

## **2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Como hemos señalado en la justificación de nuestros objetivos, la finalidad de nuestro estudio era fundamentalmente correlacionar los diferentes datos observados en el proceso del desarrollo. Por ello en la discusión de los resultados hemos seguido la secuencia de diferenciación celular incluyendo en cada uno de los tipos, la discusión de todos los datos obtenidos acerca del mismo.

La formación de la Bolsa de Rathke en el ratón comienza como en la mayoría de los vertebrados, Peces (Honna 1.969; Larsen y Rothwell 1.972; Schreiber et al. 1.973, 1.986; Gorbman 1.984), Anfibios (Kerr 1966; Remy 1969; Zuber-Vogeli and Bihoues-Louis 1971), y Reptiles (Saint-Girons 1.970; Pearson y Litch 1.974; Pearson y Wurst 1.977; Pearson et al. 1.983; Pearson 1.985; Bello AR 1.987) así como en otros mamíferos, (Schwind 1.928; Hanström 1.966; Rugh 1.968; Schambra et al. 1.992) hacia la mitad del desarrollo embrionario, en el día 10 (E.10). Sólo en las aves, la formación del esbozo hipofisario es un evento temprano en el desarrollo (E.4) (Wingstrand 1.951; 1.966; Tixier-Vidal y Follet 1.973; Betz y Jarskar 1.974). Esto es también lo que ocurre en el pollo y la codorniz, las dos especies de aves utilizadas en este estudio. Sin embargo a pesar de ser anterior en el tiempo, el grado de desarrollo de las restantes estructuras del embrión en ese momento, es similar al del resto de los vertebrados.

El origen ectodérmico de la bolsa de Rathke ha sido admitido en todos los grupos de vertebrados, aunque algunos autores han hablado de un origen endodérmico para ciertas células del lóbulo anterior (Pearson y col. 1.983; Hall y Hughes 1.985) Aunque en todos los grupos se forma, próxima a la bolsa de Rathke, una segunda evaginación ó bolsa de Sessel, de origen endodérmico, en los grupos estudiados hasta ahora dicha bolsa sufre una regresión y desaparece; sin embargo, hemos observado que esto ocurre así en el ratón y el pollo pero no en la codorniz. En esta especie la bolsa de Sessel se une a la cara ventral de la bolsa de Rathke, contribuyendo a la formación de la parte rostral del lóbulo anterior.

La diferencia en la formación de la bolsa de Rathke de las aves con respecto a los otros grupos de vertebrados en lo que se refiere a la no existencia de contacto entre la bolsa y el neuroepitelio, se traduce en la formación de tres zonas proliferativas en la bolsa de Rathke de ratón y dos en la de aves, tanto en pollo como en codorniz. Esto es debido a que la tercera zona

existente en el ratón, así como en el resto de los grupos de vertebrados, se corresponde con la zona de contacto con el neuroepitelio, inexistente en el caso de las aves.

A partir de estas regiones proliferativas se van a ir diferenciando los distintos tipos de células secretoras de la hipófisis. Nuestras observaciones muestran que las células hipofisarias se diferencian a partir de zonas específicas de la bolsa y que esto va a determinar su distribución posterior en el animal adulto; esto es debido a que la diferenciación de células en una región de la bolsa implica que ésta va a ser su localización posterior, es decir, que cuando un tipo celular se encuentra distribuido por todo el lóbulo anterior, como ocurre en el ratón, las células se diferenciaron a partir de distintas zonas proliferativas de la bolsa no existiendo en ningún caso migración de las células. La regionalización en relación con su origen había sido mostrada anteriormente sólo en reptiles (Pearson y col. 1.983; Pearson 1.985; Batista y col. 1.989); si bien para alguno de estos autores Batista y col. (1989), existe migración de las células dentro del lóbulo anterior, el uso de Bromodeoxiuridina nos ha permitido descartar esta posibilidad. Por otro lado, hemos demostrado que la diferenciación de la célula no supone una pérdida de la capacidad de división, por lo que pensamos que el aumento de células de un tipo determinado se debe, en alguna medida, a la división de otras ya existentes en contra de las conclusiones obtenidas por Ikeda y Yoshimoto (1.991), Ericson y col. (1.998) ó (Seuntjens y Deneff 1.999a) para los que el estado diferenciado implica una salida del ciclo celular y por tanto un cese de la actividad mitótica. Nuestros resultados muestran claramente como después de una etapa de proliferación, con numerosas divisiones, se continúa con un aumento de la diferenciación al tiempo que el número de divisiones es menor aunque estas pueden afectar incluso a células diferenciadas. Así células diferenciadas en división pudieron observarse también, en número muy escaso, en el estado adulto. En los trabajos realizados hasta ahora si bien algunos autores, (Shirasawa y Yoshimura 1.982; Takahashi y Kawashima 1.982; Carbajo-Pérez y col. 1.989; Carbajo-Pérez y Watanabe 1.990; Carbajo y col.1992), obtienen datos que apoyan la presencia de divisiones después del estado diferenciado, para otros la presencia de divisiones en las células diferenciadas del animal adulto responde exclusivamente a manipulaciones experimentales como la gonadectomía ó adrenalectomía (Inoue y col. 1.985;) ó a la acción de diversas moléculas como factores liberadores (Carbajo y col. 1.994; Childs y col. 1.995; Pawlikowski y Slowinska-Klencka 1.994), hormonas (Lloyd y col. 1.991; Pawelczyk y col. 1.996) ó factores de crecimiento (Childs y col. 1.995).

Recientemente, Taniguchi y col. (2.000, 2.001) utilizando dobles marcajes con la Bromodeoxiuridina observan para las células corticotropas y tireotropas la presencia de células

doblemente marcadas hacia el final del desarrollo embrionario, describiendo un aumento notable de estas en los últimos estadios. Si bien estos autores atribuyen a estas células ya diferenciadas un papel importante en la generación de nuevas células diferenciadas, nuestros resultados nos sugieren que estas células contribuyen pero de manera poco significativa, mientras que en el animal adulto contribuyen a su renovación.

Al igual que en especies de otros grupos de vertebrados como Teleósteos (McKeown y col. 1.971), Condrictios (Alluchon-Gérard 1.971; Mellinger 1.972), Anfibios (Moriceau-Hay y col. 1.979; Nyholm y Doerr-Schott 1.977), y Reptiles (Pearson y Litch 1.974; Pearson y col. 1.983; Batista y col. 1.989), así como de mamíferos (Chatelain y col. 1.979; Watanabe y Daikoku 1.979; Danchin y col. 1.981; Dacheux 1.984; Nemeskéri y col. 1.988), en la adenohipófisis de ratón así como en la de pollo y codorniz las primeras células que se diferencian son las células corticotropas; en el ratón, la presencia de células ACTH-ir ocurre en el E.13 en el extremo rostral de la cara dorsal de la bolsa exclusivamente, es decir, la mitad rostral del futuro lóbulo anterior; de la misma forma, son también las células corticotropas las primeras células inmunorreactivas observadas en las dos especies de aves estudiadas. Si bien en todas las especies utilizadas en este estudio, estas primeras células se diferencian en la zona rostral de la cara dorsal de la bolsa, en el ratón va a haber una segunda diferenciación en la mitad caudal del lóbulo, originada de la cara ventral de la bolsa; esto hace que si bien, tanto en el ratón como en las dos especies de aves, las células corticotropas proceden de las caras ventral y dorsal de la bolsa de Rathke, la falta de diferenciación de células corticotropas en la región caudal hace que la distribución definitiva en las aves esté relegada a la mitad rostral del lóbulo anterior mientras que en el ratón se extiende por todo el lóbulo lo que confirma la no migración de las células.

La identificación de células corticotropas ha sido hecha tanto inmunohistoquímicamente, utilizando anticuerpos sólo contra la ACTH, una de las hormonas derivadas del precursor POMC sintetizado por estas células, o bien mediante hibridación *in situ* utilizando una sonda complementaria del mRNAPOMC; si bien Japon y col. (1.994), observan desde el primer estadio de su diferenciación, la presencia del mRNAPOMC en las células corticotropas del ratón, inmunohistoquímicamente sólo hemos observado, en este estadio, la presencia de dos derivados de dicho precursor, la ACTH y la  $\beta$  endorfina en estas primeras células. Los mismos resultados hemos obtenido para las primeras células diferenciadas en el lóbulo anterior del pollo y la codorniz, es decir, en estas especies, las células corticotropas son también las primeras en

diferenciarse, en la misma zona y siendo también inmunorreactivas a la ACTH y la  $\beta$  endorfina. Las aves representan el grupo donde se han obtenido los resultados más diversos; así aunque algunos autores observan en primer lugar las células corticotropas, poniendo de manifiesto la presencia de ACTH (Therrien y col. 1.991; Allaerts y col. 1.999), otros observan como primer tipo celular diferenciado, las células gonadotropas (LH-ir) (Gasc y Sar 1.981) ó las somatotropas (STH-ir) (Thommes y col. 1.987).

Dos días después en el desarrollo, pueden observarse en las células corticotropas, otros derivados de la POMC, la  $\alpha$  y  $\beta$  MSH en el ratón y la  $\alpha$  MSH en el pollo y la codorniz. Nuestros resultados muestran que al menos en los dos grupos de vertebrados estudiados, el precursor POMC sufre un procesado en las células del lóbulo anterior que lleva a la presencia escalonada en el tiempo de sus diferentes derivados; además este proceso es diferente para las células corticotropas del lóbulo intermedio del ratón en las cuales se pueden observar los distintos derivados simultáneamente en un mismo estadio. Esta diferencia en el procesado de la POMC ya fue observada por otros autores, (Herbert, 1.981; Herbert y col. 1.987; Hindelang y col. 1.990). Nuestros datos nos sugieren que tanto las diferencias en la diferenciación celular como en la adquisición de la estructura adulta, son producto del diferente entorno en que ocurren estos procesos, es decir, mientras que en el lóbulo anterior las células corticotropas se diferencian con posterioridad a la entrada de mesénquima y vasos sanguíneos, la diferenciación y maduración del lóbulo intermedio nunca conlleva una entrada de mesénquima ni vasos sanguíneos entre sus células. Estas diferencias serán en parte responsables de las diferencias funcionales entre las células de ambos lóbulos. Hace unos años (Howe 1.973) se pensaba que había tipos celulares diferentes en el lóbulo intermedio responsables de la liberación de MSH ó ACTH respectivamente, aunque se le atribuía actividad melanotropa también a la ACTH. Por otra parte para la mayoría de los autores sólo las células de este lóbulo producen MSH; aunque está demostrada la síntesis del precursor POMC en las células del lóbulo intermedio, según los datos bibliográficos sus células sólo liberan  $\beta$  endorfina y  $\alpha$  MSH (Saland 2.001), de ahí que al menos en la rata y otras especies de mamíferos, se distinguen células POMC del lóbulo intermedio ó melanotropas, y células POMC del lóbulo anterior ó corticotropas; sin embargo en humanos, las observaciones de Evans y col (1.994), les llevan a sugerir que en esta especie no existe la estricta dicotomía entre los dos lóbulos observada en otros mamíferos. Las mismas observaciones, es decir la presencia de N-acetyl- $\beta$ -endorfina, que en los otros mamíferos

estudiados era una forma exclusiva de las células del lóbulo intermedio, en células corticotropas del lóbulo anterior, fueron hechas por Millington y col (1.992) en el caballo. Nosotros observamos que en el ratón, al menos inmunohistoquímicamente, los mismos derivados de la POMC están presentes en las células de ambos lóbulos durante toda la vida del animal si bien hay una disminución de  $\alpha$ MSH en las células del lóbulo anterior en el animal adulto. En la hipófisis de aves, también estuvieron representadas las mismas hormonas y péptidos  $\alpha$ MSH,  $\beta$ endorfina y ACTH, en células del lóbulo anterior y a lo largo de todas las edades estudiadas; por el contrario, sí estuvo ausente la  $\beta$ MSH.

En células corticotropas del lóbulo intermedio de vaca se ha demostrado que el procesamiento de la POMC es un fenómeno dependiente de  $Ca^{2+}$  (Birch y col 1.991). Estos autores mostraron que la acción del  $Ca^{2+}$  era la estimulación de la enzima responsable del clivaje proteolítico. El conjunto de nuestros resultados en la hipófisis de ratón nos hace sugerir, para la proteína ligante de  $Ca^{2+}$ , CB D28K, una relación con dicha acción en el lóbulo intermedio puesto que su presencia en las células de este lóbulo coincide con el estadio en el que se pueden observar los distintos péptidos de la POMC, permaneciendo por otro lado esta expresión durante toda la vida del animal; sin embargo, en las células corticotropas del lóbulo anterior, la expresión de CB D28K ocurre fundamentalmente en células no diferenciadas disminuyendo drásticamente su expresión en la primera semana de vida posnatal sugiriendo en este caso una relación con la acción del  $Ca^{2+}$  en el comienzo de la expresión génica, es decir en la acción de algún factor de diferenciación. En las aves ninguna de las proteínas ligantes de  $Ca^{2+}$  estudiadas presentó relación con la diferenciación de las células corticotropas.

Otro factor importante en la regulación de las células corticotropas, estudiado fundamentalmente en mamíferos, es el factor hipotalámico CRF liberado a la eminencia media. En el ratón parece que, al menos en un primer momento, la producción de hormona ACTH, desde las células del lóbulo anterior hipofisario, no está directamente en relación con la presencia de CRF en la zona externa de la eminencia media, puesto que las primeras fibras CRF-ir son observadas dos estadios más tarde en el desarrollo pudiendo existir un sistema regulador previo a la maduración del sistema hipotálamo-hipofisario como sugiere Lugo y Pintar (1.996). Datos existentes en otras especies de mamíferos (Phillips y col. 1.996), sugieren que la producción de ACTH durante la primera mitad de la gestación, es independiente de la presencia de un eje hipotálamo-hipófisis intacto.

El hecho de que la ACTH sea la primera célula diferenciada que se observa en el desarrollo, está acorde con la importancia de los corticoides en el desarrollo general del embrión ampliamente documentada por diversos autores (Meyer 1.983; Devenport y Devenport 1.983, 1.985; Durand 1.987; Hayes y Gill 1.995; Guo y col. 1.995; Morale y col. 1.995; Pepe y Albrecht 1.998; Dean y Matthews 1.999); los corticoides se ha mostrado tienen importancia incluso en el establecimiento y funcionalidad de otros ejes endocrinos como el eje tiroideo y el eje somatotropo (Nathanielsz y col. 1.981; Luo y col. 1.995; Mompugno y col. 1.997; Forhead y col. 2.000).

Además de los corticoides, las hormonas tiroideas son factores de suma importancia en el desarrollo de diferentes estructuras (Avivi 1.981; Thommes y col. 1.983, 1.985; Thommes 1.987; Miwa y col. 1.988; Nauber y col. 1.988; McNabb 1.989; Hayes y Gill 1.995; Rosenkilde y col. 1.996; Fisher 1.997; Jennings y col. 1.998; Gothe y col.1.999; Forhead y col. 2.000). De especial interés es su papel en el desarrollo del cerebro (Bernal y Núñez 1.995), donde parecen coordinar la diferenciación celular, migración y expresión génica; así Poddar y col. (1.996), mostraron el mecanismo de acción de la hormona tiroidea sobre la expresión génica de actina y tubulina en neuronas durante el desarrollo; también se han aportado datos sobre su acción en la diferenciación de otros tipos celulares secretores de hormonas de la hipófisis; así Stahl y col. (1.999), informan sobre el papel de la hormona tiroidea en la diferenciación de las células somatotropas y lactotropas .

Tanto en el ratón como en las especies de aves estudiadas, el segundo tipo celular en diferenciarse, son células TSH-ir. Sin embargo, en la mayoría de especies de vertebrados estudiadas hasta ahora, la diferenciación de células productoras de hormonas glucoproteicas (tireotropas y gonadotropas) ocurre de forma simultánea (Danchin y col. 1.981; Moriceau-Hay y col. 1.982; Nemeskéri y col. 1.988; Batista y col.1.989).

En el ratón, si bien nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Dihl y col. 1.988; Japon y col. 1.994), hemos observado células TSH inmunorreactivas en primer lugar en células del lóbulo tuberal de forma similar a lo observado en la rata (Nemeskéri y col. 1.988). En las aves sin embargo, se observaron en primer lugar células TSH-ir, en la región caudal del lóbulo anterior aunque posteriormente se observaron simultáneamente células TSH-ir

en la región rostral del mismo y en el lóbulo tuberal. La presencia de TSH-ir en células del lóbulo tuberal parece un hecho extendido a la mayoría de grupos de vertebrados estudiados (Pearson y col. 1.982; Nemeskéri y col. 1.988; Bello y col. 1.991a); sin embargo en aves donde los datos son muy escasos, Kameda y col. (1.998), observaron solamente células  $\beta$ LH-ir en este lóbulo en embriones de pollo. En reptiles, Bello y col. (1.991a), observaron una intensa inmunorreacción  $\beta$ TSH-ir en la mayor parte de las células de este lóbulo; aunque nuestros datos en aves y ratón muestran células  $\beta$ TSH-ir inmunorreactivas a lo largo de todo el lóbulo, la reacción es débil.

En todos los casos las células del lóbulo tuberal mostraron inmunorreacción con los mismos anticuerpos utilizados en células del lóbulo anterior; a pesar de ello, nuestras observaciones demuestran una diferencia ultraestructural entre las células de ambos lóbulos. Datos similares han sido aportados por Pearson y col. (1.998) para el lóbulo tuberal en el anfibio *Bufo borea* donde destaca, al igual que en nuestras observaciones, el pequeño tamaño de los gránulos secretores presentes en células TSH-ir del lóbulo tuberal.

Los últimos trabajos sobre los tipos celulares encontrados en el lóbulo tuberal de mamíferos (Wittkowski y col. 1.999; Guerra y Rodríguez 2.001), indican la presencia de células que presentan hormonas similares a las del lóbulo anterior, encontrándose en algunos casos representados todos los tipos hormonales de dicho lóbulo aunque estas células se encuentran relegadas a una zona del lóbulo tuberal. Por otro lado estos autores observan que una mayoría de células del lóbulo tuberal, no presenta inmunorreacción a ninguna de las hormonas presentes en células del lóbulo anterior, siendo consideradas productoras de proteínas específicas del lóbulo tuberal colocalizadas con la fracción  $\alpha$  y no con la  $\beta$  de las hormonas glucoproteicas (Guerra y Rodríguez. 2.001) en hipófisis bovina aunque en células PT específicas de la hipófisis de rata, Djungarian hamster y ratón, está demostrada la presencia de inmunorreacción con anticuerpos contra la  $\beta$ TSH (Gross 1.988; Wittkowski y col. 1.988; Sakai y col. 1.992; Rudolf y col. 1.993; Bockmann y col. 1.998; Wittkowski y col. 1.999).

También en los últimos años se ha demostrado la idéntica secuencia y tamaño de los transcritos de las dos subunidades de TSH, en células de los lóbulos tuberal y anterior (Bockmann y col. 1.997a). El análisis molecular mostró que no hay diferencias significativas entre la TSH del lóbulo tuberal y la TSH del lóbulo anterior. Sin embargo la regulación de la actividad celular y la expresión génica, es completamente diferente. La síntesis de TSH en las

células del lóbulo tuberal no parece estar bajo control de los clásicos factores reguladores, T3 y TRH para los que carece de receptores (Bockmann y col. 1.997b).

Por otro lado, un factor de transcripción, el Pitx-1, relacionado con la diferenciación de las células tireotropas del lóbulo distal, no parece afectar la diferenciación de las células TSH del lóbulo tuberal como demostraron (Bokmann y col. 1.997b), usando mutantes carentes del gen Pitx-1.

En este trabajo hemos podido demostrar la presencia de otro factor de transcripción, el Pitx-2, en células de todos los lóbulos adenohipofisarios. El resultado obtenido con los dobles marcajes nos permite sugerir para este factor, una implicación en la diferenciación hormonal de los distintos tipos celulares hipofisarios puesto que sólo se observó en células indiferenciadas.

Entre las células en las que pudimos demostrar su expresión en el estado indiferenciado y su desaparición posterior, se encuentran las células corticotropas y las células somatotropas. A medida que los diferentes tipos celulares van presentando inmunorreactividad para las distintas hormonas, deja de expresarse el gen en ellas. Hasta ahora no se han podido mostrar diferencias de acción en las células de distintos lóbulos puesto que en los mutantes carentes del gen para este factor, no progresa la formación de la hipófisis; esto ha hecho que se le haya considerado como un factor implicado en la morfogénesis (Lin y col. 1.999; Suh y col. 2.002). Ya datos previos sobre la expresión de Pitx-2 en las primeras etapas de formación de la glándula, Muchielli y col. (1.996), señalan expresión en el techo del estomodeo y en la bolsa de Rathke, sugiriendo su implicación en la morfogénesis.

Tomando en conjunto los datos referentes a la expresión de otros genes homeobox como Pax 6 (Walther y Gruss 1.991) Brn 3.0 (Gérard y col. 1.993), Pitx-1 (Dollé y col. 1.990; Simmons y col. 1.990; Lanctôt y col.1.999), Lhx3 (Sheng y col. 1.996) y Rpx (Hermesz y col. 1.996) durante el desarrollo hipofisario, podemos concluir que la organogénesis así como la diferenciación de los distintos tipos celulares secretores presentes en la hipófisis se debe a una acción secuencial y coordinada de los diferentes genes homeobox junto con otros factores.

En este sentido, otros factores observados en relación con la funcionalidad de las células TSH, han sido las proteínas ligantes de Ca<sup>2+</sup>. En la rata, la respuesta de las células del lóbulo anterior al TRH parece ser dependiente del calcio (Schrey y col. 1.978). La proteína ligante de Ca<sup>2+</sup>, CR, ha sido propuesta posteriormente (Cimini y col. 1.997) para intervenir en el mecanismo



de síntesis y liberación de TSH en tireotropas estando modulada su expresión por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides .

Nuestros resultados mostraron la presencia de CR sólo en la hipófisis de aves. Su relación con las células TSHir podemos confirmarla en el lóbulo tuberal donde se observa una reacción muy intensa que se mantiene incluso al final de la embriogénesis. Además de la CR, también estuvo presente la CB D28K en las células del lóbulo tuberal pero con una reacción más débil. Por otro lado, en el ratón se observó inmunorreacción para la CB D28K, en primer lugar en las células que van a formar el lóbulo tuberal, antes de su diferenciación, y donde se mantuvo una reacción muy intensa durante todo el desarrollo para desaparecer en el adulto. En esta especie la CB D28K no se encontró en las células TSH del lóbulo anterior. Estos resultados nos indican que en diferentes especies la misma función puede depender del calcio ligado a distintas proteínas o bien, la misma proteína ligarse al calcio para distintas funciones, por lo que son necesarios más estudios antes de asociar una proteína a una función ó a un tipo celular concreto.

Las células STH-ir del lóbulo anterior de la hipófisis de ratón se diferencian en dos regiones del esbozo hipofisario; en primer lugar a partir de células de la cara ventral, es decir en la región caudal, y posteriormente de células de la región rostral de la cara dorsal de la bolsa, región rostral del lóbulo anterior, lo que explica su distribución por todo el lóbulo anterior. En el pollo y la codorniz si bien las células STH-ir proceden de ambas caras de la bolsa, sólo se diferencian en la mitad caudal permaneciendo con esta regionalización hasta la vida adulta.

El momento de diferenciación de estas células presenta grandes diferencias entre los distintos grupos de vertebrados, e incluso dentro de un mismo grupo. En el ratón hemos encontrado células STH-ir en el E.16 al igual que su mRNA (Japon y col. 1.994). Sin embargo, en la rata, si bien para unos autores el momento de aparición de las células STH coincide en el E.16 (Nemeskéri y col. 1.988), para otros es el último tipo celular en diferenciarse, (Hemming y col. 1.986; Chatelain y col. 1.979). En los primates las células STH se diferencian después de las células corticotropas (Danchin y col. 1.981), en las aves, nosotros observamos células STH-ir en la primera semana de vida posnatal, no coincidiendo por tanto con la cronología observada en el ratón. Los datos bibliográficos muestran resultados muy dispares entre los distintos autores; así, mientras para algunos la diferenciación de este tipo celular es muy temprana en el desarrollo, (Thommes y col. 1.987; Gasc y Sar 1.981) para otros ocurre hacia la mitad del mismo,

(Malamed y col. 1.993; Porter y col. 1.995). Allaerts y col. (1.999), y otros señalan el final del desarrollo como el momento de diferenciación de este tipo celular (McCann-Levorse y col. 1.993; Kansaku y col. 1.994; Porter y col. 1.995). En reptiles todos los trabajos realizados hasta ahora señalan a las células STH como las últimas en diferenciarse (Pearson y Litch 1.974; Pearson y col. 1.983; Batista y col. 1.989).

Al igual que para las células corticotropas del lóbulo anterior, la ausencia de inmunoreactividad para GHRH durante el desarrollo embrionario, en el ratón, sugiere que la producción de STH durante el desarrollo embrionario es igualmente independiente de un eje Hipotálamo-Hipófisis intacto. Por otro lado el momento de diferenciación de estas células se ve apoyado por los resultados obtenidos por Nogami y col. (1.995) los cuales sugieren que la maduración de las células STH es inducida por el aumento conjunto en sangre de las hormonas tiroidea y glucocorticoide.

En el ratón, las células gonadotropas se diferencian en el E17, estadio en el cual se las pone de manifiesto por ser inmunorreactivas para  $\beta$ LH; en el siguiente estadio, las mismas células pueden observarse inmunorreactivas para  $\beta$ FSH. Las primeras células gonadotropas se observaron en la zona ventrorrostral del lóbulo anterior, más tarde en la zona ventrocaudal y por último en la zona dorsal tanto rostral como caudal, quedando así su distribución definitiva por todo el lóbulo pero más abundantes en las zonas periféricas. Las células gonadotropas en las aves se diferencian al final de la segunda semana de vida posnatal. Tampoco Kansaku y col. (1.994), encontraron expresión del mRNA  $\beta$ LH a lo largo del desarrollo embrionario de la hipófisis de pollo. Nemeskéri y col. (1.988) observan en la rata  $\beta$ FSH-ir y  $\beta$ LH-ir en primer lugar en el lóbulo tuberal en el E.15 y en el E.16 en el lóbulo anterior al mismo tiempo que  $\beta$ TSH, GH y PRL. En alguna especie de mamífero como el cerdo, las células gonadotropas ( $\beta$ LH-ir) se diferencian antes que las tireotropas, (Dacheux y Martinat 1.983). En otras especies de mamíferos y de otros grupos de vertebrados, como hemos discutido anteriormente, suele ser simultánea la diferenciación de todas las células productoras de glucoproteínas, TSH, LH, FSH.

Es en las aves donde existe menos acuerdo entre los distintos autores; así, mientras Gasc y Sar (1.981), observan células  $\beta$ LH-ir en embriones de pollo de 4 días de incubación y Allaerts y col. (1.999) hacia la mitad del desarrollo embrionario, otros sólo observan  $\beta$ LH-ir o mRNA  $\beta$ LH en los primeros días de vida posnatal (Kansaku y col. 1.994).

Las células gonadotropas en el ratón, están presentes, al igual que en otros vertebrados tanto en el lóbulo anterior como en el lóbulo tuberal (Midgley 1.966; Baker y Yu 1.975; Baker y col. 1.977; Pearson y col. 1.982; Bello y col. 1.991a). En este caso, las células  $\beta$ LH están presentes en primer lugar en la región ventrorostral del lóbulo anterior y posteriormente en el lóbulo tuberal, procedentes ambas regiones de la zona rostral de la cara dorsal de la bolsa.

En el caso de las células gonadotropas, sí parece existir una relación entre la presencia de la hormona y la presencia de LHRH en la zona externa de la eminencia media puesto que las primeras fibras LHRH-ir están presentes un estadio anterior a la hormona.

La presencia de las hormonas gonadotropas en células del lóbulo anterior parece relacionada con el establecimiento de la función gonadal como sugiere la presencia de receptores de alta afinidad para GnRH (LHRH) en células hipofisarias de rata en estadios muy tempranos del desarrollo (Aubert y col. 1.985); estos autores ponen de manifiesto la presencia de receptores para GnRH en el estadio E.12 produciéndose un aumento significativo a partir del E.16, estadio previo a la diferenciación de las células gonadotropas. Por otra parte la presencia de hormonas gonadotropas parece estimular la diferenciación no sólo de las propias células gonadotropas sino también de otros tipos celulares como las células lactotropas (Bégeot y col. 1.983; Seuntjens y col. 1.999a) y las células tireotropas (Héritier y col. 1.994). Esto sugiere que al menos en algunas especies es necesario el establecimiento funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas para la diferenciación de las células productoras de Prolactina.

Otros factores de probada acción sobre la función gonadal, son los péptidos; entre ellos, en rata son de principal interés, la galanina, el NPY y la NT (Billiard 1.996; Bello y col. 1.999; Reyes y col. 2.000a). Nuestros datos en el ratón muestran que si bien pueden estar implicados en las mismas funciones, la forma o el momento de acción es diferente según las especies. Así hemos observado que si bien la presencia de NT y NPY en la eminencia media, es simultánea con la diferenciación de las células gonadotropas, la NT parece tener una acción transitoria en el establecimiento de esta función puesto que deja de observarse después del nacimiento; sin embargo el NPY continúa observándose en posnatales y adulto. Por otro lado, la galanina, muy abundante incluso en células hipofisarias (Hyde y col. 1.998; Reyes y col. 2.000a), sólo está presente después del nacimiento.

Si bien está establecido el papel de las hormonas gonadotropas del lóbulo anterior en el eje reproductor, no ocurre lo mismo con las hormonas producidas por células del lóbulo tuberal, donde se ha sugerido que podrían actuar regulando la actividad de las células del lóbulo anterior o en otros órganos diana desconocidos hasta el momento (Knowles y Anand Kumar 1.969; Wittkowski y col. 1.992; Guerra y Rodríguez 2.001), observaron en una región del lóbulo tuberal distintas células que resultaron inmunorreactivas para los anticuerpos contra todos los tipos celulares del lóbulo anterior. Si bien en todas las especies existen, en el lóbulo tuberal, células productoras de distintas hormonas similares a las células del lóbulo anterior, el papel de estas células permanece desconocido.

Al menos una de estas hormonas, la TSH, sabemos que presenta un funcionamiento diferente a la presente en el lóbulo anterior pero se trata de la producida por células específicas del lóbulo tuberal en las cuales está colocalizada con la "tuberalina". Además el interés por estas células también surge por presentar receptores para la melatonina, la cual parece inhibir la secreción de tuberalinas (Morgan y col. 1.992, 1.994). Podemos preguntarnos cuál es el papel de esas otras células que en principio son iguales a las del lóbulo distal y que parecen presentar receptores para el LHRH (Gross y col. 1.984) y para esteroides gonadales (Gros y Page 1.979).

Después de nuestros resultados se hace obvio intentar colocalizar, al menos en las células del lóbulo tuberal del ratón, factores relacionados con la funcionalidad de las hormonas presentes en ellas.

Al final de la embriogénesis, en el E.19 del desarrollo de la hipófisis de ratón, se observan por primera vez células PRL-ir en la mitad rostral del lóbulo anterior y en el lóbulo tuberal. Estas células proceden de la región rostral de la cara dorsal de la bolsa; posteriormente se observan células PRL-ir en la mitad caudal del lóbulo anterior. Estas células proceden de la cara ventral de la bolsa. En aves la única proliferación de células PRL-ir ocurre en la región rostral del lóbulo anterior, que como el resto del lóbulo procede de células de ambas caras de la bolsa de Rathke. La ausencia de otra diferenciación posterior hace que su distribución permanezca relegada a esta región incluso en el animal adulto (Barbanov 1.985; Kansaku y col. 1.994; Allaerts y col. 1.999). Japon y col. (1.994) detectan mRNA PRL en el ratón en el E.15, y Nemeskéri y col. (1.988) observa PRL-ir en el E.16. En otros mamíferos algunos autores

coinciden en que las células lactotropas son las últimas en diferenciarse durante la embriogénesis (Chatelain y col. 1.979; Danchin y col. 1.981; Dacheux 1.984), mientras que otros las observan después del nacimiento (Hemming y col. 1.986). En humanos, Winter (1.982) observa la presencia de células lactotropas en la quinta semana de gestación y Asa y col. (1.988) las observan en la decimosegunda semana. En otros grupos de vertebrados, la diferenciación de las células lactotropas ocurre al final de la embriogénesis, como en Anfibios (Zuber-Vogeli y Doerr-Schott 1.984; Moriceau-Hay y col. 1.979), Reptiles (Batista y col. 1.989) y Aves (Ishida y col. 1.991; Kansaku y col. 1.994; Woods y Porter 1.998); ó durante el desarrollo posnatal como en la Lamprea, donde estas células se diferencian durante las primeras semanas de vida (Harigaya y Hoshino 1.985; Wriugh 1.986). En las especies de aves utilizadas en este estudio hemos observado la presencia de células PRL-ir al final de la embriogénesis anteriores en este caso a las células STH y gonadotropas.

En el lóbulo anterior de la hipófisis de vertebrados las células glandulares presentan un patrón de diferenciación característico, así en el ratón representante de los mamíferos, mientras las células corticotropas, gonadotropas y lactotropas se diferencian rostro-caudalmente, las células tireotropas y somatotropas lo hacen caudo-rostralmente. En el pollo y la codorniz, representantes de las aves, los tipos celulares no regionalizados gonadotropas y tireotropas presentan un patrón caudorostral. Filogenéticamente, podemos observar que la regionalización celular, que es muy marcada en los primeros grupos, peces y anfibios, progresivamente va desapareciendo, primero para un tipo celular, las gonadotropas en reptiles, luego para dos tipos celulares, gonadotropas y tireotropas en aves, hasta que finalmente en mamíferos todos los tipos celulares se distribuyen por todo el lóbulo anterior. A pesar de que en mamíferos todos los tipos celulares se localizan por todo el lóbulo anterior, existe una cierta regionalización en la distribución de al menos dos tipos celulares, las gonadotropas y las tireotropas; así, mientras las células gonadotropas se observan fundamentalmente en las regiones periféricas del lóbulo anterior, las células tireotropas están mayoritariamente en las zonas centrales, esta disposición se explica por el origen de estas células en la bolsa de Rathke, es decir el origen de su diferenciación; este fenómeno de regionalización de las células de la bolsa de Rathke se conoce en reptiles (Pearson y col. 1.983; Pearson 1.985; Bello 1.987; Batista y col. 1.989) demostrándose en ellos, que el patrón de distribución diferente observado en el adulto es consecuencia del origen diferente a partir de las células de la bolsa de Rathke. Esto sugiere que

en la filogenia, distintos factores pueden influir sobre la determinación de las células de la bolsa de Rathke en los diferentes grupos de vertebrados. Además, la puesta en marcha de las distintas funciones celulares así como de las funciones del organismo controladas por ellas requiere de distintos factores; factores que a pesar de ser los mismos en muchos de ellos actúan en distintos momentos y pueden producir efectos diferentes. Sería de gran interés conocer si las diferencias morfológicas y de distribución celular observadas en la filogenia tienen alguna relación con ese conjunto de factores que regulan cada una de las acciones hipofisarias.