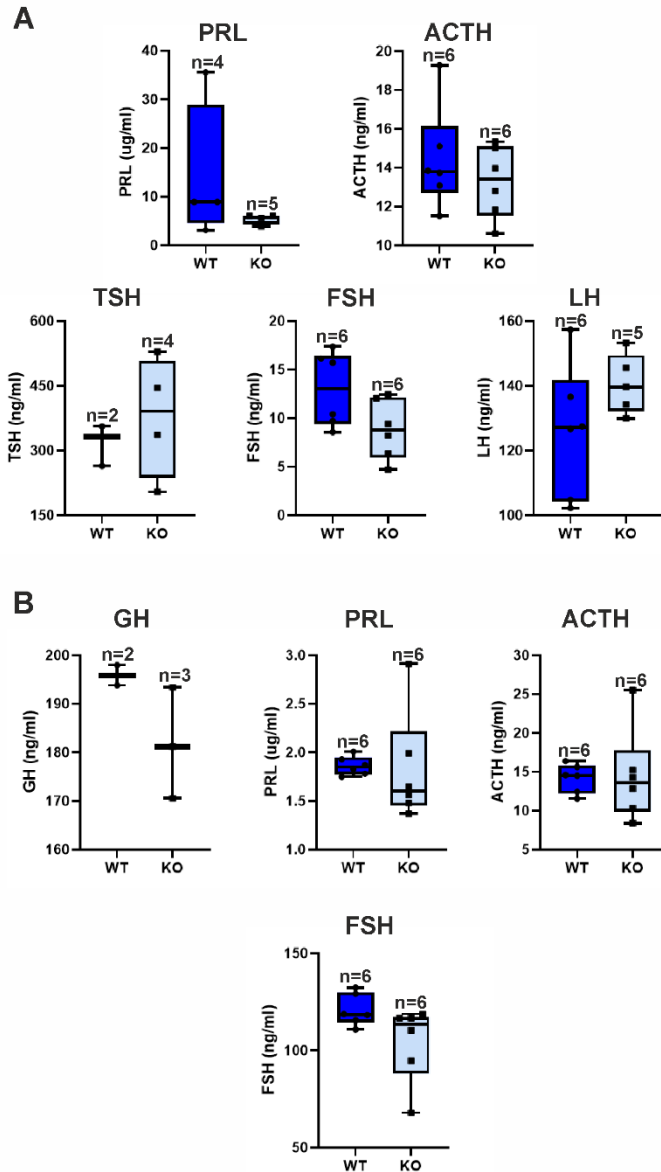


Figura 22. Contenido hipofisario de las seis hormonas hipofisarias medidas en extracto de tejido de hipófisis de machos y hembras de la cepa KO para Gfra. Los niveles hormonales se midieron en hembras (A) y machos (B). Los datos están representados en diagrama de cajas (media, percentiles 25% y 75% y los valores individuales). n=2-6. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p≤0,05.

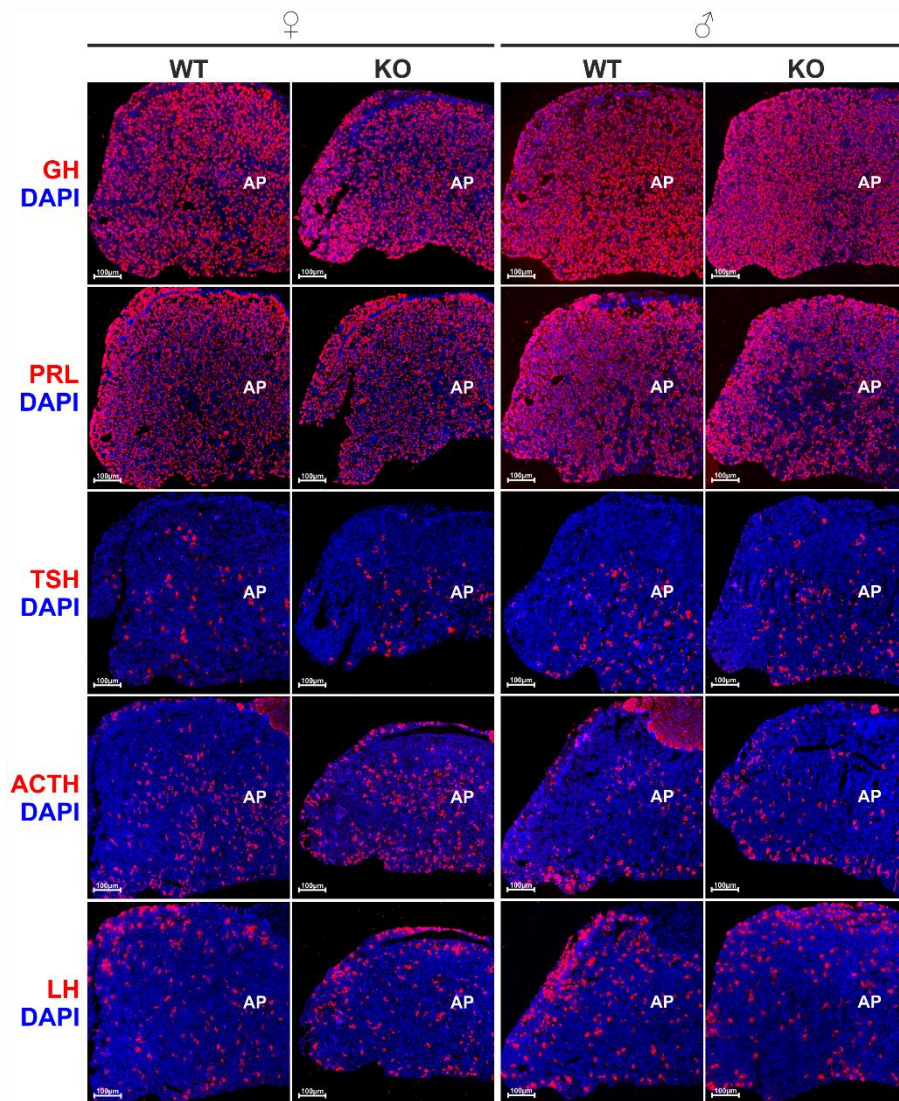


Figura 23. Immunofluorescencia para estudiar la proporción y distribución de los 5 tipos de células endocrinas de la adenohipófisis de ratones de ambos sexos WT y KO para *Gfra2*. Tinciones para células somatotropas (GH), lactotropas (PRL), tirotropas (TSHB), adenocorticotropas (ACTH) y gonadotropas (LHB). Las cinco hormonas presentan un marcaje citoplasmático. Fotografías de microscopía confocal con un objetivo 20X. Las tinciones se repitieron en 3 animales de cada grupo y la distribución fue siempre la misma. (AP: Adenohipófisis).

4. ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS HIPÓFISIS DEL MODELO $Gfra2$ -KO

4.1. $Gfra2$ Y LA FAMILIA DE CO-RECEPTORES $Gfra$

La familia de co-receptores $Gfra$ posee 4 miembros entre los que se encuentra $Gfra2$. Cada uno de los 4 co-receptores tiene mayor afinidad por un ligando específico, pero está descrito que existe cierta promiscuidad y que los co-receptores son capaces de activarse tras la unión a un ligando que no es el principal. Los cuatro ligandos son GDNF, Neurturina, Artemina y Persefina, que tienen mayor afinidad respectivamente por $Gfra1$, $Gfra2$, $Gfra3$ y $Gfra4$.

Para determinar si la función perdida por parte de $Gfra2$ en el modelo de ratón KO para $Gfra2$ está siendo llevada a cabo por alguno de los otros tres co-receptores, se estudió la expresión de los mismos y de los ligandos de los dos co-receptores mayoritarios, $Gfra1$ y $Gfra2$. Así como la distribución de estos tres mismos co-receptores en el nicho y en la adenohipófisis.

La expresión de los 3 co-receptores en la hipófisis del ratón KO no presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la de los animales WT, igual que ocurre con los ligandos GDNF y Neurturina (**Figura 24**). Estos resultados sugieren que la ausencia de $Gfra2$ no se está compensando por la sobre-expresión de cualquiera de los otros co-receptores de la familia $Gfra$ en el ratón KO.

Asimismo, ya que está descrito que los 4 co-receptores se co-expresan en las células madre del nicho hipofisario (117), se estudió además que esta expresión estuviera mantenida en el modelo KO para $Gfra2$. Para ello se realizaron tinciones dobles que permitiesen detectar el co-receptor $Gfra$ específico y un marcador de las células madre del nicho. En este caso el marcador elegido fue Sox2, que pese a que se había descubierto que está más expresado en los animales KO que en los WT, su expresión en el nicho de células madre no está alterada.

La expresión de $Gfra1$ en el nicho de células madre sigue el mismo patrón tanto en el ratón WT como en el KO, se encuentra en la membrana plasmática de los polos apical y basal de las células del nicho (**Figura 25A**). $Gfra3$ por su parte, no aparece en las células del nicho hipofisario, su expresión está conservada en humano y en rata (117), pero parece que esta no está presente en ratón, ya que no fue posible encontrarla en esta localización ni en los ratones WT ni en los KO (**Figura 25B**). Por último, $Gfra4$, el co-receptor minoritario, sí que está expresado en ambos genotipos de ratón, y puede encontrarse en el polo apical de las células del nicho, pero de forma discontinua y en un bajo número de células (**Figura 25C**).

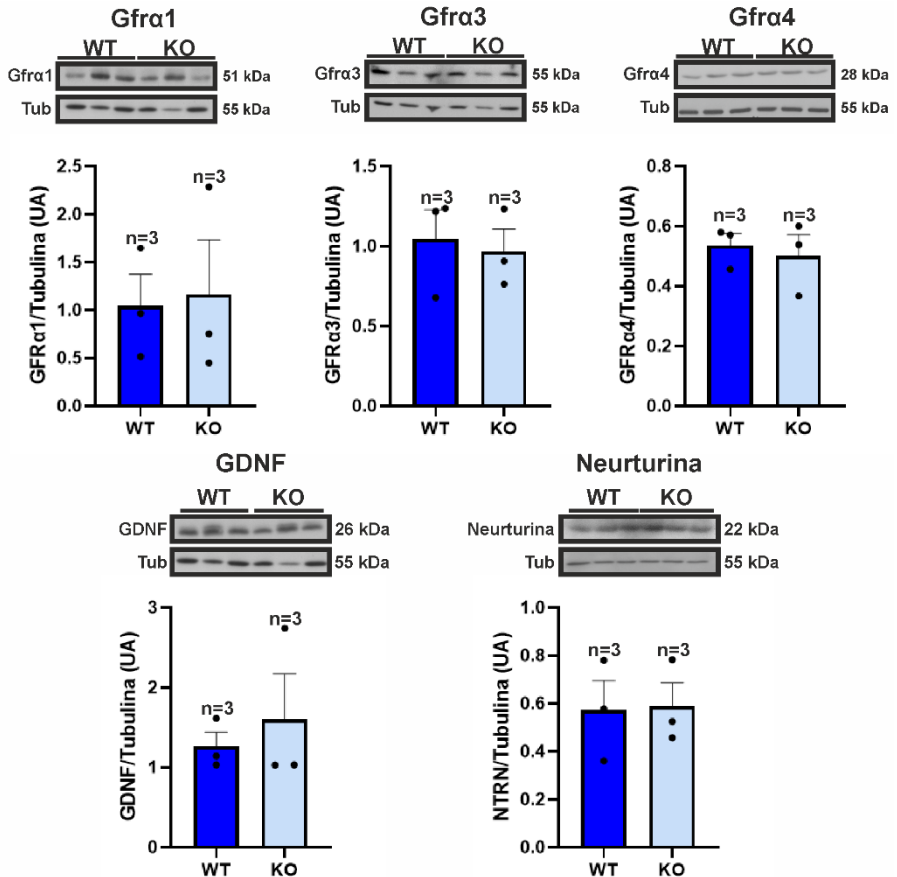


Figura 24. Expresión de los co-receptores de la familia GFR α y sus ligandos mayoritarios en la hipófisis de ratones WT y KO para Gfra2. Imagen representativa de las bandas correspondientes a las co-receptores Gfra1, Gfra3, Gfra4 y los ligandos GDNF y neurturina, y cuantificación de la intensidad de las bandas específicas para cada una de estas cinco proteínas normalizada por la intensidad de tubulina. Las gráficas representan la media \pm SEM de n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student.

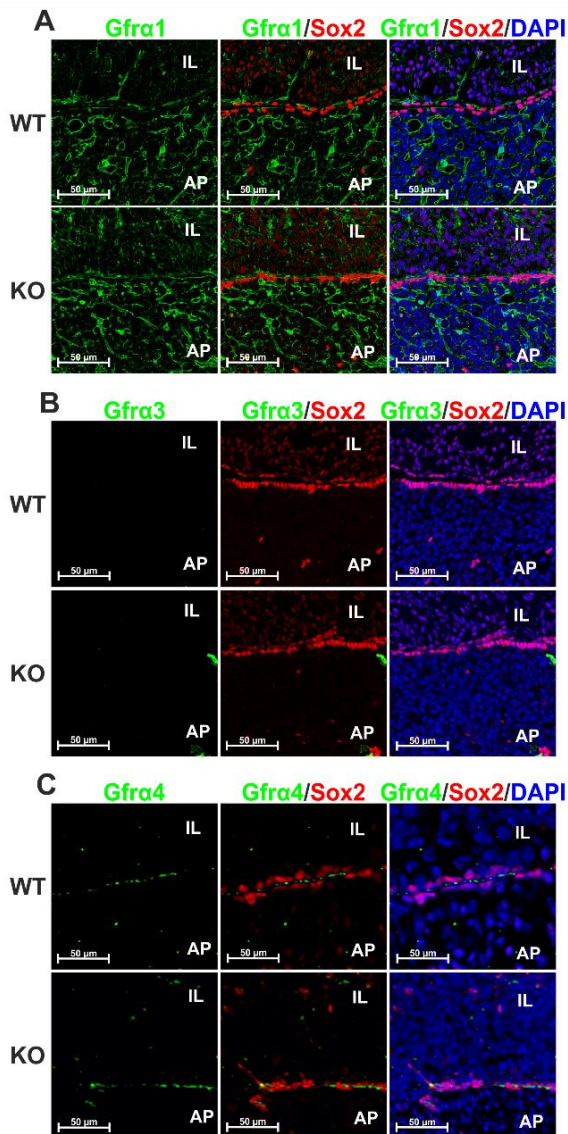


Figura 25. Inmunofluorescencia doble para los co-receptores de la familia Gfra y Sox2 en la hipófisis de ratones WT y KO para Gfra2. A) Tinción para Gfra1 (verde) y Sox2 (rojo). B) Tinción para Gfra3 (verde) y Sox2 (rojo). C) Tinción doble para Gfra4 (verde) y Sox2 (rojo). Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Las fotografías son imágenes representativas de la tinción doble en el nicho obtenidas con un microscopio confocal utilizando un objetivo 63X. Para las fotografías de Gfra4 se utilizó un zoom de 1,5x. n=4. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio).

Respecto a la adenohipófisis, sí que se detectó la expresión de los 3 co-receptores en esta localización dentro del órgano. *Gfra1* se expresa en la membrana plasmática de las células somatotropas (50, 51) de la adenohipófisis, y esta expresión no presenta diferencias entre los ratones WT y los KO (**Figura 26A**). *Gfra3* y *Gfra4* por su parte están expresados en el citoplasma de algunas pocas células dispersas por la adenohipófisis (117). Al igual que ocurre con *Gfra1*, el patrón de aparición de células positivas para estos co-receptores no presenta diferencias entre los ratones con genotipos WT y KO (**Figura 26B y 26C**).

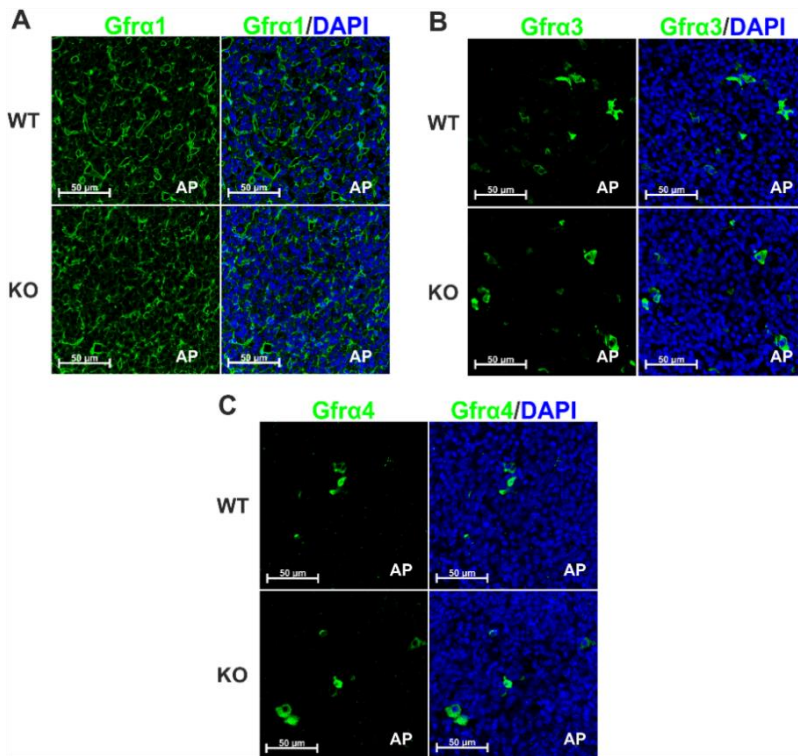


Figura 26. Tinciones simples de los co-receptores de la familia *Gfra* en la adenohipófisis en la hipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2*. *Gfra1* (A), *Gfra3* (B) y *Gfra4* (C) están expresados en la adenohipófisis de los ratones WT y KO. Los núcleos están marcados con DAPI (Azul) Las fotografías son imágenes representativas de microscopia confocal con un objetivo de inmersión 63X. Las tinciones se repitieron un mínimo de 4 veces. (AP: Adenohipófisis).

4.2. GFR α 2 Y LAS CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS

4.2.1. Expresión génica de los marcadores de células madre

La definición de las células madre del nicho hipofisario está delimitada por la co-expresión de diferentes marcadores (5, 116), entre los que se encuentra GFR α 2, cuya expresión está limitada exclusivamente a esta localización (5). Se describen dos poblaciones distintas de células no endocrinas, que expresan marcadores de células madre: las del nicho y folículos que co-expresan los marcadores (en su momento denominadas población GPS, por la co-expresión de Gfr α 2, Prop1 y Sox2) (5), y las dispersas por la adenohipófisis que sólo expresan ya alguno de los marcadores (118, 119).

La hipótesis planteada era que la ausencia de Gfr α 2 en la hipófisis del modelo Gfr α 2-KO podía estar afectando al nicho de células madre, y debido a ello se estudiaron mediante co-localización en inmunofluorescencia los principales marcadores de células madre que acompañan a Gfr α 2 en las células GPS del nicho hipofisario.

En primer lugar, se cuantificó por PCR en hipófisis total la expresión de ARN de estos marcadores de células madre hipofisarias, entre los que se incluyen *Prop1*, *Sox2*, *Sox9*, *Klf4* y *Oct4*.

De los 5 genes medidos que comparten relevancia con *Gfra2* en el nicho, en 3 de ellos se encontraron diferencias significativas, *Sox2*, *Sox9* y *Klf4*, cuya expresión se encuentra aumentada en los animales KO en comparación a los animales WT (**Figura 27**). Por otra parte, *Prop-1* y *Oct4* presentan ligera tendencia hacia el aumento de la expresión en animales KO (**Figura 27**).

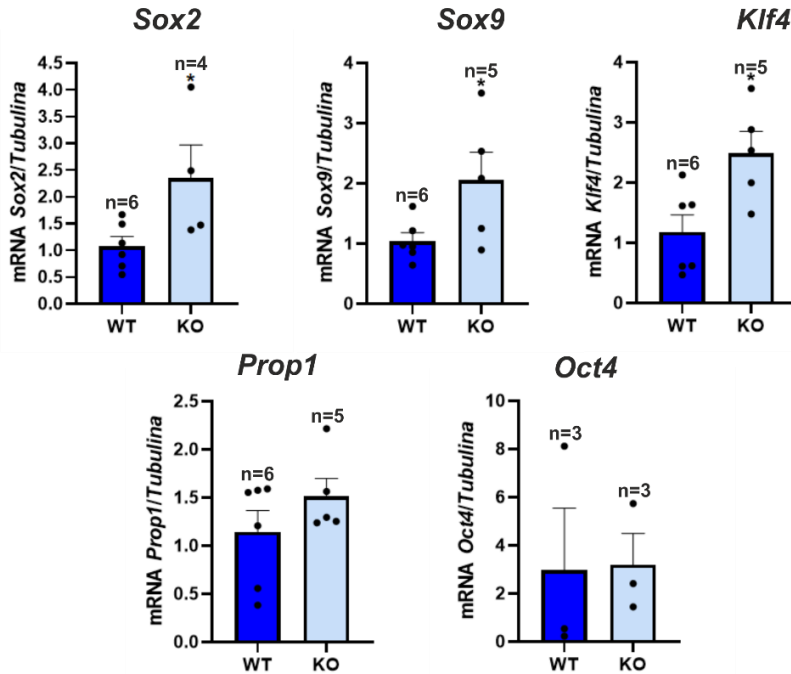


Figura 27. Expresión de ARNm en hipófisis total de los marcadores que definen las células madre del nicho hipofisario en ratones WT y KO de la cepa *Gfra2-KO*. Comparación entre ratones WT y KO de la expresión de ARN de *Sox2*, *Sox9*, *Klf4*, *Oct4* y *Prop-1*. Está representada la media \pm SEM. Los valores de expresión de todos los genes están normalizados respecto a la tubulina. n=5. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. * $p \leq 0,05$.

4.2.2. Expresión de las proteínas que definen las células madre hipofisarias

Posteriormente se estudiaron mediante western blot los niveles de expresión de las proteínas que se traducen a partir de estos genes. El aumento de expresión de los genes *Sox2* y *Klf4* se traduce también en un aumento significativo de la expresión de las proteínas Sox2 y Klf4 en el ratón KO respecto al WT (**Figura 28**). Por otra parte, aunque la expresión de *Sox9* está aumentada en el ratón KO, las diferencias observadas tras la cuantificación de la intensidad de las bandas de Sox9 presentan una tendencia al aumento en los animales KO (**Figura 28**).

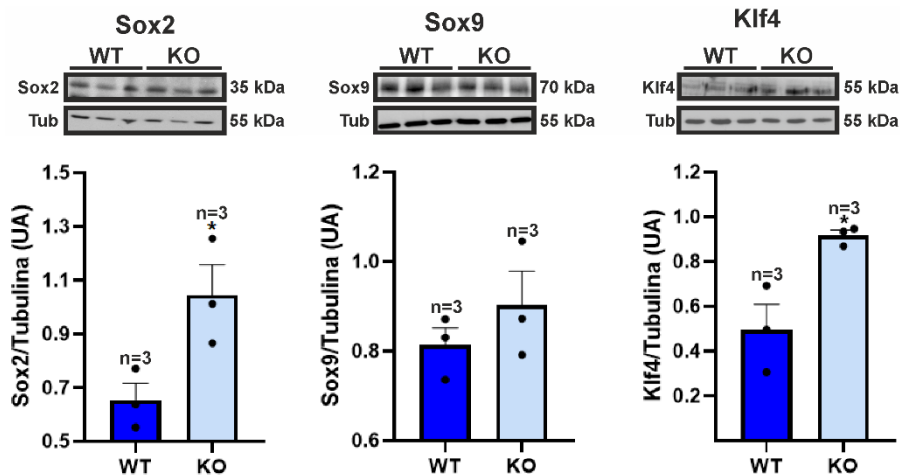


Figura 28. Expresión de proteínas características de células madre en extractos de hipófisis total de ratones WT y KO para *Gfra2*. Se incluyen los marcadores Sox2, Sox9 y Klf4. A) imágenes representativas de las bandas encontradas en la membrana de WB. B) Cuantificación de la intensidad de las bandas (A). La expresión de cada proteína está normalizada respecto a la tubulina. En las gráficas se presenta la media \pm SEM de n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. * $p \leq 0,05$.

4.2.3. Incremento de la población Sox2⁺ en la adenohipófisis de los ratones con genotipo KO

Para resolver en qué se traduce el aumento de la expresión de ARNm/proteína de Sox2, se realizó una inmunofluorescencia doble con citoqueratinas de las familias A y B que marcan el nicho de células madre., e individualizan la población Sox2⁺ del nicho frente a la de precursores de células endocrinas dispersos en la adenohipófisis o progenitoras.

Como se observa en la **figura 29A**, no se aprecian cambios en la disposición del nicho de células madre en el modelo KO. La expresión de Sox2 es clara en todas las células del nicho, y la delimitación a esta localización se corrobora con la co-expresión de este marcador con citoqueratinas. En un conjunto de datos previo, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica (IHC) para estudiar la distribución de Sox2 en la adenohipófisis de ratones del modelo *Gfra2*-KO. Las células Sox2⁺

tienen a acumularse en la hendidura en los animales con genotipo KO, sin embargo, esto no se observa en ratones WT (**Figura 29B**). EN base a estos contajes, puede observarse que el nicho en animales KO cuenta con un mayor número de células Sox2+, aunque se mantiene la doble línea bordeando la zona marginal (**Figura 29C**).

Al igual que ocurre en el nicho de células madre, también se encontró un aumento del número de células Sox2+ de la adenohipófisis, encontrando que esta sección de la glándula de los ratones KO está enriquecida en células Sox2+ (**Figura 30A**). Este aumento de las células Sox2 es homogéneo en toda la adenohipófisis, siendo el número de células Sox2+ presentes en el ratón KO casi el doble que las que pueden encontrarse en los WT (**Figura 30B**). Además, también es posible apreciar que en los ratones KO aparecen agrupaciones de progenitores Sox2+ que constan de varias células, pero estos acúmulos no se pueden encontrar en las tinciones realizadas en las hipófisis de los ratones WT (**Figura 30C**).

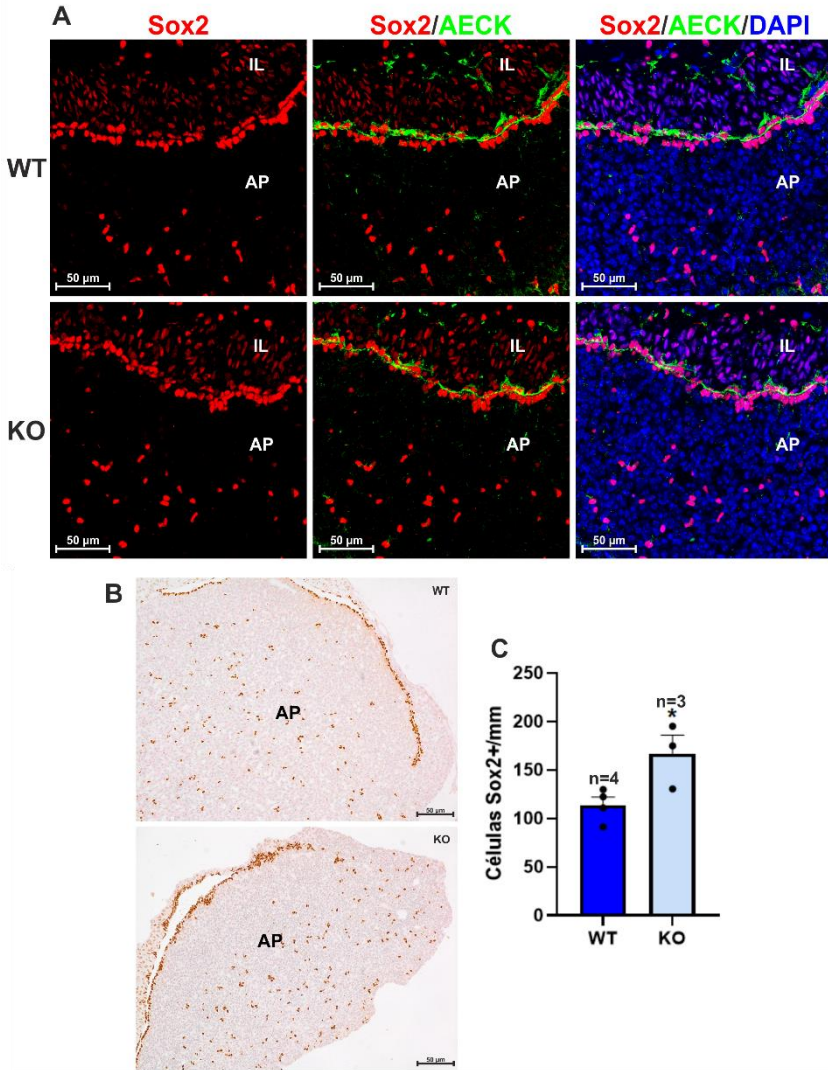


Figura 29. Sox2 en el nicho de células madre de la hipófisis de ratones WT y KO para *Gfrα2*. A) Co-localización de Sox2 (rojo) y citoqueratinas (verde). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Sox2 se localiza en el núcleo de las células madre y las citoqueratinas presentan un marcaje de membrana citoplasmática. Las fotografías presentadas son imágenes de microscopía confocal con un objetivo 63X. B) Tinción de ICH para Sox2. Imágenes de microscopía óptica a 20X. C) Cuantificación de las células madre del nicho a partir de las imágenes de IHC, n=3 del número de células Sox2+ por milímetro de nicho. * $p \leq 0,05$. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio).

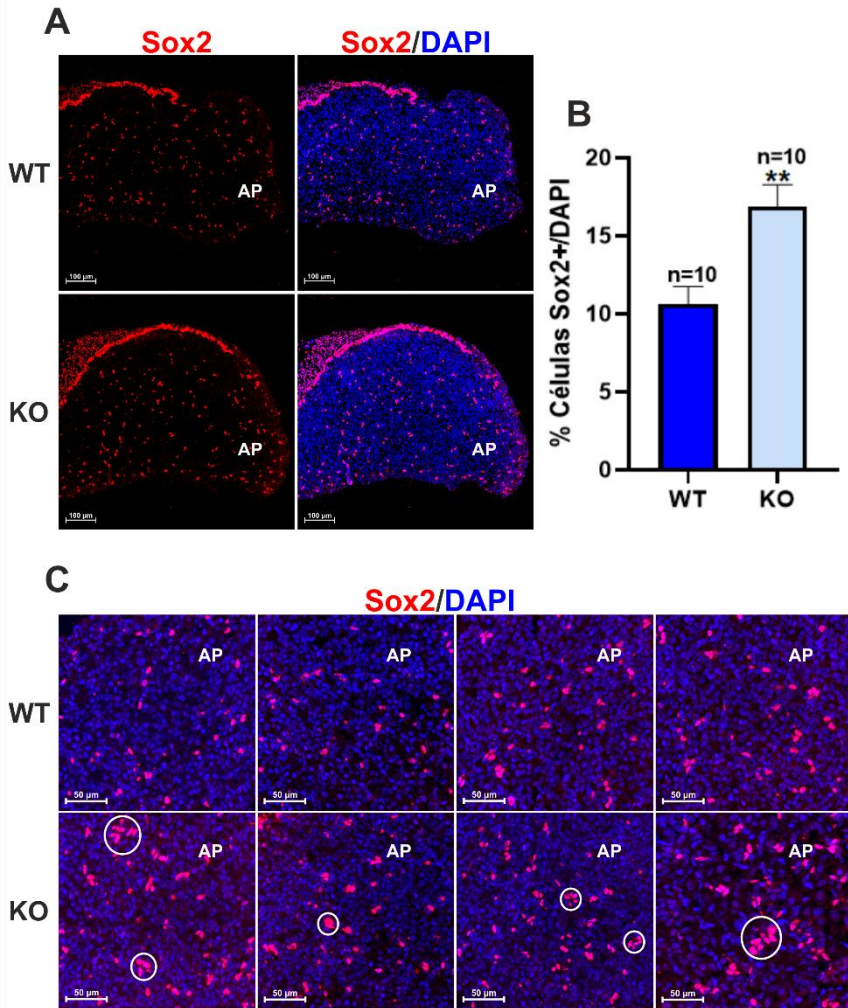


Figura 30. Inmunofluorescencia para la detección de Sox2 en la adenohipófisis de ratones adultos WT y KO para *Gfra2*. Tinción para Sox2 (rojo) y marcaje de los núcleos con DAPI (azul). **A)** Fotografías a bajo aumento de hipófisis de ratón WT y KO en la que se puede observar la distribución de las células Sox2+ en la adenohipófisis. **B)** Cuantificación de las células Sox2+ en la adenohipófisis del modelo *Gfra2*-KO. Cuantificación del de células Sox2+ se obtuvo dividiendo el número de núcleos Sox2+ respecto al total de núcleos. La gráfica representa la media±SEM de n=10. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. **p≤0,01. **C)** Fotografías de microscopía confocal a mayor aumento de campos aleatorios de la adenohipófisis de varios ratones de cada genotipo. Los círculos blancos señalan agrupaciones de células Sox2+. (AP: Adenohipófisis)

4.2.4. La adenohipófisis de los ratones KO para *Gfra2* está enriquecida en células *Klf4*⁺

La aproximación que se siguió para estudiar el aumento de la expresión de *Klf4* fue la misma que se utilizó con *Sox2*.

Primero, se realizó una inmunofluorescencia doble para estudiar la presencia de *Klf4* en el nicho de células madre. *Klf4* presentó una tinción débil para esta proteína en las células madre del nicho, donde co-localiza con citoqueratinas (**Figura 31**). Tal y como puede apreciarse en las fotografías, la tinción para *Klf4* no es continua en todas las células que conforman el nicho hipofisario, pero sigue el mismo patrón en ambos genotipos.

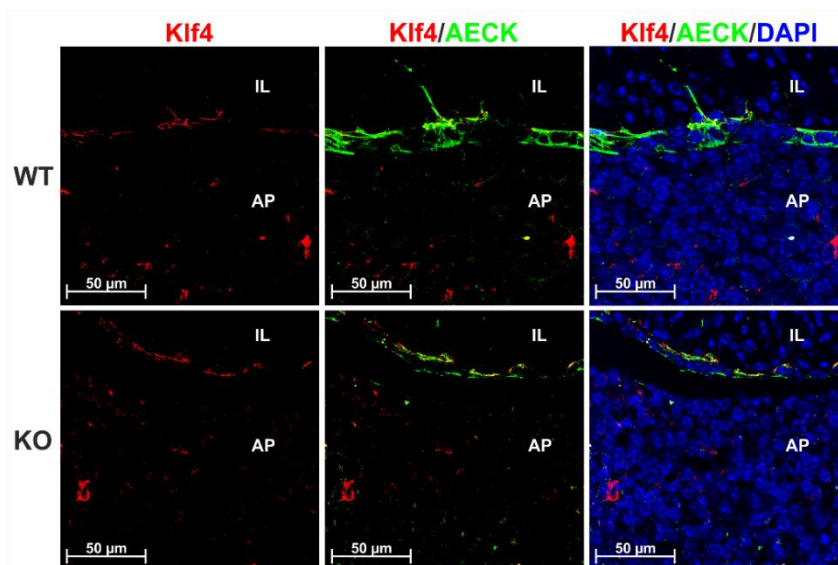


Figura 31. Inmunofluorescencia doble para *Klf4* y citoqueratinas en el nicho de células madre de la hipófisis de ratones adultos WT y KO para *Gfra2*. *Klf4* (rojo) y citoqueratinas (verde) se co-expresan en las células madre del nicho hipofisario. Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Las fotografías presentadas son imágenes de microscopía confocal con un aumento objetivo de 63X y un factor de zoom de 1,5. Las tinciones se repitieron tres veces. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio)

Posteriormente, se estudió la distribución de Klf4 en la adenohipófisis de los animales del modelo de ratón $Gfr\alpha 2$ -KO. En este caso, se volvió a encontrar un aumento de las células positivas para el marcador de células madre estudiado (**Figura 32A**). Se observa un incremento del número de células Klf4+ en la adenohipófisis de los ratones KO, pero en este caso lo que se encuentra no es una distribución homogénea de estas células Klf4+, pero si aumento de estas células hacia los extremos laterales de la adenohipófisis, aunque el mayor incremento en el número de células positivas para este marcador se da desde el nicho de células madre hacia la periferia en el borde inferior del órgano (**Figura 32A**).

Pese a que Klf4 es un factor de transcripción cuya localización predecible dentro de la célula es el núcleo, las células de la adenohipófisis que expresan Klf4 presentan un marcaje totalmente citoplasmático con los núcleos vacíos (**Figura 32A y 32B**).

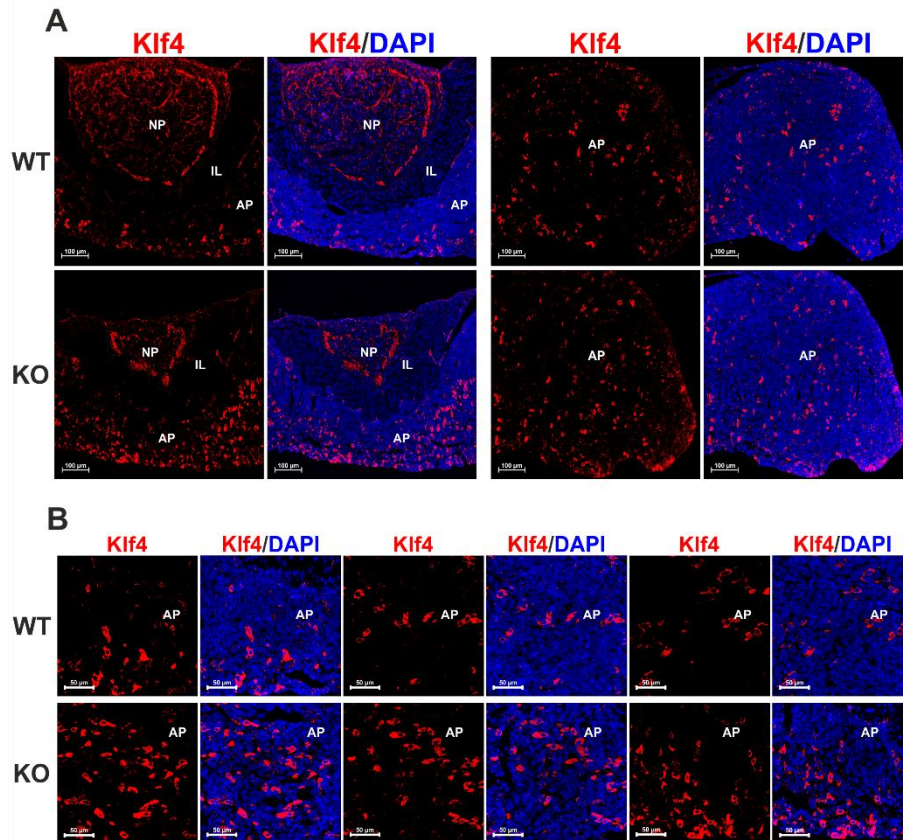


Figura 32. Inmunofluorescencia para la detección de Klf4 en la adenohipófisis de ratones adultos WT y KO para *Gfra2*. Tinción para Klf4 (rojo) y marcaje de los núcleos con DAPI (azul). A) Fotografías a bajo aumento de hipófisis de ratón WT y KO en la que se puede observar la distribución de las células Klf4+ en la adenohipófisis. C) Fotografías de microscopía confocal de diferentes campos de la adenohipófisis de varios ratones de cada genotipo. Las tinciones se repitieron un mínimo de 5 veces para cada uno de los genotipos (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

4.2.5. Proteínas relevantes en las vías de señalización de las células madre adultas

Dos de las vías destacadas en la regulación de la transición de célula madre a progenitora en la hipófisis son la vía de Shh/Patched y la vía de Wnt/ β -catenina (145). En este trabajo no se estudiaron en detalle ambas vías, pero se midió la expresión de Shh y β -catenina.

El ligando soluble Shh tiene que ser procesado antes de ser liberado, y es entonces cuando se une a su receptor Patched, e inicia una cascada de señalización relevante en el desarrollo. Se quiso comprobar si podía haber alguna alteración en el modelo KO para Gfr α 2. No existen diferencias en la expresión de la forma precursora (47kDa) ni de la forma soluble (19kDa) (**Figura 33A**).

En la vía de Wnt, éste es el ligando que se une al receptor Frizzled y activa la cascada de señalización intracelular. La activación de esta ruta lleva a la no fosforilación de la β -catenina, lo que inhibe su degradación y le permite ser translocada al núcleo, donde puede ejercer su función. Lo que se puede observar es que las diferencias de expresión de β -catenina en el modelo Gfr α 2-KO son muy leves y no poseen significancia estadística (**Figura 33B**).

Al no encontrarse diferencias significativas (**Figura 33A y 33B**), se puede afirmar que los niveles generales de expresión de las proteínas en la hipófisis de los ratones KO para Gfr α 2 no están alterados, y en el caso de que existieran defectos en estas rutas de señalización no pueden detectarse mediante esta técnica y deberían utilizarse otras diferentes.

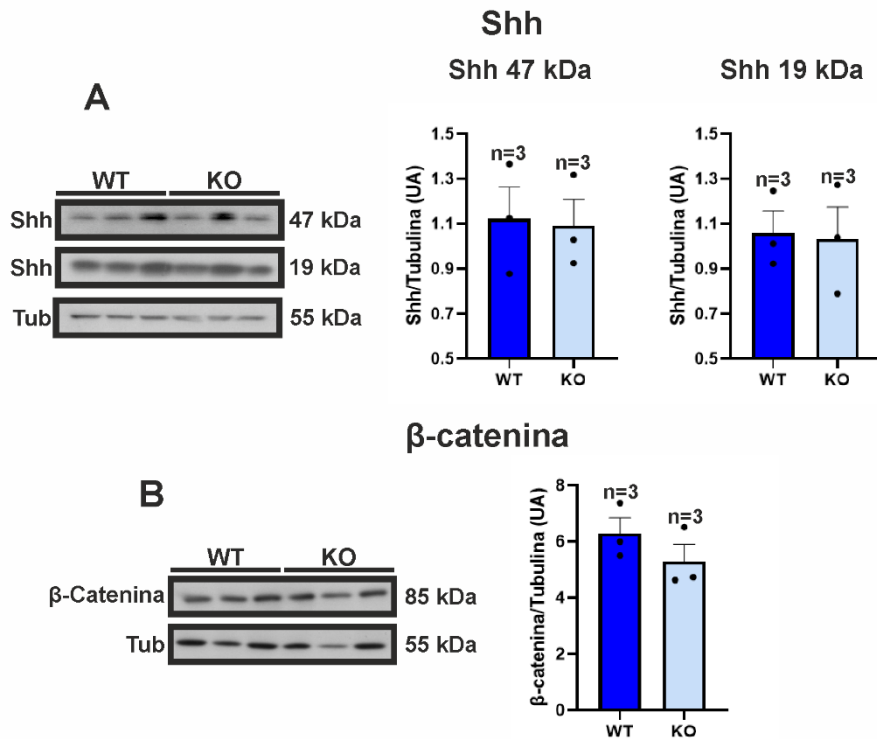


Figura 33. Expresión en extractos de hipófisis total de dos de las proteínas esenciales implicadas en vías de señalización relevantes para el reclutamiento de progenitores en la hipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2*. **A)** Imagen representativa de las bandas correspondientes a los pesos moleculares de la proteína precursora (47kDa) y la proteína procesada (19kDa) de Shh y cuantificación de la intensidad de estas bandas normalizada por tubulina. **B)** Imagen representativa de la banda correspondiente a la β-catenina y la cuantificación de la intensidad de las bandas respecto al control de carga, tubulina. Las gráficas de cuantificación para Shh y β-catenina representan la media±SEM. n=3 para ambas proteínas. El análisis estadístico aplicado es la t de Student.

4.3. LA VÍA DE RET EN LAS CÉLULAS SOMATOTROPAS DEL RATÓN KO PARA *Gfra2*

La vía de RET posee gran relevancia en el mantenimiento del número de células de la hipófisis debido a la naturaleza dual que tiene el receptor RET (52, 55). En presencia de ligando promueve la activación de vías que implican la proliferación, diferenciación o supervivencia (55). Y por otro lado, en ausencia de ligando promueve la apoptosis (52). En el modelo *Gfra2*-KO, no hay diferencias en la expresión de *Gfra1* ni GDNF, que son, respectivamente, el co-receptor y el ligando mayoritario de RET en la adenohipófisis. Aún así, se decidió estudiar si la ausencia de *Gfra2* podría estar modulando la vía de RET, debido a que los ratones KO tienen una hipófisis de menor tamaño y por consiguiente con una menor cantidad de células, hecho que podría estar debido a una alteración de la proporción entre la proliferación y la muerte celular por apoptosis de las células de la adenohipófisis del ratón KO.

4.3.1. Supervivencia mediada por la activación de la vía de RET

Para determinar como la ausencia de *Gfra2* podría estar influenciando la señalización celular mediada por RET, se estudió la expresión de este receptor y de una de las proteínas que se implicadas en la cascada de señalización cuando RET se une a su co-receptor y su ligando, que serían *Gfra1* y GDNF respectivamente, pero estas dos últimas no se incluyen en este apartado ya que han sido previamente presentados en la sección 4.1.

La expresión de RET no varía entre el ratón WT y el ratón KO (**Figura 34A**), puesto que el nivel de proteína de este receptor no presenta diferencias significativas entre ninguno de los dos genotipos.

Pese a no encontrar diferencias en la expresión del receptor, se decidió igualmente estudiar la expresión y activación de AKT, implicada en la cascada de señalización.

Inicialmente no se encontraron diferencias ni en la expresión de AKT ni en la fosforilación de esta proteína, por lo que el ratio pAKT/AKT tampoco presentó ningún tipo de cambio en el animal KO respecto al WT (**Figura 32B**).

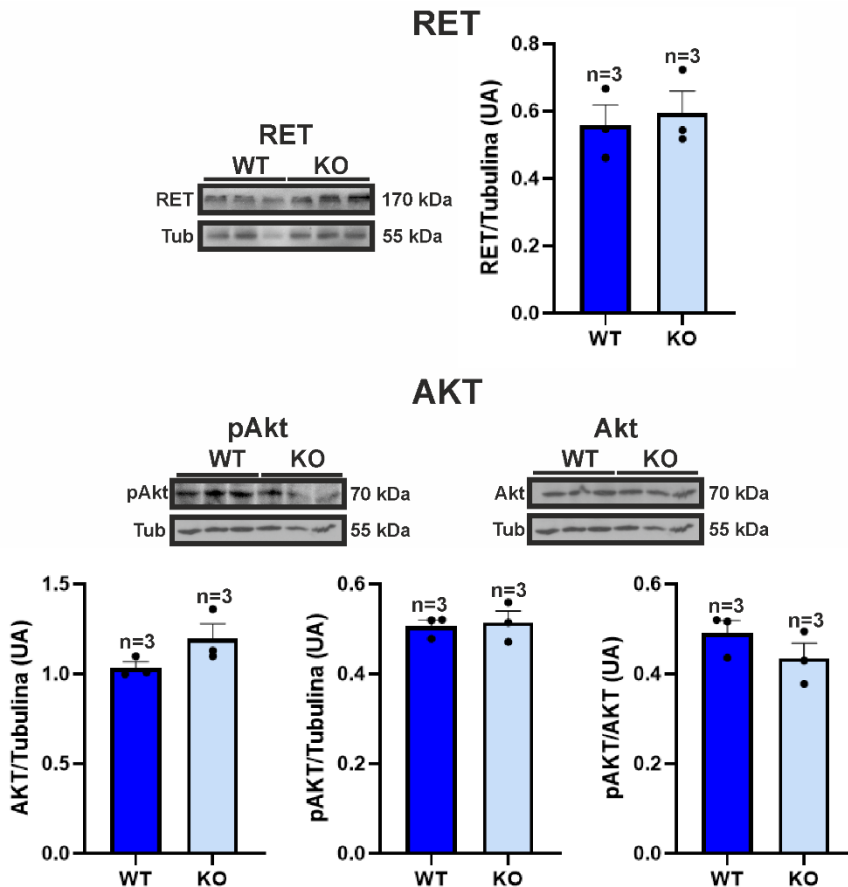


Figura 34. Expresión de proteínas implicadas en la vía de supervivencia mediada por RET en la hipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2*. A) Bandas representativas de la expresión del receptor RET y cuantificación de la intensidad de las mismas normalizada por el control de carga, tubulina. B) Bandas representativas de la expresión de AKT y de AKT fosforilado, y gráficas que representan la cuantificación de intensidad de estas bandas normalizada por tubulina. Se incluye también una gráfica que representa la relación de proteína AKT activa (pAKT/AKT). Las gráficas representan la media \pm SEM de n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student.

Respecto a la distribución del receptor RET dentro de la hipófisis, no hay diferencias entre los genotipos comparados (**Figura 35**). Ambas proteínas colocalizan en el nicho de células madre, como puede verse en la línea teñida de forma más intensa entre la adenohipófisis y el lóbulo intermedio (**Figura 35A**). La colocalización entre el receptor y el co-receptor puede observarse en las fotografías en las que está presentada la tinción doble RET/Gfr α 1, ya que las células del nicho que los expresan se ven en amarillo (suma de la señal de fluorescencia verde y la señal de fluorescencia roja) (**Figura 35A**). El área de la adenohipófisis cercana al nicho que presenta una tinción débil o nula para RET es la zona de la glándula en la que hay menor cantidad de células somatotropas, en las cuales la vía de RET/Gfr α 1 es más relevante (**Figura 35B**). Este área tiene una mayor superficie en la fotografía del ratón WT ya que la hipófisis del mismo es de mayor tamaño que la del ratón KO. En las zonas de la hipófisis en las que hay mayor abundancia de células somatotropas, tampoco es posible apreciar diferencias en la expresión y distribución de RET o Gfr α 1 (**Figura 35B**).

Con todo esto se puede afirmar que la activación de RET en presencia de GDNF y Gfr α 1, y su implicación en la supervivencia celular, no está afectada en el ratón KO para Gfr α 2.

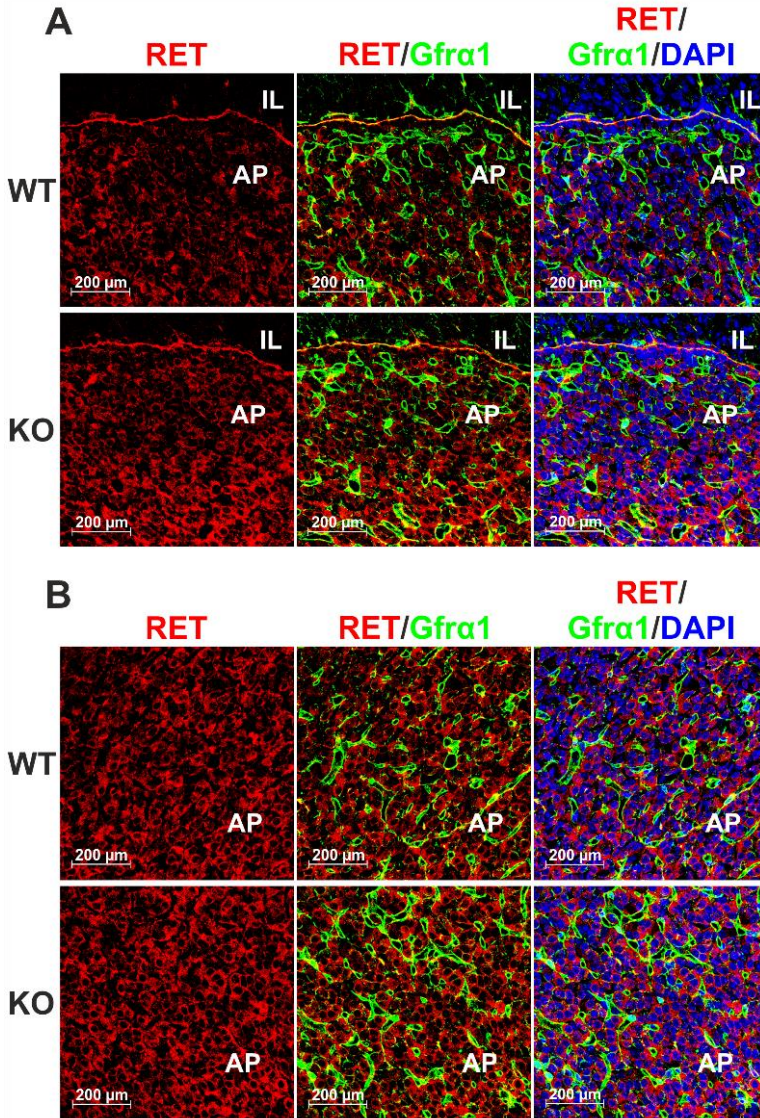


Figura 35. Inmunofluorescencia doble para RET y su co-receptor GFR α 1 en la hipófisis de ratones WT y KO para Gfra2. Tinción para RET (rojo) y Gfra1 (verde) y su co-expresión en el nicho de células madre (A) y en la adenohipófisis (B). Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Imágenes representativas de la tinción doble en el nicho obtenidas con un microscopio confocal y un objetivo de inmersión 63X. n=3. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio).

4.3.2. Apoptosis mediada por el receptor RET en las células somatotropas de la adenohipófisis del ratón KO para *Gfra2*

El siguiente paso relacionado con la vía de RET fue estudiar si existían diferencias entre los ratones WT y KO en relación a la apoptosis mediada por RET en ausencia de su ligando. Para ello se evaluó la expresión de la vía apoptótica de RET desde la activación de las caspasas hasta los factores de transcripción nucleares que se activan en respuesta a la proteólisis de RET (52, 55, 199).

De todas las proteínas de la vía apoptótica de RET, se encontraron diferencias en ninguna de ellas (**Figura 36**). Sin embargo, sí que se produce un cambio significativo en la activación de PKC δ (pKC δ /PKC δ) en los animales KO (**Figura 36**).

También se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión y distribución de la Caspasa-3 activa en las hipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2* (**Figura 37A**). Se calculó el número de células positivas para este marcador de apoptosis y se normalizó por el área de la sección (**Figura 37B**). Se puede observar el aumento significativo en el número de células apoptóticas en la hipófisis del ratón KO respecto al WT. En la fila inferior de fotografías de la **figura 37A** se puede observar con una mayor magnificación la morfología propia de las células apoptóticas.

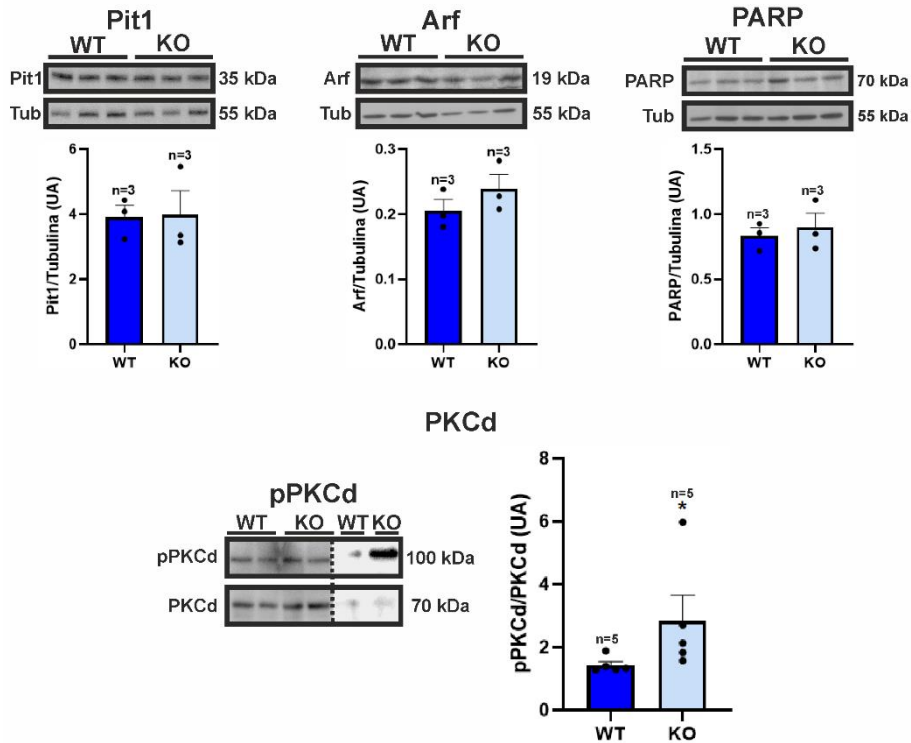


Figura 36. Expresión de proteínas implicadas en la vía apoptótica de RET en ausencia de ligando en la hipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2*. Bandas representativas de los factores de transcripción Pit1 y Arf, Caspasa-3, Caspasa-3 activa, PARP procesado, PKCd y fosfoPKCd. También se incluyen gráficas de barras en las que se recoge la cuantificación de la intensidad de las bandas de todas las proteínas nombradas anteriormente normalizadas por la intensidad de la banda de tubulina. Se incluye también una gráfica que representa la relación de pPKCd/PCd. Las gráficas representan la media±SEM de n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p≤0,05.

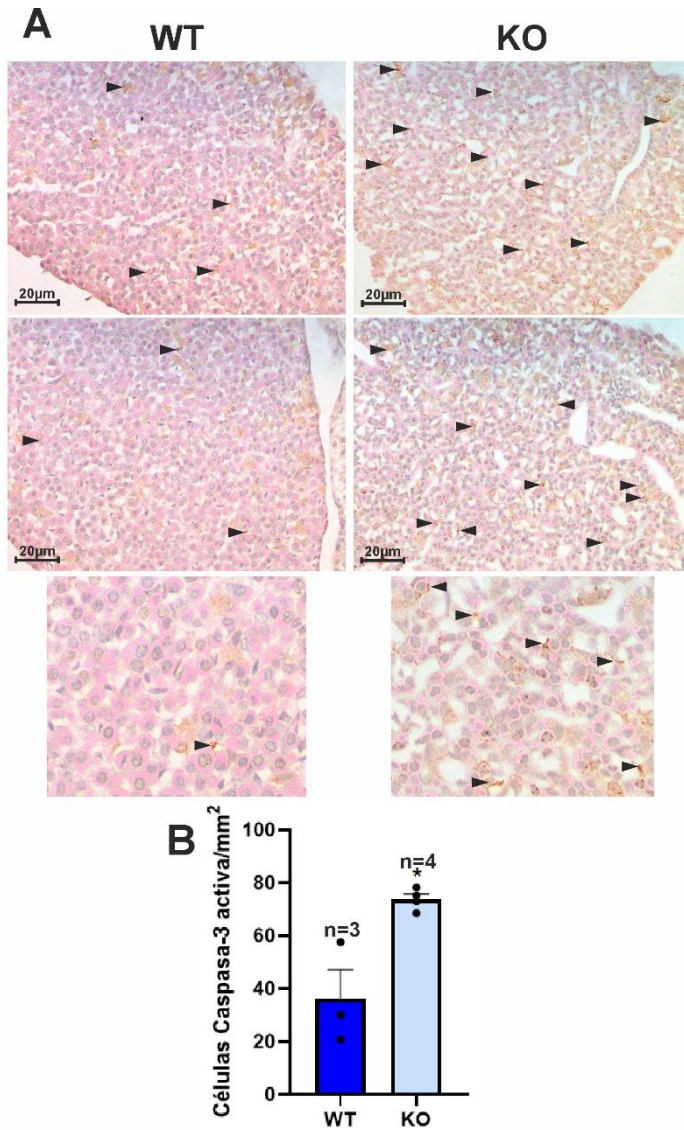


Figura 37. Tinción de IHC para caspasa-3 activa en la adenohipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2*. **A)** Imágenes representativas de la expresión de Caspasa-3 activa en los lóbulos de la adenohipófisis de ratones adultos de la cepa *Gfra2*-KO. Las tinciones se repitieron en un mínimo de 3 animales de cada genotipo. Las flechas indican células apoptóticas con tinción para Caspasa-3 activa. **B)** Cuantificación del número de células positivas para la tinción de Caspasa-3 activa por unidad de área (mm²), n=3-4. *p<0,05. (AP: Adenohipófisis).

4.4. LA HIPÓFISIS DEL RATÓN *Gfra2*-KO DURANTE EL DESARROLLO

Además de estudiar la hipófisis en ratones adultos de la cepa KO para *Gfra2*, también se comprobó que es lo que está ocurriendo en estos animales durante su desarrollo postnatal. Tras el nacimiento, el nicho de células madre se vuelve muy activo, y especialmente se ha visto que se reclutan muchas células que se diferenciarán a células somatotropas (5, 213, 214), y de esta manera satisfacer la demanda de GH. Para ello se eligió el día 10 postnatal, que corresponde con la activación del eje hipotálamo-hipofisario que involucra a GH e IGF-1 (5, 215) y se da un importante aumento en el crecimiento longitudinal de los animales.

En este modelo de desarrollo se realizaron tinciones para Sox2 y GH, y de esta forma comprobar si la distribución de las células madre y somatotropas es como la de los ratones adultos.

La distribución de las células somatotropas (GH+) en ratones en desarrollo es la misma que en ratones adultos (**Figura 23**), y no se aprecian diferencias en la distribución de células de este tipo a lo largo de toda la adenohipófisis (**Figuras 38A y 38B**). En estas tinciones para la hormona de crecimiento se presentan fotografías de animales de ambos sexos ya que la diferencia en expresión de GH no es tan diferencial como en adultos.

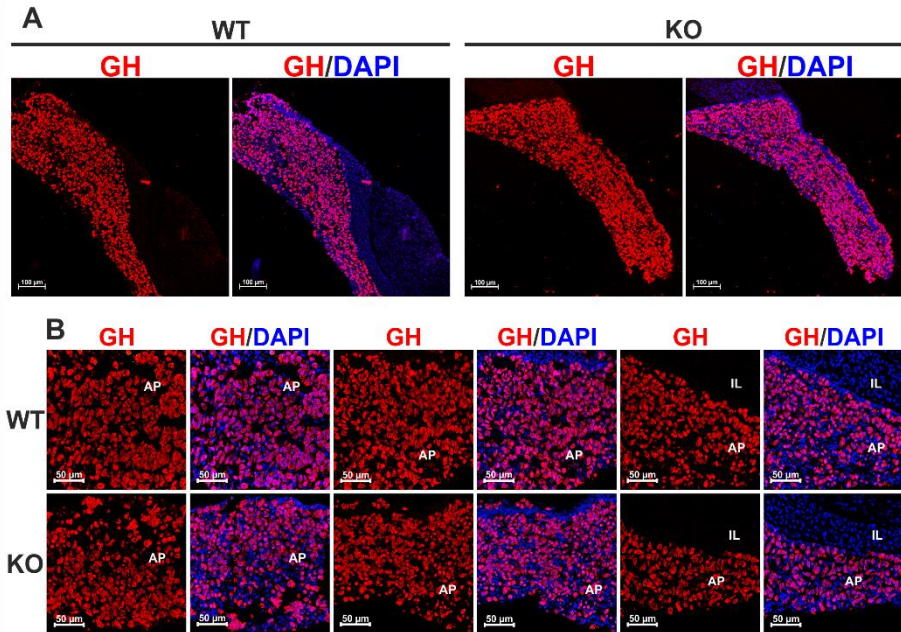


Figura 38. Inmunofluorescencia para la detección de GH en la adenohipófisis de ratones en desarrollo WT y KO para *Gfra2*. Tinción para GH (rojo) y marcaje de los núcleos con DAPI (azul). **A)** Fotografías a bajo aumento puede observar la distribución de las células somatotropas en un campo más amplio. **B)** Fotografías de microscopía confocal a mayor aumento de campos aleatorios de la adenohipófisis de varios ratones de cada genotipo. Las tinciones se repitieron un mínimo de 3 veces. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio)

El nicho de células madre se mantiene en ambos genotipos (**Figura 39A**), como puede observarse en la última línea de células Sox2⁺ bordeando la zona marginal. Además, el porcentaje de progenitores Sox2⁺ dispersos en la adenohipófisis ya se encuentra significativamente aumentado en los ratones con genotipo KO a día postnatal P10 (**Figura 39B**), siendo este del 20% en ratones WT y del 30% en KO (**Figura 39B**). Una vez los ratones llegan a la edad adulta, este porcentaje parece reducirse proporcionalmente a la mitad en ambos genotipos, tal y como se observa en la **figura 30B**. Asimismo, también aparecen más agrupaciones de progenitores Sox2⁺ en la adenohipófisis de los ratones KO (**Figura 39C**).

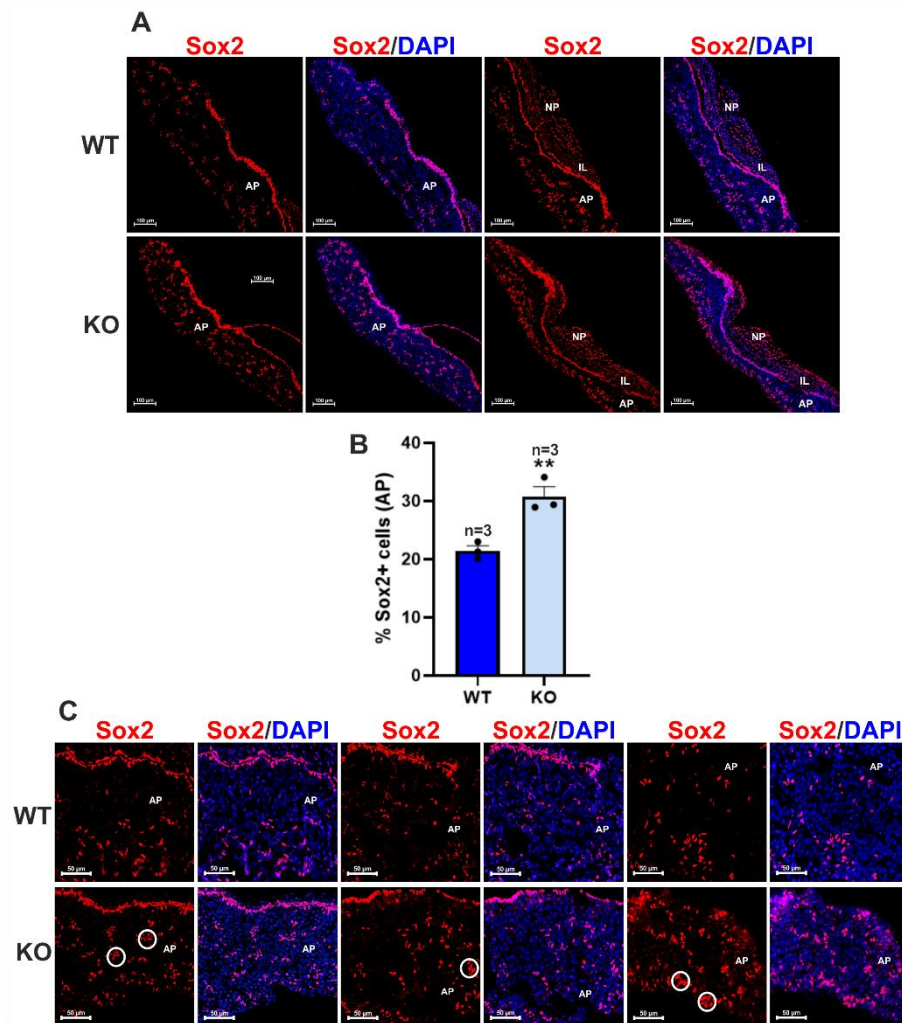


Figura 39. Inmunofluorescencia para la detección de Sox2 en la adenohipófisis de ratones en desarrollo WT y KO para *Gfra2*. Tinción para Sox2 (rojo) y marcaje de los núcleos con DAPI (azul). **A**) Fotografías a bajo aumento de hipófisis de ratón WT y KO. **B**) Cuantificación de las células Sox2+ respecto al número total de células de la adenohipófisis. La gráfica representa la media±SEM de n=3 animales por grupo. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. **p≤0,01. **C**) Fotografías de microscopía confocal a mayor aumento de campos aleatorios de la adenohipófisis de varios ratones de cada genotipo. Los círculos blancos señalan cúmulos de células Sox2+ (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis)

5. PROLIFERACIÓN CELULAR

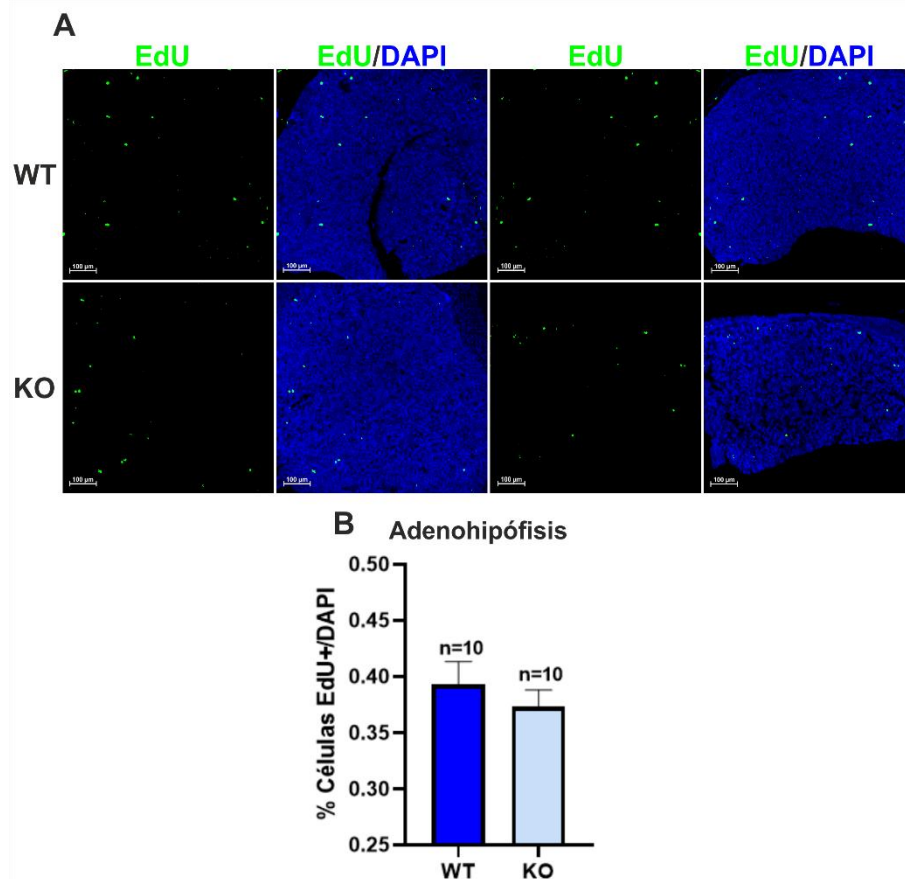
La proliferación celular es otro de los parámetros que se estudió en el modelo *Gfra2*-KO. La hipófisis es un órgano que tiene muy poco recambio una vez se llega a la edad adulta y las necesidades hormonales del organismo se estabilizan. Sin embargo, algunos procesos fisiológicos pueden influenciar la demanda hormonal, lo que activa la maquinaria del ciclo celular para producir nuevas células que produzcan la hormona requerida en ese momento concreto. Además, tras el nacimiento la hipófisis tiene varios momentos temporales donde activa su proliferación, dependiendo del eje que necesite activación funcional. El crecimiento longitudinal, o la pubertad, son dos de esas etapas clave en la proliferación hipofisaria. Por todo ello, se estudió la proliferación de las células del nicho y de la adenohipófisis de los animales del modelo KO para *Gfra2*.

La proliferación celular se midió mediante el contaje del número de células que habían incorporado EdU, un análogo de la uridina, que funciona parecido a la BrdU. Las células que entran en fase S del ciclo celular captan este compuesto y lo intercalan en el ADN, donde queda fijado y posteriormente será detectado mediante reacciones de oxidación y reducción denominadas química Click. La EdU se administra a los animales 24 horas antes de la perfusión, por lo que mediante esta técnica es posible conocer la tasa de replicación celular en 24 horas.

5.1. PROLIFERACIÓN EN LA HIPÓFISIS DE RATONES ADULTOS

La tasa de proliferación en las células de la adenohipófisis adulta es muy reducida. Y no se encontraron diferencias importantes entre los dos genotipos (**Figura 40A**). Sí que es posible apreciar una pequeña disminución en el número de células EdU+ en los ratones KO

(Figura 40B), pero esta diferencia puede ser debida al menor tamaño que presenta la hipófisis de los ratones que tienen este genotipo, y debido a ello a que presentan un menor número total de células. Figura



40. Proliferación celular en la adenohipófisis de ratones adultos de la cepa *Gfra2*-KO. A) Detección de células EdU+ en hipófisis de ratones WT y KO adultos. El marcaje y revelado del EdU (verde) puede observarse en los núcleos de las células que han entrado en división. Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Imágenes representativas de dos campos de la adenohipófisis de cada uno de los genotipos. Las fotografías se obtuvieron en un microscopio confocal con un objetivo 20X. B) Gráfica que compara el conteo del número de células EdU+ por sección en cada uno de los dos genotipos. La gráfica representa la media ± SEM de n=10 animales por grupo. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. (AP: Adenohipófisis).

Para estudiar la proliferación de las células del nicho, se realizó una tinción que permitiera delimitar el nicho de células madre y la detección de EdU. El marcador de células madre elegido fue Sox2, ya que es un factor de transcripción y su localización nuclear podía facilitar la co-localización con la EdU. Esta detección se repitió en 10 animales adultos de cada genotipo y en la mayoría de ellos no se encontró ninguna célula EdU+/Sox2+ en la línea del nicho (**Figura 41A y 41B**). Una de las características que definen a las células madre pluripotenciales es el mantenimiento de la quiescencia, y las células del nicho hipofisario cumplen con esta característica. El máximo de células EdU+ en el nicho fue de 2 en una sección completa de hipófisis. Y la media para ambos genotipos está en torno a 0,8 células por sección, esto es, la tasa de replicación de estas células es tan baja que la media de células proliferando encontradas en cada sección ni siquiera alcanza la unidad (**Figura 41A y 41B**).

Esta detección doble de EdU y Sox2 también permitió estudiar la proliferación de las células progenitoras dispersas en la adenohipófisis, ya que están definidas por la expresión de Sox2 y/o Sox9. En el modelo de ratón Gfra2-KO, las células Sox2+ en el genotipo WT suponen un 10% del total de células de la hipófisis, y este porcentaje supera el 15% en los animales con genotipo KO (**Figura 30B**). Sin embargo, no se encontraron células EdU+/Sox2+ en la adenohipófisis de ratones adultos, ni en el genotipo WT ni en el KO (**Figura 41C**). Por lo que el mantenimiento de la quiescencia de estas células también se da una vez han sido reclutadas desde el nicho y la ausencia de Gfra2 no está relacionada con la replicación celular de la hipófisis en la edad adulta.

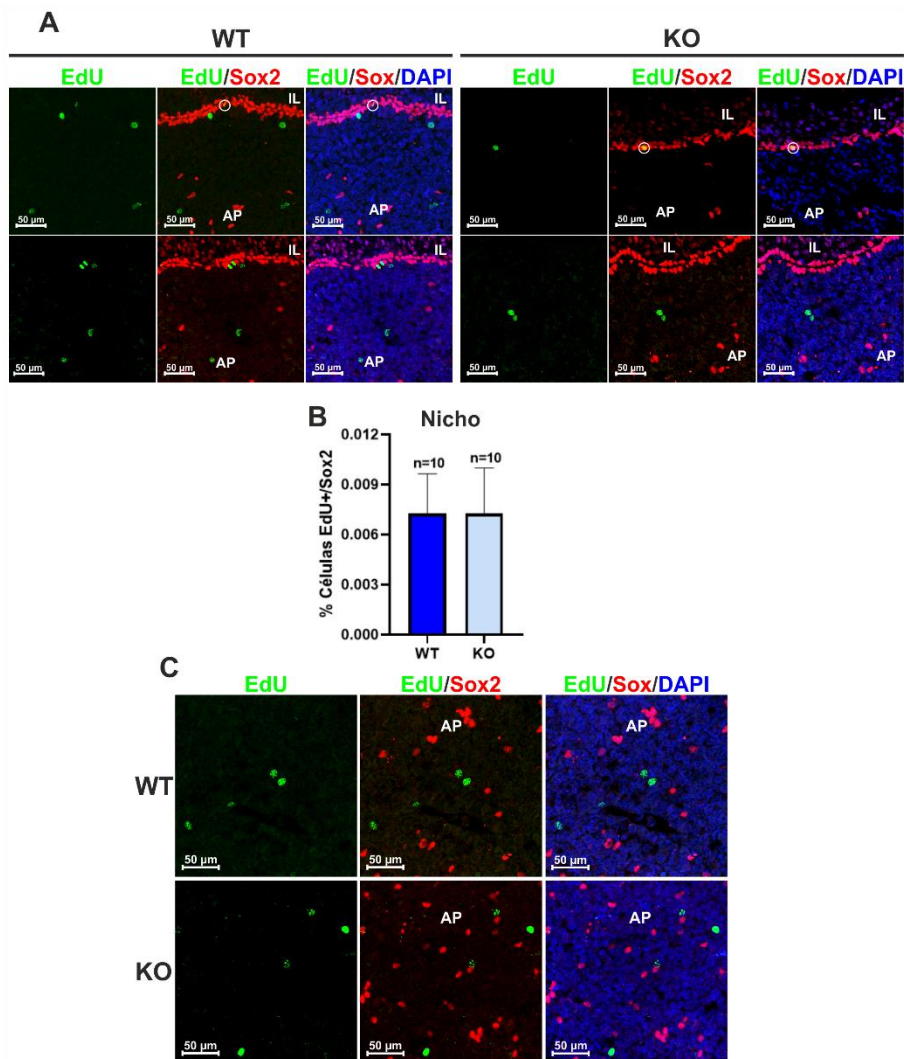


Figura 41. Proliferación de las células madre del nicho y de la adenohipófisis de ratones WT y KO para *Gfra2*. A) Imágenes representativas de la proliferación (EdU, verde) en el nicho de células madre, delimitado por las células Sox2+ (rojo) de la línea. Las células EdU+/Sox2+ se ven de color amarillo y están rodeadas por un círculo blanco. B) Representación gráfica de la media±SEM de células EdU+ en el nicho de células madre de una sección de hipófisis completa. n=10. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. C) Detección de EdU en secciones de adenohipófisis teñidas para Sox2. Las fotografías de A) y C) se recogieron en un microscopio confocal utilizando un objetivo de 63X.

5.2. PROLIFERACIÓN EN LA HIPÓFISIS DE RATONES WT Y KO PARA *Gfra2* DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

La proliferación celular en ratones adultos es muy reducida y no presentó diferencias entre ninguno de los dos genotipos en el modelo *Gfra2*-KO. Por ello, se decidió estudiar también la proliferación en un modelo en el que la demanda hormonal fuera más elevada y la hipófisis tuviera que estar hiperactivada para satisfacer esa demanda. Al tratarse de un modelo de enanismo se eligió el día postnatal 10 que corresponde con el comienzo de la activación del eje hipotálamo hipofisario que involucra a GH e IGF-1 (5, 215) y comienza el crecimiento longitudinal de los ratones.

El procedimiento seguido fue el mismo que con los animales adultos. Un día antes del sacrificio y perfusión de los ratones, se les administro la EdU. Y, por lo tanto, los resultados reflejan la tasa de replicación celular en 24 horas. El número de células EdU+ en la adenohipófisis de los ratones prepuberales está disparado respecto al de los ratones adultos, llegando a encontrarse que en torno a un 8% del total de las células de la adenohipófisis de los ratones WT habían captado y retenido EdU. Sorprendentemente, este porcentaje aumentó hasta aproximadamente el doble en los animales con genotipo KO (**Figura 42A y 42B**).

El caso del nicho de células madre en los ratones en desarrollo es todavía más llamativo. Mientras que en adultos no fue posible siquiera encontrar una única célula en todas las secciones (**Figura 41A y 41B**), el porcentaje de células del nicho (células EdU+/Sox2+ en la última línea bordeando la zona marginal) fue de en torno al 8% en los animales WT, porcentaje que ascendía al 11% en los hermanos de camada con genotipo KO (**Figura 43A y 43B**). Esta subida representa diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de las células del nicho de los ratones con genotipo KO (**Figura 43B**).

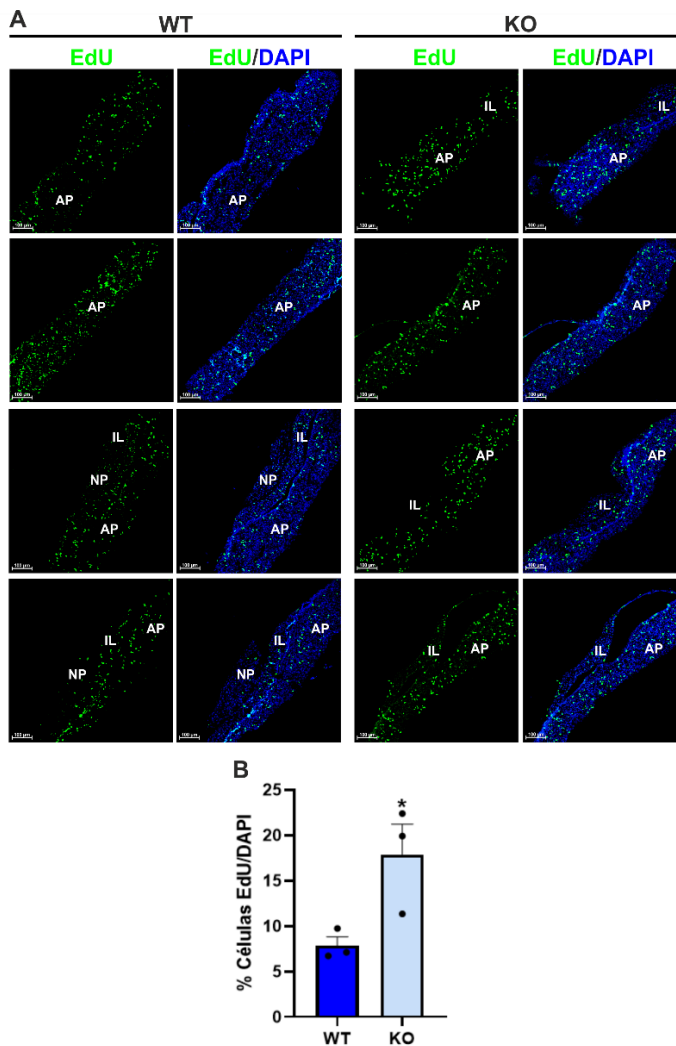


Figura 42. Proliferación celular en la adenohipófisis de ratones en desarrollo de la cepa *Gfra2*-KO. A) Detección de células EdU+ en hipófisis de ratones WT y KO adultos. El marcaje y revelado del EdU (verde) puede observarse en los núcleos de las células que han entrado en división. Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Imágenes representativas de cuatro campos de la adenohipófisis de cada uno de los genotipos. Las fotografías se obtuvieron en un microscopio confocal con un objetivo 20X. **B)** Gráfica que compara el porcentaje del número de células EdU+ por sección. La gráfica representa la media±SEM de n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p<0,05. (AP: Adenohipófisis, IL; Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

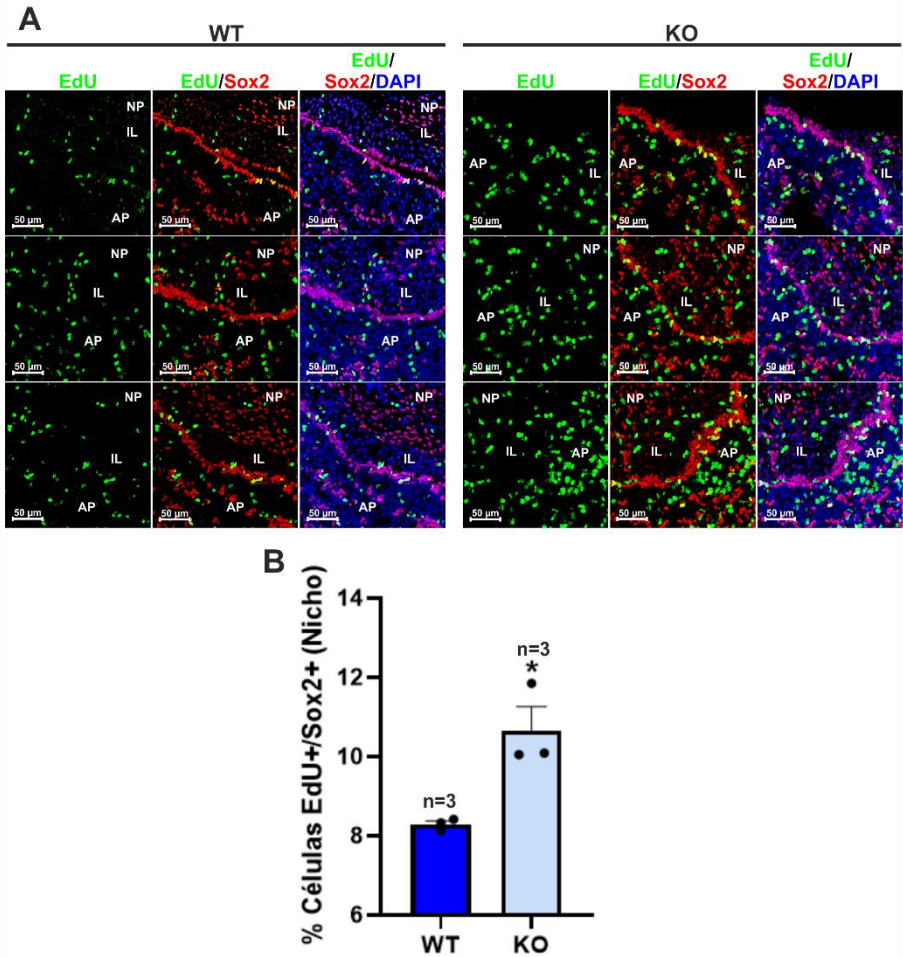


Figura 43. Proliferación de las células madre del nicho en ratones en desarrollo WT y KO para *Gfra2*. **A)** Imágenes representativas de la proliferación (EdU, verde) en el nicho de células madre, delimitado por las células Sox2+ (rojo) de la línea. Las células EdU+/Sox2+ se observan de color amarillo. Las fotografías se recogieron en un microscopio confocal utilizando un objetivo de 63X. **B)** Representación gráfica de la media±SEM de n=3 del porcentaje de células EdU+ respecto a células Sox2+ en el nicho de células madre de una sección de hipófisis completa de un ratón de 10 días. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p<0,05. (AP: Adenohipófisis, IL, Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

Al igual que en adultos, también se estudió la proliferación de las células progenitoras dispersas en la adenohipófisis. Respecto al porcentaje de células EdU+/Sox2+ en relación al número total de células de la adenohipófisis, se puede observar que es relativamente bajo (**Figura 44A**). Este porcentaje en los ratones WT es de en torno al 1%, sin embargo, prácticamente se duplica en los hermanos de camada KO, llegando al 2% (**Figura 44B**). En base a estos datos es posible afirmar que el número de progenitores que entran en ciclo celular es más elevado en los ratones KO cuando se compara con los WT.

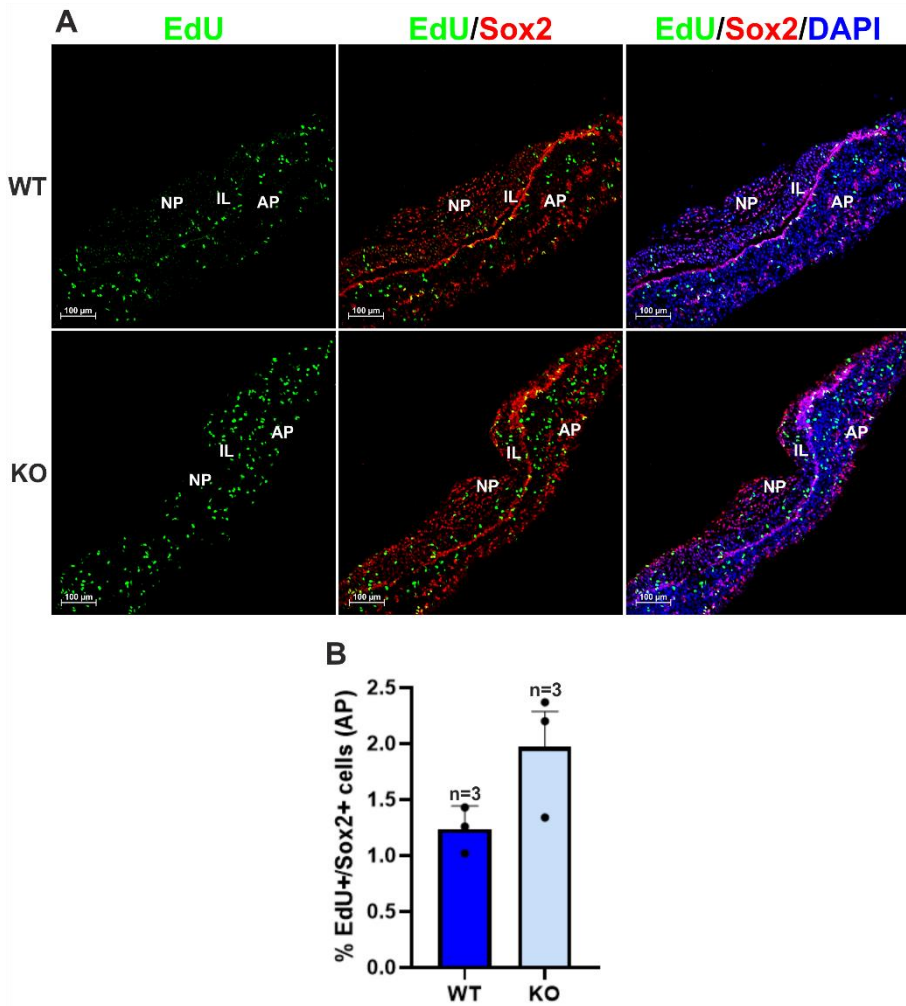


Figura 44. Proliferación de las células madre de la adenohipófisis en ratones en desarrollo WT y KO para *Gfra2*. **A)** Imágenes representativas de la proliferación (EdU, verde). Sox2 (rojo) marca las células progenitoras dispersas en la adenohipófisis. Las células Sox2⁺ proliferantes están marcadas en color amarillo. Las fotografías se recogieron en un microscopio confocal utilizando un objetivo de 20X para ofrecer un campo más amplio. **B)** Representación gráfica de la media±SEM del porcentaje de células EdU⁺/Sox2⁺ respecto al número total de células (DAPI) en la adenohipófisis de un ratón de 10 días. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p≤0,05. (AP: Adenohipófisis, IL, Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

6. ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA EN LA HIPÓFISIS DE LOS RATONES KO PARA *Gfra2*

Las diferencias en la tasa de replicación en ambos genotipos son más que evidentes en los ratones en desarrollo, pero esta diferencia es prácticamente nula en animales adultos. La combinación de estos datos junto con la falta de diferencias en la tasa de activación de la Caspasa-3 llevó a pensar que es posible que la incrementada tasa de replicación de las células del nicho y de la adenohipófisis en los animales KO durante su desarrollo, produjese que sufriesen de senescencia replicativa durante el desarrollo postnatal y que por lo tanto de adultos presentasen una hipófisis envejecida y con un menor número de células totales.

El proceso de envejecimiento está definido por multitud de factores o características, de las cuales algunas fueron estudiadas en el modelo de ratón *Gfra2*-KO, como son la propia senescencia celular y el acortamiento de la longitud de los telómeros.

6.1. SENESCENCIA CELULAR EN LA HIPÓFISIS DEL RATÓN KO PARA *Gfra2*

La senescencia celular se entiende por el proceso mediante el cual las células dejan de dividirse pero no sufren procesos de muerte celular (216). Para confirmarlo, se estudió la proteína p21 (*Cdkn1a*), una quinasa dependiente de ciclinas que regula la fase G1 del ciclo celular, y que es uno de los marcadores por excelencia del envejecimiento celular (217-221).

La expresión de la proteína p21 está significativamente aumentada en ratones KO adultos cuando se compara con sus hermanos de camada WT (**Figura 45**).

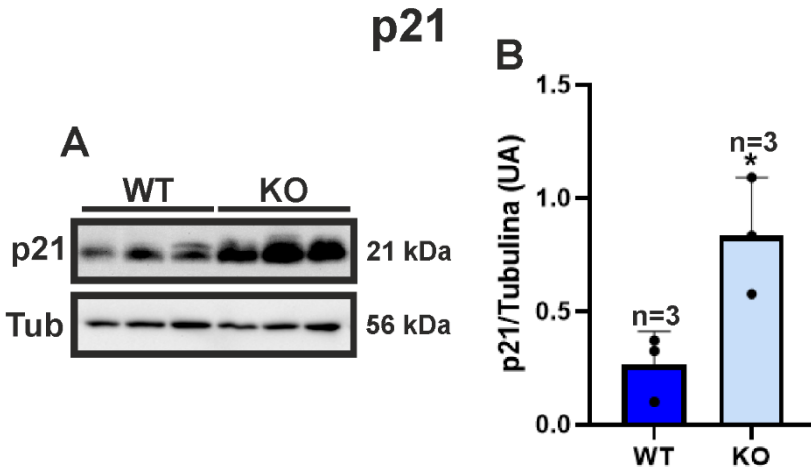


Figura 45. Expresión de la proteína p21 en la hipófisis de ratones WT y KO de la cepa KO para *Gfra2*. A) Bandas representativas de la detección de p21 mediante la técnica de western blot. B) Representación gráfica de la cuantificación de la intensidad de las bandas (A), normalizado por la intensidad de tubulina. Las gráficas representan la media \pm SEM de n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. *p \leq 0,05.

Para el estudio de la senescencia, se llevaron a cabo inmunofluorescencias triples en las que se tiñó para el propio marcador de senescencia (p21), un marcador de células madre o progenitoras (Sox2) y finalmente un marcador de células diferenciadas, que en este caso fue GH, ya que está presente en aproximadamente entre un 35 y un 50% de las células de la hipófisis, y que, además, de todas las hormonas producidas en este órgano es la más relacionada con el tamaño del cuerpo. El número de células p21+ en la hipófisis de los animales KO es mucho más elevado que en sus congéneres WT, a pesar de la hipófisis más pequeña (**Figura 46A y 46B**). La co-expresión de p21 y Sox2 (amarillo) es mayor en los animales con genotipo KO (**Figura 46A y 46C**), determinando que hay un mayor porcentaje de células progenitoras dentro de la adenohipófisis se encuentran en estado senescente debido al mayor número de repeticiones llevadas a cabo durante la etapa de desarrollo. Las células madre dispersas por la adenohipófisis de los

ratones KO no se han agotado, pero si que están menos activas que en los ratones WT.

Por otra parte, hay un mayor número de células p21+/GH+ (núcleo teñido en verde y citoplasma teñido en azul), indicando que son las células endocrinas diferenciadas, procedentes de reclutamientos anteriores en tiempo, son las que se encuentran en un estado de senescencia. Los núcleos teñidos en verde que no coinciden con células Sox2+ o GH+ podrían corresponder con uno de los otros 4 tipos de células productoras de hormonas que hay presentes en la adenohipófisis (**Figura 46A**).

También se estudió la presencia de p21 en las células madre del nicho hipofisario. Al igual que ocurre en la adenohipófisis (**Figura 46A y 46B**), existe un mayor porcentaje de células p21+ en el nicho de células madre de las hipófisis de los ratones con genotipo KO (**Figura 47A y 47B**). Las células GPS que co-expresan p21 y Sox2 se ven en amarillo como resultado de la suma de los colores verde (p21) y rojo (Sox2). El número de células inactivas en el nicho de los ratones KO adultos es de aproximadamente el doble que en los ratones WT adultos, 30% respecto a 16,6% (**Figura 47B**).

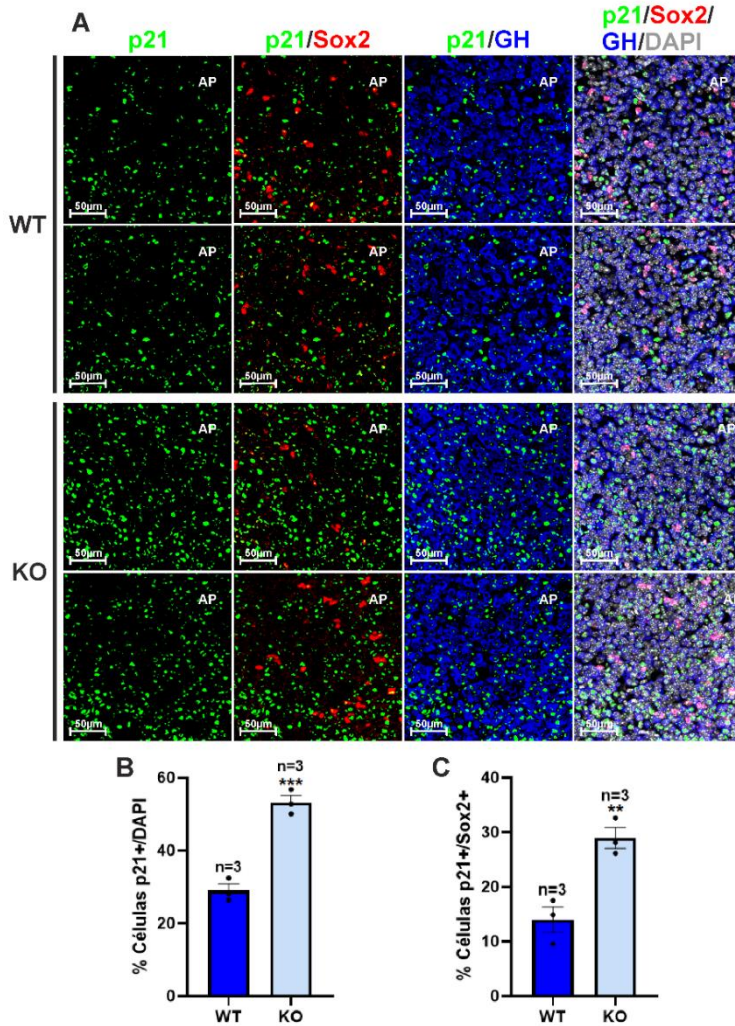


Figura 46. Expresión y distribución de p21 en la hipófisis de ratones adultos con genotipo WT y KO para *Gfra2*. **A)** Tinción de inmunofluorescencia para p21 (verde), Sox2 (rojo), GH (azul). Los núcleos están marcados con DAPI (gris). Las fotografías son imágenes representativas de n=3 de la tinción triple obtenidas con un microscopio confocal utilizando un objetivo de inmersión 63X. **B)** Representación gráfica de la media±SEM del porcentaje de células p21+/DAPI en la adenohipófisis de ratones adultos de la cepa KO para *Gfra2*, n=3. **C)** Representación gráfica de la media±SEM del porcentaje de células p21+/Sox2+ en la adenohipófisis de ratones adultos de la cepa KO para *Gfra2*, n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. **p≤0,01; ***p≤0,001. (AP: Adenohipófisis).

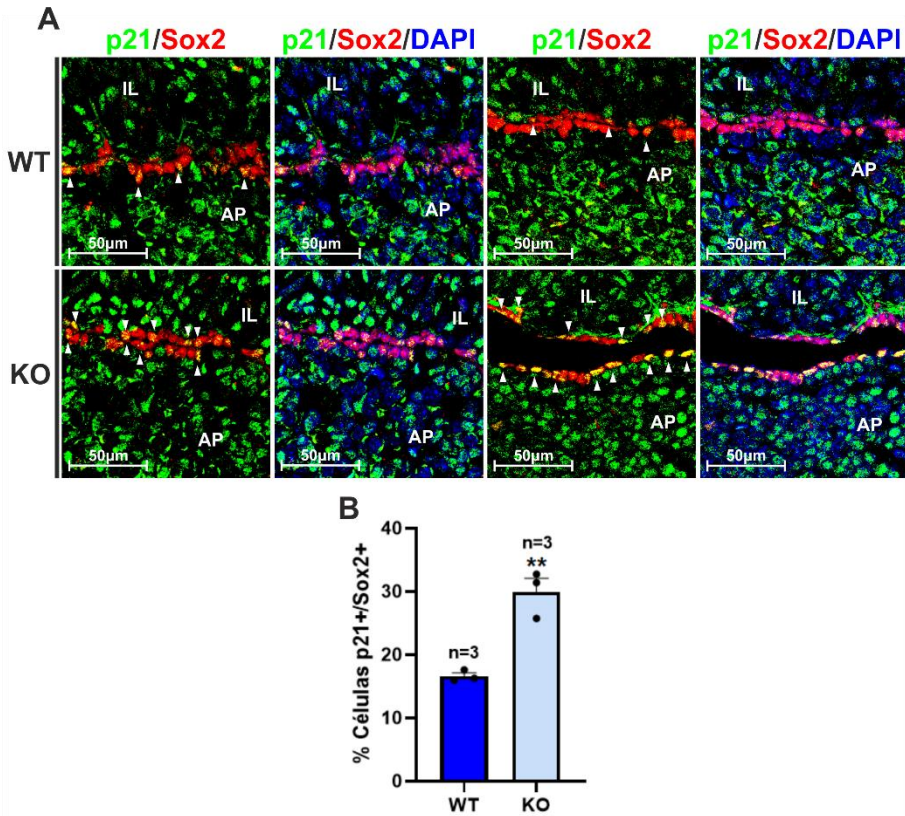


Figura 47. Expresión y distribución de p21 en el nicho de células madre de ratones adultos con genotipo WT y KO para *Gfra2*. **A)** Tinción de inmunofluorescencia para p21 (verde) y Sox2 (rojo). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Las fotografías son imágenes representativas de n=3 de la tinción triple obtenidas con un microscopio confocal utilizando un objetivo de inmersión 63X y zoom 1.8. Las flechas indican las células donde existe co-localización de p21 y Sox2 (amarillo) **B)** Representación gráfica de la media±SEM del porcentaje de células p21+/Sox2+ en el nicho de células madre de ratones adultos de la cepa KO para *Gfra2*, n=3. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. **p≤0,01. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio)

6.2. ACORTAMIENTO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Otra de las características que definen la senescencia es un acortamiento de la longitud de los telómeros, la cual está asociada con el número de procesos replicativos que las células van completando (5). Para el estudio de la longitud de los telómeros, se realizó una hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa (qFISH) en secciones de parafina (5, 202). En esta técnica se utiliza una sonda fluorescente que reconoce las secuencias de los telómeros ricas en repeticiones de citosinas.

La longitud de los telómeros se cuantificó de manera indirecta en base a la intensidad de fluorescencia de las sondas hibridadas. Unos telómeros más largos van a tener regiones más largas ricas en repeticiones de citosinas, permitiendo hibridar más sondas, y dando lugar a una mayor intensidad de fluorescencia. La cuantificación de la señal fluorescente se realizó mediante el programa de inteligencia artificial *TruAI* (Olympus LS), que permitió la detección automática de los núcleos y la cuantificación de la señal fluorescente relativa a cada uno de ellos.

La intensidad de fluorescencia de los ratones KO es significativamente menor que en los hermanos de camada WT. Y esta diferencia es más pronunciada en machos que en hembras (**Figura 48**). Esta disminución de la señal en la fluorescencia de los animales KO se traduce en una longitud media reducida de los telómeros.

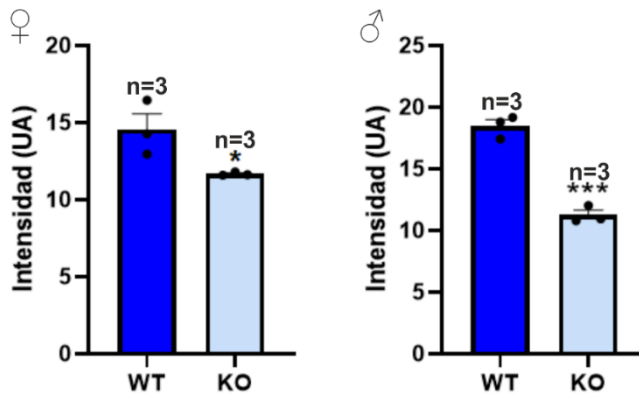


Figura 48. Media de la intensidad de fluorescencia como medida de la longitud de los telómeros en ratones WT y KO de la cepa *Gfra2-KO*. Representación gráfica de las medias de intensidad de fluorescencia en la adenohipófisis en machos y hembras tras la hibridación con la sonda rfluorescente. Las gráficas representan la media±SEM de n=3. La media de cada uno de los animales se calculó en base a la media de intensidad de todas las células presentes en dos campos aleatorios de cada adenohipófisis. El análisis estadístico utilizado fue la t de Student. *p≤0,05; ***p≤0,001.

Además de calcular la intensidad media de todos los núcleos presentes en las fotografías de las secciones, se realizó un mapa cuantitativo con la distribución espacial de las células según la longitud de los telómeros: *Telomapping* (202). En esta técnica, cada uno de los núcleos se encuentra coloreado en base a su intensidad de fluorescencia según una escala de cuatro colores generada de forma arbitraria. Esta escala está basada en los histogramas y la distribución de la intensidad de fluorescencia que se obtuvieron tras calcular la intensidad de todos los núcleos individuales de todas las fotografías. Los cuatro colores utilizados son azul, verde, amarillo y rojo, que representan los cuatro grupos, de menor a mayor intensidad respectivamente.

Los porcentajes mayoritarios tanto en hembras como en machos WT corresponden a los colores verde y amarillo, habiendo muy pocas células azules, y un porcentaje de células rojas que es más alto en machos (**Figura 49A**). En los animales KO, el porcentaje mayoritario corresponde con células verdes, siendo posible encontrar una cantidad importante de células azules (telómeros más desgastados) y una presencia testimonial de células amarillas y rojas (**Figura 49A y 49B**). Además, las células del nicho hipofisario (indicadas con puntas de flecha negras en las imágenes correspondientes) presentan el patrón de colores que también puede observarse en la adenohipófisis de esos genotipos (**Figura 49A y 49B**). Por lo tanto, mediante esta técnica de mapeado de los telómeros, o *telomapping*, es posible cuantificar y representar la intensidad de la señal fluorescente en cada una de las células de forma individual y de esta manera, complementar los resultados obtenidos previamente al calcular las intensidades medias. Los datos aportados mediante esta técnica permitieron demostrar que existe una disminución generalizada en la longitud de los telómeros de las células de la adenohipófisis de ratones KO adultos jóvenes (día postnatal 90-120) respecto a los WT. Estas diferencias son especialmente llamativas en las células madre del nicho hipofisario, es decir, aquellas que deberían sostener la regeneración de células endocrinas durante el resto de la vida del ratón.

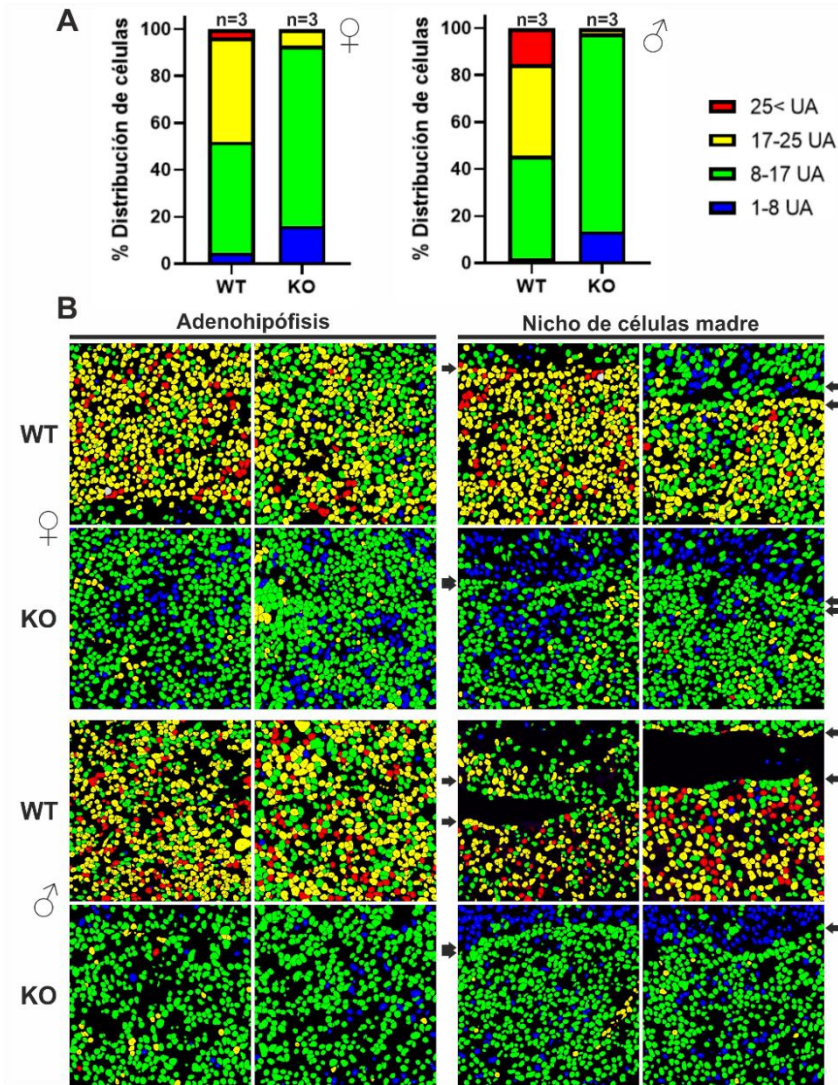


Figura 49. Mapeado de la longitud de los telómeros en secciones de hipófisis de ratones hembra y macho WT y KO para *Gfra2*. **A)** Gráfica semáforo que recoge los porcentajes de células individuales en cada uno de los grupos delimitados en base a la intensidad de fluorescencia individual de las células. **B)** Imágenes representativas de varios campos generadas tras la cuantificación de la intensidad media de cada núcleo individual y tras aplicar el patrón de color recogido en (A). n=3 animales por grupo. Las flechas negras delimitan la línea de células que conforma el nicho de células madre, tanto en la adenohipófisis como en el lóbulo intermedio.

7. CULTIVOS DE CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS

Estudiar la población aislada de células madre hipofisarias puede ser importante para comprobar *in vitro* los resultados que se han obtenidos en las hipófisis enteras. Purificar la población GPS de una dispersión celular de la hipófisis gracias al marcador de superficie Gfra2, y crecerlas en medio de esferoides, es un método bien establecido laboratorio (5). Sin embargo, la selección en el modelo Gfra2-KO no es compatible con este protocolo por carecer del marcador de superficie utilizado para la selección. Una metodología alternativa establecida por otros grupos, es crecer la dispersión celular hipofisaria en un medio muy concreto que permite el establecimiento de colonias. Dispersando las células de la adenohipófisis y cultivándolas en un medio en el que se añade FGF y toxina de cólera (estimula directamente la señalización mediada por AMPc), las células madre y progenitoras pueden adherirse al material de cultivo y, tras dos o tres días de adaptación, crecer formando colonias (119, 200, 222).

Tras la dispersión celular, las células se sembraron y se dejaron crecer hasta el séptimo día. A partir del segundo día ya fue posible empezar a observar células adheridas a la placa de cultivo y a partir del cuarto día las colonias empezaron a desarrollarse. El séptimo día de cultivo las células fueron fijadas y se tiñeron con hematoxilina-eosina para detectar los núcleos, se contó el número de colonias por pocillo y se fotografiaron las colonias para estudiar su morfología. En los contajes de todos los cultivos, se consideraron colonias aquellas agrupaciones de células que estaban creciendo adheridas y que se habían generado a partir de una única célula.

En la **figura 50A** se puede observar el aspecto de las placas de cultivo tras dejar las colonias formarse y crecer durante una semana. Cada uno de los puntos violeta que se pueden observar corresponde a una colonia. El número de colonias encontradas en los cultivos obtenidos a partir de células de ratones WT es superior al de las colonias que se han generado en los cultivos de ratones KO. La diferencia fue de aproximadamente 140 colonias en los cultivos WT frente a 100 en los KO (**Figura 50B**). Tras siete días de cultivo es posible encontrar colonias de diferente morfología y tamaño, se realizó una clasificación entre colonias de pequeño tamaño (<20 células) o de gran tamaño (>20 células). Encontrando que no hay diferencias en el número de colonias formadas por más de 20 células entre ambos genotipos (**Figura 50C**).

El tamaño y morfología de las colonias es muy heterogéneo, siendo posible encontrar colonias que tienen desde 3 hasta cientos de células (**Figura 51**). La primera fila de fotografías de cada uno de los genotipos en la **figura 51** son imágenes a bajo aumento donde se puede observar que la densidad de colonias que se han formado es mayor en el cultivo generado a partir de los animales WT. Las filas central e inferior de la **figura 51** son fotografías a mayor aumento que demuestran que es posible encontrar colonias de todos los tamaños dentro de ambos cultivos, por lo que el genotipo parece no estar influyendo en el tamaño y la forma de las colonias, solo en el número.

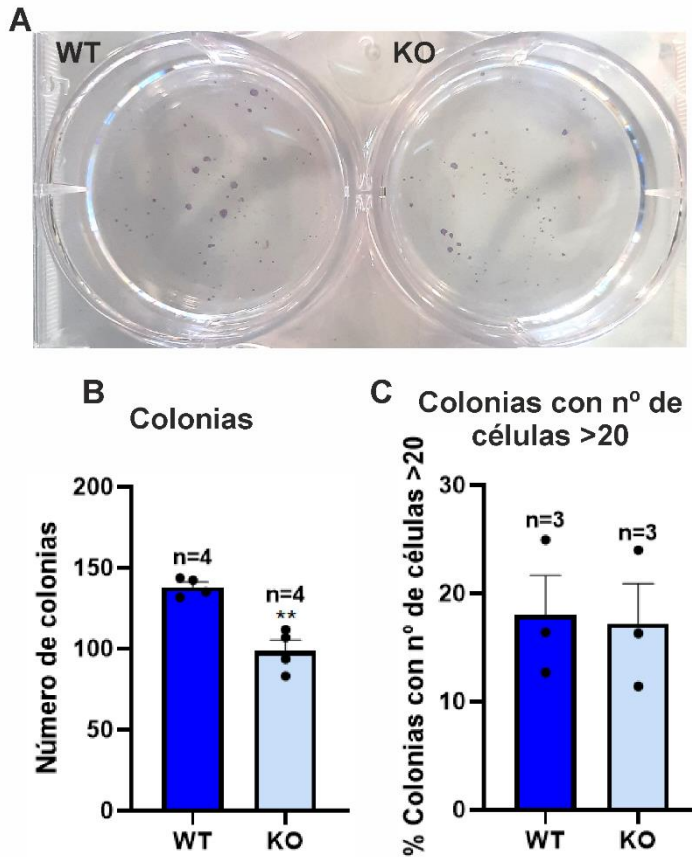


Figura 50. Formación de colonias de células madre y progenitoras en cultivos primarios a partir de células de hipófisis de ratones WT y KO para Gfra2. **A)** Gráfica que recoge el número de colonias en los cultivos a partir de animales WT y KO. Está representada la media±SEM de n=4 con tres replicados técnicos por condición. El análisis estadístico aplicado es la t de Student. **p≤0,01. **B)** Fotografía representativa de una placa de cultivo de 6 pocillos en la que se puede observar el número de colonias obtenidas tras 7 días de cultivo.

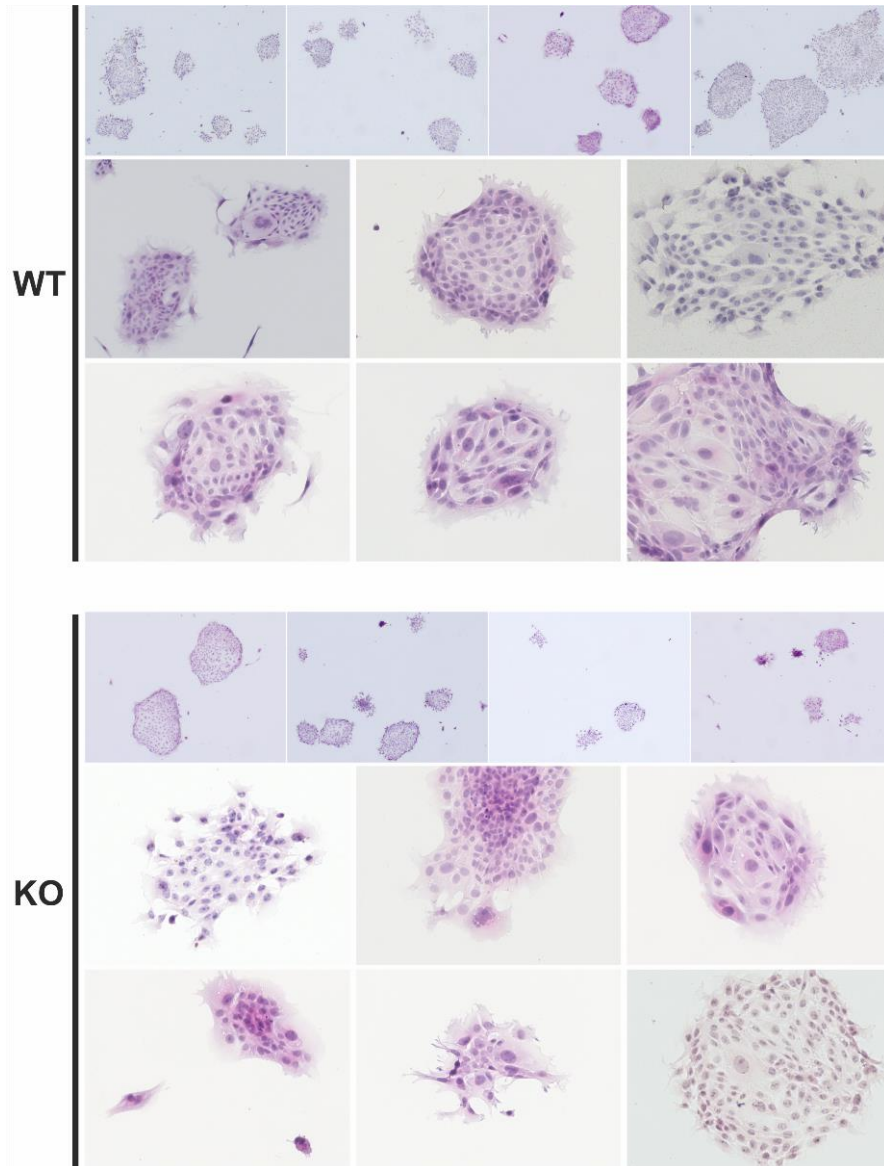


Figura 51. Colonias formadas a partir de células madre y progenitoras de la hipófisis de ratones WT y KO de la cepa *Gfra2*-KO. Imágenes representativas de colonias crecidas en cultivos obtenidos a partir de adenohipófisis de ratones WT y KO. Fotografías realizadas mediante microscopía óptica a diferentes aumentos (4X, 10X y 20X) de colonias teñidas con hematoxilina-eosina tras haber crecido durante 7 días. n=4 con 3 replicados técnicos.

7.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS OBTENIDAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS

Además de sembrar las células en placas de cultivo de 6 pocillos, se sembraron en placas de 48 pocillos, a una menor densidad celular, para realizar tinciones y confirmar que esas células son realmente células madre y si presentan alguna diferencia entre ambos genotipos.

Las colonias formadas en los cultivos de ambos genotipos son positivas tanto para Sox2 (**Figura 52A**), como para Klf4 (**Figura 52B**). La tinción para ambos factores de transcripción presenta localización nuclear. La tinción para ambos marcadores demuestra que prácticamente la totalidad de las células que forman las colonias son positivas para estas proteínas de célula madre (**Figura 52A y 52B**), lo que confirma que son colonias formadas por células madre del nicho hipofisario ya que expresan ambas proteínas.

Asimismo, se realizaron tinciones para marcadores de células diferenciadas, que en este caso fueron GH y Pit1, este último un factor de transcripción involucrado en el linaje celular que da lugar a varios de los tipos de células endocrinas en la adenohipófisis. No se encontraron células GH+ positivas en las colonias (**Figura 53A**) y el número de células Pit1+ dentro de las mismas es muy reducido (**Figura 53B**). No se encontraron diferencias significativas en el número de células Pit1+ entre las colonias formadas a partir de hipófisis de ratón WT y KO (**Figura 53C**). De esta forma se puede descartar que las células diferenciadas formen colonias y, al mismo tiempo, asegurar que las células madre se mantienen en este estado indiferenciado durante al menos siete días.

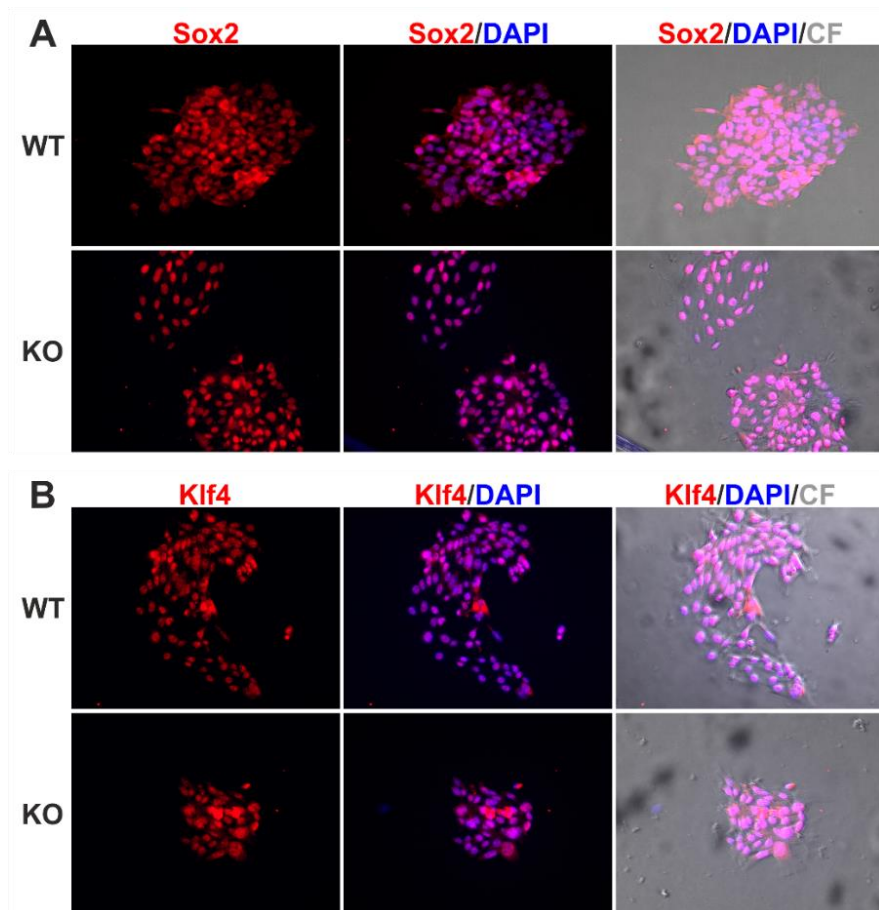


Figura 52. Tinciones para marcadores de células madre en cultivos primarios de hipófisis de ratón. Tinciones para Sox2 (A) y Klf4 (B). Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Se incluye también una imagen de contraste de fases (CF) para delimitar la morfología de la colonia. Fotografías representativas de colonias teñidas para estos dos marcadores en cultivos de ratón con genotipos WT y KO. Las fotografías se tomaron en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 20X. n=3.

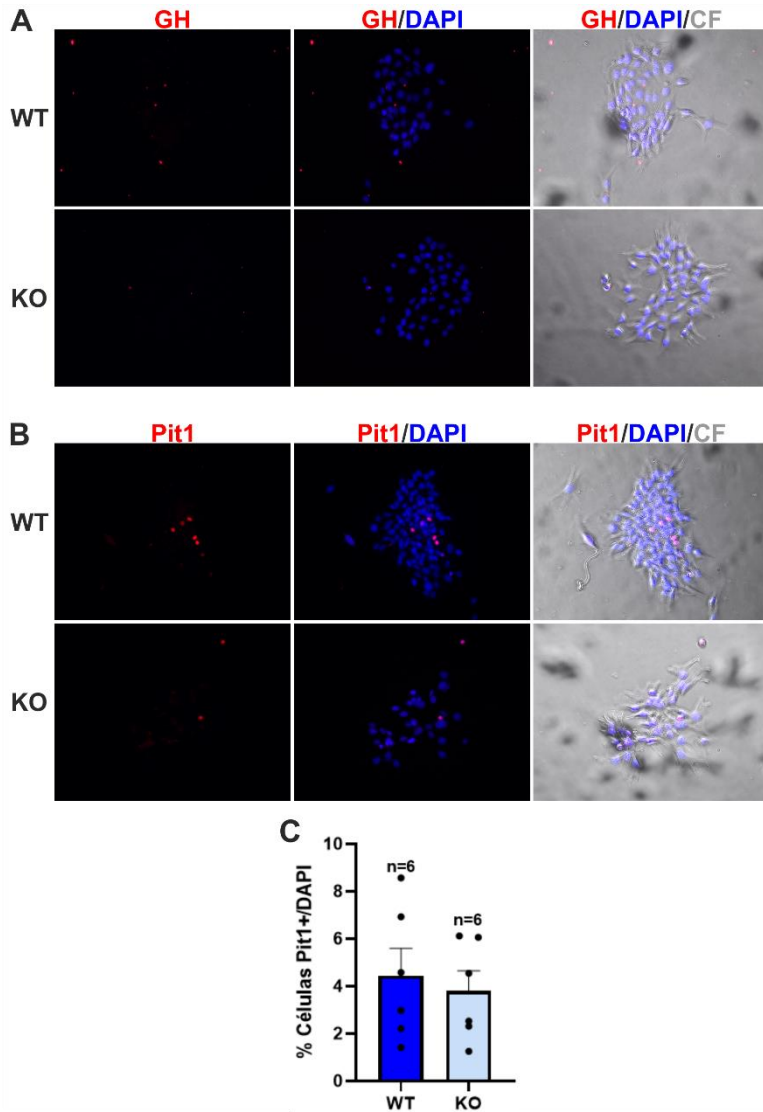


Figura 53. Tinciones para marcadores de células diferenciada en cultivos primarios de hipófisis de ratón WT y KO para *Gfra2*. Tinciones para GH (A) y Pit1 (B). Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Se incluye también una imagen de contraste de fases (CF) para delimitar la morfología de la colonia. Fotografías representativas de colonias teñidas para estos dos marcadores en cultivos de ratón con genotipos WT y KO. C) Porcentaje de células Pit1+ respecto al número de células (DAPI) de 6 colonias de un cultivo. Las fotografías se tomaron en un microscopio de fluorescencia con un objetivo 20X.

7.2. PROLIFERACIÓN DENTRO DE LAS COLONIAS DE CÉLULAS MADRE

Al igual que en los estudios *in vivo*, se añadió EdU a los pocillos en los que habían crecido colonias para estudiar la proliferación celular dentro de las colonias de células madre. Un número elevado de las células encontradas en las colonias obtenidas a partir de ratones WT son positivas para la detección de EdU (**Figura 54A y 54B**). Por el contrario, las colonias obtenidas a partir de ratones KO presentan una menor cantidad de células EdU+. Además, la intensidad de fluorescencia obtenida tras las reacciones de química Click es mayor en las células de los cultivos de ratones WT (**Figura 54A y 54B**).

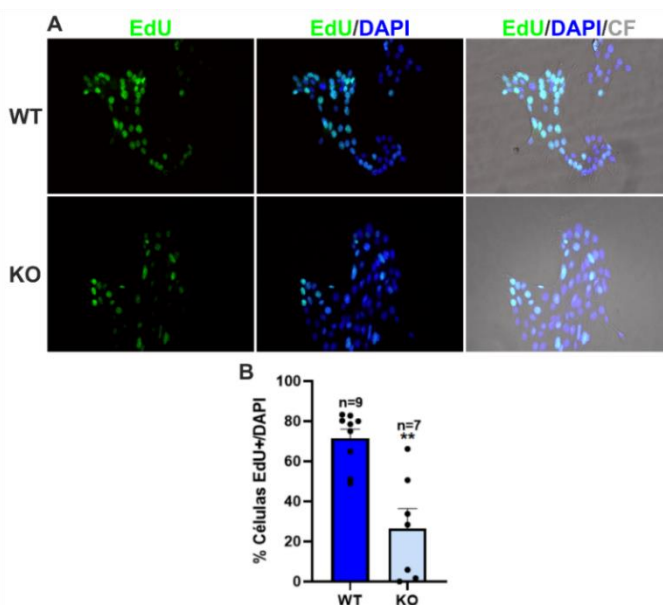


Figura 54. Proliferación celular en las colonias de células madre de hipófisis de ratón WT y KO para *Gfra2*. A) Detección de EdU (verde) intercalado en el ADN de las células que forman las colonias. Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Se incluye también una imagen de contraste de fases (CF) para delimitar la morfología de la colonia. Fotografías representativas de colonias en cultivos de ratón con genotipos WT y KO. B) Porcentaje del número de células EdU+ respecto al número de células (DAPI), conteo de 9 (WT) y 7 (KO) colonias de un total de 3 cultivos diferentes.

7.3. SENESCENCIA EN LAS COLONIAS DE CÉLULAS MADRE HIPOFISARIAS

Tal y como ocurre *in vivo*, las células de los cultivos conseguidos a partir de hipófisis de ratones KO presenta un mayor número de células positivas para la tinción de p21 (**Figura 55A y 55B**). Mientras que en la tinción de las colonias generadas a partir de animales WT solo un pequeño porcentaje del total de células es positivo para este marcador (**Figura 55A y 55B**). Las colonias de los ratones KO están envejecidas respecto a las producidas a partir de células de los animales WT.

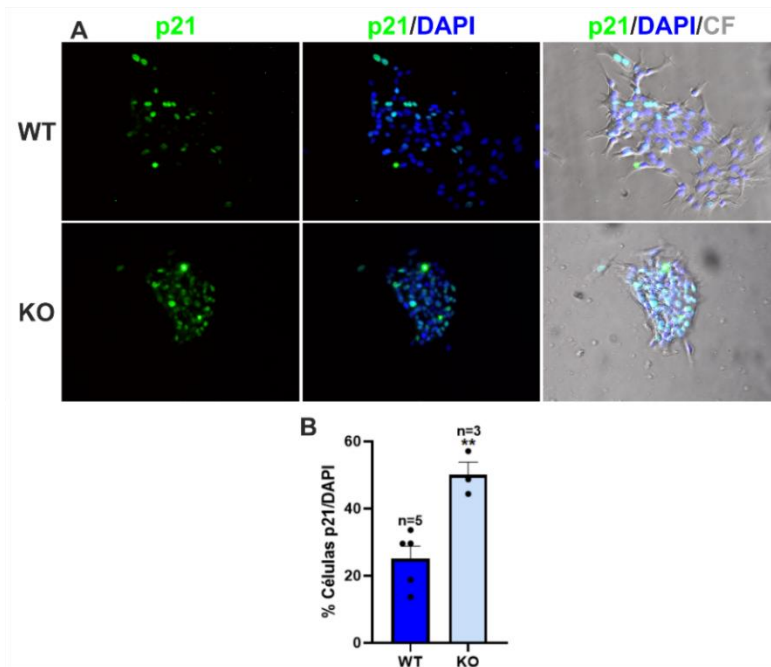


Figura 55. Inmunofluorescencia para el marcador de senescencia, p21, en cultivos de células de hipófisis de ratones WT y KO para $G\alpha\alpha 2$. **A)** Imágenes representativas de la tinción para la detección de p21 (verde) en colonias formadas a partir de células madre hipofisarias. Los núcleos están marcados con DAPI (Azul). Se incluye también una imagen de contraste de fases (CF) para delimitar la morfología de la colonia. **B)** Porcentaje del número de células p21+ respecto al número total de células (DAPI) de un total de entre 3 y 5 colonias de un cultivo.

8. EXPERIMENTO DE RESCATE DEL FENOTIPO DE ENANISMO

8.1. DESCRIPCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO.

Tras los resultados obtenidos previamente, y tras haber demostrado que la ausencia de *Gfra2* produce cambios en la maquinaria molecular de las células madre hipofisarias, se planteó la posibilidad de realizar un experimento de rescate del fenotipo hipofisario normal en estos ratones. Para ello, la propuesta fue utilizar una selección de células madre *Gfra2*⁺ de ratones WT implantadas directamente en la hipófisis de animales KO (*Gfra2*^{-/-}) recién nacidos.

Debido a la necesidad de realizar un seguimiento posterior de las células *Gfra2*⁺, se utilizó la cepa *Gfra2*-KO; *B6;129S-Sox2tm1(cre/ERT2)Hoch/J*; *B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J}* como donantes, ya que la activación del sistema de la Cre-Recombinasa iba a permitir marcar las células *Gfra2*⁺ con GFP, que posteriormente se mantendría en todo el linaje producido por estas células en las hipófisis de los animales receptores, que fueron de la cepa *Gfra2*-KO, modelo en el cual no hay expresión de GFP.

El primer paso antes de proceder con el experimento fue estandarizar el protocolo de aislamiento de las células madre de animales de en torno a los 15 días de edad, en los cuales estas células están muy activas, y garantizar que una dispersión de un número suficiente de células (5000 células) puede concentrarse en un volumen ínfimo de líquido que posteriormente ha de ser inyectado en la cabeza de un animal neonato.

Las hipófisis de los animales en día P15 se dispersaron a célula única y posteriormente se purificó la población de células *Gfra2*⁺ mediante selección por anticuerpos anti-*Gfra2* y al que posteriormente

se une un anticuerpo secundario unido a partículas magnéticas (5). Una vez seleccionadas las células $Gfra2+$ se colocó en una placa de cultivo una gota de $4\mu\text{l}$ de medio con matrigel en la que habían sido resuspendidas las células $Gfra2+$. El cultivo se mantuvo hasta el día siguiente para determinar que las células eran viables y proliferaban. Como puede observarse en la **figura 56A**, es posible obtener una densidad celular elevada en el volumen final igual al que posteriormente sería inyectado en los animales receptores. Debido al matrigel y a la alta tasa de replicación de las células madre en ratones prepuberales, al día siguiente de cultivar las células algunas se habían adherido al matrigel y comenzaron a dividirse formando colonias.

Para confirmar que efectivamente las células contenidas en la dispersión eran células madre, se realizó una tinción doble para detectar Sox2 (como marcador de célula madre) y GH (como marcador de célula diferenciada), ya que ambos no se expresan juntos en las células de la hipófisis. La gran mayoría de células presentes en la dispersión son positivas para Sox2, incluyendo aquellas que se habían adherido al plato de cultivo y habían formado colonias (**Figura 56B**). Por otra parte, la selección de las células $Gfra2+$ con partículas magnéticas puede considerarse un éxito ya que el número de células $GH+$ es ínfimo (**Figura 56B**).

En esta prueba inicial del cultivo, o se utilizaron animales que expresasen EYFP debido a que presenta una mayor dificultad obtener un elevado número de animales que posean los 3 genotipos adecuados, puesto que para obtener una dispersión celular suficiente fueron utilizados 17 animales. También por ello se eligió Sox2 como marcador de células madre en la validación del cultivo de células $Gfra2+$, debido a que, en el modelo de triple mutante son las células Sox2+ las que expresan EYFP tras la activación de la Cre-recombinasa.

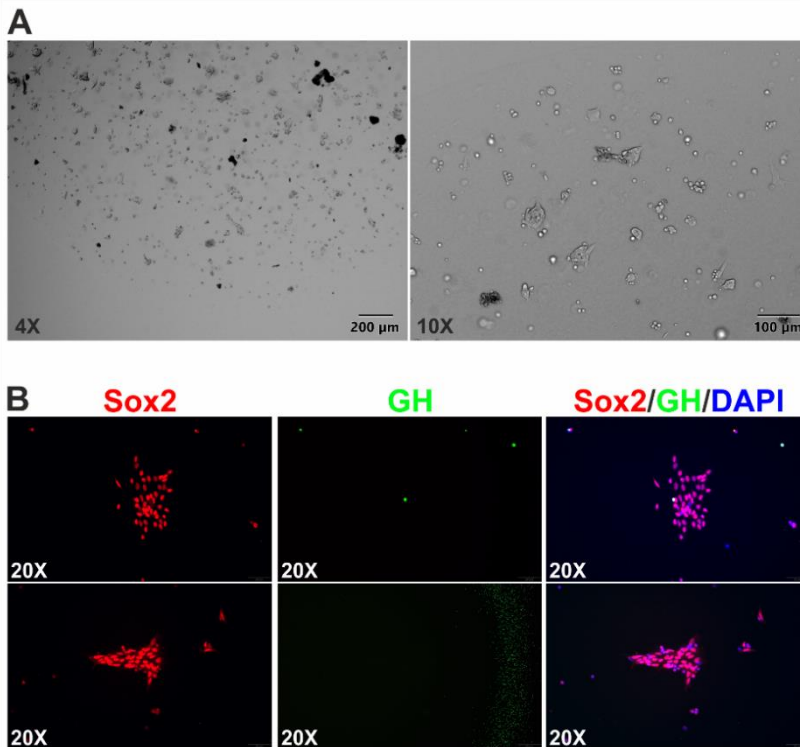


Figura 56. Validación de la obtención de células madre de ratones prepuberales (día postnatal 15, P15). **A)** Fotografías de microscopía óptica de la dispersión celular obtenida a partir de las hipófisis de 15 animales en edad P15. **B)** Tinción de la dispersión celular para la detección de Sox2 (rojo) y GH (verde). Esta doble tinción la comprobación de que las células presentes en la dispersión son solo células madre (Sox2+/GH-). Los núcleos están marcados con DAPI (Azul).

Tras demostrar que es posible obtener un volumen pequeño con una dispersión celular suficiente, se procedió a iniciar el experimento de implantación de las células. La vía elegida fue el canal auditivo, que en roedores neonatos se encuentra alineado con la hipófisis y de esta forma no se dañan estructuras fundamentales presentes en la cabeza en el momento de la inyección. Antes de la realización del experimento se llevaron a cabo varias pruebas con tinta china en ratones neonatos utilizando una aguja Hamilton a 90° y a 4mm de profundidad es posible alojar una gota de 4μL de líquido sin que haya reflujos ni se produzca sangrado a través del canal auditivo.

Para el experimento se establecieron 6 cruces de animales donantes con genotipo $Gfra2^{+/+}$; $Sox2^{CreERT2+/-}$; $R26^{YFP+/+}$ y 4 cruces para la obtención de animales receptores $Gfra2^{-/-}$. De los cruces donantes se obtuvieron 35 animales de los cuales solo 11 fueron válidos para el experimento. De los cruces receptores se obtuvieron 13 crías, de las cuales 4 fueron hembras y 9 machos, y solo 2 de estos animales presentaban el genotipo KO (una hembra y un macho).

Todos los animales sobrevivieron al pinchazo, y no se observó sangrado en ninguna cría tras la inyección. No se produjo ningún tipo de rechazo por parte de las madres, y las crías no presentaron alteraciones evidentes hasta el momento del destete a los 25 días, por lo que no se descartó ningún animal.

Las crías se marcaron en la segunda semana después de la inyección y se realizó un seguimiento de pesos y longitudes a todos los animales receptores desde el día del marcaje hasta la semana 13, edad en la que se consideran adultos jóvenes y el crecimiento se ha detenido. En ese momento los animales se anestesiaron para medirles diferentes características físicas y se perfundieron para incluir las hipófisis en parafina y poder realizar tinciones que corroborasen que las células se habían alojado en la hipófisis y los posibles efectos que podían tener.

8.2. EFECTOS DE LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS $Gfra2^{+}/Sox2^{+}/LoxP$ -EYFP EN RATONES KO PARA $Gfra2$

Los ratones a los cuales se les implantaron las células madre se denominaron R seguido del número dentro del experimento. Los animales KO fueron la hembra R6 y el macho R7. El resto de los animales poseen genotipo heterocigoto y se utilizaron como controles en el experimento, ya que el fenotipo presentado es igual al WT.

Como se puede observar en la **figura 57A** y **57B**, los valores de talla y peso de la hembra R6 están por debajo del resto de los valores medidos en las hembras heterocigotas para Gfr α 2. El patrón de crecimiento es el mismo que el de sus hermanas de camada, pero durante las once semanas en las cuales se realizó seguimiento, no parece que haya ningún momento en el que pueda apreciarse una diferencia en el crecimiento.

Por otro lado, el crecimiento del macho R7 se asemeja al de sus hermanos de camada heterocigotos (**Figura 57A** y **57B**). El ratón R7 presenta una longitud reducida respecto a los heterocigotos durante las semanas 2 a 6 del seguimiento (**Figura 57A**), pero su crecimiento se dispara en torno a la semana 7, momento en el que supera en longitud a algunos de sus hermanos. Posteriormente la longitud de R7 se estabiliza, pero continúa manteniéndose por encima de algunos de los machos heterocigotos hasta el final del experimento (**Figura 57A**).

En lo relativo al peso, el macho R7 comienza el seguimiento con un peso menor al de sus hermanos de camada heterocigotos (**Figura 57B**). Esta tendencia se mantiene a lo largo de todo el experimento, mostrando valores que se acercan al rango en el que se encuentran los animales heterocigotos. Si se compara la pendiente de la curva del peso de la hembra R6 y el macho R7 (**Figura 57B**), se puede observar que la curva de crecimiento de la hembra R6 tiene una pendiente igual a la de sus hermanas heterocigotas hasta la semana 4, pero posteriormente la pendiente de la curva de crecimiento en peso es menor. Sin embargo, la curva de crecimiento en peso del macho R7 tiene la misma pendiente que la de sus hermanos de camada desde la semana 4 hasta el final del experimento (**Figura 57B**).

El siguiente paso fue comparar las curvas de crecimiento de R6 y R7 con las de ratones WT y KO de la cepa Gfr α 2-KO. Para ello se generaron gráficas de curvas de crecimiento en las que se integran los datos recogidos en la **figura 57** para R6 y R7 junto con las curvas de crecimiento de machos y hembras, WT y KO, de la **figura 15**.

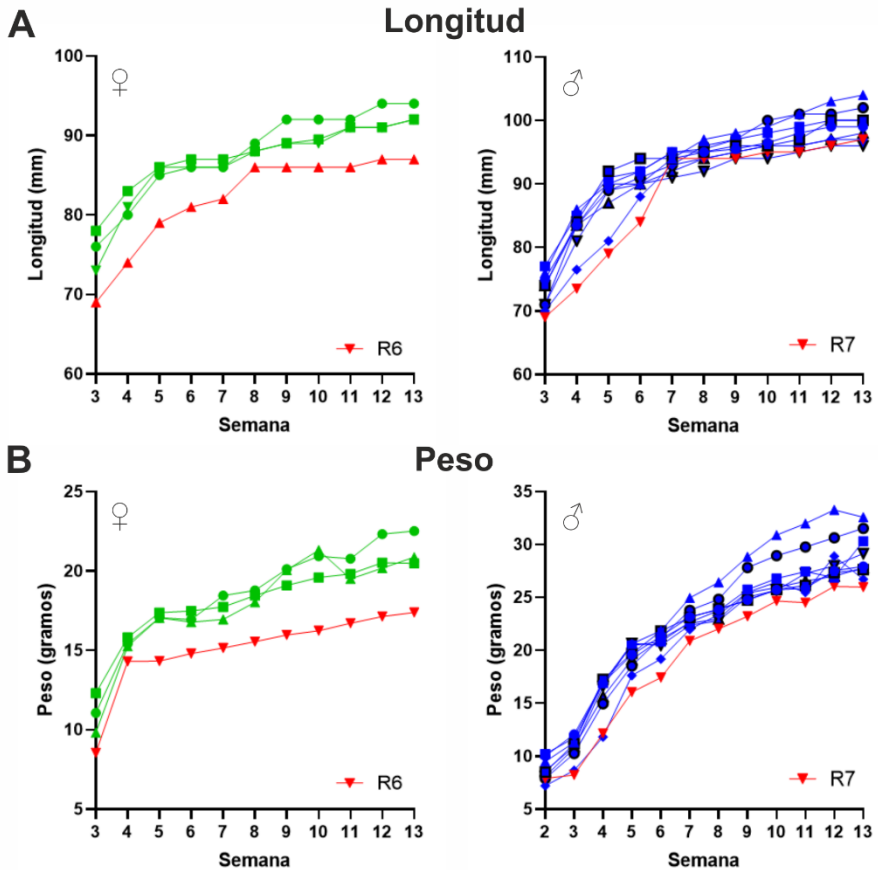


Figura 57. Curvas de crecimiento de todos los animales con células *Gfra2+* inyectadas al momento del nacimiento. Curvas de crecimiento en longitud (A) y peso (B) en hembras (verde) y machos (azul) desde la tercera semana hasta la edad adulta. Los ratones R6 y R7 tienen genotipo KO y están representados en rojo para diferenciarlos del resto de hembras y machos. Los datos están representados como el valor individual de longitud o peso para cada ratón. Están marcados en rojo la hembra KO R6 y el macho KO R7.

La hembra R6 tiene una longitud y un peso en el rango de los valores medios de las hembras KO a la tercera semana (**Figura 58A y 58B**). La tendencia de crecimiento seguida por R6 es similar a la que puede observarse en hembras KO, aunque el área bajo la curva es ligeramente superior hasta la octava semana. Después el crecimiento

en longitud de R6 se estabiliza, quedando en la media de las hembras KO (**Figura 58A**). Por otra parte, el aumento de peso que surge en la cuarta semana se asemeja más a la media que presentan las hembras WT (**Figura 58B**). A partir de la quinta semana, la ganancia de peso de R6 se reduce considerablemente y continua en valores próximos a los de hembras KO hasta la semana 13, en la que fue sacrificada (**Figura 58B**).

El macho R7 comienza el seguimiento presentando una longitud en la media de un macho KO de tres semanas (**Figura 58A**). Sin embargo, su peso se encuentra por debajo de la media cuando se compara con el de los machos KO en la tercera semana (**Figura 58B**). El crecimiento tanto en peso como en longitud de este ratón se mantiene con la misma pendiente que la de los machos KO hasta la sexta semana (**Figuras 58A y 58B**), y los valores continuaron siendo similares a la media de los machos KO. En la séptima semana se produce un aumento relevante de ambas medidas, que permiten comparar la longitud del ratón R7 a la de un macho WT en la séptima semana (**Figura 58A**). El aumento del peso de R7 no es tan pronunciado, pero en este punto empieza a superar a la media de peso de los machos KO (**Figura 58B**). A partir de la octava semana la longitud de R7 se estabiliza y el crecimiento hasta la decimotercera semana es mínimo (**Figura 58A**). De todas formas, el crecimiento disparado de la séptima semana le permite mantener una talla en la media de los ratones WT desde ese momento hasta el sacrificio (**Figura 58A**). El aumento de peso del ratón R7 no es tan pronunciado como el aumento en la talla, pero ya se sitúa por encima de la media de los ratones KO de siete semanas (**Figura 58B**). A partir de la octava semana, el aumento de peso se asemeja más al propio de los machos WT que al de los KO, pero no llega a alcanzar el peso de los ratones WT, aunque si supera la media del peso de los ratones KO desde la octava semana hasta el momento del sacrificio (**Figura 58B**).

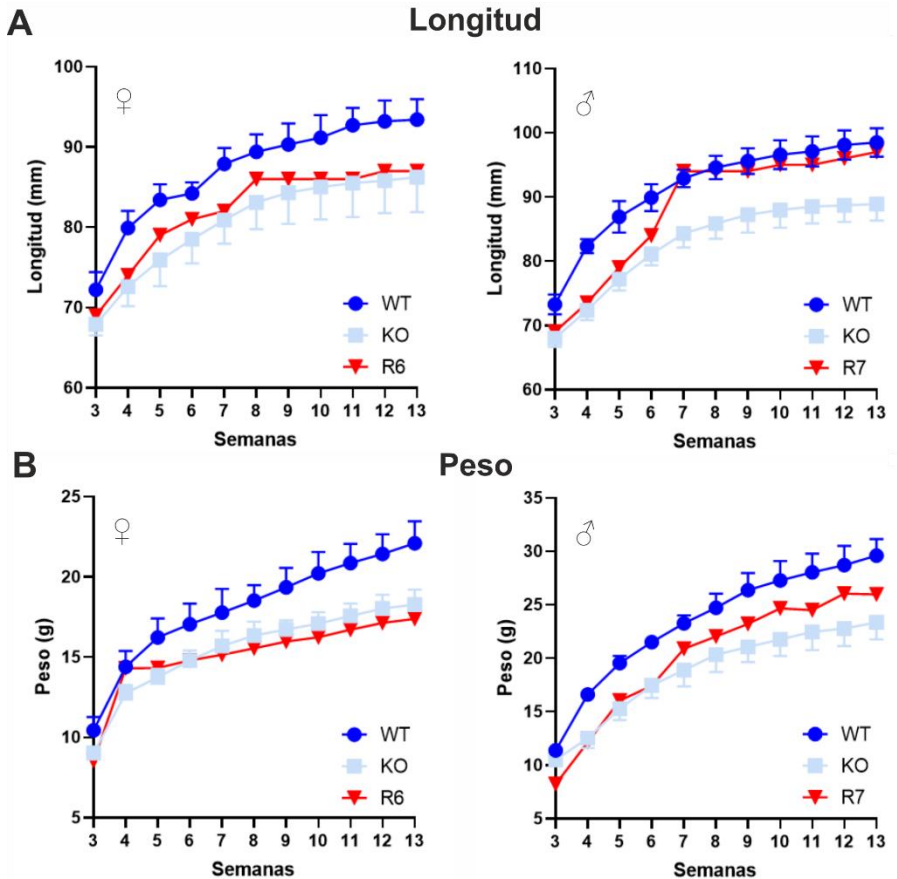


Figura 58. Curvas de crecimiento de los ratones R6 y R7 en comparación a las de ratones WT y KO. Comparación de longitud (A) y peso (B) en de R6 y R7 con hembras y machos respectivamente, tanto WT como KO desde la tercera semana hasta la edad adulta. Los datos están representados como la media±SD. n=10 para longitudes y n=15 para pesos. Los valores de R6 y R7 son individuales de cada animal.

Una vez estudiadas las curvas de longitud y peso de los ratones KO a los que se les habían implantado células $Gfr\alpha 2^+$ en la hipófisis y determinar que se había producido un aumento del crecimiento en peso y longitud de uno de ellos, se comparó la longitud y el peso de todos los animales al momento del sacrificio con las medias de los ratones WT y KO del sexo correspondiente.

Las hembras heterocigotas hermanas de camada de R6 no presentan variaciones significativas en peso o longitud respecto a la media de hembras WT adultas jóvenes (**Figura 59A**). La hembra R6, como ya se pudo observar en las curvas de crecimiento, presenta una talla en la media de las hembras KO adultas y un peso ligeramente inferior a la media (**Figura 59A y 59B**).

En machos, sin embargo, el resultado obtenido es diferente. Se puede observar que 6 de los 8 animales heterocigotos a los que se les implantaron células *Gfra2+* en la hipófisis, presentan una talla mayor en la edad adulta cuando estos valores se compararon con la media de ratones macho WT adultos jóvenes (**Figura 59A**). Este aumento de la longitud es especialmente llamativo en el ratón R4, cuya longitud supera a la media de los ratones WT en casi 10mm (**Figura 59A**). En cuanto al peso, la mayoría de los ratones heterocigotos se encuentra en los valores medios de los machos WT adultos jóvenes, menos los animales R4 y R9 que superan el peso medio (**Figura 59B**). El ratón KO R7 por su parte, alcanza la longitud media de un ratón WT adulto (**Figura 59A**) y presenta un peso marcadamente superior al de un macho KO adulto (**Figura 59B**).

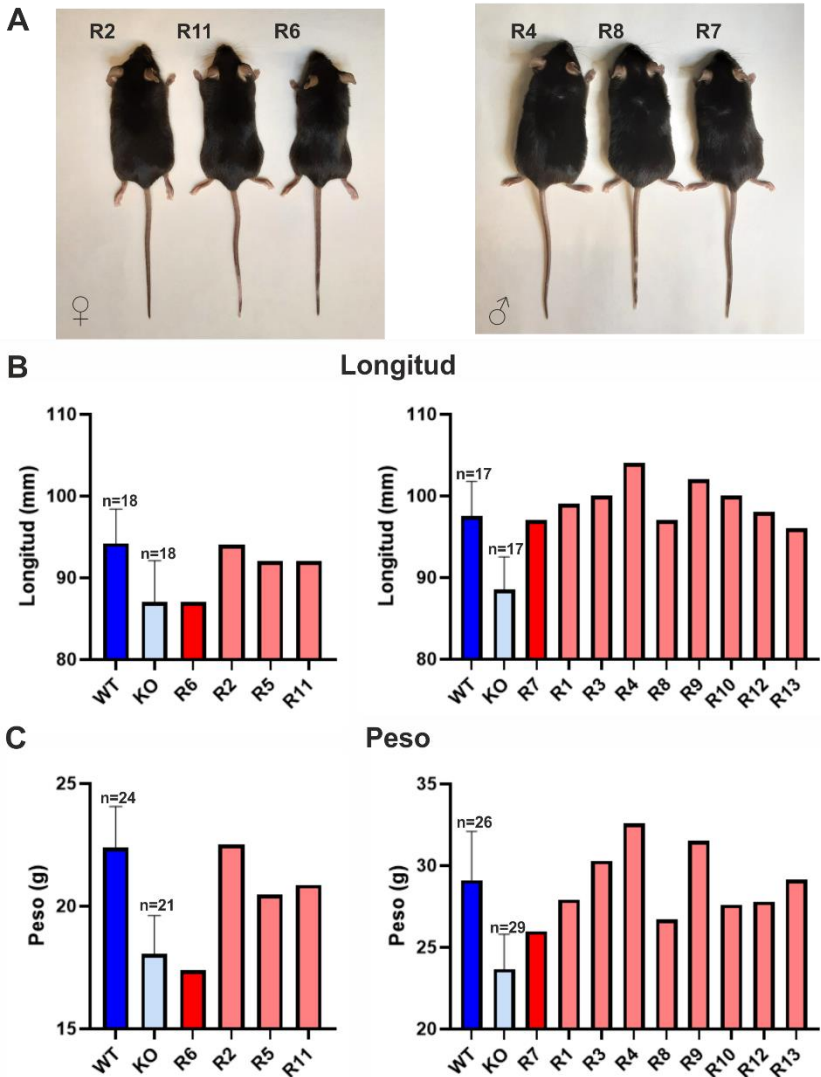


Figura 59. Comparación de la longitud y el peso en la edad adulta de los ratones del experimento con los de adultos WT y KO. A) Fotografías de las hembras R2 (HZ), R11 (HZ) y R6 (KO) y los machos R4 (HZ), R8 (HZ) y R7 (KO). B) Medida de la longitud en la edad adulta de animales WT y KO, representada como la media±SD de 17 animales y de todos los ratones con células *Gfra2+* inyectadas representados como valores individuales. C) Medida del peso en la edad adulta de animales WT y KO, representada como la media±SD de n=21-28 animales, y de todos los ratones incluidos en el experimento representados como valores individuales.

Continuando con el experimento de rescate de fenotipo, en el siguiente paso se seleccionan los dos ratones KO (R6 y R7), además de dos hembras (R2 y R11) y dos machos (R4 y R8) para estudiar diferentes características físicas de estos animales y compararlas con las de ratones WT y KO adultos.

En hembras puede apreciarse a simple vista que el tamaño de la cabeza de R6 es menor que el de las otras dos hembras seleccionadas en el experimento (**Figura 60**). Y cuando se observan las medidas de la longitud y anchura de la cabeza y la longitud de la mandíbula inferior, los valores son muy similares a los de las hembras WT (**Figura 60**). Las medidas de R6 se encuentran en el rango medio para una hembra KO, y las de R2 y R11 en el rango de una hembra WT adulta (**Figura 60**).

En machos las diferencias entre las cabezas de los tres ratones son menos evidentes, pese a que a simple vista es posible reconocer que R4 tiene una cabeza de mayor tamaño que las de sus hermanos de camada (**Figura 60**). Cuando se comparan los valores medidos para la longitud de la cabeza, con los valores de referencia (medias de machos WT o KO), no hay muchas diferencias (**Figura 60**). Es relevante resaltar que el tamaño de la cabeza de R8 queda por debajo del valor medio para un macho heterocigoto adulto (**Figura 60**). Sin embargo, la diferencia de longitud de la cabeza entre R4 y R8 es de tan solo 1mm (**Figura 60**). Respecto a la anchura de la cabeza, R7 alcanza un valor en la media de machos WT y R4 supera esta media (**Figura 60**), resultado que se repite al comparar la longitud de sus mandíbulas inferiores con los valores promedio de machos WT adultos (**Figura 60**).

En la **figura 60** también puede observarse que el tamaño de la hipófisis de R6 es menor que el de R2 y R11. Respecto a los machos, el tamaño de la hipófisis de R7 se asemeja bastante al de la hipófisis de R4, y es superior al de R8.

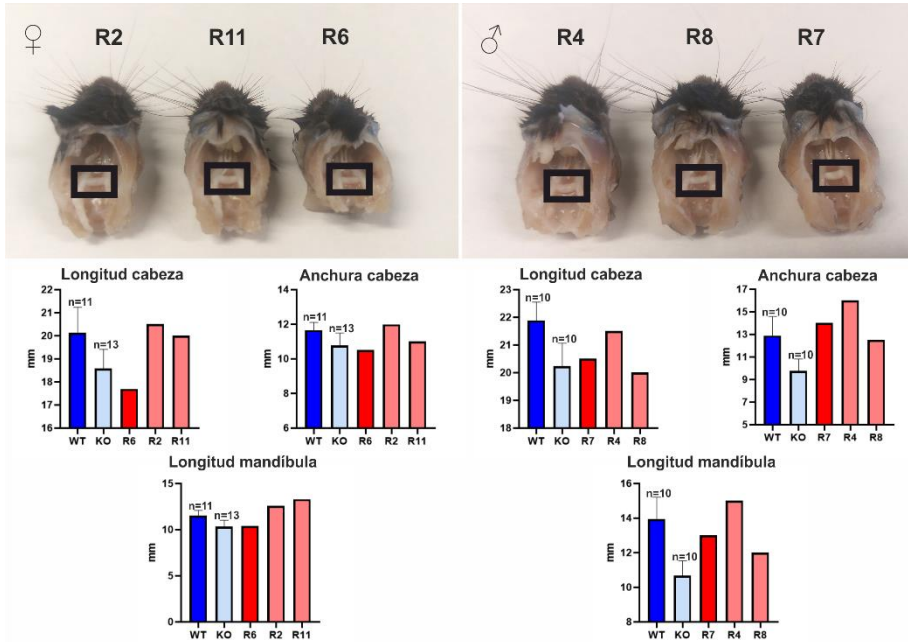


Figura 60. Tamaño de la cabeza y la hipófisis de los ratones con células *Gfra2+* implantadas. Hembras: R2, R11 y R6 (KO); Machos R4, R8 y R7 (KO). La media de las medidas en animales WT y KO (tanto hembras como machos) se calculó a partir de los valores de 10 ratones. Estos valores están representados como la media \pm SD. Los valores de los ratones R2, R11, R6, R4, R8 y R7 están representados como valores individuales.

Previamente a la perfusión de estos 6 ratones, también se les midieron algunas otra de las características fenotípicas que tienen que ver con las extremidades. Las medidas de la tibia y la mano de R6 son iguales que la media de estas medidas en hembras KO adultas (**Figura 61**). El pie, por otra parte, presenta una longitud mayor a la media, pero en el rango de las hembras KO. Por su parte, se puede observar que las hembras R2 y R11 poseen unas extremidades más largas que las encontradas en hembras WT adultas (**Figura 61**). En el caso de R7, la medida del pie se encuentra por encima de la media de este miembro en machos KO adultos y las medidas de la tibia y la mano alcanzan el rango de longitudes que se puede encontrar en ratones WT (**Figura 61**). El macho R4 presenta extremidades y miembros que

superan la media obtenida en ratones WT adultos (**Figura 59**). El macho heterocigoto R8, por su parte, posee miembros cuya longitud se mantiene en la media de ratones WT (**Figura 59**).

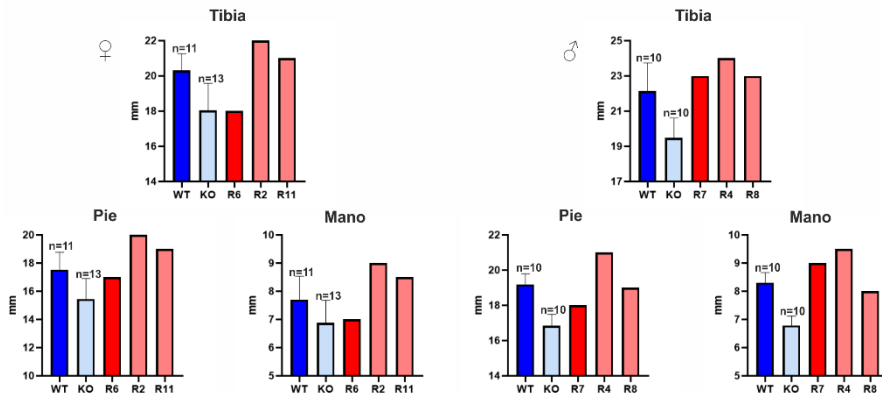


Figura 61. Tamaño de las extremidades de los ratones con células *Gfra2*⁺ implantadas. Hembras: R2, R11 y R6 (KO); Machos R4, R8 y R7 (KO). La media de las medidas en animales WT y KO (tanto hembras como machos) se calculó a partir de los valores de 10 ratones. Estos valores están representados como la media±SD. Los valores de los ratones R2, R11, R6, R4, R8 y R7 están representados como valores individuales.

8.3. DETECCIÓN DE CÉLULAS GFP⁺ EN LA HIPÓFISIS DE LOS DOS RATONES *Gfra2*^{-/-}

Una vez demostrado que el ratón R7 no presentaba el fenotipo de enanismo encontrado en los machos KO de la misma edad, se decidió comprobar que efectivamente este rescate del fenotipo era debido a la implantación y posterior proliferación y diferenciación de las células *Gfra2*⁺ inyectadas en el momento del nacimiento. Esta validación se realizó mediante una tinción inmunofluorescente triple para la detección de GFP (presente solo en las células implantadas), Sox2 (marcador de célula madre) y GH (marcador de célula diferenciada).

Se realizó la inmunodetección en los ratones R2, R11, R6, R4, R8 y R7. Pero solo fue posible detectar células GFP+ en los ratones R11 y R7 (**Figura 62**).

Algunas células GFP+ se encuentran dispersas en la adenohipófisis de estos dos ratones. Lo que demuestra que las células que se habían inyectado al momento del nacimiento se han implantado en la hipófisis (**Figura 62**). Además, es posible encontrar alguna célula GFP+/Sox2+, que ha mantenido el estado de célula madre desde el momento de la implantación (**Figura 60**).

También se encuentran células GFP+/GH+, que en este caso corresponden a células que se han implantado correctamente y que se han diferenciado a células somatotropas (**Figura 62**). Estas células pierden la expresión de Sox2 en el proceso de diferenciación, pero mantienen la expresión de GFP.

Finalmente, aparecen células GFP+/Sox2-/GH- (**Figura 62**). Estas células provienen de las células que se implantan en la hipófisis y que probablemente se hayan diferenciado a otro tipo de célula endocrina diferente a la célula somatotropa.

Con todos estos resultados, se confirma que la implantación de células Gfr α 2+ en ratones KO neonatos fue un éxito, y que estas células fueron capaces de sobrevivir hasta la edad adulta, dividirse y diferenciarse. Además, la implantación de estas células madre Gfr α 2+ permitió a unos de los ratones KO (R7) crecer y adquirir un tamaño que se podría comparar al de un ratón WT en lugar de un ratón KO adulto. Gracias a esta implantación de células, fue posible rescatar el fenotipo de este animal.

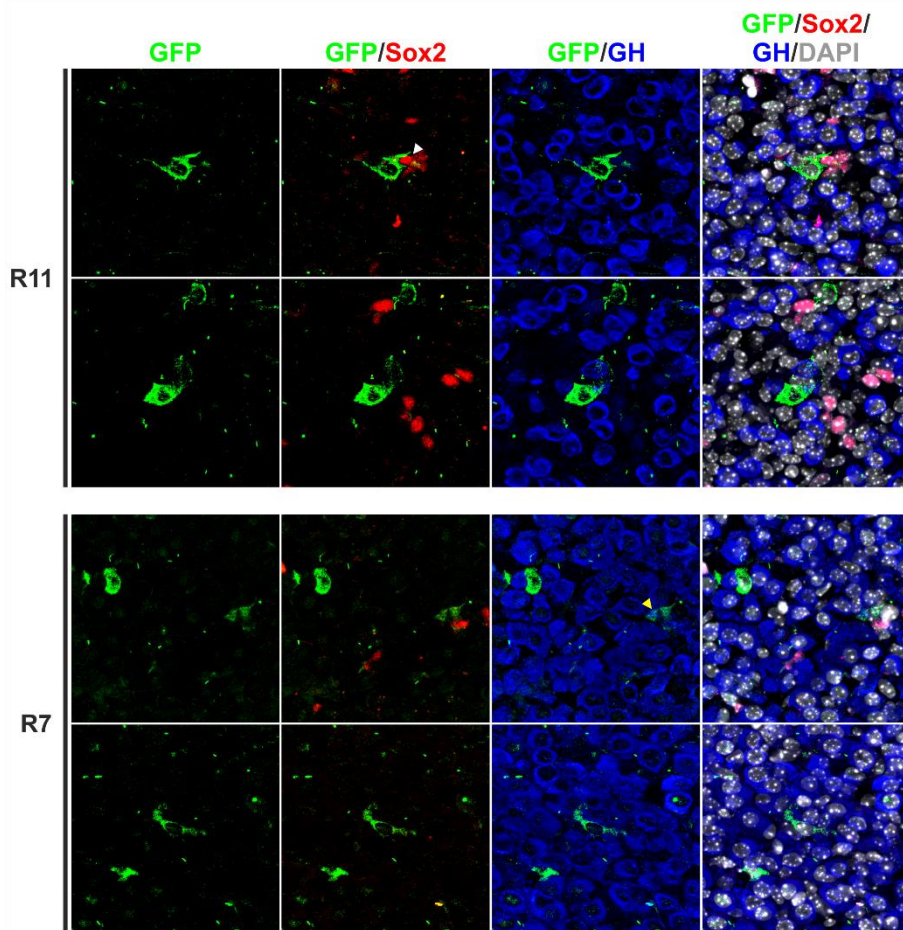


Figura 62. Inmunofluorescencia para la detección de células GFP+ implantadas en la hipófisis de ratones heterocigotos o KO. Tinción triple para detectar GFP (verde), un marcador de células madre (Sox2; rojo) y un marcador de célula diferenciada (GH; azul). Los núcleos están marcados con DAPI (Gris). En la figura se muestran fotografías de microscopía confocal de secciones de hipófisis de los ratones R11 y R7, que son los dos en los que pudieron detectarse células GFP+. La punta de flecha blanca señala una célula GFP+/Sox2+, que corresponde con una célula implantada que mantiene el estado de célula madre. La punta de flecha amarilla señala una célula GFP+/GH+, que corresponde con una célula que fue implantada pero que se diferenció a célula somatotropa.

9. MICROSCOPIA 3D EN LA HIPÓFISIS: ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA OBSERVACIÓN CON EL MISROSCOPIO LIGHT-SHEET

La microscopía de fluorescencia clásica en dos dimensiones presenta algunas limitaciones. Las secciones de criotomo o de parafina tienen un grosor aproximado de entre 4 y 10 micras y para órganos de gran tamaño, es necesario el estudio de un gran número de secciones. Otra de las limitaciones es que no siempre se trata de órganos que sean simétricos; así dentro de algunos órganos la localización de un determinado tipo de células no está distribuida homogéneamente. Un ejemplo concreto es el nicho de células madre de la hipófisis, que se extiende en prolongaciones hacia el interior de la adenohipófisis (118, 119).

Para solucionar estas limitaciones de la microscopia en dos dimensiones, surgió a principios del siglo XXI un nuevo tipo de microscopía de fluorescencia denominado microscopía de fluorescencia *Light-Sheet* (LSFM) (223). La principal ventaja de este tipo de microscopia es que permite una distancia focal o profundidad de imagen mucho mayor que otros tipos de microscopía actuales. Sin embargo, el aumento en este poder de penetración de la luz se consigue sacrificando poder de resolución cuando se compara con otros tipos de microscopia, como la microscopia confocal, ya que la microscopía *Light-Sheet* no deja de ser un tipo de microscopía óptica (224, 225).

En este tipo de microscopio es posible el estudio de muestras tridimensionales teñidas con anticuerpos fluorescentes. Esta tecnología nació principalmente para el estudio del cerebro, pero con el tiempo los protocolos disponibles fueron adaptándose a otro tipo de muestras diferentes entre las que se podían encontrar otros órganos de

ratón, embriones de ratón, pez cebra, fragmentos de tejido humano o incluso cultivos celulares en tres dimensiones (226-228).

Para la visualización de las muestras en el microscopio *Light-Sheet*, estas tienen que pasar primero por dos etapas críticas que son el clarificado y la tinción con anticuerpos fluorescentes. Una vez las muestras están clarificadas se iguala su índice de refracción al del líquido en el que van a sumergirse para su observación. Finalmente, las muestras se sumergen en el líquido y se iluminan de forma lateral con dos haces láser, cada uno de los cuales está compuesto por 3 hojas de luz. Los dos haces confluyen en el mismo punto, la luz es reflejada 90 grados verticalmente, recogida por el objetivo y finalmente fotografiada. Gracias al poder de penetración de la luz, y a la distancia de trabajo del objetivo, es posible fotografiar múltiples planos a partir de los cuales se puede generar una reconstrucción en tres dimensiones del órgano completo, en la cual poder estudiar la tinción de la muestra entera (229, 230).

El clarificado es la etapa más crítica en la microscopía *Light-Sheet*. Es fundamental obtener muestras lo más transparentes posibles para evitar la refracción de la luz dentro de la muestra y de esta forma aumentar la nitidez de las imágenes obtenidas. Muestras translúcidas u opacas no permiten el completo paso de la luz y las imágenes obtenidas no pueden enfocarse bien y quedan borrosas.

Para la implementación de la microscopía *Light-Sheet* en el estudio de la hipófisis, se comenzó con la comparación de varios métodos de clarificado mediante métodos orgánicos como VISIKOL e iDISCO (203) con el método acuoso X-CLARITY.

9.1 VISIKOL

La gran ventaja de este método es que es un método comercial en el que todos los pasos del protocolo están estandarizados y desde la propia compañía tienen preparados protocolos personalizados para determinados tipos de muestras.

Los resultados obtenidos mediante este protocolo no fueron óptimos. Tras múltiples intentos de estandarización, no se consiguió un grado de clarificado aceptable en ninguna de las muestras ensayadas. Solo fue posible enfocar bien la neurohipófisis o las capas más externas de la adenohipófisis (**Figura 63**). Esto es debido a que la opacidad que todavía presentan las muestras no permite el paso de la luz a capas más internas de la adenohipófisis, ya que la densidad celular de esta parte del tejido es muy alta, a diferencia de la neurohipófisis que está formada por algunas células y principalmente axones de neuronas.

Por otra parte, el protocolo de tinción resultó admisible. La tinción para Sox2 que se puede observar en la **figura 63A** es relativamente similar a la que podría obtenerse en una sección de parafina fotografiada con un microscopio confocal a bajo aumento. El nicho de células madre puede observarse en la última fila de células bordeando la zona marginal, pero los progenitores dispersos en la adenohipófisis no se definen debido a la insuficiencia en el grado de clarificado y de magnificación, que es una limitación propia de la configuración del microscopio del que se dispone en ese momento.

Además de las limitaciones en el proceso de clarificado, este protocolo también dificulta la manipulación de las muestras una vez deshidratadas ya que reduce visiblemente su tamaño y las endurece. Algunas muestras se perdieron por la fragilidad que presenta el tejido una vez completado todo el proceso. Finalmente, las muestras deben ser pegadas al soporte del microscopio para poder ser fijadas y observadas, lo que complica enormemente que tengan la orientación deseada para su observación en el microscopio *Light-Sheet*.

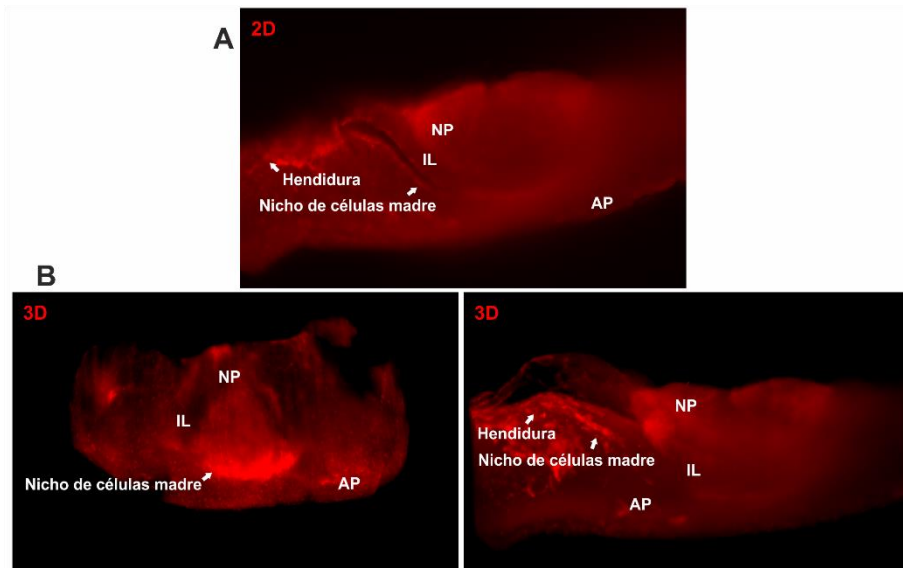


Figura 63. Tinción para Sox2 en hipófisis de ratón adulto joven clarificadas con VISIKOL. A) Imagen de una fotografía en 2D. B) Reconstrucciones tridimensionales realizadas a partir de secciones en 2D que abarcan el volumen completo de la hipófisis. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

9.2. iDISCO

El segundo de los métodos orgánicos de clarificado utilizados fue iDISCO, que presentó algunas mejoras sustanciales respecto a los resultados que se habían obtenido con el protocolo de VISIKOL.

El grado de clarificado de la muestra mejora en gran medida con este nuevo protocolo. Y las tinciones conseguidas se asemejan todavía más a aquellas de microscopía confocal previamente presentadas en la **figura 30A**. No obstante, aparece un halo rojo alrededor del tejido, el denominado efecto borde, que tiene una intensidad superior a la de la tinción (**Figura 64A y 64B**). En la **figura 64A** puede observarse uno de los planos recogidos con el microscopio *Light-Sheet*. En esta imagen, la tinción conseguida en el nicho de células madre es intensa y precisa, pero no es posible

observar los progenitores de la adenohipófisis debido a la intensidad del efecto borde. La **figura 64B** es una reconstrucción tridimensional en la que solo se utilizan los planos intermedios de la hipófisis. En este caso el problema es el mismo, el efecto borde tan intenso que aparece en la imagen opaca el resto de la tinción. Cuando se realiza la reconstrucción tridimensional de la muestra completa, el nicho de células madre puede observarse completamente definido, al igual que las prolongaciones de células Sox2+ que nacen en el nicho y van hacia la adenohipófisis (**Figura 64C**). En este caso el efecto borde se diluye, pero sigue siendo difícil encontrar las células Sox2+ dispersas en la adenohipófisis (**Figura 64C**).

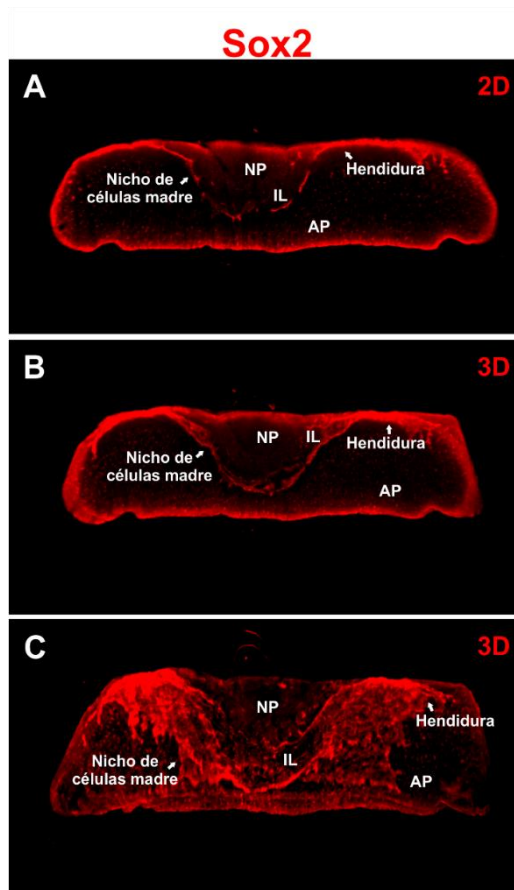


Figura 64. Tinción para Sox2 en hipófisis de ratón adulto joven clarificadas con iDISCO. A) Imagen de una fotografía en 2D. B) Reconstrucción tridimensional realizada a partir de secciones en 2D de la parte central de la hipófisis. C) Reconstrucción en 3D del volumen completo de la hipófisis teñida para Sox2. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

Los resultados con el protocolo de iDISCO son mejores que los obtenidos previamente con VISIKOL. Aun así, el resultado final no es el óptimo y siguen existiendo algunos inconvenientes. El principal es el efecto borde mencionado anteriormente, causado durante la etapa de tinción, durante la cual la penetración de los anticuerpos resulta insuficiente. Además, al tratarse de otro método orgánico, la muestra reduce su tamaño y se torna más dura y frágil. Se utilizó agarosa para

incluir las muestras, y aunque se facilitaba el manejo y la colocación de estas en el microscopio, se perdía calidad en la observación en el microscopio *Light-Sheet*.

9.3. X-CLARITY

El último de los métodos de clarificado estandarizados fue X-CLARITY, que está incluido en los protocolos acuosos. El cambio de tipo de protocolo significa una ventaja desde el principio, ya que en los métodos acuosos las muestras no se deshidratan al final del procedimiento, la consistencia de la muestra final es similar a la de un gel y puede manejarse con un menor riesgo de partirse ya que no es tan frágil. Además, los órganos aumentan el tamaño en un factor de 2x o 3x, al tiempo que mantienen completamente la estructura.

En la **figura 65** se pueden observar el aspecto de la muestra tras las diferentes etapas del proceso hasta la obtención de la muestra final completamente clarificada. El grado de transparencia obtenido con este protocolo es muy elevado.

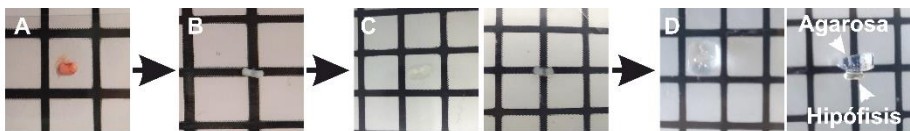


Figura 65. Etapas del clarificado en el protocolo X-Clarity utilizando hipófisis de ratón adulto joven. A) Hipófisis sin perfundir. B) Hipófisis perfundida. En este paso se ha eliminado la sangre y la hipófisis adquiere un color blanco opaco. C) Hipófisis transparente tras el paso de clarificado. Tras este paso la hipófisis aumenta de tamaño. D) Hipófisis colocado sobre un bloque de agarosa tras el paso final de índice de refracción. En este punto el protocolo está acabado y la hipófisis es completamente transparente.

Las imágenes obtenidas al fotografiar en el microscopio *Light-Sheet* al fotografiar las muestras clarificadas con el protocolo de X-CLARITY permiten observar una gran mejoría en cuanto a las obtenidas con los dos métodos orgánicos. En la tinción para Sox2, la definición de las células del nicho de células madre mejora considerablemente, y además permite distinguir las células Sox2+ dispersas en la adenohipófisis (**Figura 66A y 66B**). También es posible definir mejor la estructura de las prolongaciones que nacen en el nicho y se prolongan hacia la adenohipófisis (**Figura 66A y 66B**). Finalmente, la calidad de las imágenes a mayores aumentos se mantiene, reforzando de esta manera la capacidad de afirmar que tanto la tinción como el clarificado son más adecuados.

En la reconstrucción tridimensional realizada a partir de todos los planos fotografiados del órgano se observa correctamente la estructura de las dos líneas de células que conforman el nicho de células madre. También queda definida la estructura de los folículos de células madre (**Figura 66C**), estructuras que actualmente no están estudiadas, pero se postulaba que se trata de prolongaciones tubulares que en las secciones de parafina pueden observarse como espacios vacíos rodeados de células Sox2+ y que se asemejan a la luz de una tubería. Además, la distribución de las células Sox2 dispersas en la adenohipófisis es muy similar a la que se consigue en las tinciones de secciones de parafina previamente presentadas en la **figura 30**.

La calidad de las imágenes obtenidas tras el clarificado con el protocolo de X-CLARITY, es muy superior a aquella que se observa en los protocolos de clarificado anteriores, no se pierde información. Este protocolo de clarificado y tinción, podría ser de gran utilidad en el estudio de la hipófisis.

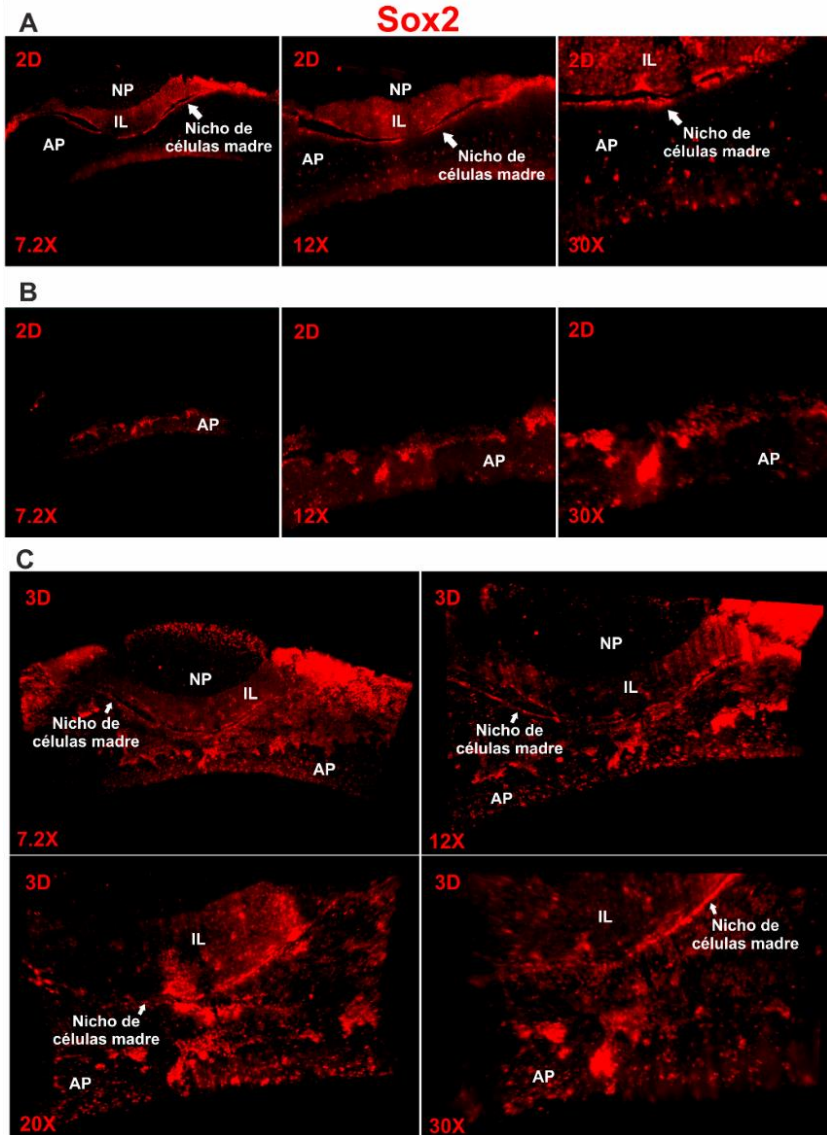


Figura 66. Tinción para Sox2 en hipófisis de ratón macho adulto joven clarificadas con X-CLARITY. A) Fotografías en 2D de una hipófisis teñida para Sox2 a diferentes aumentos en las que se puede observar con detalle el nicho de células madre. B) Fotografías en 2D de una hipófisis teñida para Sox2 a diferentes aumentos en las que se puede observar las prolongaciones del nicho hacia la adenohipófisis. C) Reconstrucción en 3D del volumen completo de la hipófisis teñida para Sox2. (AP: Adenohipófisis; IL: Lóbulo intermedio; NP: Neurohipófisis).

Además de la tinción para Sox2, también se probó a detectar la población endocrina más abundante, las células somatotropas, tiñendo para GH. Este tipo de tinción es completamente diferente, ya que es un marcaje citoplasmático en lugar de nuclear. Además, aproximadamente la mitad de las células de la hipófisis son positivas para GH.

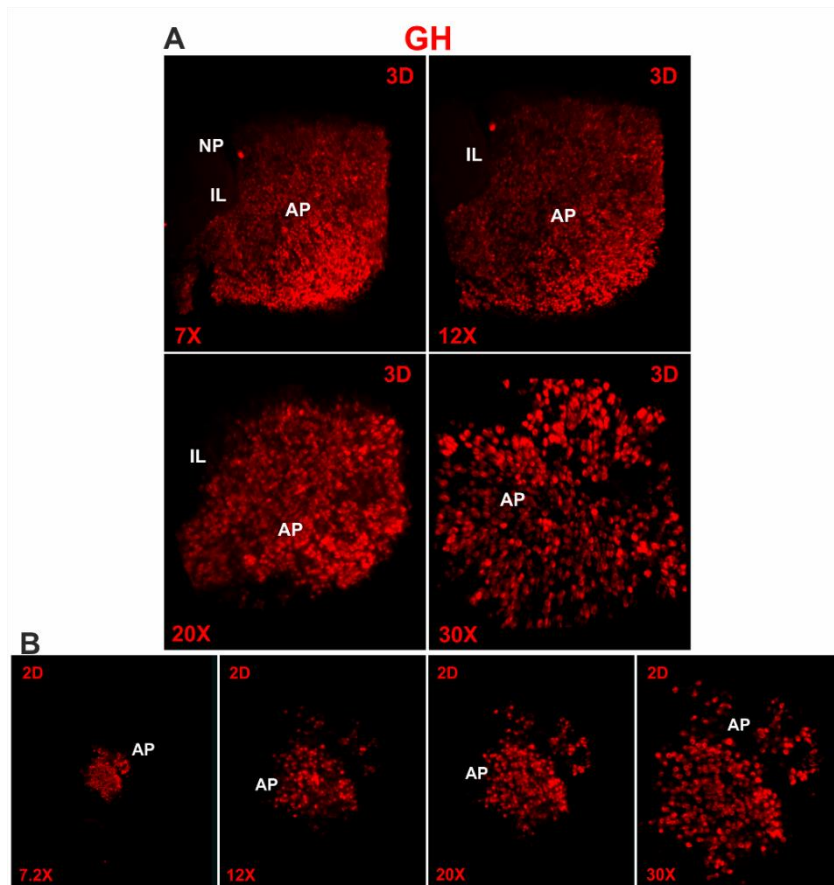


Figura 67. Tinción para GH en hipófisis clarificadas con X-CLARITY. **A)** Reconstrucciones en 3D de una hipófisis teñida para GH a diferentes aumentos en las que se puede observar la distribución de las células somatotropas. **B)** Fotografías en 2D de una hipófisis teñida para GH a diferentes aumentos en las que es posible apreciar la tinción citoplasmática con el núcleo vacío (AP: Adenohipófisis).

La tinción obtenida para esta hormona permite observar los citoplasmas teñidos con el núcleo vacío. Y la distribución de las células es la esperable en los laterales de la hipófisis (**Figura 67A y 67B**).

De los tres métodos de clarificado utilizados el que mejor resultados aporta es X-CLARITY, en el cual el grado de transparencia conseguido es muy elevado y las tinciones muy convincentes. Los resultados aquí presentados permiten confirmar que este protocolo es válido en el estudio de órganos endocrinos de pequeño tamaño, como la hipófisis.

DISCUSIÓN

Estado actual de las células madre hipofisarias

La hipófisis es un órgano fundamental para la homeostasis y el correcto funcionamiento del organismo, ya que de esta glándula dependen procesos básicos como el crecimiento, la reproducción o el metabolismo. Es conocido que los requerimientos hormonales no son estables a lo largo de la vida de los individuos, y que procesos fisiológicos o patológicos puedan estar modulando dicha demanda. Durante el comienzo del desarrollo postnatal y la pubertad existe una mayor demanda de hormona de crecimiento, implicada en el crecimiento longitudinal del individuo. El embarazo y la lactancia son otras situaciones concretas que requieren un mayor aporte hormonal, siendo necesaria una mayor cantidad de gonadotropinas durante el embarazo y de prolactina durante la lactancia. Sin embargo, estos son solo algunos ejemplos.

Como ya se había comentado en la introducción, la distribución clásica de células endocrinas en humano es la siguiente: Somatotropas 40-50%, lactotropas 10-25%, corticotropas 15-20%, gonadotropas 10-15% y tirotropas <5% (2). No obstante, las situaciones antes mencionadas requieren una mayor cantidad de una o varias de las hormonas. Los estudios más recientes de snRNAseq y snATACseq aportan información más actualizada sobre esta distribución celular en la hipófisis, y con toda la información obtenida, el recuento de células no se restringe exclusivamente a las células endocrinas diferenciadas (aunque sigan siendo la mayor proporción de células de la hipófisis). En la nueva distribución celular de hipófisis total de ratón según la secuenciación llevada a cabo por Ruf-Zamojski y colaboradores se reduce el número de somatotropas a 30% en hembras y 50% en machos, lactotropas 36% hembras y 19% machos, melantropas alrededor de un 7% para ambos sexos, 4% de gonadotropas en hembras y 6% en machos, 3,5% de corticotropas y entre 1,5 y 2% de células tirotropas (8). Las células madre suponen entre un 7 y un 10% del número total de células, siendo este mayor en hembras (8). Finalmente se puede encontrar un porcentaje de en torno al 6-8% del resto de células entre las que se encuentran pericitos, pituicitos, células endoteliales y macrófagos (8). Estudios posteriores en

hipófisis humana de donante cadáver también estudiaron las distintas poblaciones celulares presentes en la hipófisis, y los autores comentan que los porcentajes y marcadores son muy similares a los encontrados por Ruf-Zamojski en ratón, pero no aparecen en el artículo (10).

En estas situaciones en las que existe una mayor demanda hormonal la hipófisis tiene que adaptarse, y esto es posible debido a la elevada plasticidad que presenta este órgano. Pese a que en circunstancias normales la tasa de proliferación y recambio de la hipófisis es extremadamente baja, ésta es capaz de adaptarse y generar células nuevas para responder rápido a la demanda hormonal del momento. No obstante, los mecanismos que aportan a la hipófisis su capacidad plástica no están bien definidos (231). Se conoce que las células diferenciadas son capaces de proliferar para dar lugar a células del mismo tipo, o que puede darse procesos de transdiferenciación mediante los cuales se produce un cambio en el programa genético de la célula y se transforma en otro de los tipos productores de hormonas (232). Sin embargo, muchos autores afirman que las protagonistas principales implicadas en la plasticidad de la hipófisis son las células madre del nicho hipofisario y los progenitores comprometidos dispersos por la adenohipófisis (4-6, 116). Gracias a los recientes avances relacionados con la secuenciación *single-cell* y *single-nuclei*, el conocimiento sobre las células madre se ha ampliado en los últimos cinco años (8-10, 215, 233-235). No obstante, es un campo en el que no se conocen los mecanismos exactos que regulan estas células ni se conoce a fondo la relevancia que estas tienen, y las perspectivas para los próximos años resultan prometedoras (145).

Las células madre de la hipófisis se encuentran bordeando la zona marginal, en las últimas capas de células de la adenohipófisis y el lóbulo intermedio, pero este nicho no se considera una estructura estática ya que de él nacen ramificaciones de células positivas para los marcadores SOX2 y SOX9 que parten hacia al parénquima de la adenohipófisis. Además, también existen células SOX2+ y/o SOX9+ dispersas de forma individual por la adenohipófisis. La existencia de dos poblaciones diferentes de células madre en la hipófisis ha sido demostrada con los recientes estudios de snRNAseq (8), sin embargo,

estas dos poblaciones no resultaron distinguibles mediante snATACseq (8). Por lo que parece que ambas poblaciones de células madre comparten el perfil epigenético. En base a la literatura actual sobre las células madre hipofisarias, las células del nicho poseen un estadio de diferenciación anterior a aquellas presentes en las prolongaciones del nicho, y las células dispersas son progenitores comprometidos en etapas de diferenciación más avanzadas pero que pueden dar lugar a los cinco tipos de células productoras de hormonas (8, 10, 122). A pesar de ello, no se conocen completamente los mecanismos celulares que permiten completar la diferenciación a estos progenitores.

Respecto a las células del nicho (células GPS), nuestro grupo las definió en el estudio original por la co-expresión de diferentes marcadores, entre los que se encuentran $GFR\alpha 2$, PROP1 y marcadores de célula madre (SOX2, SOX9, OCT4, KLF4...) (5, 116). De entre estos marcadores, el más estudiado es PROP1, se sabe que este factor de transcripción es importante para la activación del linaje dependiente de PIT1 que da lugar a las células somatotropas, lactotropas y tirotropas, pero estudios llevados a cabo por Davis y colaboradores utilizando un ratón Prop1-Cre permitieron demostrar que las células que originalmente expresan Prop1 no dan lugar solo a las dependientes de Pit1, sino también a las gonadotropas y las corticotropas (236). La relevancia de PROP1 también se ha estudiado ampliamente en el ratón enano de Ames (Prop1^{df/df}), en el cual la ausencia de Prop1 da lugar a hipopituitarismo, presentando bajos niveles de GH combinados con insuficiencia de uno o varios de los demás tipos de hormonas (237, 238). El déficit menos es frecuente en la deficiencia combinada de las hormonas hipofisarias (CPHD) por mutación de PROP1 es el de la hormona adenocorticotropa, aunque no se conocen las razones por las cuales esta última no está alterada en el fenotipo, aunque si puede haber déficit de hormonas gonadotropas (LH y FSH).

De $GFR\alpha 2$ en la hipófisis solo se conoce que está exclusivamente presente en las células madre del nicho y que aumenta su expresión en

determinadas etapas como el fin de la gestación y el comienzo de la lactancia (146). También hay una mayor expresión de $GFR\alpha 2$ en adenomas hipofisarios no funcionantes, cuyo origen estimado son las células madre (147).

Por ello, en la presente tesis doctoral quisimos ahondar en el conocimiento de $GFR\alpha 2$ como marcador de células madre y en la implicación que pueda tener éste en la fisiología de la hipófisis postnatal.

Possible *splicing* alternativo del gen *Gfra2* en la hipófisis

Para ello nos fue amablemente cedido el ratón $Gfra2$ -KO ($Gfra2^{-/-}$) desde el grupo de Mati S. Airaksinen, de la Universidad de Helsinki. Este ratón generado y mantenido en Helsinki en un fondo genético mixto C57Bl/6 / Sv129J, tiene interrumpido el primer exón del gen $Gfra2$. Desde el grupo de Airaksinen, este modelo de ratón había sido utilizado principalmente para el estudio de $Gfra2$ en el sistema nervioso del aparato gastrointestinal. Todo ello sin olvidar que la mayoría de las investigaciones que se han enfocado en $Gfra2$ desde su descubrimiento han sido en el sistema nervioso (63, 64).

El ratón $Gfra2$ -KO fue diseñado en 1999 por Rossi y colaboradores, y los primeros descubrimientos que se hicieron sobre $Gfra2$ utilizando este animal se centraron en la inervación parasimpática del intestino (65). Los animales $Gfra2^{-/-}$ no presentaron alteraciones en la inervación simpática, pero tenían importantes alteraciones de las neuronas colinérgicas del plexo mientérico (65). También en relación con el aparato digestivo, estos ratones $Gfra2^{-/-}$ presentaban un déficit en la inervación de las glándulas salivares (65). Las alteraciones relacionadas con la inervación parasimpática del intestino delgado se traducen a su vez en una disminución de la actividad contráctil de este órgano, que los autores del estudio lo atribuyen como causa del fenotipo ocasionado en estos ratones: Un menor tamaño corporal debido a un crecimiento retardado. No obstante, son los propios autores del estudio los que concluyen que este crecimiento retardado no puede ser debido exclusivamente las alteraciones en la inervación del sistema gastrointestinal (65).

La relación entre *Gfra2* y un modelo animal que presenta un crecimiento retardado (y el consiguiente tamaño reducido) podría deberse a multitud de factores. Y una de estas posibilidades es el enlace entre *Gfra2* y la hipófisis, órgano en el que esta proteína solo está presente en las células madre (5).

El primer paso fue estudiar la expresión de *Gfra2* en la hipófisis del modelo de ratón *Gfra2*-KO que nosotros mantuvimos en un fondo genético puro C57Bl/6. Mediante PCR pudimos detectar que el ratón WT para *Gfra2* expresa los transcritos que posteriormente darán lugar a las 3 isoformas de la proteína *Gfra2*, la isoforma 201 (canónica o larga), la isoforma mediana 202 (isoforma corta) y la isoforma 203 (mediana). Sin embargo, de estas 3 isoformas, solo el mRNA de la isoforma 202 fue detectado en la hipófisis de los ratones con genotipo KO para *Gfra2*. La banda esperada para la pareja de cebadores era de 152pb, como aparece en muestras de testículo (tejido en el que existe una elevada expresión de *Gfra2* y que fue utilizado como control positivo (26-28)). Sin embargo, en la hipófisis se encontró una banda de aproximadamente 300pb utilizando los mismos cebadores específicos de la isoforma corta de *Gfra2*, como se puede observar en la banda obtenida para testículo, y la débil presencia también detectada en hipófisis de la isoforma 202 del tamaño adecuado. Las 3 isoformas previamente descritas fueron detectadas en diferentes tejidos, entre los que no se encuentra la hipófisis (62, 239, 240), por lo que es posible que en este órgano se produzca un *splicing* alternativo que da lugar a isoformas alternativas a las descubiertas anteriormente en el grupo de Too. Además, la isoforma resultante de este *splicing* alternativo estaría compartiendo parte de la secuencia de la isoforma corta, que no está presente en la isoforma principal ni en la mediana. La isoforma 202 y cualquiera que comience en este exón, tiene el primer exón diferente a las isoformas 201 (canónica) y 203, por lo que la mutación introducida en la generación del ratón KO para *Gfra2* creado por Rossi y colaboradores (65), no afecta a dichas isoformas, que siguen expresándose en el ratón *Gfra2*-KO.

En cuanto a la proteína *Gfra2*, hemos demostrado por western blot mediante el uso de dos anticuerpos que la proteína canónica no se

encuentra en ratones KO para *Gfra2*. Sin embargo, al utilizar uno de los anticuerpos en inmunofluorescencia (*Invitrogen, PA5-19874*), se observó que aparece tinción positiva para *Gfra2* en las células madre del nicho tanto de ratones WT como KO. Una de las posibilidades es que se esté reconociendo la isoforma 202, que debería reconocerse en ambos genotipos ya que habíamos encontrado ARNm de la misma en extractos de hipófisis. Sin embargo, la isoforma 202 carece de péptido señal de entrada en el retículo endoplásmico, y no existen predicciones para un punto de anclaje GPI, por lo que no se espera que sea esta isoforma la que se detectando en la membrana plasmática de las células del nicho hipofisario mediante inmunofluorescencia. La otra alternativa está relacionada con la banda de mayor peso encontrada en la detección de ARNm de la isoforma 202. Desconocemos la secuencia de esta posible isoforma, y por consiguiente lo aminoácidos que conforma la proteína que se traduce a partir de la misma. Pero viendo que comparte secuencia con la isoforma 202 es probable que la proteína resultante contenga el epítipo reconocido en inmunofluorescencia por nuestro anticuerpo (*Invitrogen, PA5-19874*). Otra alternativa planteada es la posibilidad de que en los ratones KO para *Gfra2* se estuviese produciendo una forma truncada de la isoforma canónica. Existen varios puntos de inicio de la traducción en la secuencia posterior a la mutación introducida por Rossi y colaboradores (65), pudiendo traducirse en proteínas que contienen el epítipo que reconoce nuestro anticuerpo. No obstante, no se predicen secuencias promotoras y las proteínas resultantes carecen de péptido señal, por lo que no se espera que se pudieran expresar en la membrana plasmática. Además, cuando utilizamos el mismo anticuerpo en western blot no se encontró ninguna banda específica en el ratón KO. Por todo ello, la hipótesis más probable es que la isoforma no descrita hasta ahora sea la detectada en inmunofluorescencia.

Gfra2 en la hipófisis solo se expresa en las células madre del nicho hipofisario, por lo que estas formas de *splicing* alternativo podrían deberse a la naturaleza propia de estas células. Un caso parecido es el que puede encontrarse en los tumores neuroendocrinos relacionado con el receptor de somatostatina (SST). La somatostatina

(o también conocido como factor inhibitorio de la liberación de somatotropina, *Somatotropin release-inhibiting factor (SRIF)*) es un neuropéptido hipotalámico cuya función principal es la inhibición de la secreción de la hormona de crecimiento por parte de la adenohipófisis, aunque también posee actividad inhibitoria sobre otras hormonas como la insulina, el glucagón, la ghrelina, la gastrina o la colecistoquinina (17). De los 5 receptores de SRIF que se conocen, los principales que se expresan en la hipófisis son el SST₂ y el SST₅. El SST₂ posee dos variantes originadas por splicing, SST_{2A} y SST_{2B}, ambos expresados en las células somatotropas de la hipófisis. El receptor SST₅, tiene dos isoformas, SST₅TMD4 y SST₅TMD5. Estas son dos isoformas truncadas del SST₅, y se producen a partir del gen *SST5* mediante splicing no canónico (241). En roedores el receptor *sst5* posee 3 isoformas truncadas *sst5*TMD1, *sst5*TMD2 y *sst5*TMD4 (241). Todas ellas, salvo la *sst5*TMD4 se expresan en la hipófisis. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de SST₅TMD4 y SST₅TMD5 es muchísimo más elevada en tumores adenomas hipofisarios productores de GH y en adenomas hipofisarios no funcionantes (NFPA) (242). Esta expresión diferencial de las dos isoformas truncadas del SST₅ sugieren que estos transcritos coordinan respuestas diferentes en estado fisiológico o patológico, como es el caso de la isoforma SST₅TMD4 en somatotropinomas, a los que les confiere características más agresivas, entre las que destacan proliferación e invasión celular (243).

Fenotipo de enanismo hipofisario en el ratón KO para *Gfra2*

Con el modelo validado se estudió el fenotipo de estos ratones. Rossi y colaboradores solo se habían basado en el peso de los ratones *Gfra2*^{-/-} para asegurar que tienen un retraso en el crecimiento(65), sin embargo, esta medida por sí misma no es suficiente ya que el peso puede verse afectado por múltiples causas. En el trabajo original de Neuron de 1999 también se midió longitud morro – cola y se encontró que había una diferencia descriptiva de un 10-15%, sin mostrar los datos (65). Los propios autores publicaron en otro artículo que los ratones con genotipo *Gfra2*^{-/-} poseen menores niveles de grasa gonadal (68), que es un parámetro utilizado para estimar los niveles de grasa

corporal en ratones (244). Otro de los factores que describen Rossi y colaboradores como potencial causa de este retraso del crecimiento es la mala absorción de nutrientes debida al déficit de inervación intestinal (65).

Por todo ello, se realizó un seguimiento de los animales, pero además de medir y comparar el peso de los ratones *Gfra2*^{-/-} con los *Gfra2*^{+/+}, también se analizó el crecimiento longitudinal de estos animales durante 10 semanas. Al momento del nacimiento, los ratones de los tres genotipos son totalmente indistinguibles entre sí, todos tienen el mismo aspecto físico, y no se empiezan a observar diferencias entre genotipos hasta el momento en el que comienza la pubertad. En este punto del desarrollo de los ratones empieza a ser posible detectar a simple vista aquellos animales pueden tener el genotipo KO, no obstante, los heterocigotos y los WT son indistinguibles. Al momento del destete, en torno a los 21 días, es cuando las diferencias entre genotipos empiezan a ser más evidentes, tal y como publicaron Rossi y colaboradores (65). No obstante, la longitud de los animales no se ajusta a la definición de crecimiento retardado, ya que es a partir de la octava semana, cuando el crecimiento longitudinal empieza a estabilizarse, y a partir de este punto los ratones KO no alcanzan nunca el tamaño de los WT, por lo que se trata de un fenotipo de enanismo, no de crecimiento retardado.

Al mismo tiempo, se estudiaron diferentes características físicas relacionadas con la condición de enanismo en humanos, y todas ellas presentaban una disminución proporcionada en los ratones KO. Se trata de un estudio del fenotipo muy completo que descarta completamente el crecimiento retardado, ya que los ratones son enanos y mantienen esas diferencias de tamaño durante toda su vida. En las gráficas del seguimiento de la sección de resultados se muestran las curvas de crecimiento hasta la semana trece, pero una vez pasada esta edad los ratones *Gfra2*^{-/-} mantienen el fenotipo de enanismo. Los machos KO que se utilizaron en cruces para la obtención de camadas enriquecidas en crías con genotipo KO no superaron nunca en tamaño a las hembras heterocigotas utilizadas en esos mismos cruces. Y como se había presentado en las gráficas de

pesos y longitudes de los ratones a los 90 días, el tamaño de los machos KO es muy similar al de las hembras WT, hecho que se mantiene durante toda la vida de estos (los cruces se mantuvieron hasta la semana 32).

Los ratones *Gfra2*^{-/-} son enanos. No obstante, estos datos solo refutan el crecimiento retardado, pero siguen sin relacionar el fenotipo con la hipófisis. Para definir un enanismo hipofisario, esta condición debe estar ligada a la hormona de crecimiento (GH), como ocurre en los ratones enanos de Ames, Snell o Laron. Solo que cada uno de ellos posee mutaciones en un gen diferente, que son *Prop1* en el ratón enano de Ames, *Pit1* en el ratón enano de Snell y *GHR* en el ratón enano de Laron (195).

El fenotipo hipofisario se confirma con el descenso que se produce en los niveles de IGF-1 en el suero de los ratones KO, tanto en machos como en hembras. La hormona IGF-1 es secretada en el hígado en respuesta a la GH, y se utiliza como una medida indirecta de la producción de GH, debido a que ésta no se produce de forma lineal durante el día. La hormona de crecimiento se produce en forma de picos muy bruscos, seguido de periodos en los que no hay secreción de esta hormona (18). La disminución de IGF-1 por tanto, refleja que los ratones *Gfra2*^{-/-} en el modelo *Gfra2*-KO tienen niveles más bajos de GH.

En otros modelos de enanismo, como es el caso del ratón enano de Ames, que es deficiente para el factor de transcripción *Prop1* (específico de la hipófisis), el resultado, además del fenotipo enano debido a la falta de GH, es una disminución conjunta en los niveles de todas las hormonas hipofisarias, salvo la ACTH (237, 238). Por su parte, el ratón enano de Snell tiene mutado el factor de transcripción *Pit1* (191), y en este caso el ratón es deficiente para células somatotropas, lactotropas y tirotropas (192), es decir, para todos aquellos tipos de células productoras de hormonas que son dependientes de *Pit1* (245). A diferencia de las mutaciones en *Prop1* y *Pit1*, el ratón *Gfra2*^{-/-} del modelo *Gfra2*-KO no parece estar ocasionando una deficiencia hormonal múltiple, y que no tiene afectado el eje tiroideo, y la producción de las hormonas tiroideas no

están alteradas, tal y como se demuestra al no existir diferencias en la hormona T4 libre en ambos genotipos y sexos.

Las diferencias en los niveles de IGF-1 en suero, unido a que no existan diferencias en la hormona T4 libre hacen pensar que no se trata de un modelo de enanismo similar al encontrado en los modelos de Ames y Snell, ya que no aparece esa deficiencia combinada de varias hormonas. De todas formas, se midieron los niveles de las seis hormonas hipofisarias tanto en contenido hipofisario como en suero de los ratones del genotipo WT y KO del modelo *Gfra2*-KO. El principal resultado obtenido de estos análisis es que los niveles de hormona de crecimiento en el suero de los ratones macho *Gfra2*^{-/-} está disminuido respecto a los WT, confirmando a su vez la bajada en los niveles de IGF-1. Esta tendencia se mantiene además en los niveles de GH del contenido hipofisario de los machos *Gfra2*^{-/-}.

La liberación de la hormona de crecimiento presenta un marcado dimorfismo sexual en mamíferos, lo que incluye humanos y roedores. En machos la GH se libera en pulsos a intervalos de 3-4 horas que producen un importante aumento de la concentración de esta hormona en sangre, por el contrario, la concentración de GH en suero entre pulsos disminuye mucho hasta niveles casi indetectables (18). Por otra parte, en hembras la secreción de GH no sigue el patrón de pulsos tan intenso como en machos, y la liberación de esta hormona es más constante (18).

En pacientes existe este problema para el diagnóstico de deficiencia de GH y enanismo hipofisario y que se necesitan pruebas de estimulación funcionales, comparando el pico de secreción con los valores esperados normalizados. Entre estas pruebas destacan la de tolerancia a la insulina (ITT), el de GHRH+Arginina, el de estimulación con Glucagón (GST), u otros que se han propuesto en la literatura (el de GHRH+GHRP o el de Ghrelina (acylada) sola (167, 246, 247). Estas pruebas no están validadas en ratón, por lo que tampoco podríamos utilizarlos con seguridad diagnóstica. Y al menos el ITT no se podría utilizar ya que la respuesta es inversa en roedores. E incluso en pacientes, la especificidad no es absoluta, necesitándose más de una prueba en ausencia de enfermedad genética demostrada

(167, 246, 247). Constantemente nuevos métodos se están proponiendo para asegurar un diagnóstico más específico (248)

En lo relativo a los niveles de GH en extractos de hipófisis de hembras *Gfra2*^{-/-}, no fue posible obtener datos relevantes debido a problemas técnicos con el kit elegido. Estas muestras se ensayaron más veces, aumentando la dilución de las muestras para intentar que pudieran ser interpoladas en la curva patrón, pero no fue posible conseguir mejoras sustanciales en los nuevos datos obtenidos. Para solucionar este problema, las posibilidades que se plantean serían utilizar el mismo kit de medición de hormonas con nuevos extractos de ratón, utilizando un tampón de lisis diferente. Uno de los principales problemas relacionados con el uso de anticuerpos y la detección de proteínas es la concentración de los detergentes utilizados para romper las membranas lipídicas de las células, un exceso de concentración de estos componentes interfiere con la unión de los anticuerpos a su epítipo. El tampón de lisis utilizado en la generación de los extractos utilizados en este experimento contenía una pequeña concentración de detergentes (1% Tritón-X100), pero es posible que el Triton-X100 interfiera específicamente con los anticuerpos utilizados en este kit concreto. Por ello, otra de las posibles alternativas podría ser emplear un kit diferente al que utilizamos, que esté validado para poder ser utilizado en muestras de extracto de tejido en las que el diluyente de las proteínas contenga detergentes no iónicos más concentrados. La concentración de hormona de crecimiento en extractos de tejido de hembras WT y KO para *Gfra2* es un dato relevante que complementaría a los resultados previamente comentados sobre la disminución de la concentración de GH en suero y extractos de tejido de ratones macho KO para *Gfra2* y también la disminución en los niveles de IGF-1 en suero de ratones hembra y macho KO para *Gfra2*, que indican que en el ratón KO para *Gfra2* se da un fenotipo de enanismo hipofisario derivado de una disminución de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-GH/IGF-1.

En cuanto a las medidas de las otras 5 hormonas hipofisarias en ambos tipos de muestras, no se encontraron diferencias. Es posible apreciar ligeros cambios en los ratones KO para *Gfra2* que no poseen

significancia estadística. En estos datos existe un nivel de dispersión elevado para algunos individuos, tanto en las para en suero como en extracto hipofisario. Para evitar esta dispersión una de las soluciones sería repetir el kit que se utilizó, utilizando diluciones independientes para cada una de las hormonas. O también utilizar un kit específico de cada hormona, aunque la oferta de kits garantizados para la detección de hormonas en extractos de tejido es muy limitada y la sensibilidad que poseen es baja. No obstante, el número de animales utilizados en estos experimentos fue de 6 para extractos de hipófisis y 8 para muestras de suero, un número elevado para poder descartar que existan diferencias significativas en la concentración de las hormonas hipofisarias diferentes a la GH. Estos resultados, sumados a la regulación de los ejes hipotálamo-hipofisario que involucran a las hormonas lactotropas, gonadotropas, tirotropas y corticotropas y a la compensación que estos ejercen, junto con las imágenes de la distribución de cada uno de los 5 tipos de células endocrinas en el ratón KO para *Gfra2*, se puede descartar que exista una deficiencia combinada de varios tipos de hormonas.

Los ratones KO para *Gfra2* creados en los laboratorios de Airaksinen (65) y Millbrandt (205) fueron generados en un fondo genético mixto C57Bl/6 x 129Sv/J. No obstante, el ratón *Gfra2*-KO usado en nuestro grupo de investigación fue cruzado con ratones de la cepa C57Bl/6 puro para obtener una cepa de ratón KO con un fondo genético puro C57Bl/6. Una de las diferencias encontradas es que las hembras con genotipo *Gfra2*^{-/-} con fondo mixto C57Bl/6 x 129Sv/J eran fértiles y son capaces de generar camadas. Por el contrario, las hembras *Gfra2*^{-/-} con fondo puro C57Bl/6 no resultaron fértiles y tras establecer varios cruces, en ninguno de ellos se obtuvo ninguna camada. No hemos profundizado más en las causas que han podido llevar a producir esta infertilidad en las hembras de nuestra línea KO para *Gfra2* con fondo puro C57Bl/6, ni hemos estudiado en profundidad su sistema reproductivo. No obstante, las alteraciones en la producción de FSH en las hembras de nuestro modelo KO para *Gfra2* podrían estar detrás de este hecho.

Poblaciones endocrinas en la hipófisis del ratón *Gfra2*-KO

La hipófisis del ratón *Gfra2*^{-/-} es significativamente más pequeña que la del ratón WT de la misma cepa. Además, mantiene perfectamente la estructura de los 3 lóbulos, adenohipófisis, neurohipófisis y lóbulo intermedio. El tamaño de la hipófisis difiere en el número total de células, siendo posible encontrar de media unas 10.000 células en una sección coronal de hipófisis de ratón WT adulto, y unas 7.000-8.000 en las hipófisis del ratón KO. En ratones en desarrollo a día 10 postnatal también es posible encontrar estas diferencias, en este caso, una sección coronal de adenohipófisis de ratón KO tiene una media de 3.800 células por sección y el WT en torno 5.500.

En el ratón enano de Snell, se reduce el tamaño total de la glándula, pero desaparecen por completo las células somatotropas, lactotropas y tirotropas en las hipófisis de estos ratones (192). Fenómeno que ocurre también en el ratón enano de Ames (190, 249). Otros autores, como Cao y colaboradores, han utilizado otros modelos Knockout que dan lugar a un fenotipo de enanismo hipofisario. Cao y colaboradores utilizaron un ratón KO para *Zbtb20*, un factor de transcripción expresado en todas las células diferenciadas de la adenohipófisis, pero que es más relevante en células lactotropas. Ratones *Zbtb20*^{-/-} presentan una hipófisis reducida con una disminución de la producción de GH, al igual que ocurre en los *Gfra2*^{-/-}, pero carecen de células lactotropas (250). Por otro lado, Scully y colaboradores estudiaron la implicación de la Integrina $\beta 1$ en el desarrollo embrionario. La ausencia de esta proteína da lugar a una importante deficiencia combinada de GH y Prl, generando un individuo enano en el que también es posible encontrar hipófisis de tamaño muy reducido y morfología alterada durante el desarrollo (251). En este modelo, sí que se mantiene la presencia de células somatotropas, al igual que lo encontrado en el modelo *Gfra2*-KO. *Tcf711* es otro factor importante en el desarrollo del hipotálamo y la hipófisis, embriones de ratón deficientes en *Tcf711* muestran una morfología anómala de la hipófisis durante el desarrollo embrionario, los cambios en el fenotipo de estos animales se observan ya durante la

etapa embrionaria, pero presentan un marcado fenotipo de enanismo postnatal (252). En algunos casos de hipopituitarismo en humanos se descubrieron mutaciones en el factor de transcripción *PROKR2*, este hecho fue estudiado por McCabe y colaboradores utilizando un ratón KO para *Prokr2* en el que descubrieron que estos ratones también tienen un menor tamaño corporal e hipofisario, presentando una severa disminución en las células gonadotropas de estos ratones (253). A diferencia de mutantes en *Sox2*, una mutación de *Sox3* en homocigosis no produce letalidad embrionaria, y los ratones *Sox3*^{-/-} llegan a la etapa postnatal, lo que permitió a Rizzoti y colaboradores estudiar los efectos en el desarrollo de la ausencia de *Sox3*. Estos animales presentan un fenotipo de hipopituitarismo combinado de varias hormonas que no cursa con los mismos síntomas en todos los individuos KO para *Sox3*, aun así, uno de los parámetros que más se repite en este modelo es el déficit de GH y la aparición de más de un nicho de células madre (254). Defectos en la hipófisis pueden ser causados por la ausencia de multitud de genes, otro de ellos es *Cdk4*, una ciclina dependiente de quinasas con un papel regulador de la fase G1 del ciclo celular. Jirawatnotai y colaboradores observaron en ratones *Cdk4*^{-/-} que el desarrollo de la hipófisis es completamente defectuoso en ausencia de esta ciclina, y, además, el número de células somatotropas, lactotropas y tirotropas de estos animales está prácticamente reducido a cero (255).

Un caso completamente diferente es el que publicaron Friedrichsen y colaboradores, que utilizaron el modelo de hipotiroidismo congénito *Pax8*^{-/-}. Estos ratones *Pax8*^{-/-} no tienen glándula tiroidea, pero también tienen un fenotipo enano, aunque el enanismo aquí sería debido al hipotiroidismo y no a la falta de GH, en el que se pueden encontrar hipófisis de tamaño normal, pero con una distribución celular totalmente anómala, primando las células tirotropas (que en condiciones normales son las menos frecuentes) y con una importante disminución en el número de células somatotropas, lactotropas y gonadotropas (256).

La naturaleza de todos estos modelos KO tienen en común el fenotipo de enanismo, pero las características derivadas de estas mutaciones cambian completamente entre todos los animales.

Por ello, se centró principalmente el estudio en ratones adultos, donde el fenotipo es más evidente, y en ratones en los primeros días de desarrollo postnatal, al comienzo de la pubertad. El hipopituitarismo de los ratones KO par *Gfra2* parece ser causado por el menor tamaño de la hipófisis, y por consiguiente una reducción en el número total de células productoras de hormonas, que al mismo tiempo no parece disminuir la distribución porcentual de las mismas. Las tinciones para los cinco tipos de células productoras de hormonas en hipófisis de ratones WT y KO de la cepa *Gfra2*-KO corroboran estos resultados, ya que no se aprecian diferencias en la distribución ni el número de células de ninguno de estos cinco tipos. A diferencia de los datos presentados en el ratón *Gfra2*-KO, el ratón enano de Snell no tiene en su hipófisis ninguno de los tipos celulares presentes en el linaje dependiente de *Pit1*, esto es, no tienen células somatotropas, lactotropas ni tiotropas (192). Igual que ocurre también con el ratón enano de Ames (190).

Por todo ello, se decidió continuar el estudio en aquellas vías o tipos celulares en los cuales se expresa *Gfra2* o puede tener una función, como son: los co-receptores de la familia *Gfra2*, la vía de señalización de RET, y las células madre hipofisarias.

Gfra2 es uno de los miembros de la familia *Gfra*, en la cual también están incluidos *Gfra1*, *Gfra3* y *Gfra4*, siendo minoritarios los dos últimos. No obstante, a excepción de *Gfra1*, el conocimiento de los demás miembros de la familia *Gfra* es prácticamente un libro en blanco. En humano y rata, se mantiene la co-expresión de los 4 miembros de la familia *GFR α* y del receptor RET en las células madre del nicho hipofisario (117) y también se encuentran en células de la adenohipófisis (117), pese a que ya no se encuentran todos los *GFR α* s en las mismas células. *GFR α 1* se expresa principalmente en las células somatotropas, al igual que RET. *GFR α 2* puede aparecer en las prolongaciones de células madre que parten del nicho hipofisario, y finalmente, *GFR α 3* y *GFR α 4* aparecen como un pequeño porcentaje

de células aisladas por la adenohipófisis (117). La distribución de los RET y sus co-receptores Gfra se mantiene también en ratón, como se puede observar en los resultados que se han presentado en el ratón WT (*Gfra2^{+/+}*), con la excepción de Gfra3, que no se encuentra en las células madre del nicho en ratón, siendo probable que la expresión de este marcador no esté tan conservada como la de los otros Gfras en ratones. Además, la expresión de Gfra1, Gfra3, Gfra4 y de los dos ligandos mayoritarios, GDNF y neurturina, se mantiene en el ratón *Gfra2^{-/-}*. De esta forma, el hecho de que se sigan expresando los otros co-receptores en la misma intensidad y localización en el ratón KO con fenotipo permite descartar que uno de los otros co-receptores pueda suplir la ausencia de Gfra2 en las células del nicho hipofisario al mismo tiempo que es posible postular que cada uno de los miembros de esta familia está involucrado en sus propias funciones y pese que se expresen en el mismo tipo celular, no existe redundancia. Este fenómeno de solapamiento de funciones entre Gfra1 y Gfra2 sí que se ha observado en otros tipos celulares, como pueden ser motoneuronas en el sistema nervioso central (35, 257, 258), neuronas dopaminérgicas y parasimpáticas de los ganglios submandibulares (259), células de Leydig (260), cardiomiocitos (150) y timocitos inmaduros (155).

El receptor RET y la señalización mediada por GDNF y GFR α 1 es fundamental para la regulación de las células somatotropas de la hipófisis, promoviendo la activación de rutas que favorecen la proliferación y supervivencia celular en presencia de GDNF o induciendo apoptosis de estas células en ausencia del ligando (52, 53). Es debido a esta naturaleza dual que RET se considera un receptor de dependencia (55). Ambas vías de señalización (supervivencia y apoptosis) han sido estudiadas en el ratón *Gfra2^{-/-}*. No se observaron cambios en la expresión del receptor RET en ratones con genotipo KO, igual que no se observaron variaciones en una de las principales proteínas implicadas en la vía de señalización por la activación de RET tras la unión de GDNF: Akt. Los niveles de Akt y la forma activa de Akt (pAkt) no se ven alterados respecto a los ratones WT. Por otra parte, se estudió la vía de apoptosis mediada por RET en ausencia de ligando, y la expresión de todas las proteínas se mantiene en los

animales *Gfra2*^{-/-}. Sin embargo, hay un aumento de la activación de PKCd (Aumento del ratio pPKCd/PKd) en ratones KO. Además, hemos detectado un aumento significativo en el número de células positivas para Casapasa-3 activa en la hipófisis en el ratón KO. Hasta el momento solo se ha descrito que la señalización de RET esta mediada por la formación del complejo con GDNF y GFR α 1 (52, 53), y no hay artículos publicados en los que se relacione la vía de RET con GFR α 2 en la hipófisis. No existe co-localización de RET y GFR α 2 en las células somatotropas, pero receptor y co-receptor sí que se encuentran en las células del nicho hipofisario (117). Y pese a que esté descrito que la principal vía de señalización está mediada por la formación del complejo RET-GDNF-GFR α 1, existe promiscuidad en la unión entre ligandos GFLs y miembros de la familia GFR α , siendo posible la formación de los complejos RET-NTRN-GFR α 2, RET-GDNF-GFR α 2, RET-NTRN-GFR α 1 (150). Estos hallazgos permiten postular que uno de los motivos que llevan a la reducción del tamaño de la hipófisis en los animales KO para *Gfra2* es la mayor tasa de apoptosis de laa células de la adenohipófisis, siendo el porcentaje mayoritario células somatotropas.

Funcionalidad de las células madre en el ratón KO para *Gfra2*

El nicho de células madre está definido por GFR α 2, Prop1, y marcadores de célula madre (Sox2, Sox9, Oct4, KLF4...), sin embargo, en este campo es en el que más diferencias pueden encontrarse en el ratón *Gfra2*^{-/-}, donde se elimina la isoforma principal de Gfra2.

A nivel de expresión genética en hipófisis total, se encontró un aumento de la expresión de ARN mensajero de *Sox2*, *Sox9* y *Klf4*. Sox2 y Sox9, son dos marcadores importantes en el nicho de células madre, pero también de los progenitores dispersos de la adenohipófisis (118, 119). El caso de Klf4 puede resultar más sorprendente, puesto que lo único que se conoce sobre este marcador es que está presente en las células del nicho hipofisario. Por ello, se decidió continuar con el estudio de las proteínas Sox2, Sox9 y Klf4.

Por otro lado, *Prop1* y *Oct4* no presentaron diferencia en la expresión de ARNm. Respecto a *Prop1*, se trata de un factor de transcripción importante en la hipófisis con relevancia en la etapa embrionaria y los primeros días de desarrollo postnatal. La función embrionaria principal de este factor de transcripción se cree que es guiar a los progenitores de la bolsa de Rathke para formar el lóbulo anterior de la hipófisis, favoreciendo la proliferación de estos para la generación del órgano maduro (249). Defectos en *Prop1* llevan a un fallo de la migración de los progenitores, disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis, dando lugar a un desarrollo anómalo de la hipófisis prenatal, generando hipoplasia y ausencia total de células somatotropas, lactotropas y tirotropas (249), como ocurre en el ratón enano de Ames (*Prop1^{df/df}*). Tanto las características del ratón *Gfra2^{-/-}* como su fenotipo se diferencian enormemente de las que exhibe el ratón *Prop1^{df/df}*, unido a que su expresión se mantiene en el modelo *Gfra2*-KO, no continuamos con el estudio de *Prop1*, ya que no aparenta tener relevancia en este fenotipo.

Algo similar ocurre con *Oct4*, que originalmente se pensaba que su expresión estaba ligada exclusivamente a las células madre embrionarias (78), además de reportar que son los niveles de expresión de *Oct4* los que guían el mantenimiento o diferenciación de las células madre (81). “Niveles normales” de *Oct4* permiten a las células madre mantener su estado indiferenciado (261). El compromiso o progresión inicial hacia la diferenciación en neuroectodermo necesitaría un incremento de *Sox2* con reducción de *Oct4*; por el contrario, el paso a mesodermo necesitaría reducción de *Sox2* y aumento de *Oct4*. Como la hipófisis se incluye en el neuroectodermo, esta es la función que *Oct4* podría tener en las células madre del nicho hipofisario, mantener el estado pluripotencial.

Continuando con la expresión de las proteínas *Sox2*, *Sox9* y *Klf4*, se observa que *Sox2* y *Klf4* están más expresadas en los ratones *Gfra2^{-/-}*, mientras que en *Sox9* solo es posible observar una ligera tendencia al aumento. En base a estos resultados se decidió estudiar en más profundidad que ocurre con *Sox2* y *Klf4*, y para ello se realizaron

tinciones que aportasen más información sobre la distribución de estos dos factores de transcripción en la hipófisis adulta.

El conteo para las células Sox2+ en el nicho de los ratones *Gfra2*^{-/-} es mayor que en sus congéneres *Gfra2*^{+/+} en la edad adulta joven (P90-P120), sin embargo, este aumento es mucho menos marcado en animales que se encuentran en desarrollo. En torno al día postnatal 10, la hipófisis está muy activa debido al comienzo de la pubertad y del crecimiento longitudinal, en esta etapa se produce un importante reclutamiento de células madre del nicho hipofisario hacia la adenohipófisis para dar lugar a las células endocrinas que producirán las hormonas necesarias para satisfacer la demanda del organismo en un momento de cambio tan importante el inicio del crecimiento puberal (214, 262). En adultos, por otra parte, se ha publicado que el reclutamiento del nicho es prácticamente nulo cuando hay una demanda por fracaso del eje endocrino correspondiente. En esta edad en nuestro modelo, es posible ver que en ausencia de *Gfra2* ha aumentado el número de células madre (Sox2+) en el nicho, sugiriendo un fallo en el reclutamiento que ha dado lugar a este acúmulo. Debido a la inactividad del nicho en la edad adulta, no es descabellado pensar que este acúmulo de células madre en el nicho proviene ya de la etapa del desarrollo postnatal (118, 119). El aumento de la expresión de Sox2 no está únicamente relacionado con el nicho de células madre. Este factor de transcripción también puede encontrarse en los progenitores que se encuentran dispersos por la adenohipófisis. Estas células Sox2+ son las que dan lugar a todas las células endocrinas diferenciadas de la adenohipófisis (4). Los porcentajes de células Sox2+ en secciones de hipófisis WT corresponden con la nueva distribución de tipos celulares que describió Ruf-Zamojski tras sus experimentos de snRNAseq y snATACseq, donde muestra que el porcentaje de células madre en la hipófisis de ratones adultos es de en torno al 8-10% (8). No obstante, en los experimentos de secuenciación single-nuclei este porcentaje es relativo al número total de células de la hipófisis (teniendo en cuenta adenohipófisis, lóbulo intermedio y neurohipofisis) (8), y nuestros conteos son el porcentaje relativo a las células Sox2+ respecto al número total de células en la adenohipófisis. Por otra parte, los

resultados de secuenciación de Hou y colaboradores demuestran que en la hipófisis de ratones a día postnatal 12 (P12), el porcentaje de células madre también es de en torno 8-10% (9), aunque este baja a 5% a día P32 (9), demostrando que a medida que el desarrollo postnatal avanza, el número de células madre va disminuyendo. Nuevamente, estos porcentajes se calculan en base al total de células de la hipófisis. En este caso el porcentaje de células Sox2+ que encontramos en nuestros ratones WT es superior (en torno al 20%), pero se trata de animales en P10 a los que solo se les ha tenido en cuenta el total de células de la adenohipófisis para calcular el porcentaje. Además, tal y como se ve en los resultados de Hou y colaboradores, el número total de células madre decrece con los días (9), por lo que es probable que en ratones de diez días el número de células madre fuese más alto. En el caso del ratón KO para Gfra2 también existe un aumento importante en el porcentaje de estas células que están dispersas en la adenohipófisis. Además, en las secciones de parafina de adenohipófisis de ratón con genotipo KO, aparecen acumulaciones de células Sox2+ que en el caso de sus hermanos de camada WT casi no se encuentran. Estos datos indican un reclutamiento exacerbado de las células del nicho o una acumulación de progenitores comprometidos, y podrían sugerir que la diferenciación de estos progenitores en el ratón KO para Gfra2 está comprometida. El papel de Sox2 en la hipófisis es todavía sujeto de estudio, y su relevancia tanto en las células madre del nicho como en las progenitoras no está totalmente identificada, aunque en la etapa embrionaria se considere una proteína clave para el establecimiento de los distintos linajes endocrinos (263).

Un factor relacionado con el reclutamiento y la diferenciación es la proliferación celular. La hipófisis adulta es un órgano que no posee prácticamente recambio y la proliferación de las células que la componen se mantiene en unas tasas muy bajas, que solo se ven alteradas en situaciones fisiológicas concretas (118) o en respuesta a un daño que requiere de regeneración de parte de la glándula (213). Se sabe las células Sox2+ comprometidas tienen una tasa de replicación muy baja incluso cuando responden a la regeneración del tejido hipofisario en respuesta a daños causados a la glándula, y en estos

casos parece ser que son las células endocrinas diferenciadas las que activan la maquinaria celular encargada de la replicación y dan lugar a la recuperación de las células productoras de hormonas que se han perdido (264).

Como esperábamos, la actividad proliferativa del nicho en hipófisis adulta es muy reducida en ambos genotipos del modelo *Gfra2*-KO, encontrando menos de una célula proliferante (EdU+/Sox2+ en la línea) por sección de parafina. En la adenohipófisis los resultados encontrados son muy similares, siendo el porcentaje de células proliferando menor del 1% y no existen diferencias entre ninguno de los dos genotipos. En el modelo *Gfra2*-KO no se encontraron células Sox2 en estado proliferativo fuera del nicho, ni en los ratones con genotipo WT ni KO. Por otro lado, los resultados de proliferación aportan un dato cuanto menos sorprendente en los ratones en etapa de desarrollo postnatal. En estos animales la proliferación de las células del nicho está aumentada en casi un 40% y el aumento del porcentaje de células proliferantes en la adenohipófisis de estos animales es de aproximadamente el 100%. Pese al elevado aumento de la replicación celular, la hipófisis de los ratones KO a día 10 es más pequeña que la de los WT (5.500 células por sección para los WT frente a 3800 de los KO), por lo que es predecible que en esta etapa de la vida de estos animales se produzca algún evento que impida que esas células madre comprometidas completen el proceso de diferenciación terminal. Esta hipótesis concordaría con el mayor aumento de células Sox2+ en adulto, frente a la reducción de la población total endocrina, contada como número de células en la hipófisis. Otra hipótesis sería la muerte de estas células Sox2+ comprometidas, pero no creemos que sea posible dado el incremento del porcentaje de Sox2+ sobre el total de la hipófisis. Sin embargo, es difícil estudiar en la hipófisis entera el posible mecanismo, y para ello realizamos estudios *in vitro* (ver en siguiente sección). Recientemente fue publicado por el grupo de Hugo Vankelecom un estudio en el que incluye la secuenciación de *single cell* RNA de las células madre en la etapa temprana postnatal de ratón, y entre estos resultados destaca la activación de la vía de Wnt (215).

El importante aumento de la proliferación de células madre en el desarrollo postnatal de los ratones KO para *Gfra2* implica que las células entren más veces en ciclo celular y que por lo tanto completen más divisiones. Esto se traduciría en una hipófisis envejecida en la edad adulta, hecho que también hemos podido observar en la hipófisis de estos animales. La senescencia replicativa de este órgano se estudió en base a dos de los parámetros clave que la definen, parada completa del ciclo celular (con p21 como marcador más relevante junto a p53) y un acortamiento de la longitud de los telómeros. Respecto a p21, hay un aumento significativo de la expresión de esta proteína en el ratón KO para *Gfra2* respecto al WT, que se traduce en un aumento del número de células p21+ en la adenohipófisis y en el nicho de células madre. Esta senescencia replicativa afecta a todos los tipos celulares, ya que el porcentaje de células Sox2+/p21+ y Sox2+/GH+ (se utilizó GH como marcador de células endocrinas diferenciadas ya que las células somatotropas son el tipo más abundante) es más elevado en los ratones con genotipo KO. De la misma manera que ocurre con el aumento de la expresión de p21, las células de la hipófisis del ratón KO para *Gfra2* tienen de media los telómeros más cortos que las de los ratones WT, y no solo eso, si no que mediante la técnica de *Telomapping* es posible cuantificar en base a una escala arbitraria la longitud de los telómeros de cada célula individual. Las células madre del nicho de los ratones KO tienen los telómeros acortados. Los telómeros son las regiones situadas en los extremos de los cromosomas, y son una de las regiones más propensas a sufrir daño en el DNA. La DNA polimerasa es incapaz de replicar estas regiones teloméricas, y es necesaria una enzima diferente, llamada telomerasa, que también actúa como una DNA polimerasa. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas no expresan la telomerasa, lo que produce un acortamiento de los telómeros a medida que las células van completando procesos replicativos (216). Un caso contrario al visto en el ratón KO para *Gfra2* es el que ocurre en el modelo animal KO para *Cdk4*, una proteína dependiente de quinasas implicada en la progresión de la fase G1 del ciclo celular (265). Los animales KO para esta proteína tienen una hipófisis de tamaño muy reducido, lo que implica una mayor proporción de células GPS que en animales WT de

la misma cepa. Sin embargo, al no poder progresar en el ciclo celular, las células de la hipófisis de estos ratones no proliferan y por lo tanto poseen unos telómeros más largos al no haber sufrido acortamiento en cada replicación (5). En este modelo se acumularían las células madre GPS Sox2+/Gfra2+, mientras que en nuestro modelo se acumularían las células comprometidas Sox2+/Gfra2-.

Para poder ahondar más en el reclutamiento de las células del nicho que se produce en el ratón KO, se buscó realizar experimentos que permitieran marcar las células madre de los ratones antes del día 10 postnatal para seguirlas hasta los diferentes periodos estudiados. El modelo buscado fue similar al que había utilizado los grupos de Lovell Badge (118) y Martínez Barberá (119) en 2013. Lovell-Badge utilizó un modelo de seguimiento de las células Sox2+ en el que uno de los dos alelos del gen *Sox2* se había sustituido por el constructo Cre-ERT2 y estos ratones se cruzaron con la línea genéticamente modificada R26-Stop-EYFP. En estos ratones el gen que codifica para la proteína fluorescente se encuentra bajo el control del promotor ubicuo Rosa 26, pero está precedido por una secuencia Stop flanqueada por los sitios LoxP. Con la administración de Tamoxifeno que se une a ERT2, se activa la dimerización de la Cre-ERT2, volviéndose activa. Se produce entonces la recombinación mediada por la enzima Cre-recombinasa y aquellas células que expresan Sox2 comienzan a expresar también EYFP. Al momento de la activación del modelo, son casi exclusivamente las células del nicho las que expresan EYFP, sin embargo, con el paso del tiempo, las células EYFP+ co-expresan marcadores de células diferenciadas, demostrando de esta manera que las células endocrinas derivan de las células Sox2+ (118). Para poder estudiar el reclutamiento de las células madre del nicho hipofisario en ausencia de un marcador fundamental, como es *Gfra2*, generamos un modelo animal que permitiera realizar un marcaje y seguimiento de estas células. El mecanismo seguido fue establecer una línea estable mediante cruce de la cepa *Gfra2*-KO con la R26-Stop-EYFP, y posteriormente incluir el alelo CRE-ERT2. La obtención de la línea triple mutante que dio lugar a animales con genotipo *Gfra2*^{-/-}, *R26*^{YFP+/+}, *Sox2*^{CreERT2+/-} fue un proceso muy costoso y poco eficiente, debido a las propias

dificultades intrínsecas de los diferentes modelos, que se acentuaban al combinarse en el mismo animal. El gen *Sox2* es fundamental para el desarrollo, por lo que el alelo mutado *Sox2^{CreERT2}* no puede encontrarse en homocigosis ya que la eliminación completa del gen *Sox2* da lugar a una disrupción de la homeostasis epitelial, y otras alteraciones en el desarrollo embrionario por haploinsuficiencia, que resulta letal para el individuo (266). Por otra parte, las hembras con genotipo *Gfra2^{-/-}* no son fértiles en el fondo genético C57BL/6, dando lugar a la imposibilidad de fijar el genotipo KO. Se establecieron diferentes cruces a lo largo de varios años con el objetivo de obtener ratones *Gfra2^{-/-}*, *R26^{YFP+/+}*, *Sox2^{CreERT2+/-}* con los que poder estudiar los procesos de reclutamiento a diferentes periodos de la vida de los ratones, principalmente los dos utilizados en la presente tesis doctoral, que son el final del crecimiento longitudinal (día 90-100) y el desarrollo postnatal (día 10). No obstante, la recombinación genética no fue el único problema encontrado, y es que los ratones neonatos parecían ser muy sensibles al Tamoxifeno, perdiendo muchas camadas enteras hasta que la dosis fue completamente estandarizada. Las hembras utilizadas en cruces se mantenían junto al macho tras el nacimiento de las crías, para favorecer el efecto del celo post-parto y poder estar disponiendo continuamente de camadas. Además, las hembras a cuyas crías se les había administrado Tamoxifeno durante la lactancia no produjeron más camadas o en caso de hacerlo, tardaban meses y las camadas producidas eran muy pequeñas, lo que obligaba a estar renovando los cruces constantemente.

Volvimos entonces a estudiar el ratón *Gfra2* inicial. De entre los marcadores que definen a las células madre de la hipófisis, está descrito que *Klf4* se expresa en las células GPS, sin embargo, no se apreciaron diferencias en cuanto a la distribución de esta proteína en el nicho de células madre de la hipófisis de los ratones KO respecto a los WT. No obstante, en las tinciones realizadas para la detección de *Klf4* es posible observar una población de células positivas para este marcador en la adenohipófisis. Las células *Klf4+* están dispersas por la adenohipófisis, pero no siguen una distribución homogénea, como podría ser el caso de aquellas *Sox2+*. Las células que presentan este marcador pueden encontrarse aisladas o en pequeños grupos en el

parénquima de los laterales de la glándula, pero el mayor acúmulo de células positivas para Klf4 aparece en la parte central, cerca del nicho. El compartimento celular esperado para Klf4 es el núcleo ya que se trata de un factor de transcripción que se une a ADN o a otros factores de transcripción para llevar a cabo sus funciones, sin embargo, en la adenohipófisis además de aparecer en los núcleos de algunas células, también se encuentra en el citoplasma de éstas, y en otras tiene una localización totalmente citoplasmática. Este resultado puede parecer llamativo, pero se ha descrito en diferentes tejidos una expresión en esta localización celular. En el esófago KLF4 tiene localización tanto nuclear como citoplasmática en las células escamosas del epitelio (267). En las células vasculares del músculo liso Klf4 se expresa en el citoplasma y su función está más relacionada con la estabilización del citoesqueleto (268). También se ha detectado expresión de Klf4 citoplasmático en hepatocitos y hepatocarcinomas (269) o en cáncer de próstata (270). Sin embargo, la función de KLF4 citoplasmático es todavía una incógnita en la mayoría de los tejidos en los que se ha encontrado. En relación a las funciones de Klf4 nuclear, actúa como factor de transcripción modulando procesos de mantenimiento de la capacidad de auto renovación y mantenimiento de pluripotencia de las células madre embrionarias (86), inhibición de la proliferación celular (85, 271) inducción de la diferenciación (272-274) y finalmente posee un papel dual en la apoptosis (275, 276).

En la hipófisis del ratón KO para *Gfra2* el aumento del número de células KLF4+ en la adenohipófisis parece estar más ligado con la senescencia. Ya que la expresión de p21 está muy aumentada en estos animales, y hay un mayor número de células p21+ en la adenohipófisis de los ratones KO para *Gfra2*. Estudios llevados a cabo por Xu y colaboradores demostraron que Klf4 promueve senescencia tanto *in vitro* como *in vivo*, y que regula directamente a la proteína p21, uno de los marcadores de senescencia por excelencia. Además, Klf4 también actúa regulando a p21 de forma indirecta mediante un complejo formado por survivina y miR-203 (267). Un caso contrario (pero que aporta información en la misma línea) es el reportado por Katz y colaboradores, que describieron que la ausencia de Klf4 en el intestino deriva en hipertrofia de este órgano a largo plazo, además la

expresión de p21 se ve enormemente reducida (272). Técnicamente no fue posible obtener una tinción doble para detectar células Klf4+/p21+, debido a las dificultades para conseguir una tinción aceptable para el marcador p21. Aunque esta tinción podría ser de gran utilidad para desenmascarar la función de Klf4 en las células de la adenohipófisis no solo en el ratón KO para Gfra2 sino también para la fisiología de este órgano.

Estudios in vitro de la población de células madre Sox2+

El estudio en exclusividad del nicho presenta dificultades debido a que las células que lo conforman suman menos del 1% del total de células de la hipófisis (5). Para corroborar nuestras hipótesis sobre la senescencia de las células madre Gfra2-, generamos cultivos primarios a partir de células madre de hipófisis. El protocolo que teníamos estandarizado previamente en el laboratorio consiste en la selección mediante anticuerpos de una proteína de la superficie de la membrana plasmática exclusiva de estas células: Gfra2. Posteriormente un anticuerpo secundario marcado con partículas magnéticas se une al anticuerpo 1nti-Gfra2 y la suspensión celular se pasa por una columna sujeta en un imán, separando de esta manera la fracción Gfra2+ y Gfra2- (5). Lamentablemente, este marcador no puede utilizarse en un animal KO para la isoforma de superficie del mismo, por lo que fue necesario buscar un método diferente de cultivo de estas células.

Desde el grupo de Gleiberman desarrollaron un tipo de cultivo en el que las células de hipófisis crecen formando colonias adheridas al material de cultivo cuando se añade al medio bFGF y toxina del cólera (200). Las células madre se pegan al plato de cultivo y forman colonias. Hasta el día siete las colonias crecen formando una monocapa, pero a partir de este momento empiezan a sufrir diferenciación espontánea y expresan algunos marcadores de células endocrinas como ACTH, α GSU, LH, FSH o Pit (200). Se trata de un método de cultivo ampliamente utilizado en diferentes grupos de investigación para estudiar las células madre hipofisarias (119, 222, 277). Estas colonias están caracterizadas para algunos marcadores

propios de células madre: nestina, Sox2, Wnt3a o CD34 (200). En nuestros experimentos se generaron cultivos de colonias de células madre hipofisarias a partir de hipófisis de ratones adultos y se dejaron crecer hasta el séptimo día, momento previo al que empieza la diferenciación espontánea. En los pocillos correspondientes a ratones WT el número de colonias formadas tras una semana fue de una media de aproximadamente 140, por 100 que se formaron en los cultivos de ratones KO. Esto sugiere que bajo estas condiciones de cultivo las células Sox2+ de los animales WT que poseen Gfra2 son capaces de establecer colonias desde una única célula y proliferar más activamente. De la misma manera, se realizó una división en base al tamaño de las colonias, diferenciando entre las que tenían hasta 20 células o más de 20 células. En los pocillos correspondientes al ratón KO el número de colonias grandes (>20 células) no presentó diferencias respecto al WT.

Posteriormente se realizaron tinciones para los mismos marcadores que habían sido estudiados previamente: Sox2, Klf4, GH, Pit, p21 y EdU, como indicador de proliferación activa. En ambos cultivos es posible encontrar la tinción nuclear propia de los factores de transcripción Sox2 y Klf4, sumando este último a la lista de marcadores que definen las células crecidas mediante este protocolo. Respecto a GH y Pit, no aparecieron células GH en ninguno de los cultivos a día siete, confirmando que no se ha completado ningún proceso de diferenciación celular hasta ese momento. Aunque, por otra parte, es posible observar algunas células Pit1+ en las colonias. El número de células Pit1+ es muy reducido, sin embargo, la cantidad de células positivas para Pit1 es ligeramente mayor en los cultivos de hipófisis de ratones WT para Gfra2, permitiendo postular que en los cultivos de ratones KO está comprometida la diferenciación espontánea de estas células tras 7 días. Finalmente, aparecen significativamente más células EdU+ en los cultivos de células de ratón WT y más células p21+ en los pocillos que contenían células de ratón KO. Estos resultados siguen la misma línea que lo encontrados *in vivo*, y es que las células madre de los ratones KO son intrínsecamente senescentes y tienen dificultades para generar una colonia proliferando.

Este método de cultivo puede resultar interesante para estudiar la diferenciación de las células GPS en ausencia de *Gfra2*. Las colonias empiezan a sufrir una diferenciación espontánea a partir del séptimo día, y nuestra tinción para Pit1 parece sugerir que la diferenciación de las células del ratón KO podría estar comprometida. La utilización de factores que permitan dirigir la diferenciación hacia uno de los 5 tipos endocrinos (5) consistiría en una potente herramienta para conocer que señalización está involucrada en la diferenciación de cada uno de estos tipos celulares al tiempo que permitiría delimitar cuales de estas vías están alteradas en las células madre del ratón KO para *Gfra2*.

El modelo de ratón *Gfra2*-KO también ha sido utilizado para estudiar la regulación colinérgica de las células madre del nicho hematopoyético (HSCs). La regulación de este nicho está mediada tanto por el sistema nervioso parasimpático como simpático, incluyendo inervación adrenérgica y colinérgica en este último (151). La ausencia de *Gfra2* se traduce en una disminución de la actividad nerviosa colinérgica y un aumento de la actividad noradrenérgica, que a su vez lleva a un aumento importante del número de células madre hematopoyéticas y glóbulos blancos que son reclutados de la médula ósea. Pero este tráfico es bidireccional, ya que también aumenta el número de estos dos tipos celulares que retorna hacia la médula ósea (151). En las investigaciones posteriores llevadas a cabo en este mismo grupo de investigación realizaron una secuenciación de ARN de célula única (*single cell RNAseq*) utilizando células madre hematopoyéticas de ratones WT y KO para *Gfra2*. Análisis mediante GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) permitieron valorar que en las HSCs del ratón KO la quiescencia de estas células no se mantiene y están aumentados los genes relacionados con la proliferación (ciclo celular, mitosis...) (152). Estos resultados siguen la misma línea que nuestros resultados del reclutamiento amplificado producido en la hipófisis del ratón KO durante el desarrollo postnatal.

Gfra2 es una proteína expresada en las células madre hemtopoyéticas, y en ausencia de la misma se ha demostrado que existe una disminución en la expresión de los genes relacionados con *Gfra1* y RET en las HSCs de los ratones KO para *Gfra2*, siendo esta

señalización de gran relevancia en las capacidades de autorrenovación y proliferación de las HSCs (154). Por otro lado, la señalización mediada por Notch1 aparece enriquecida en las células madre hematopoyéticas del ratón WT para *Gfra2* (152). No obstante, pese a que los autores no hablan de los marcadores que hemos visto aumentados en la hipófisis del ratón KO para *Gfra2*, nosotros hemos visto que en sus datos de secuenciación se produce un enriquecimiento en la expresión de RNA en los genes *Klf4* y *Cdkn1a*, ambos relevantes en nuestro fenotipo hipofisario. Esta información es relevante para guiar los próximos pasos de nuestro estudio, y está planteada la realización un experimento de secuenciación espacial (*Visium Spatial Gene Expression*) en secciones de hipófisis, para determinar las diferencias en el programa genético de las células madre del nicho y de las progenitoras en los ratones KO adultos (P90-100) y en desarrollo (P10). De esta manera va a ser más fácil encontrar las rutas que están alteradas en estos animales, y así poder conocer la señalización que se encuentra detrás de las alteraciones ocasionadas por la ausencia de *Gfra2*. Antes planteábamos la posibilidad de alteraciones en la vía de Wnt (215) y ahora Notch1 (152), ambas muy importantes en la señalización de las células madre hipofisarias. No obstante, nuestros resultados actuales con extractos de hipófisis total no demuestran alteraciones en la expresión de β -catenina en adultos (sería necesario estudiar los niveles de β -catenina fosforilada). Estos estudios son preliminares dentro de la vía de Wnt, y no permiten descartar que se produzcan alteraciones mediadas por esta familia de ligandos. Los resultados de proliferación del nicho y de las células de la adenohipófisis encontrados a P10 parecen indicar que las alteraciones en las rutas podrían encontrarse a esta edad y no tanto en la edad adulta, como pensábamos en un inicio.

Como resumen general, la ausencia de *Gfra2* produce una sobreactivación de las células del nicho hipofisario durante el desarrollo postnatal que se traduce en un aumento de progenitores dispersos por la adenohipófisis, sin embargo, la diferenciación final de estos no se completa (con los datos actuales no es posible conocer el motivo) y es predecible que se produzcan eventos de muerte celular para regular el número de células que conforman la hipófisis, dando

lugar a una hipófisis de menor tamaño. En la edad adulta la proliferación celular se acerca a los valores normales, pero el número aumentado de progenitores senescentes se mantiene. Al haber menos células, el número de cada uno de los cinco tipos endocrinos se reduce, pero esto no implica una reducción en la secreción de la mayoría de las hormonas, ya que el eje hipotálamo-hipofisario se regula de forma compensatoria. No obstante, esto no ocurre en las células somatotropas, que son las células más abundantes de la hipófisis, ya que existe una fase esencial de reclutamiento de progenitores en la etapa temprana postnatal, que queda muy afectada en el ratón KO y que produce una disminución relevante del número de somatotropas, el cual no es capaz de ser compensado por el eje y produce el fenotipo de enanismo. Además, el exceso de proliferación en el desarrollo postnatal da lugar a una población de células madre senescentes que da lugar a una hipófisis envejecida en la edad adulta.

¿Son las células madre una potencial terapia para el tratamiento de enfermedades como el hipopituitarismo?

Desde hace décadas se comenzó a plantear la posibilidad de que las células madre pudieran convertirse en una terapia adecuada para el tratamiento de enfermedades. Y desde hace algunos años, es posible el uso de células madre de la médula ósea (HSCs) para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (278) o incluso potenciar la capacidad de estas células para diferenciarse a condrocitos y recuperar el cartílago dañado de las articulaciones (279). La posibilidad de utilizar las células madre en terapia es la que nos llevó a plantear la siguiente cuestión: ¿podrían utilizarse las células madre hipofisarias para tratar enfermedades como el hipopituitarismo? Y en esta pregunta se basó el siguiente objetivo del trabajo, que consistió en determinar si el trasplante de células era capaz de revertir el fenotipo que estaba causando la ausencia de *Gfra2*.

La línea triple mutante *Gfra2-KO; B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J; B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J}}* presentaba dificultades para la obtención de un número suficiente de animales con genotipo KO para *Gfra2*, no obstante, la obtención de animales WT únicamente contaba

con las limitaciones derivadas de la necesidad de mantener el genotipo $Sox2^{CreERT2+/-}$ en heterocigosis. Estos animales actuaron como donantes, ya que la activación de la recombinasa CRE iba a permitir a las células obtenidas de estos ratones expresar GFP de forma constitutiva, una herramienta muy útil para validar la implantación de estas células en la hipófisis de los ratones KO para $Gfra2$ ($Gfra2^{-/-}$). Como se comentó anteriormente, el aislamiento de células madre hipofisarias había sido desarrollado y puesto a punto previamente en nuestro grupo de investigación (5). Este protocolo se basa en la selección de las células vivas $Gfra2+$ mediante el uso de anticuerpos combinados con partículas magnéticas que quedan retenidas en una columna de separación tras colocarla en un imán. Estas células formaban esferoides al cultivarse en el medio adecuado y mantenían la capacidad de diferenciarse in vitro (5).

La implantación de las células en las camadas receptoras se realizó a día postnatal 2 a través del canal auditivo, ya que en roedores éste se encuentra alineado con la hipófisis en los primeros días de vida, y así se evita dañar estructuras importantes (199). Y se realizó un seguimiento de los animales hasta llegar a la edad adulta.

Se obtuvieron dos ratones KO a los que se les habían inyectado células madre tras el nacimiento, un macho y una hembra. Este macho, al que se le denominó R7 dentro del experimento, comenzó el seguimiento con la talla esperada para un ratón KO para $Gfra2$ de su edad, pero fue a partir de la séptima semana (antes del día postnatal 50) cuando la longitud de este animal aumentó hasta quedar en la media de los ratones WT y posteriormente se mantendría en esos valores. Algo similar ocurría con el peso, en la séptima semana se produce una ganancia de peso importante, pero en este caso no se alcanza el valor medio que presentan los ratones WT, ni en este momento ni tras alcanzar la edad adulta. En base a estas dos medidas se puede afirmar que este ratón recuperó parcialmente el fenotipo. Por el contrario, el ratón R6 (hembra KO para $Gfra$) no consiguió recuperar el fenotipo y durante todo el ensayo mantuvo un tamaño y un peso en línea con el esperado para una hembra KO para $Gfra2$ de esa edad. Esta recuperación parcial del peso del ratón concuerda con

lo publicado anteriormente por el grupo de Airaksinen, que ya había descrito que el ratón KO para *Gfra2* poseía un déficit en la innervación colinérgica del aparato gastrointestinal y las glándulas salivares (65, 68), ocasionando una disminución del peso de estos animales. Consiguieron recuperar ligeramente el peso mediante dieta húmeda, pero no fue suficiente para revertir completamente las diferencias ocasionadas por la ausencia de *Gfra2* (68). Desde el mismo grupo de investigación aseguraron que parte de este fenotipo era debida al déficit de la innervación del plexo mientérico que ellos habían descubierto, pero dejaban la puerta abierta a otras posibilidades. Sumando el resultado de la recuperación parcial del peso del ratón R7 en este experimento de rescate del fenotipo, y la afirmación de Airaksinen de que la dieta húmeda también recupera parcialmente el peso de los ratones KO (68), es posible afinar en el conocimiento de todos los sistemas en los que *Gfra2* es relevante. De esta forma, se complementan las teorías del enanismo hipofisario y de los desórdenes gastrointestinales debidos a la alteración de la innervación del plexo mientérico. Debido a que en nuestro caso se trató de un experimento piloto en el que solo se contó con un animal, se realizó exclusivamente un seguimiento de la longitud y el peso y no se alimentó al animal con dieta húmeda, pero es una posibilidad que se mantiene abierta.

Además, el ratón R7 no solo recuperó la longitud y parte del peso, si no que todas las características morfológicas asociadas con el eje hipotálamo-hipófisis que involucra a GH e IGF-1 habían sido recuperadas también (199, 211, 212). En la edad adulta es posible distinguir los ratones WT y KO del mismo sexo en base al tamaño de estos, y sorprendentemente, la distinción de R7 de sus compañeros de camada no resultaba tan sencilla, pues su tamaño y el de sus caracteres físicos resultaba indistinguible a simple vista. No obstante, las medidas de las características físicas del ratón hembra R6 tuvieron unos valores en la media de lo esperado para un ratón hembra KO adulto.

Puede considerarse que la implantación de las células madre tuvo un 50% de éxito, y que éstas se mantuvieron en la hipófisis de los

ratones receptores hasta la edad adulta. Gracias a la detección de GFP, fue posible mediante inmunofluorescencia que las células habían sobrevivido durante más de 90 días en la hipófisis. Y estas células no solo habían sobrevivido, sino que además también habían dado lugar a células diferenciadas GH+/GFP+/Sox2-. En cuanto a los resultados obtenidos en la hembra R6, es posible que ocurriera algún fallo técnico durante la inyección de las células en el animal neonato, debido a que se trata de un procedimiento complejo que incluso con experiencia es difícil afirmar que está realizándose correctamente. Incluso después de haber realizado múltiples ensayos previos inyectando tinta china mediante esta vía a ratones neonatos. Estos animales fueron sacrificados inmediatamente después de la inyección y pudo comprobarse en un gran porcentaje de ellos que la tinta china se había depositado en la hipófisis, sin embargo, la inyección no supuso un éxito del 100%. Otras alternativas podrían ser que la implantación fracasase en este ratón, ya que, en las tinciones realizadas tras terminar el seguimiento de los animales, no fue posible encontrar células GFP+ en la hipófisis de la hembra R6. Otra de las causas posibles es que el sexo pueda estar influenciando la viabilidad de las células inyectadas, pero en este caso descartamos esa posibilidad porque en una de las hembras heterocigotas (R11) si fue posible detectar células GFP+ implantadas en su hipófisis tras terminar el ensayo.

Este experimento de rescate del fenotipo es un estudio piloto en el que por circunstancias técnicas solo ha podido realizarse una vez. El establecimiento de la cepa triple mutante *Gfra2*-KO; *B6*; *129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch}/J*; *B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}/J* fue un proceso extremadamente costoso, y la obtención de animales que poseyeran el triple genotipo deseado resultó una tarea ardua. Por lo que no es posible lograr conclusiones definitivas de este experimento, y va a ser necesario obtener un número mayor de ratones KO con células *Gfra2*+ viables correctamente implantadas en la edad adulta. En esta continuación del experimento sería conveniente medir los niveles de GH e IGF-1 de los ratones en diferentes puntos del seguimiento y al final del experimento, para confirmar que la

concentración de estas dos hormonas se recupera con el trasplante de células Gfr α 2+.

Desde la década de 1950 se han realizado experimentos consistentes en el trasplante tejido hipofisario para el estudio de la regulación de esta glándula (280-282), pero no fue hasta 1969 que en el grupo de investigación de Yumiko Ohtsuka utilizaron explantes de hipófisis consistentes en grupos de células cromóforas (las que en ese momento se consideraban como células diferentes a las endocrinas, cromófilas) para ser implantados en ratas hipofisectomizadas (283) en una localización que previamente se había definido como área hipofisiotrófica del hipotálamo (283, 284). En estos experimentos, los explantes de células cromóforas del área hipofisiotrófica habían proliferado y dado lugar a células cromófilas, a diferencia de los explantes que a modo de control se habían implantado en la corteza cerebral o bajo la corteza suprarrenal, que en este caso no estuvieron bajo la influencia del control de los factores hipotalámicos (283). Posteriormente, en 2007, Lepore y colaboradores trasplantaron una población celular enriquecida en células formadoras de colonias en cámaras de silicona, e implantaron éstas en la arteria epigástrica de ratones SCID. Después de 6 semanas, fue posible detectar células GH+, sugiriendo que las células que habían implantado tenían la capacidad de diferenciarse a células somatotropas *in vivo* (285). También en 2007, U y colaboradores implantaron células madre del sistema nervioso central, obtenidas a día embrionario E12, directamente en la hipófisis de ratas adultas mediante cirugía estereotáxica. Gracias a que las células implantadas habían sido infectadas con GFP, a las 4 semanas pudieron comprobar que se habían diferenciado a células productoras de GH, PRL y FSH. Los factores hipotalámicos y de la propia hipófisis habían guiado la diferenciación de estas células según las necesidades de la hipófisis (286). Sin embargo, en este último experimento se desconocía si el tejido hipofisario normal era determinante en la proliferación y diferenciación de estas células. Y además las células transplantadas habían sido muy poco caracterizadas para nuestra visión actual; por otra parte, hoy sabemos que las neuronas del SNC expresan individualmente muchos de los genes comúnmente encontrados en el

Sistema Endocrino, por lo que es difícil valorar si el destino de diferenciación final de las células implantadas se modificó realmente.

El trasplante de células llevado a cabo en el modelo *Gfra2*-KO es el siguiente paso en estos experimentos, ya que en este experimento piloto hemos demostrado que las células madre son capaces de implantarse y dar lugar a células endocrinas incluso en la hipófisis de un modelo de enanismo. No obstante, es necesario profundizar más en el conocimiento de estas células y en su comportamiento antes de sacar conclusiones que sugieran que este proceso puede ser escalado a la clínica.

La tecnología *Light-Sheet* en el estudio de la hipófisis

Las etapas críticas de la preparación de las muestras que van a ser observadas en un microscopio *Light-Sheet* son el clarificado y la tinción con anticuerpos. Es importante obtener muestras transparentes que no dispersen la luz cuando son atravesadas por el haz láser, y al mismo tiempo es fundamental que los anticuerpos se unan al antígeno de forma no saturada pero específica en un órgano entero. Son multitud las variables que pueden influir en este proceso, algunas dependientes de las etapas de clarificado y tinción, otras intrínsecas de la muestra con la que se está trabajando (como por ejemplo el hueso, cuyo tejido duro presenta dificultades a la hora de ser clarificado (287), u órganos muy vascularizados como el riñón (288)).

Nosotros hemos probado tres métodos de clarificado diferentes. Dos de ellos, VISIKOL e iDisco, están clasificados como métodos orgánicos y se basan en el uso de disolventes orgánicos para dar transparencia al tejido. Por otro lado, están los métodos acuosos, que se basan en la eliminación de los lípidos de la muestra, que son las biomoléculas que le confieren su opacidad al tejido. El método acuoso utilizado fue X-CLARITY.

En base a nuestra experiencia, los métodos orgánicos no son los más adecuados para el clarificado y la tinción de hipófisis de ratón. Es cierto que el grado de transparencia obtenido con el método de iDisco

es adecuado (no ocurre lo mismo con VISIKOL), sin embargo, debido a las características de estos protocolos, la deshidratación de la muestra produce que el tamaño de la hipófisis se reduzca a un volumen inferior a la mitad del original, al tiempo que confiere al tejido una mayor dureza y fragilidad. Para órganos de mayor tamaño estas características pueden considerarse ventajosas ya que facilitarían la obtención de imágenes, pero en la hipófisis de ratón dificultan el manejo y la adecuada colocación de las muestras en el microscopio *Light-Sheet*, que no deja de ser un microscopio óptico. Es posible utilizar agarosa para facilitar el trabajo con la muestra una vez ésta ha sido teñida, pero el clarificado posterior no permite igualar el índice de refracción de la muestra y del bloque de agarosa, provocando refracción de la luz e imposibilitando el correcto enfoque de la muestra, lo que dará lugar a imágenes sin nitidez suficiente. Además, la tinción presenta dificultades en estos protocolos, al ser la hipófisis un órgano muy compacto con una elevada densidad celular, la penetración de los anticuerpos no es la adecuada y se produce un efecto borde muy intenso que no permite apreciar bien la tinción.

Por el contrario, el método acuoso X-CLARITY permitió la obtención de muestras con un grado de transparencia aceptable, aunque no tan cercano a la transparencia total como con iDisco. Además, en los métodos acuosos se genera una matriz de hidrogel en el interior del órgano, que al eliminar los lípidos se expande y da lugar a un aumento del volumen del órgano, al tiempo que le otorga una consistencia blanda como la de un gel. Esta consistencia facilita el manejo de las muestras. Este método es irreversible debido a que los lípidos se eliminan tras someter al tejido a una corriente constante de un detergente (SDS), pero la estructura se mantiene y el resto de las macromoléculas quedan retenidas en la matriz del gel. La penetración de los anticuerpos resultó más eficaz que en los métodos orgánicos, y las tinciones conseguidas son más claras y precisas, evitando el efecto borde antes mencionado. En las imágenes que hemos conseguido de muestras bien teñidas y clarificadas con X-CLARITY puede

apreciarse le nicho con mucha resolución. Además, se observan las estructuras de células madre que salen del nicho ((118, 119)). El grado de clarificado y tinción obtenidos también permiten distinguir las células Sox2+ dispersas por la adenohipófisis. Por lo que la técnica de X-CLARITY parece ser la más adecuada de las 3 que se han probado para ser utilizadas con un órgano pequeño de complejas características como es la hipófisis. Finalmente, una de las ventajas de esta técnica es que mantiene la fluorescencia endógena, que facilitaría en gran medida la observación de muestras en las que se activase la expresión endógena de GFP (289), como el modelo de seguimiento que hemos generado en la cepa triple mutante *Gfra2-KO; B6;129S-Sox2^{tm1(cre/ERT2)Hoch/J}; B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/J}*.

Una alternativa que nosotros no hemos probado pero que sí han reportado otros grupos es la combinación de varios métodos de clarificado, uno acuoso y otro orgánico, que permitan aunar las ventajas de cada uno de ellos al mismo tiempo que se disminuyen los inconvenientes. Una de estas combinaciones es la de iDisco + CUBIC en ovario de ratón (290). En este protocolo los autores aprovechan las etapas de tinción de iDisco que son más adecuadas en la tinción de ovario de ratón, y terminan el protocolo mediante el clarificado del método acuoso CUBIC, obteniendo imágenes de gran resolución con tinciones

La aparición de nuevos métodos de clarificado junto con las mejoras que se van implementando en los ya existentes hacen que la tecnología *Light-Sheet* esté en evolución continua, buscando y encontrando soluciones que permitan la obtención de un grado de clarificado óptimo y tinciones de calidad. Pero ahora mismo ya es posible confirmar el potencial de este tipo de microscopia en el estudio de órganos y tejidos en 3D (291).

CONCLUSIONES

1. El modelo de ratón $Gfra2$ -KO tiene eliminadas en la hipófisis dos de las isoformas de $Gfra2$ (201 y 203) pero sigue expresando la isoforma 202 y una forma nueva de splicing alternativo de ésta.
2. El ratón KO para $Gfra2$ presenta un fenotipo de enanismo en el que presenta una disminución de la talla y el peso, características físicas derivadas del eje hipotálamo-hipofisario-GH/IGF-1 y una hipófisis con un volumen disminuido.
3. El ratón KO para $Gfra2$ presenta un fenotipo de enanismo hipofisario derivado de una disminución en la producción de GH e IGF-1.
4. La ausencia de $Gfra2$ no se compensa con ninguno de los otros miembros de la familia de co-receptores $Gfra$, ya que la expresión y distribución de estos no cambia en la hipófisis del ratón KO.
5. El reclutamiento de las células del nicho hipofisario se encuentra alterado en el ratón con genotipo KO para $Gfra2$ durante el desarrollo postnatal y se mantiene en la edad adulta. El nicho de los animales KO posee un mayor número de células Sox2+, al mismo tiempo que existe un mayor número de progenitores comprometidos Sox2+ en la adenohipófisis de estos animales.
6. Se produce un aumento de la activación de PKCd y Caspasa-3, indicando un aumento de la muerte celular por apoptosis, mecanismo que compensa las alteraciones en el reclutamiento por parte del nicho hipofisario.
7. La hipófisis del ratón KO para $Gfra2$ posee una proliferación muy activa en la etapa postnatal, viendo incrementado el

número de células que entran en ciclo celular en el nicho y en la adenohipófisis. Este aumento de la proliferación no se da en la edad adulta, donde la tasa de replicación en ratones WT y KO se iguala y se reduce respecto a los animales en desarrollo postnatal, tanto en el nicho como en la adenohipófisis.

8. La elevada tasa de reclutamiento y recambio en la hipófisis del ratón KO para *Gfra2* durante el desarrollo postnatal conduce a una hipófisis envejecida en adultos jóvenes, que se traduce en un aumento generalizado de la expresión de p21 y un acortamiento de los telómeros, tanto en las células del nicho hipofisario como en la adenohipófisis.
9. Los cultivos de colonias de células madre hipofisarias mantienen las características estudiadas *in vivo*, los cultivos de células de ratón KO forman menos colonias, tienen una menor tasa de replicación y presentan mayor expresión de p21.
10. Las células madre *Gfra2*⁺ implantadas directamente en la hipófisis de animales neonatos sobreviven hasta la edad adulta en la hipófisis receptora. En uno de los ratones KO con células *Gfra2*⁺ implantadas se revirtió parcialmente el fenotipo generado por la ausencia de *Gfra2*, suponiendo un avance en la terapia regenerativa con células madre.
11. Las técnicas de clarificado y tinción de hipófisis entera estandarizadas, sumadas a la tecnología *Light-Sheet* son una potente herramienta para el estudio en profundidad de este órgano y más concretamente para una estructura tridimensional compleja como es el nicho hipofisario de células madre.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Larkin, O. Ansorge., *Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland*. (Endotext. MDText.com, Inc ed. South Dartmouth (MA), 2017).
2. A. P. Amar, M. H. Weiss, Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am* **14**, 11-23, v (2003).
3. L. S. Frawley, Mammosomatotropes: current status and possible functions. *Trends Endocrinol Metab* **1**, 31-34 (1989).
4. T. Fauquier, K. Rizzoti, M. Dattani, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson, SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2907-2912 (2008).
5. M. Garcia-Lavandeira *et al.*, A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One* **4**, e4815 (2009).
6. J. Chen *et al.*, Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells* **27**, 1182-1195 (2009).
7. P. R. Le Tissier, P. Mollard, Renewing an old interest: Pituitary folliculostellate cells. *J Neuroendocrinol* **33**, e13053 (2021).
8. F. Ruf-Zamojski *et al.*, Single nucleus multi-omics regulatory landscape of the murine pituitary. *Nat Commun* **12**, 2677 (2021).
9. H. Hou *et al.*, Postnatal developmental trajectory of sex-biased gene expression in the mouse pituitary gland. *Biol Sex Differ* **13**, 57 (2022).
10. Z. Zhang *et al.*, Single nucleus transcriptome and chromatin accessibility of postmortem human pituitaries reveal diverse stem cell regulatory mechanisms. *Cell Rep* **38**, 110467 (2022).
11. J. Drouin, in *Chapter 1 - Pituitary Development in The Pituitary (Third Edition)*, S. Melmed, Ed. (Academic Press, 2011), pp. 3-19.
12. K. Rizzoti, Genetic regulation of murine pituitary development. *J Mol Endocrinol* **54**, R55-73 (2015).
13. H. M. Goodman, in *Basic Medical Endocrinology (Fourth Edition)*, H. M. Goodman, Ed. (Academic Press (Elsevier), 2009), pp. 29-42.

14. L. Rosso, J. M. Mienville, Pituicyte modulation of neurohormone output. *Glia* **57**, 235-243 (2009).
15. P. M. Daniel, Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* **7**, 1-7 (1976).
16. S. Melmed, *Williams textbook of endocrinology / Shlomo Melmed, MBChB, MACP [and three others]*. (Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania, ed. 13th, 2016).
17. T. Günther *et al.*, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev* **70**, 763-835 (2018).
18. J. O. Jansson, S. Edén, O. Isaksson, Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* **6**, 128-150 (1985).
19. S. M. Pincus *et al.*, Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats. *Am J Physiol* **270**, E107-115 (1996).
20. J. Argente, J. A. Chowen, L. A. Pérez-Jurado, J. Frystyk, C. Oxvig, One level up: abnormal proteolytic regulation of IGF activity plays a role in human pathophysiology. *EMBO Mol Med* **9**, 1338-1345 (2017).
21. S. Yakar, Y. Wu, J. Setser, C. J. Rosen, The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models. *Endocrine* **19**, 239-248 (2002).
22. V. Chikani, K. K. Ho, Action of GH on skeletal muscle function: molecular and metabolic mechanisms. *J Mol Endocrinol* **52**, R107-123 (2014).
23. V. Locatelli, V. E. Bianchi, Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol* **2014**, 235060 (2014).
24. N. Møller, J. O. Jørgensen, Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev* **30**, 152-177 (2009).
25. M. Ahmid, C. G. Perry, S. F. Ahmed, M. G. Shaikh, Growth hormone deficiency during young adulthood and the benefits

- of growth hormone replacement. *Endocr Connect* **5**, R1-R11 (2016).
26. M. Uhlén *et al.*, Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
 27. P. J. Thul *et al.*, A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**, (2017).
 28. M. Karlsson *et al.*, A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv* **7**, (2021).
 29. M. G. Borrello *et al.*, RET inhibition: implications in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **17**, 403-419 (2013).
 30. L. M. Mulligan, RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat Rev Cancer* **14**, 173-186 (2014).
 31. M. Takahashi, RET receptor signaling: Function in development, metabolic disease, and cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **98**, 112-125 (2022).
 32. M. S. Airaksinen, M. Saarma, The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* **3**, 383-394 (2002).
 33. R. H. Baloh *et al.*, TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron* **18**, 793-802 (1997).
 34. R. D. Klein *et al.*, A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* **387**, 717-721 (1997).
 35. S. Jing *et al.*, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J Biol Chem* **272**, 33111-33117 (1997).
 36. R. H. Baloh *et al.*, Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* **21**, 1291-1302 (1998).
 37. Y. Enokido *et al.*, GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. *Curr Biol* **8**, 1019-1022 (1998).

38. S. E. Mullican *et al.*, GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat Med* **23**, 1150-1157 (2017).
39. L. Yang *et al.*, GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nat Med* **23**, 1158-1166 (2017).
40. P. J. Emmerson *et al.*, The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat Med* **23**, 1215-1219 (2017).
41. M. Sanicola *et al.*, Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6238-6243 (1997).
42. E. Arighi, M. G. Borrello, H. Sariola, RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 441-467 (2005).
43. K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39 (2000).
44. M. Perrinjaquet, M. Vilar, C. F. Ibáñez, Protein-tyrosine phosphatase SHP2 contributes to GDNF neurotrophic activity through direct binding to phospho-Tyr687 in the RET receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* **285**, 31867-31875 (2010).
45. J. Grimm *et al.*, Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* **154**, 345-354 (2001).
46. H. Murakami *et al.*, Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem* **277**, 32781-32790 (2002).
47. R. J. Crowder, H. Enomoto, M. Yang, E. M. Johnson, J. Milbrandt, Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J Biol Chem* **279**, 42072-42081 (2004).
48. H. Hayashi *et al.*, Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* **19**, 4469-4475 (2000).

49. K. Kawai, M. Takahashi, Intracellular RET signaling pathways activated by GDNF. *Cell Tissue Res* **382**, 113-123 (2020).
50. A. G. Urbano, J. M. Suárez-Peñaranda, C. Diéguez, C. V. Alvarez, GDNF and RET-gene expression in anterior pituitary-cell types. *Endocrinology* **141**, 1893-1896 (2000).
51. M. A. Japón *et al.*, Glial-derived neurotropic factor and RET gene expression in normal human anterior pituitary cell types and in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1879-1884 (2002).
52. E. Diaz-Rodriguez *et al.*, Direct promoter induction of p19Arf by Pit-1 explains the dependence receptor RET/Pit-1/p53-induced apoptosis in the pituitary somatotroph cells. *Oncogene* **31**, 2824-2835 (2012).
53. C. Cañibano *et al.*, The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J* **26**, 2015-2028 (2007).
54. M. Chenlo *et al.*, Unmasking a new prognostic marker and therapeutic target from the GDNF-RET/PIT1/p14ARF/p53 pathway in acromegaly. *EBioMedicine* **43**, 537-552 (2019).
55. M. Garcia-Lavandeira *et al.*, Functional role of the RET dependence receptor, GFRA co-receptors and ligands in the pituitary. *Front Horm Res* **38**, 127-138 (2010).
56. J. B. Vanhorne *et al.*, Cloning and characterization of the human GFRA2 locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. *Hum Genet* **108**, 409-415 (2001).
57. F. Cunningham *et al.*, Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res* **50**, D988-D995 (2022).
58. U. Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* **51**, D523-D531 (2023).
59. T. Kinoshita, Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *J Lipid Res* **57**, 4-5 (2016).
60. J. Sandmark *et al.*, Structure and biophysical characterization of the human full-length neurturin-GFRA2 complex: A role for heparan sulfate in signaling. *J Biol Chem* **293**, 5492-5508 (2018).

61. G. Paratcha, F. Ledda, C. F. Ibáñez, The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* **113**, 867-879 (2003).
62. Y. W. Wong, G. M. Sia, H. P. Too, Quantification of mouse glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2 alternatively spliced isoforms by real time detection PCR using SYBR Green I. *Neurosci Lett* **320**, 141-145 (2002).
63. W. Luo *et al.*, A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-dependent and Ret-independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. *Neuron* **54**, 739-754 (2007).
64. M. Quartu *et al.*, Tissue distribution of Ret, GFRalpha-1, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 receptors in the human brainstem at fetal, neonatal and adult age. *Brain Res* **1173**, 36-52 (2007).
65. J. Rossi *et al.*, Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* **22**, 243-252 (1999).
66. N. V. Botchkareva *et al.*, New roles for glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin: involvement in hair cycle control. *Am J Pathol* **156**, 1041-1053 (2000).
67. J. Rossi, P. Santamäki, M. S. Airaksinen, K. H. Herzig, Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* **54**, 1324-1330 (2005).
68. J. Rossi *et al.*, Alimentary tract innervation deficits and dysfunction in mice lacking GDNF family receptor alpha2. *J Clin Invest* **112**, 707-716 (2003).
69. W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak, Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther* **10**, 68 (2019).
70. H. Clevers, STEM CELLS. What is an adult stem cell? *Science* **350**, 1319-1320 (2015).
71. A. de Morree, T. A. Rando, Regulation of adult stem cell quiescence and its functions in the maintenance of tissue integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 334-354 (2023).

72. K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
73. J. Bowles, G. Schepers, P. Koopman, Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* **227**, 239-255 (2000).
74. L. Hou, Y. Srivastava, R. Jauch, Molecular basis for the genome engagement by Sox proteins. *Semin Cell Dev Biol* **63**, 2-12 (2017).
75. R. Feng, J. Wen, Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development. *Biol Chem* **396**, 883-891 (2015).
76. A. A. Avilion *et al.*, Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**, 126-140 (2003).
77. T. Schaefer, C. Lengerke, SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond. *Oncogene* **39**, 278-292 (2020).
78. G. J. Pan, Z. Y. Chang, H. R. Schöler, D. Pei, Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* **12**, 321-329 (2002).
79. H. Yu *et al.*, Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* **168**, 1879-1888 (2006).
80. C. Matthai *et al.*, Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod* **12**, 7-10 (2006).
81. H. Niwa, J. Miyazaki, A. G. Smith, Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376 (2000).
82. D. T. Dang, J. Pevsner, V. W. Yang, The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1103-1121 (2000).
83. D. E. Geiman, H. Ton-That, J. M. Johnson, V. W. Yang, Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) are dependent on

- acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res* **28**, 1106-1113 (2000).
84. X. Chen *et al.*, Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J Biol Chem* **276**, 30423-30428 (2001).
 85. W. Zhang *et al.*, The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* **275**, 18391-18398 (2000).
 86. Y. Shi, W. Ai, in *Pluripotent Stem Cells*. (InTechOpen, 2013).
 87. B. D. Rowland, R. Bernards, D. S. Peeper, The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* **7**, 1074-1082 (2005).
 88. B. Wang *et al.*, Krüppel-like factor 4 induces apoptosis and inhibits tumorigenic progression in SK-BR-3 breast cancer cells. *FEBS Open Bio* **5**, 147-154 (2015).
 89. N. C. Whitlock, J. H. Bahn, S. H. Lee, T. E. Eling, S. J. Baek, Resveratrol-induced apoptosis is mediated by early growth response-1, Krüppel-like factor 4, and activating transcription factor 3. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**, 116-127 (2011).
 90. P. Zhang, R. Andrianakos, Y. Yang, C. Liu, W. Lu, Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem* **285**, 9180-9189 (2010).
 91. A. M. Ghaleb, V. W. Yang, Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene* **611**, 27-37 (2017).
 92. J. Yu *et al.*, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
 93. K. Mitsui *et al.*, The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631-642 (2003).
 94. G. Pan, J. A. Thomson, Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* **17**, 42-49 (2007).

95. C. V. Alvarez, F. Oroz-Gonjar, M. Garcia-Lavandeira, Future perspectives in adult stem cell turnover: Implications for endocrine physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol* **445**, 1-6 (2017).
96. C. V. Alvarez *et al.*, Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol* **49**, R89-111 (2012).
97. J. Zhang *et al.*, Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).
98. L. M. Calvi *et al.*, Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
99. G. M. Crane, E. Jeffery, S. J. Morrison, Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol* **17**, 573-590 (2017).
100. H. Cheng, C. P. Leblond, Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* **141**, 461-479 (1974).
101. H. Gehart, H. Clevers, Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**, 19-34 (2019).
102. F. Doetsch, I. Caillé, D. A. Lim, J. M. García-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716 (1999).
103. T. D. Palmer, J. Takahashi, F. H. Gage, The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8**, 389-404 (1997).
104. Q. Shen *et al.*, Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**, 1338-1340 (2004).
105. V. Llorente, P. Velarde, M. Desco, M. V. Gómez-Gaviro, Current Understanding of the Neural Stem Cell Niches. *Cells* **11**, (2022).
106. G. Cotsarelis, T. T. Sun, R. M. Lavker, Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-1337 (1990).

107. T. Tumber *et al.*, Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* **303**, 359-363 (2004).
108. H. Vankelecom, Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 559-570 (2007).
109. S. Correr, P. M. Motta, The rat pituitary cleft: a correlated study by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res* **215**, 515-529 (1981).
110. T. Soji, T. Yashiro, D. C. Herbert, Granulated 'marginal cell layer' in the rat anterior pituitary gland. *Tissue Cell* **21**, 849-856 (1989).
111. O. Krylyshkina, J. Chen, L. Mebis, C. Deneff, H. Vankelecom, Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology* **146**, 2376-2387 (2005).
112. F. Yoshimura, T. Soji, S. Sato, M. Yokoyama, Development and differentiation of rat pituitary follicular cells under normal and some experimental conditions with special reference to an interpretation of renewal cell system. *Endocrinol Jpn* **24**, 435-449 (1977).
113. D. B. Wilson, Distribution of 3H-thymidine in the postnatal hypophysis of the C57BL mouse. *Acta Anat (Basel)* **126**, 121-126 (1986).
114. W. Allaerts, H. Vankelecom, History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur J Endocrinol* **153**, 1-12 (2005).
115. J. Chen *et al.*, The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* **146**, 3985-3998 (2005).
116. M. Garcia-Lavandeira *et al.*, Craniopharyngiomas express embryonic stem cell markers (SOX2, OCT4, KLF4, and SOX9) as pituitary stem cells but do not coexpress RET/GFRA3 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, E80-87 (2012).
117. A. Pradilla Dieste *et al.*, GFRa 1-2-3-4 co-receptors for RET Are co-expressed in Pituitary Stem Cells but Individually

- Retained in Some Adenopituitary Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 631 (2020).
118. K. Rizzoti, H. Akiyama, R. Lovell-Badge, Mobilized adult pituitary stem cells contribute to endocrine regeneration in response to physiological demand. *Cell Stem Cell* **13**, 419-432 (2013).
 119. C. L. Andoniadou *et al.*, Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell* **13**, 433-445 (2013).
 120. M. Garcia-Lavandeira *et al.*, Pituitary Cell Turnover: From Adult Stem Cell Recruitment through Differentiation to Death. *Neuroendocrinology* **101**, 175-192 (2015).
 121. D. Pfaff, Y. Christen. (2016).
 122. B. Cox, H. Roose, A. Vennekens, H. Vankelecom, Pituitary stem cell regulation: who is pulling the strings? *J Endocrinol* **234**, R135-R158 (2017).
 123. J. Briscoe, P. P. Théron, The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 416-429 (2013).
 124. G. Luchetti *et al.*, Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *Elife* **5**, (2016).
 125. L. E. Weiss, L. Milenkovic, J. Yoon, T. Stearns, W. E. Moerner, Motional dynamics of single Patched1 molecules in cilia are controlled by Hedgehog and cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 5550-5557 (2019).
 126. G. Carreno *et al.*, Hypothalamic sonic hedgehog is required for cell specification and proliferation of LHX3/LHX4 pituitary embryonic precursors. *Development* **144**, 3289-3302 (2017).
 127. J. Ericson, S. Norlin, T. M. Jessell, T. Edlund, Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* **125**, 1005-1015 (1998).
 128. H. Suga *et al.*, Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature* **480**, 57-62 (2011).

129. C. Ozone *et al.*, Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. *Nat Commun* **7**, 10351 (2016).
130. H. Vankelecom, Pituitary stem/progenitor cells: embryonic players in the adult gland? *Eur J Neurosci* **32**, 2063-2081 (2010).
131. C. Willems *et al.*, Regeneration in the Pituitary After Cell-Ablation Injury: Time-Related Aspects and Molecular Analysis. *Endocrinology* **157**, 705-721 (2016).
132. I. Ackers, R. Malgor, Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diab Vasc Dis Res* **15**, 3-13 (2018).
133. T. Zhan, N. Rindtorff, M. Boutros, Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **36**, 1461-1473 (2017).
134. N. C. Ha, T. Tonozuka, J. L. Stamos, H. J. Choi, W. I. Weis, Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Mol Cell* **15**, 511-521 (2004).
135. C. Niehrs, The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 767-779 (2012).
136. M. A. Potok *et al.*, WNT signaling affects gene expression in the ventral diencephalon and pituitary gland growth. *Dev Dyn* **237**, 1006-1020 (2008).
137. J. Chen, A. Crabbe, V. Van Duppen, H. Vankelecom, The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. *Mol Endocrinol* **20**, 3293-3307 (2006).
138. L. T. Raetzman *et al.*, Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev Biol* **265**, 329-340 (2004).
139. L. Y. Cheung, K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, P. R. Le Tissier, Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *J Neuroendocrinol* **25**, 391-401 (2013).

140. L. B. Nantie, A. D. Himes, D. R. Getz, L. T. Raetzman, Notch signaling in postnatal pituitary expansion: proliferation, progenitors, and cell specification. *Mol Endocrinol* **28**, 731-744 (2014).
141. F. X. Yu, B. Zhao, K. L. Guan, Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811-828 (2015).
142. L. T. Raetzman, J. X. Cai, S. A. Camper, Hes1 is required for pituitary growth and melanotrope specification. *Dev Biol* **304**, 455-466 (2007).
143. T. Azad *et al.*, A gain-of-functional screen identifies the Hippo pathway as a central mediator of receptor tyrosine kinases during tumorigenesis. *Oncogene* **39**, 334-355 (2020).
144. P. Xekouki *et al.*, Non-secreting pituitary tumours characterised by enhanced expression of YAP/TAZ. *Endocr Relat Cancer* **26**, 215-225 (2019).
145. T. L. Willis, E. J. Lodge, C. L. Andoniadou, V. Yianni, Cellular interactions in the pituitary stem cell niche. *Cell Mol Life Sci* **79**, 612 (2022).
146. A. M. Vaca *et al.*, The expansion of adult stem/progenitor cells and their marker expression fluctuations are linked with pituitary plastic adaptation during gestation and lactancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **311**, E367-379 (2016).
147. N. Mathioudakis *et al.*, Expression of the pituitary stem/progenitor marker GFR α 2 in human pituitary adenomas and normal pituitary. *Pituitary* **18**, 31-41 (2015).
148. C. B. Guido *et al.*, Changes of stem cell niche during experimental pituitary tumor development. *J Neuroendocrinol* **33**, e13051 (2021).
149. J. O. Hiltunen, A. Laurikainen, M. S. Airaksinen, M. Saarma, GDNF family receptors in the embryonic and postnatal rat heart and reduced cholinergic innervation in mice hearts lacking ret or GFR α 2. *Dev Dyn* **219**, 28-39 (2000).
150. H. Ishida *et al.*, GFRA2 Identifies Cardiac Progenitors and Mediates Cardiomyocyte Differentiation in a RET-

- Independent Signaling Pathway. *Cell Rep* **16**, 1026-1038 (2016).
151. A. García-García *et al.*, Dual cholinergic signals regulate daily migration of hematopoietic stem cells and leukocytes. *Blood* **133**, 224-236 (2019).
152. C. Fielding *et al.*, Cholinergic signals preserve haematopoietic stem cell quiescence during regenerative haematopoiesis. *Nat Commun* **13**, 543 (2022).
153. D. Fonseca-Pereira *et al.*, The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function. *Nature* **514**, 98-101 (2014).
154. W. Grey *et al.*, Activation of the receptor tyrosine kinase RET improves long-term hematopoietic stem cell outgrowth and potency. *Blood* **136**, 2535-2547 (2020).
155. A. R. Almeida *et al.*, RET/GFR α signals are dispensable for thymic T cell development in vivo. *PLoS One* **7**, e52949 (2012).
156. V. Vargas-Leal *et al.*, Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *J Immunol* **175**, 2301-2308 (2005).
157. J. G. Cunha-Vaz, The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol* **41**, 287-327 (1976).
158. Y. Igarashi *et al.*, Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell Struct Funct* **25**, 237-241 (2000).
159. M. A. Adly, H. A. Assaf, M. R. Hussein, R. Paus, Analysis of the expression pattern of glial cell line-derived neurotrophic factor, neurturin, their cognate receptors GFR α -1 and GFR α -2, and a common signal transduction element c-Ret in the human scalp skin. *J Cutan Pathol* **33**, 799-808 (2006).
160. P. H. Lindfors, V. Vöikar, J. Rossi, M. S. Airaksinen, Deficient nonpeptidergic epidermis innervation and reduced inflammatory pain in glial cell line-derived neurotrophic factor

- family receptor alpha2 knock-out mice. *J Neurosci* **26**, 1953-1960 (2006).
161. M. P. Jankowski *et al.*, Cutaneous neurturin overexpression alters mechanical, thermal, and cold responsiveness in physiologically identified primary afferents. *J Neurophysiol* **117**, 1258-1265 (2017).
162. . (2023).
163. U. E. Heinrich, Intrauterine growth retardation and familial short stature. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **6**, 589-601 (1992).
164. M. N. Moreira-Andrés, F. J. Cañizo, F. J. de la Cruz, A. Gómez-de la Cámara, F. G. Hawkins, Bone mineral status in prepubertal children with constitutional delay of growth and puberty. *Eur J Endocrinol* **139**, 271-275 (1998).
165. B. Krupa, T. Miazgowski, Bone mineral density and markers of bone turnover in boys with constitutional delay of growth and puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2828-2830 (2005).
166. J. M. Wit *et al.*, Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res* **18**, 89-110 (2008).
167. G. H. R. Society, Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3990-3993 (2000).
168. G. Mazziotti, A. G. Lania, E. Canalis, Skeletal disorders associated with the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis. *Nat Rev Endocrinol* **18**, 353-365 (2022).
169. M. B. Ranke, Short and Long-Term Effects of Growth Hormone in Children and Adolescents With GH Deficiency. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, 720419 (2021).
170. S. Takabayashi *et al.*, A novel hypothyroid dwarfism due to the missense mutation Arg479Cys of the thyroid peroxidase gene in the mouse. *Mol Endocrinol* **20**, 2584-2590 (2006).
171. K. R. Johnson *et al.*, Congenital hypothyroidism, dwarfism, and hearing impairment caused by a missense mutation in the

- mouse dual oxidase 2 gene, Duox2. *Mol Endocrinol* **21**, 1593-1602 (2007).
172. G. Copinschi, P. Nève, R. Woltr, P. A. Bastenie, Dwarfism caused by cushing's syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh)* **60**, 446-450 (1969).
173. I. Ríos Orbañanos *et al.*, Turner syndrome: From birth to adulthood. *Endocrinol Nutr* **62**, 499-506 (2015).
174. A. E. Roberts, J. E. Allanson, M. Tartaglia, B. D. Gelb, Noonan syndrome. *Lancet* **381**, 333-342 (2013).
175. P. Pavone, S. Marino, A. Maniaci, S. Cocuzza, Aarskog-Scott syndrome: clinical and molecular characterisation of a family with the coexistence of a novel FGD1 mutation and 16p13.11-p12.3 microduplication. *BMJ Case Rep* **13**, (2020).
176. D. M. Ornitz, L. Legeai-Mallet, Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. *Dev Dyn* **246**, 291-309 (2017).
177. S. Saleem, A. Anwar, P. M. Iftikhar, Z. Anjum, Z. Tariq, Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita: A Rare Cause of Respiratory Distress. *Cureus* **11**, e5101 (2019).
178. D. B. Allen, Growth suppression by glucocorticoid therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am* **25**, 699-717 (1996).
179. S. Bechtold, J. Roth, Natural history of growth and body composition in juvenile idiopathic arthritis. *Horm Res* **72 Suppl 1**, 13-19 (2009).
180. F. Vasseur *et al.*, Nutritional status and growth in pediatric Crohn's disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* **105**, 1893-1900 (2010).
181. K. S. Alatzoglou, E. A. Webb, P. Le Tissier, M. T. Dattani, Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: recent advances. *Endocr Rev* **35**, 376-432 (2014).
182. Z. Laron, H. Werner, Laron syndrome - A historical perspective. *Rev Endocr Metab Disord* **22**, 31-41 (2021).
183. Q. Fang *et al.*, Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. *Endocr Rev* **37**, 636-675 (2016).

184. D. Kelberman *et al.*, SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 1865-1873 (2008).
185. A. Gualtieri *et al.*, Activating mutations in BRAF disrupt the hypothalamo-pituitary axis leading to hypopituitarism in mice and humans. *Nat Commun* **12**, 2028 (2021).
186. S. B. Kaygusuz *et al.*, Dysgenesis and Dysfunction of the Pancreas and Pituitary Due to FOXA2 Gene Defects. *J Clin Endocrinol Metab* **106**, e4142-e4154 (2021).
187. D. Giri *et al.*, Novel FOXA2 mutation causes Hyperinsulinism, Hypopituitarism with Craniofacial and Endoderm-derived organ abnormalities. *Hum Mol Genet* **26**, 4315-4326 (2017).
188. T. Bistritzer, S. A. Chalew, J. C. Lovchik, A. A. Kowarski, Growth without growth hormone: the "invisible" GH syndrome. *Lancet* **1**, 321-323 (1988).
189. A. A. Kowarski, J. Schneider, E. Ben-Galim, V. V. Weldon, W. H. Daughaday, Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *J Clin Endocrinol Metab* **47**, 461-464 (1978).
190. M. W. Sornson *et al.*, Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature* **384**, 327-333 (1996).
191. G. D. Snell, DWARF, A NEW MENDELIAN RECESSIVE CHARACTER OF THE HOUSE MOUSE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **15**, 733-734 (1929).
192. S. Li *et al.*, Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* **347**, 528-533 (1990).
193. S. A. Camper, T. L. Saunders, R. W. Katz, R. H. Reeves, The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics* **8**, 586-590 (1990).
194. M. P. Wajnrajch, J. M. Gertner, M. D. Harbison, S. C. Chua, R. L. Leibel, Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat Genet* **12**, 88-90 (1996).

195. Y. Liu, M. M. Masternak, A. Schneider, X. Zhi, Dwarf mice as models for reproductive ageing research. *Reprod Biomed Online* **44**, 5-13 (2022).
196. Y. Zhou *et al.*, A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13215-13220 (1997).
197. L. C. Gregory, M. T. Dattani, The Molecular Basis of Congenital Hypopituitarism and Related Disorders. *J Clin Endocrinol Metab* **105**, (2020).
198. S. A. Jayakody *et al.*, SOX2 regulates the hypothalamic-pituitary axis at multiple levels. *J Clin Invest* **122**, 3635-3646 (2012).
199. A. R. Garcia-Rendueles *et al.*, RET signalling provides tumorigenic mechanism and tissue specificity for AIP-related somatotrophinomas. *Oncogene* **40**, 6354-6368 (2021).
200. A. S. Gleiberman *et al.*, Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6332-6337 (2008).
201. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
202. I. Flores *et al.*, The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* **22**, 654-667 (2008).
203. N. Renier *et al.*, iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896-910 (2014).
204. R. O. Heuckeroth *et al.*, Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* **22**, 253-263 (1999).
205. S. C. McDonagh, J. Lee, A. Izzo, P. L. Brubaker, Role of glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor alpha2 in the actions of the glucagon-like peptides on the murine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G461-468 (2007).

206. J. G. Vandenberg, The influence of the social environment on sexual maturation in male mice. *J Reprod Fertil* **24**, 383-390 (1971).
207. C. Mayer *et al.*, Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22693-22698 (2010).
208. M. R. Bell, Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. *Endocrinology* **159**, 2596-2613 (2018).
209. J. Roa *et al.*, Dicer ablation in Kiss1 neurons impairs puberty and fertility preferentially in female mice. *Nat Commun* **13**, 4663 (2022).
210. R. Perchard, P. G. Murray, P. E. Clayton, Approach to the Patient With Short Stature: Genetic Testing. *J Clin Endocrinol Metab* **108**, 1007-1017 (2023).
211. J. F. Martín-Rodríguez *et al.*, Molecular Characterization of Growth Hormone-producing Tumors in the GC Rat Model of Acromegaly. *Sci Rep* **5**, 16298 (2015).
212. G. O. Ramirez-Yañez, J. R. Smid, W. G. Young, M. J. Waters, Influence of growth hormone on the craniofacial complex of transgenic mice. *Eur J Orthod* **27**, 494-500 (2005).
213. Q. Fu *et al.*, The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration. *Endocrinology* **153**, 3224-3235 (2012).
214. E. Laporte, A. Vennekens, H. Vankelecom, Pituitary Remodeling Throughout Life: Are Resident Stem Cells Involved? *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 604519 (2020).
215. E. Laporte *et al.*, Decoding the activated stem cell phenotype of the neonatally maturing pituitary. *Elife* **11**, (2022).
216. A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria, Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* **28**, 436-453 (2018).
217. V. Chesnokova *et al.*, Senescence mediates pituitary hypoplasia and restrains pituitary tumor growth. *Cancer Res* **67**, 10564-10572 (2007).
218. V. Chesnokova *et al.*, p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17498-17503 (2008).

219. V. Chesnokova *et al.*, Growth hormone is a cellular senescence target in pituitary and nonpituitary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3331-3339 (2013).
220. V. Chesnokova, S. Melmed, GH and Senescence: A New Understanding of Adult GH Action. *J Endocr Soc* **6**, bvab177 (2022).
221. P. Monahan, A. D. Himes, A. Parfieniuk, L. T. Raetzman, p21, an important mediator of quiescence during pituitary tumor formation, is dispensable for normal pituitary development during embryogenesis. *Mech Dev* **128**, 640-652 (2012).
222. C. Gaston-Massuet *et al.*, Increased Wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11482-11487 (2011).
223. E. G. Reynaud, P. Tomancak, Meeting report: first light sheet based fluorescence microscopy workshop. *Biotechnol J* **5**, 798-804 (2010).
224. E. Remacha, L. Friedrich, J. Vermot, F. O. Fahrbach, How to define and optimize axial resolution in light-sheet microscopy: a simulation-based approach. *Biomed Opt Express* **11**, 8-26 (2020).
225. B. Chen *et al.*, Resolution doubling in light-sheet microscopy via oblique plane structured illumination. *Nat Methods* **19**, 1419-1426 (2022).
226. H. Du, P. Hou, L. Wang, Z. Wang, Q. Li, Modified CLARITY Achieving Faster and Better Intact Mouse Brain Clearing and Immunostaining. *Sci Rep* **9**, 10571 (2019).
227. C. Kirst *et al.*, Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell* **180**, 780-795.e725 (2020).
228. A. D. Collier *et al.*, Sexually dimorphic and asymmetric effects of embryonic ethanol exposure on hypocretin/orexin neurons as related to behavioral changes in zebrafish. *Sci Rep* **11**, 16078 (2021).
229. G. D. Wright, H. F. Horn, Three-dimensional image analysis of the mouse cochlea. *Differentiation* **91**, 104-108 (2016).

230. P. Q. Yuan *et al.*, Intrinsic cholinergic innervation in the human sigmoid colon revealed using CLARITY, three-dimensional (3D) imaging, and a novel anti-human peripheral choline acetyltransferase (hpChAT) antiserum. *Neurogastroenterol Motil* **33**, e14030 (2021).
231. F. Castinetti, S. W. Davis, T. Brue, S. A. Camper, Pituitary stem cell update and potential implications for treating hypopituitarism. *Endocr Rev* **32**, 453-471 (2011).
232. S. Vidal *et al.*, Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism. *Virchows Arch* **436**, 43-51 (2000).
233. L. Y. M. Cheung *et al.*, Single-Cell RNA Sequencing Reveals Novel Markers of Male Pituitary Stem Cells and Hormone-Producing Cell Types. *Endocrinology* **159**, 3910-3924 (2018).
234. P. A. Fletcher *et al.*, Cell Type- and Sex-Dependent Transcriptome Profiles of Rat Anterior Pituitary Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 623 (2019).
235. S. Zhang *et al.*, Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development. *Nat Commun* **11**, 5275 (2020).
236. S. W. Davis, J. L. Keisler, M. I. Pérez-Millán, V. Schade, S. A. Camper, All Hormone-Producing Cell Types of the Pituitary Intermediate and Anterior Lobes Derive From Prop1-Expressing Progenitors. *Endocrinology* **157**, 1385-1396 (2016).
237. W. Wu *et al.*, Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* **18**, 147-149 (1998).
238. F. A. Correa *et al.*, Combined pituitary hormone deficiency caused by PROP1 mutations: update 20 years post-discovery. *Arch Endocrinol Metab* **63**, 167-174 (2019).
239. Y. W. Wong, H. P. Too, Identification of mammalian GFRalpha-2 splice isoforms. *Neuroreport* **9**, 3767-3773 (1998).
240. H. P. Too, Real time PCR quantification of GFRalpha-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **114**, 146-153 (2003).

241. J. Córdoba-Chacón, M. D. Gahete, M. Durán-Prado, R. M. Luque, J. P. Castaño, Truncated somatostatin receptors as new players in somatostatin-cortistatin pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* **1220**, 6-15 (2011).
242. M. Durán-Prado *et al.*, Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 2634-2643 (2009).
243. R. M. Luque *et al.*, Truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 confers aggressive features (proliferation, invasion and reduced octreotide response) to somatotropinomas. *Cancer Lett* **359**, 299-306 (2015).
244. P. Rogers, G. P. Webb, Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr* **43**, 83-86 (1980).
245. S. J. Rhodes, G. E. DiMattia, M. G. Rosenfeld, Transcriptional mechanisms in anterior pituitary cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 709-717 (1994).
246. A. Y. Kargi, G. R. Merriam, Diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in adults. *Nat Rev Endocrinol* **9**, 335-345 (2013).
247. V. Gasco *et al.*, Acylated ghrelin as a provocative test for the diagnosis of GH deficiency in adults. *Eur J Endocrinol* **168**, 23-30 (2013).
248. T. Garner *et al.*, Diagnosis of childhood and adolescent growth hormone deficiency using transcriptomic data. *Front Endocrinol (Lausanne)* **14**, 1026187 (2023).
249. R. D. Ward *et al.*, Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol Endocrinol* **19**, 698-710 (2005).
250. D. Cao *et al.*, ZBTB20 is required for anterior pituitary development and lactotrope specification. *Nat Commun* **7**, 11121 (2016).
251. K. M. Scully *et al.*, Epithelial cell integrin $\beta 1$ is required for developmental angiogenesis in the pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 13408-13413 (2016).

252. C. Gaston-Massuet *et al.*, Transcription factor 7-like 1 is involved in hypothalamo-pituitary axis development in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E548-557 (2016).
253. M. J. McCabe *et al.*, Variations in PROKR2, but not PROK2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, E547-557 (2013).
254. K. Rizzoti *et al.*, SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet* **36**, 247-255 (2004).
255. S. Jirawatnotai *et al.*, Cdk4 is indispensable for postnatal proliferation of the anterior pituitary. *J Biol Chem* **279**, 51100-51106 (2004).
256. S. Friedrichsen *et al.*, Expression of pituitary hormones in the Pax8^{-/-} mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* **145**, 1276-1283 (2004).
257. J. Widenfalk *et al.*, Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci* **17**, 8506-8519 (1997).
258. A. Garces, J. Livet, N. Grillet, C. E. Henderson, O. Delapeyrière, Responsiveness to neurturin of subpopulations of embryonic rat spinal motoneuron does not correlate with expression of GFR alpha 1 or GFR alpha 2. *Dev Dyn* **220**, 189-197 (2001).
259. L. C. Wang, A. Shih, J. Hongo, B. Devaux, M. Hynes, Broad specificity of GDNF family receptors GFRalpha1 and GFRalpha2 for GDNF and NTN in neurons and transfected cells. *J Neurosci Res* **61**, 1-9 (2000).
260. C. K. Naughton, S. Jain, A. M. Strickland, A. Gupta, J. Milbrandt, Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* **74**, 314-321 (2006).
261. M. Thomson *et al.*, Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* **145**, 875-889 (2011).

262. X. Zhu, J. Tollkuhn, H. Taylor, M. G. Rosenfeld, Notch-Dependent Pituitary SOX2(+) Stem Cells Exhibit a Timed Functional Extinction in Regulation of the Postnatal Gland. *Stem Cell Reports* **5**, 1196-1209 (2015).
263. S. Goldsmith, R. Lovell-Badge, K. Rizzoti, SOX2 is sequentially required for progenitor proliferation and lineage specification in the developing pituitary. *Development* **143**, 2376-2388 (2016).
264. H. Roose *et al.*, Major depletion of SOX2. *Sci Rep* **7**, 16940 (2017).
265. S. J. Baker, P. I. Poulikakos, H. Y. Irie, S. Parekh, E. P. Reddy, CDK4: a master regulator of the cell cycle and its role in cancer. *Genes Cancer* **13**, 21-45 (2022).
266. K. Arnold *et al.*, Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* **9**, 317-329 (2011).
267. Q. Xu *et al.*, Overexpression of KLF4 promotes cell senescence through microRNA-203-survivin-p21 pathway. *Oncotarget* **7**, 60290-60302 (2016).
268. Y. Liu *et al.*, Localization and function of KLF4 in cytoplasm of vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun* **436**, 162-168 (2013).
269. H. T. Hsu *et al.*, High cytoplasmic expression of Krüppel-like factor 4 is an independent prognostic factor of better survival in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* **15**, 9894-9906 (2014).
270. C. Le Magnen *et al.*, Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cells. *Eur J Cancer* **49**, 955-963 (2013).
271. X. Chen, E. M. Whitney, S. Y. Gao, V. W. Yang, Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J Mol Biol* **326**, 665-677 (2003).
272. J. P. Katz *et al.*, The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* **129**, 2619-2628 (2002).

273. S. K. Swamynathan *et al.*, Conditional deletion of the mouse Klf4 gene results in corneal epithelial fragility, stromal edema, and loss of conjunctival goblet cells. *Mol Cell Biol* **27**, 182-194 (2007).
274. J. A. Segre, C. Bauer, E. Fuchs, Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* **22**, 356-360 (1999).
275. A. M. Ghaleb, J. P. Katz, K. H. Kaestner, J. X. Du, V. W. Yang, Krüppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage. *Oncogene* **26**, 2365-2373 (2007).
276. D. T. Dang *et al.*, Overexpression of Krüppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity. *Oncogene* **22**, 3424-3430 (2003).
277. C. L. Andoniadou *et al.*, Identification of novel pathways involved in the pathogenesis of human adamantinomatous craniopharyngioma. *Acta Neuropathol* **124**, 259-271 (2012).
278. M. C. Pasquini, Z. Wang, M. M. Horowitz, R. P. Gale, 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl*, 87-105 (2010).
279. G. Kalamegam, A. Memic, E. Budd, M. Abbas, A. Mobasheri, A Comprehensive Review of Stem Cells for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Adv Exp Med Biol* **1089**, 23-36 (2018).
280. M. NIKITOVITCH-WINER, J. W. EVERETT, Functional restitution of pituitary grafts re-transplanted from kidney to median eminence. *Endocrinology* **63**, 916-930 (1958).
281. M. NIKITOVITCH-WINER, J. W. EVERETT, Histocytologic changes in grafts of rat pituitary on the kidney and upon retransplantation under the diencephalon. *Endocrinology* **65**, 357-368 (1959).
282. P. E. SMITH, POSTPONED PITUITARY HOMOTRANSPLANTS INTO THE REGION OF THE HYPOPHYSIAL PORTAL CIRCULATION IN

- HYPOPHYSECTOMIZED FEMALE RATS. *Endocrinology* **73**, 793-806 (1963).
283. F. Yoshimura, K. Harumiya, H. Ishikawa, Y. Otsuka, Differentiation of isolated chromophobes into acidophils or basophils when transplanted into the hypophysiotrophic area of hypothalamus. *Endocrinol Jpn* **16**, 531-540 (1969).
284. B. HALASZ, L. PUPP, S. UHLARIK, Hypophysiotrophic area in the hypothalamus. *J Endocrinol* **25**, 147-154 (1962).
285. D. A. Lepore *et al.*, Survival and differentiation of pituitary colony-forming cells in vivo. *Stem Cells* **25**, 1730-1736 (2007).
286. H. S. U, B. Wu, N. Wilkes, A. Ho, F. Saljooque, Brain stem cells adopt a pituitary fate after implantation into the adult rodent pituitary gland. *Neuroendocrinology* **86**, 58-68 (2007).
287. A. Greenbaum *et al.*, Bone CLARITY: Clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. *Sci Transl Med* **9**, (2017).
288. G. Farber *et al.*, Glomerular endothelial cell maturation depends on ADAM10, a key regulator of Notch signaling. *Angiogenesis* **21**, 335-347 (2018).
289. M. Carrillo *et al.*, Optical tissue clearing in combination with perfusion and immunofluorescence for placental vascular imaging. *Medicine (Baltimore)* **97**, e12392 (2018).
290. J. McKey, L. A. Cameron, D. Lewis, I. S. Batchvarov, B. Capel, Combined iDISCO and CUBIC tissue clearing and lightsheet microscopy for in toto analysis of the adult mouse ovary†. *Biol Reprod* **102**, 1080-1089 (2020).
291. E. H. K. Stelzer *et al.*, Light sheet fluorescence microscopy. *Nature reviews methods primers* **1**, (2021).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la anatomía de la hipófisis humana	9
Figura 2. Figura 2. La hipófisis del ratón	10
Figura 3. Esquema representativo de la estimulación e inhibición de las hormonas producidas en la adenohipófisis y la neurohipófisis.....	12
Figura 4. Esquema representativo de los mecanismos de retroalimentación negativa	13
Figura 5. Efectos biológicos de la hormona de crecimiento.....	16
Figura 6. Co-receptores de la familia GFR α y sus ligandos GFLs principales.....	19
Figura 7. Esquema de las isoformas del gen Gfra2 y la proteína Gfra2 en ratón	24
Figura 8. Clasificación de las células madre	28
Figura 9. Resumen de las vías de señalización implicadas en el control de las células madre.....	43
Figura 10. Estrategia seguida para obtener ratones que expresen EYFP	71
Figura 11. Isoformas del gen Gfra2	136
Figura 12. Isoformas de Gfra2	138
Figura 13. Tinción para Gfra2 en secciones de parafina de ratones WT y KO para Gfra2.....	140
Figura 14. La ausencia de Gfra2 resulta en una disminución significativa de la talla y el peso en ratones adultos mantenidos en fondo C57BL/6.....	143
Figura 15. Curvas de crecimiento en ratones WT y KO para Gfra2 con fondo genético C57BL/6 desde el destete hasta la edad adulta.....	144
Figura 16. Comparación en ratones hembra WT y KO para Gfra de las características físicas relacionadas con la acción del eje GH/IGF-1	146
Figura 17. Comparación en ratones macho WT y KO para Gfra de las características físicas relacionadas con la acción del eje GH/IGF-1	147
Figura 18. Diferencia en el tamaño de la hipófisis entre ratones WT y KO	149
Figura 19. Medida de los niveles de IGF-1 en suero de ratones de ambos sexos WT y KO para Gfra2	150

Figura 20. Medida de los niveles de T4 libre en suero de ratones de ambos sexos WT y KO para $Gfra2$	151
Figura 21. Niveles de las seis hormonas hipofisarias medidas en suero de ratones de ambos sexos WT y KO para $Gfra2$	154
Figura 22. Contenido hipofisario de las seis hormonas hipofisarias medidas en extracto de tejido de hipófisis de machos y hembras de la cepa KO para $Gfra$	157
Figura 23. Inmunofluorescencia para estudiar la proporción y distribución de los 5 tipos de células endocrinas de la adenohipófisis de ratones de ambos sexos WT y KO para $Gfra2$	158
Figura 24. Expresión de los co-receptores de la familia $GFR\alpha$ y sus ligandos mayoritarios en la hipófisis de ratones WT y KO para $Gfra2$	161
Figura 25. Inmunofluorescencia doble para los co-receptores de la familia $Gfra$ y $Sox2$ en la hipófisis de ratones WT y KO para $Gfra2$	162
Figura 26. Tinciones simples de los co-receptores de la familia $Gfra$ en la adenohipófisis en la hipófisis de ratones WT y KO para $Gfra2$	163
Figura 27. Expresión de ARNm en hipófisis total de los marcadores que definen las células madre del nicho hipofisario en ratones WT y KO de la cepa $Gfra2$ -KO	165
Figura 28. Expresión de proteínas características de células madre en extractos de hipófisis total de ratones WT y KO para $Gfra2$	166
Figura 29. $Sox2$ en el nicho de células madre de la hipófisis de ratones WT y KO para $Gfra2$	168
Figura 30. Inmunofluorescencia para la detección de $Sox2$ en la adenohipófisis de ratones adultos WT y KO para $Gfra2$	169
Figura 31. Inmunofluorescencia doble para $Klf4$ y citoqueratinas en el nicho de células madre de la hipófisis de ratones adultos WT y KO para $Gfra2$	170
Figura 32. Inmunofluorescencia para la detección de $Klf4$ en la adenohipófisis de ratones adultos WT y KO para $Gfra2$	172

Figura 33. Expresión en extractos de hipófisis total de dos de las proteínas esenciales implicadas en vías de señalización relevantes para el reclutamiento de progenitores en la hipófisis de ratones WT y KO para <i>Gfra2</i>	174
Figura 34. Expresión de proteínas implicadas en la vía de supervivencia mediada por RET en la hipófisis de ratones WT y KO para <i>Gfra2</i>	176
Figura 35. Inmunofluorescencia doble para RET y su co-receptor <i>GFRα1</i> en la hipófisis de ratones WT y KO para <i>Gfra2</i>	178
Figura 36. Expresión de proteínas implicadas en la vía apoptótica de RET en ausencia de ligando en la hipófisis de ratones WT y KO para <i>Gfra2</i>	180
Figura 37. Tinción de IHC para caspasa-3 activa en la adenohipófisis de ratones WT y KO para <i>Gfra2</i>	181
Figura 38. Inmunofluorescencia para la detección de GH en la adenohipófisis de ratones en desarrollo WT y KO para <i>Gfra2</i>	183
Figura 39. Inmunofluorescencia para la detección de Sox2 en la adenohipófisis de ratones en desarrollo WT y KO para <i>Gfra2</i>	184
Figura 40. Proliferación celular en la adenohipófisis de ratones adultos de la cepa <i>Gfra2</i> -KO	185
Figura 41. Proliferación de las células madre del nicho y de la adenohipófisis de ratones WT y KO para <i>Gfra2</i>	188
Figura 42. Proliferación celular en la adenohipófisis de ratones en desarrollo de la cepa <i>Gfra2</i> -KO	190
Figura 43. Proliferación de las células madre del nicho en ratones en desarrollo WT y KO para <i>Gfra2</i>	191
Figura 44. Proliferación de las células madre de la adenohipófisis en ratones en desarrollo WT y KO para <i>Gfra2</i>	193
Figura 45. Expresión de la proteína p21 en la hipófisis de ratones WT y KO de la cepa KO para <i>Gfra2</i>	195
Figura 46. Expresión y distribución de p21 en la hipófisis de ratones adultos con genotipo WT y KO para <i>Gfra2</i>	197
Figura 47. Expresión y distribución de p21 en el nicho de células madre de ratones adultos con genotipo WT y KO para <i>Gfra2</i>	198

Figura 48. Media de la intensidad de fluorescencia como medida de la longitud de los telómeros en ratones WT y KO de la cepa Gfr α 2-KO	200
Figura 49. Mapeado de la longitud de los telómeros en secciones de hipófisis de ratones hembra y macho WT y KO para Gfr α 2	202
Figura 50. Formación de colonias de células madre y progenitoras en cultivos primarios a partir de células de hipófisis de ratones WT y KO para Gfr α 2	205
Figura 51. Colonias formadas a partir de células madre y progenitoras de la hipófisis de ratones WT y KO de la cepa Gfr α 2-KO	206
Figura 52. Tinciones para marcadores de células madre en cultivos primarios de hipófisis de ratón.....	208
Figura 53. Tinciones para marcadores de células diferenciada en cultivos primarios de hipófisis de ratón WT y KO para Gfr α 2.....	209
Figura 54. Proliferación celular en las colonias de células madre de hipófisis de ratón WT y KO para Gfr α 2	210
Figura 55. Inmunofluorescencia para el marcador de senescencia, p21, en cultivos de células de hipófisis de ratones WT y KO para Gfr α 2	211
Figura 56. Validación de la obtención de células madre de ratones prepuberales (día postnatal 15, P15)	214
Figura 57. Curvas de crecimiento de todos los animales con células Gfr α 2+ inyectadas al momento del nacimiento	217
Figura 58. Curvas de crecimiento de los ratones R6 y R7 en comparación a las de ratones WT y KO	219
Figura 59. Comparación de la longitud y el peso en la edad adulta de los ratones del experimento con los de adultos WT y KO.....	221
Figura 60. Tamaño de la cabeza y la hipófisis de los ratones con células Gfr α 2+ implantadas	223
Figura 61. Tamaño de las extremidades de los ratones con células Gfr α 2+ implantadas	224
Figura 62. Inmunofluorescencia para la detección de células GFP+ implantadas en la hipófisis de ratones heterocigotos o KO	226
Figura 63. Tinción para Sox2 en hipófisis de ratón adulto joven clarificadas con VISIKOL	230

Figura 64. Tinción para Sox2 en hipófisis de ratón adulto joven clarificadas con iDISCO.....	232
Figura 65. Etapas del clarificado en el protocolo X-Clarity utilizando hipófisis de ratón adulto joven.....	233
Figura 66. Tinción para Sox2 en hipófisis de ratón macho adulto joven clarificadas con X-CLARITY	235
Figura 67. Tinción para GH en hipófisis clarificadas con X-CLARITY.....	236

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de los diferentes tipos celulares en la hipófisis de ratones hembra y macho adultos.	7
Tabla 2. Porcentajes de los diferentes tipos celulares en la hipófisis de ratones hembra y macho a días postnatal 12 y 32.	8
Tabla 3. Cebadores utilizados en la PCR de genotipado de la cepa $GFR\alpha 2$ -KO.	74
Tabla 4. Configuración del termociclador para genotipado de la línea $GFR\alpha 2$ -KO.	74
Tabla 5. Cebadores utilizados en la PCR de genotipado de la cepa B6;129S- $Sox2tm1^{(cre/ERT2)Hoch/J}$	75
Tabla 6. Configuración del termociclador para genotipado de la línea B6;129S- $Sox2tm1^{(cre/ERT2)Hoch/J}$	75
Tabla 7. Cebadores utilizados en la PCR de genotipado de la cepa B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J.	76
Tabla 8. Configuración del termociclador para genotipado de la línea B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J.	77
Tabla 9. Composición de la mezcla anestésica inyectable para ratón.	83
Tabla 10. Genotipos de los progenitores implicados en los cruces para la obtención de camadas donantes con genotipo $Gfra2^{+/+}$; $Sox2^{CreERT2+/-}$; $R26^{YFP+/+}$ y camadas receptoras con genotipo $Gfra2^{-/-}$; $Sox2^{CreERT2^{-/-}}$; $R26^{YFP^{-/-}}$	85
Tabla 11. Mezcla de enzimas utilizada en la dispersión del tejido a célula única.	87
Tabla 12. Composición de la mezcla de enzimas utilizada en la dispersión para el cultivo de colonias.	90
Tabla 13. Composición del medio de cultivo de colonias.	91
Tabla 14. Componentes utilizados en la preparación del tampón para extracción de proteína a partir de muestras de tejido.	94
Tabla 15. Composición del gel <i>stacking</i> SDS-PAGE para la electroforesis de proteínas.	96
Tabla 16. Composición del gel <i>resolving</i> SDS-PAGE para la electroforesis de proteínas.	96
Tabla 17. Tampones de transferencia.	98
Tabla 18. Soluciones de bloqueo utilizadas en inmunodetección.	99

Tabla 19. Anticuerpos primarios utilizados en inmunodetección en western blot.	99
Tabla 20. Anticuerpos secundarios utilizados en western blot.	101
Tabla 21. Relación de anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.	108
Tabla 22. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia.	109
Tabla 23. Canales utilizados en microscopia confocal.	111
Tabla 24. Protocolo utilizado en la RT-PCR	113
Tabla 25. Reactivos utilizados en la reacción de qPCR.....	113
Tabla 26. Cebadores utilizados para la detección de cada gen. . ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 27 Componentes de la mezcla de hibridación.....	117

ANEXOS



XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

Data 21/07/2014 09:45:39

SAÍDA 77423 / RX 648372



Clara Álvarez Villamarín
Centro de Investigación en Medicina
Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS)
Avda. Barcelona, 22
15782 Santiago de Compostela (A Coruña)

Ref.: JLPV/Ild

NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DUNHA AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15010/14/005

Data de inicio: 01-01-2014

Interesado: Clara Álvarez Villamarín

Forma de inicio: solicitude do interesado

Procedemento: resolución de autorización

Notifícolle que con data 17 de xullo de 2014, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural e do Mar emitiu unha resolución de autorización de proxectos de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 02-05-2014 e rexistro de entrada 51704 RX 419942, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: Mecanismos de recambio e proliferación, benigna e maligna, das células endócrinas

Nome do centro usuario: CIMUS (USC)

Persoa responsable do proxecto: Clara Álvarez Villamarín

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): CIMUS (USC)

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado Sección de Experimentación animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 46/2012, de 19 de xaneiro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución ao interesado.

O mencionado proxecto deberá someterse a unha avaliación retrospectiva que se realizará no prazo de tres anos.

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (BOE núm.: 285, 27 de novembro de 1992), de réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

A Coruña, 17 de xullo de 2014
O xefe do Servizo de Gandaría



Eugenio Romero Senande
SERVIZO DE
GANDARÍA





XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do
Medio Rural e do Mar

Edificio Administrativo Monelos
Vicente Ferrer, 2
15071 A Coruña

galicia

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA
A CORUÑA

Data 06/05/2016 13:29:07

SA/DA 58695 / RX 634937



José Manuel Cifuentes Martínez
Departamento de Anatomía
Facultade de Veterinaria
Campus Universitario
27002 Lugo

Ref.: JLP/lld

DENOMINACIÓN DO PROXECTO: Mecanismos de recambio e proliferación, benigna e maligna, das células endocrinas

INTERESADO: Clara Álvarez Villamarín

CÓDIGO DO PROXECTO: 15010/14/005

NOME /CÓDIGO DE REXISTRO DO CENTRO: CIMUS (USC)/Facultade de Medicina ES150780275701

REXISTRADO (REXISTRO, DATA E NÚMERO): Lugo 52964/RX 1152160 28.04.2016

Pola presente acúsase recibo da solicitude de modificación da autorización do proxecto arriba referido, conforme ao establecido no artigo 33 do Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro, polo que se establecen normas básicas para a protección de animais utilizados en experimentación e outros fins científicos incluíndo a docencia, que foi recibida no Servizo Provincial de Gandaría.

Ao non existir modificacións substanciais que afectan á autorización, comunícolle que se procede a incorporar estes datos ao expediente.

A Coruña, 5 de maio de 2016

O xefe do Servizo de Gandaría

Eugenio Romero Senande





RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.: 15012/2020/008

Data de inicio do expediente: 28.10.2020

Persoa solicitante: Anxo Vidal Figueroa

Procedemento: resolución de autorización

Forma de inicio: solicitude da persoa interesada

ANTECEDENTES

Anxo Vidal Figueroa, en representación do Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), presentou con data 28.10.2020 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2020/2073672), cuxos datos se detallan a continuación:

Denominación do proxecto: *Mecanismos de recambio e proliferación, benigna e maligna, de células endocrinas*

Nome do centro usuario: Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela

Persoa responsable do proxecto: Clara Álvarez Villamarín

Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

Clasificación do proxecto : Tipo I Tipo II Tipo III

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícase a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.



Generalitat de Catalunya
Departament de Territori i Sostenibilitat
**Direcció General
de Polítiques Ambientals**

Jaume Vicens Perpinyà

Subdirector general de la Biodiversitat / Deputy Director-General for Biodiversity

CERTIFICO/ HEREBY CERTIFY

Que en/na:/ Que el/la Sr. Sra:/ That Ms

ALBERTO PRADILLA DIESTE

amb/con DNI/NIE/Passaport / With national ID card

73013834N

ha acreditat davant del Departament de Territori i Sostenibilitat reunir els requisits necessaris per exercir les tasques de **personal investigador** d'acord amb el que estableix el Decret 214/1997, de 30 de juliol, pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques.

ha acreditado ante el Departament de Territori i Sostenibilitat reunir los requisitos necesarios para ejercer las funciones de **personal investigador** de acuerdo con lo que establece el Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas.

has proved to the satisfaction of the Ministry of Territory and Sustainability that he meets the requirements necessary to carry out the tasks of **scientist** (person responsible for directing animal experiments) in accordance with Catalan Government Decree 214/1997, of 30 July, regulating the use of animals for experimental and other scientific purposes.

I perquè així consti, signo el present certificat / Y para que así conste, firmo el presente certificado / In witness whereof, I hereby sign this certificate

Barcelona, 2 / 2nd agost / agosto / august 2016

 
Generalitat de Catalunya
Departament de Territori i Sostenibilitat
Direcció General
de Polítiques Ambientals
Servei de Biodiversitat i Protecció
de Animals

Lista de verificación para Tesis con animales de experimentación.
EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ARRIVE

Sí/no/NA		página
	Título	
Sí	Proporcionar una descripción tan exacta y concisa como sea posible sobre el contenido del trabajo.	Portada
	Resumen	
Sí	Proporcionar un resumen preciso de los antecedentes, los objetivos de la investigación, incluyendo detalles de la especie y cepa de los animales utilizados, métodos relevantes, hallazgos principales y conclusiones del estudio.	I
	Antecedentes	
Sí	Incluir suficientes antecedentes científicos (incluyendo las referencias pertinentes al trabajo anterior) a fin de comprender la motivación y el contexto para el estudio, y explicar las bases y el enfoque experimental.	1-55
Sí	Explicar cómo y por qué la especie y el modelo animal utilizados permiten abordar los objetivos científicos y, cuando sea apropiado, la relevancia del estudio para la biología humana.	57-61
	Objetivos	
Sí	Describir claramente los objetivos primarios y secundarios del estudio, o las hipótesis específicas que se van a probar.	57-61
	Declaración Ética	
Sí	Indicar el permiso del comité ético, y las leyes o decretos pertinentes para el cuidado y uso de animales, bajo las que se realiza la investigación.	65-66
	Diseño del estudio	
Sí	Número de grupos experimentales y control.	131-225
Sí	La unidad experimental (por ej., un solo animal, grupos o jaulas de animales). Un diagrama cronológico o de flujo pueden ser útiles para ilustrar cómo se realizaron los diseños de estudio complejos.	131-225
	Procedimientos experimentales	
Sí	Cómo (por ej., formulación y dosis del tratamiento, el sitio y la vía de administración, anestesia y analgesia utilizadas [incluyendo la monitorización], procedimiento quirúrgico, el método de eutanasia). Proporcionar detalles de cualquier equipo especializado utilizado, incluyendo	67-90

	proveedor(es).	
	Animales de experimentación	
Sí	Proporcionar detalles de los animales utilizados, incluyendo especie, cepa, sexo, etapa de desarrollo (por ej., edad media o mediana de edad y rango) y peso (por ej., media o mediana más rango de peso).	131-225
Sí	Proporcionar otra información pertinente, como la procedencia de los animales, nomenclatura internacional de la cepa, modificación genética (por ej., animal deficiente o transgénico), genotipo, estado de salud/inmune, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido tratamientos anteriormente, procedimientos previos, etc.	67-90 131-225
	Animales	
Sí	Alojamiento (tipo de instalación por ej., libre de patógenos específicos [SPF], tipo de jaula o habitáculo, material del lecho, número de animales por jaula, forma y material del tanque, etc. para peces).	66-67
Sí	Condiciones de cría (por ej., programa de reproducción, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, calidad de agua, etc. para peces, el tipo de alimentación, el acceso a los alimentos y al agua, enriquecimiento ambiental).	66-72
	Tamaño de la muestra	
Sí	Especificar el número total de animales utilizados en cada experimento, y el número de animales en cada grupo experimental.	131-225
Sí	Indicar el número de repeticiones independientes de cada experimento, si es pertinente.	131-225
	Asignación de animales a grupos experimentales	
Sí	Resultados experimentales 12 Definir claramente los resultados primarios y secundarios evaluados (por ej., muerte celular, marcadores moleculares, cambios de comportamiento).	131-225
	Métodos estadísticos	
Sí	Proporcionar detalles sobre los métodos estadísticos utilizados para cada análisis.	131-225
Sí	Especificar la unidad de análisis para cada grupo de datos (por ej., un solo animal, grupo de animales, neurona individual).	131-225
Sí	Describir los métodos utilizados para evaluar si los datos corroboran las suposiciones del método estadístico.	128-129

	Cantidades analizadas	
Sí	Indicar el número de animales en cada grupo incluido en cada análisis. Presentar números absolutos (por ej., 10/20, no 50 %2).	131-225
	Resultados y Discusión	
Sí	Indicar los resultados de cada análisis llevado a cabo, con una medida de precisión (por ej., error estándar o intervalo de confianza).	131-225
	Interpretación /implicaciones científicas	
Sí	Interpretar los resultados, teniendo en cuenta los objetivos y las hipótesis del estudio, la teoría actual y otros estudios pertinentes en la literatura.	239-278
Sí	Comentar las limitaciones del estudio incluyendo cualquier fuente potencial de sesgo, cualquier limitación del modelo animal y la imprecisión asociada con los resultados	239-278
	Financiación	
Sí	Listar todas las fuentes de financiación (incluyendo el número del proyecto) y el papel de la fuente(s) de financiación en el estudio.	65

Basado en The ARRIVE guidelines: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments.

Firma Doctorando

Alberto Pradilla Dieste

GFR α 2 es un marcador específico de las células madre del nicho hipofisario, una población importante para el mantenimiento de la capacidad plástica de este órgano. En esta tesis doctoral se pretende ahondar en el papel de Gfr α 2 en la fisiología hipofisaria y su relación con el enanismo. Para ello se ha utilizado un ratón KO para Gfr α 2 que presenta un fenotipo de enanismo hipofisario debido a una menor producción de GH. En ausencia de Gfr α 2 se producen alteraciones en el recambio y proliferación de las células madre y en el reclutamiento desde el nicho durante el desarrollo postnatal, dando lugar a una hipófisis envejecida en adultos. Nuestros resultados también sugieren que las células madre poseen un potencial terapéutico para el tratamiento de algunas enfermedades como el hipopituitarismo.