

Universidad de Salamanca
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía e Histología Humanas
Laboratorio de Neuroendocrinología del INCyL



**Análisis de las Células de Prolactina
(Proliferación y Apoptosis) en
Ratones Trasgénicos (Knock Out) para
la Aromatasa P450.**

David Prieto Ruiz

Salamanca, 2015

José CARRETERO GONZÁLEZ, Catedrático de Embriología y Anatomía Humana, como director del presente trabajo de Tesis Doctoral,

HACE CONSTAR:

Que D. David PRIETO RUIZ ha realizado el trabajo "ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS DE PROLACTINA (PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS) EN RATONES TRASGÉNICOS (KNOCK OUT) PARA LA AROMATASA P450" en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, con financiación pública competitiva del Instituto de Salud Carlos III.

Que a nuestro juicio, el trabajo reúne los requisitos de originalidad, dedicación y labor investigadora; así como de formación investigadora de su autor, que pueden ser exigibles a un trabajo de Tesis Doctoral.

Igualmente reúne todos los requisitos legales en la manipulación de animales.

Por todo ello, da el visto bueno para la presentación del trabajo para su defensa y lectura.

En Salamanca a 8 de febrero de 2015.

José Carretero

Indice

Indice.....	5
Prólogo.....	9
Agradecimientos	13
Introducción.....	17
Prolactina	19
El gen de prolactina y su promotor.....	20
Células hipofisarias productoras de prolactina.....	24
Estrógenos y Prolactina	30
Hipótesis y Objetivos del Estudio.....	33
Antecedentes	35
Objetivos del estudio.....	37
Siendo los objetivos específicos de este trabajo:	37
Materiales y Métodos Empleados	39
Animales empleados para el estudio experimental	41
Genotipaje	41
Extracción, aislamiento y purificación del DNA.....	42
Amplificación del DNA purificado, PCR.	42
Sacrificio de los animales, Extracción y Procesado de las muestras.....	43
Inmunocitoquímica.	44
Marcaje simple para prolactina.	44
Marcaje doble para PCNA y prolactina.	45
Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.....	46
Estudio de las muestras.....	46
Morfometría.....	46
Análisis morfométrico de los cortes histológicos.....	47
Análisis planimétrico, cuantificación celular.....	47
Análisis Estadístico de los resultados.	47
Resultados.....	49

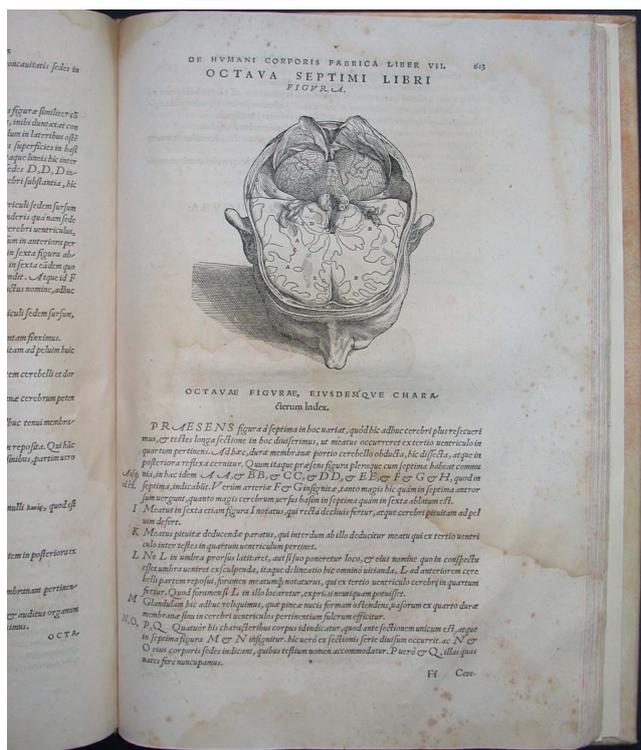
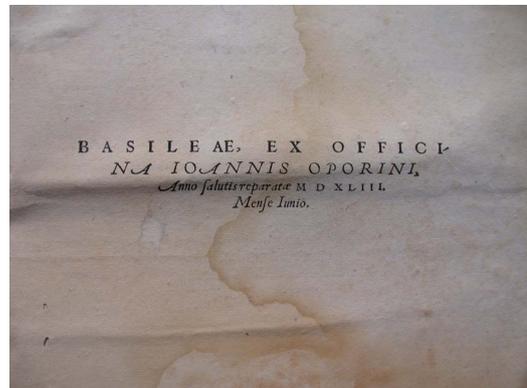
Células positivas a Prolactina.	51
Distribución general.....	51
Células positivas a Prolactina en las hembras de 22 meses de edad.	51
Células positivas a Prolactina en los machos de 22 meses de edad.	52
Análisis Planimétrico de las Células de Prolactina.....	54
Porcentaje de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en hembras wild type y knock out para aromatasa.....	54
Densidad numérica de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en hembras wild type y knock out para aromatasa.....	54
Porcentaje de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en machos wild type y knock out para aromatasa.	56
Densidad numérica de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en machos wild type y knock out para aromatasa.....	56
Análisis Morfométrico de las Células de Prolactina	58
Áreas celular y nuclear de células de prolactina en hembras wild type y knock out para aromatasa.....	58
Áreas celular y nuclear de células de prolactina en machos wild type y knock out para aromatasa.....	59
Proliferación celular	60
Células de prolactina en proliferación, positivas a prolactina y PCNA.....	60
Hembras.....	60
Machos.....	62
Análisis Morfológico de las Células de Prolactina.....	64
Células de prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de hembras.	64
Células de prolactina en la región dorsal de la hipófisis de hembras.	68
Células de prolactina en la región lateral de la hipófisis de hembras.	72
Células de prolactina en la región polar de la hipófisis de hembras.....	76
Células de prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de hembras.....	80
Células de prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de hembras	84
Células de prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de hembras.....	88
Células de prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de hembras....	92
Células de prolactina en la región central medial de la hipófisis de hembras wild type.....	96

Células de prolactina en la región central lateral de la hipófisis de hembras wild type.....	100
Análisis Morfológico de las Células de Prolactina.....	104
Células de prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de machos.....	104
Células de prolactina en la región dorsal de la hipófisis de machos	108
Células de prolactina en la región lateral de la hipófisis de machos.....	112
Células de prolactina en la región polar de la hipófisis de machos.....	116
Células de prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de machos	120
Células de prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de machos.....	124
Células de prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de hembras wild type	128
Células de prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de hembras wild type	132
Células de prolactina en la región central medial de la hipófisis de machos	136
Células de prolactina en la región central lateral de la hipófisis de machos.....	140
Discusión.....	145
Comentarios sobre la Metodología empleada.	147
Inmunocitoquímica.....	147
Morfometría y Planimetría.	148
Los ratones knock out para la aromatasa (ArKO).	150
Comentarios sobre los resultados obtenidos.	152
Ausencia de la aromatasa P450 y génesis de adenomas hipofisarios.....	152
Prolactinomas y Aromatasa.....	155
Prolactina y Aromatasa.....	159
Apoptosis de las células positivas a Prolactina.....	164
Proliferación de las células positivas a Prolactina.....	166
Conclusiones	169
Referencias Bibliográficas	173

Prólogo

Algo muy conocido por todos los que de una u otra manera trabajan en el sistema endocrino y por los médicos en general, es que la hipófisis recibe también el nombre de glándula pituitaria, que a diferencia del de hipófisis, es el término anatómico mundialmente aceptado.

Este nombre le viene de antiguo, ya Vesalio (1543) en su “De Humani Corporis Fabrica”¹ utiliza dicho término para referirse a una glándula situada en la silla turca de la base del cráneo, unida por un fino pedículo o tallo a la cara basal del cerebro.



En este mismo libro, Vesalio describe como “cerebro pituitam” a lo que hoy conocemos como líquido céfalo-raquídeo, y cómo la “pituita cerebral”, a través de la “pituitaria”, se dirigía hacia las fosas nasales para su liberación.

Este concepto, fisiológicamente erróneo, pero delicada y hermosamente descrito por Vesalio, dio nombre a la glándula pituitaria e incluso a la mucosa nasal también conocida como pituitaria.

Desde entonces hasta el presente los conocimientos sobre la hipófisis y su patología han variado de forma infinita, siendo tres los hitos fundamentales en este progreso que, por orden

cronológico de aparición, han sido: la purificación y determinación de las hormonas, la capacidad de estudiar la hipófisis con inmunocitoquímica y microscopía electrónica, y el desarrollo de las técnicas de biología molecular.

¹ Nota: Las imágenes del libro “De Humani Corporis Fabrica” se han tomado, con los pertinentes permisos, del original que se encuentra en la Biblioteca Histórica de la Universidad de Salamanca.

En este estudio, que sirve como trabajo de Tesis Doctoral, se combinan el empleo de técnicas inmunocitoquímicas (completadas con estudios de cuantificación morfológica) con técnicas de biología molecular para obtener animales knock out, lo que conlleva un análisis profundo e interesante de la regulación de una de las poblaciones celulares de la hipófisis más excitantes a estudiar.

La combinación de técnicas permite a don David llegar a conclusiones muy interesantes sobre la regulación de las células hipofisarias productoras de prolactina, y de cómo un enzima clave en la esteroidogénesis, la aromatasa P450, participa en el desarrollo de los prolactinomas.

El enzima clave en la biosíntesis de estrógenos es la aromatasa P450, que transforma los andrógenos aromatizables (como la testosterona) en estrógenos. Puesto que la secreción hipofisaria de prolactina se ve afectada por la actuación de los esteroides gonadales, la posibilidad de que la glándula produzca aromatasa y que esta desarrolle su actuación a nivel local podría ser especialmente relevante, más aun en aquellos aspectos relacionados con el mantenimiento de la población celular. Ya que los estrógenos tienen un importante papel en la génesis de prolactinomas, la transformación local de andrógenos a estrógenos una vez desregulada, podría ser un mecanismo patogénico en el desarrollo de estos tumores.

Para profundizar en el papel que podría tener la aromatasa en la modulación de la función hipofisaria, en el presente trabajo se ha empleado el modelo experimental proporcionado por los ratones knock out para aromatasa (ArKO). Estos animales se obtienen mediante una disrupción selectiva del gen CYP19, que codifica dicho enzima. El desarrollo de este modelo de insuficiencia de estrógenos es ideal para investigar el papel de estas hormonas.

Esta Tesis es el fruto de la ilusión personal por culminar un trabajo de investigación novedoso en el campo de la Endocrinología. Ilusión impulsada por Soledad, tía del autor del trabajo, antaño oficial de laboratorio en el Departamento de Anatomía de la Universidad de Salamanca y Auxiliar en el Servicio de Microscopía Electrónica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Su cariño (hacia el doctorando, hacia el que escribe esas letras, y hacia el departamento) ha sido crucial para que se diera el empuje necesario para que este estudio se haya culminado.

Ha sido un inmenso placer para mí prologar este trabajo de investigación.

José Carretero-González

Catedrático de Universidad de Embriología y Anatomía Humana.

Director del trabajo

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Profesor Carretero, director de esta investigación, por la orientación, seguimiento y supervisión de la misma. Su motivación constante y el apoyo recibido a lo largo de estos años han sido fundamentales para que esta obra haya llegado felizmente a término. Siempre será para mí un ejemplo de constancia y vocación docente-investigadora.

Al Departamento de Anatomía e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, por abrirme las puertas de su laboratorio y poner a mi disposición todas las instalaciones y recursos necesarios para realizar este trabajo. En especial a D. Ricardo Vázquez, a Dña. Marisa Fontanillo y Dña. Concepción Sánchez, por su inestimable colaboración en el laboratorio y cuidado y manipulación de los animales empleados en el estudio.

A mis padres, por todos los valores que me han inculcado, y porque siempre me han hecho sentir que su amor era incondicional.

A Mercedes, mi mujer, por su cariño, su infinita paciencia y su comprensión. Con su ejemplo he aprendido la lección de que con optimismo y grandeza de corazón es posible alcanzar cualquier meta.

A la alegría de mi vida, mis hijos Héctor y Merche, por los ratos que no he podido dedicarles durante la elaboración de este trabajo.

Y a mi tía Soledad, cuya constancia y paciencia infinitas han sido indispensables para que este trabajo se culminara.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

A todos, gracias de corazón.

El trabajo de Tesis Doctoral que se presenta ha sido realizado en el Dpto. de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina, en el laboratorio de Neuroendocrinología del INCyL y en el de estudio morfofisiológico del sistema endocrino del IBSal, financiado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

SAF2002-00808, Ministerio de Ciencia y Tecnología.

FIS PI030818, Instituto de Salud Pública Carlos III.

Los ratones heterocigotos necesarios para formar la colonia de ratones knock out, fueron gentilmente cedidos por el Dr. Harada.

Introducción

Prolactina

La Prolactina (prolactina) es una hormona peptídica segregada por las células lactotropas de la adenohipófisis que fue descrita a finales de los años 20 y principios de los 30 por varios grupos de estudio como una hormona hipofisaria diferenciada de las ya conocidas hormonas del Crecimiento (GH) y Sustancias Estimuladoras Gonadales (FSH y LH) y capaz de inducir la secreción láctea (Riddle y Braucher, 1931; Riddle y col., 1932; 1933).

En los primeros estudios experimentales se comprueba que dichos extractos hipofisarios estimulan la secreción de leche en cobayas y de una sustancia similar en pichones y palomas (Riddle y col., 1935; Nicoll, 1967).

Pero no será hasta 1970 cuando se logre aislar la prolactina de la GH en humanos, llegándose incluso a dudar de la existencia de la primera de forma aislada (Ferguson y Wallace, 1961). Sin embargo, posteriormente, Frantz y Kleimberg (1970) desarrollaron un proceso *in vitro* muy sensible, bloqueando las acciones lactotropas de la GH mediante anticuerpos anti-GH en cultivos de tejido mamario de ratones. Ello les permitió determinar de forma muy sensible los niveles de prolactina y les llevó a demostrar la existencia de niveles mensurables de prolactina en mujeres con galactorrea.

Pocos años después, todavía en ensayos con pichones, el grupo de Lewis mejoró los procesos de purificación de prolactina y su separación de GH mediante varias técnicas de separación secuencial (Sinha y col., 1973), abriendo camino a la utilización de Radioinmunoanálisis (RIA) homólogo y heterólogo para la medición de prolactina en el suero de individuos normales. A partir de estos procesos de RIA se consigue también la secuenciación de la prolactina humana (Shome y Parlow, 1977) así como la de su cDNA (Cooke y col., 1981).²

² Tomado de: Prolactin. ME Molitch (2002) en: The Pituitary 2ª edición, S. Melmed ed.; Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA. pp:119-171

El gen de prolactina y su promotor.

Como proteína que es, la síntesis de prolactina está codificada genéticamente. En la especie humana, el gen de prolactina se localiza en el cromosoma 6 (Owerbach y col., 1981) y en la rata en el cromosoma 10 (Cooke y col., 1986).

Tanto en el hombre como en la rata, el gen de la prolactina tiene aproximadamente 10 kb. En su extremo terminal 5' se encuentra el lugar de iniciación de la transcripción y en el extremo 3' el lugar de adicción para el Poli A. Este gen está formado por 5 exones separados por 4 grandes intrones, A: 1.3 kb; B: 1.5kb; C: 1.9 kb; D: 2.0 kb (Gaiddon y col., 1999). El exón 1 está formado por unos 56 pares de bases que codifican una región no transcrita al mRNA y los 28 primeros aminoácidos del péptido señal; el exón 2 consta de 56 para de bases que codifican el resto del péptido señal y otros 120 que codifican los 40 primeros aminoácidos de la secuencia de la prolactina; el exón 3 codifica del 41º al 76º aminoácidos de la secuencia hormonal; el exón 4 codificará desde el 77º al 136º; por último, el exón 5 codifica desde el aminoácido 137º al 199º en la especie humana (192º en la rata), presenta el triplete de terminación TAA y, además, presenta 118 pares de bases de la señal Poli A AATAA (Truong y col., 1984).

Después del procesado intranuclear de los RNA formados a partir de los exones, el mRNA resultante es una molécula de 1kb de longitud que codifica a una secuencia de 227 aminoácidos de los cuales los primeros 28 corresponden a un péptido señal y los otros 199 constituyen la secuencia estructural de la hormona (Cooke y col., 1980, 1981; Truong y col., 1984).

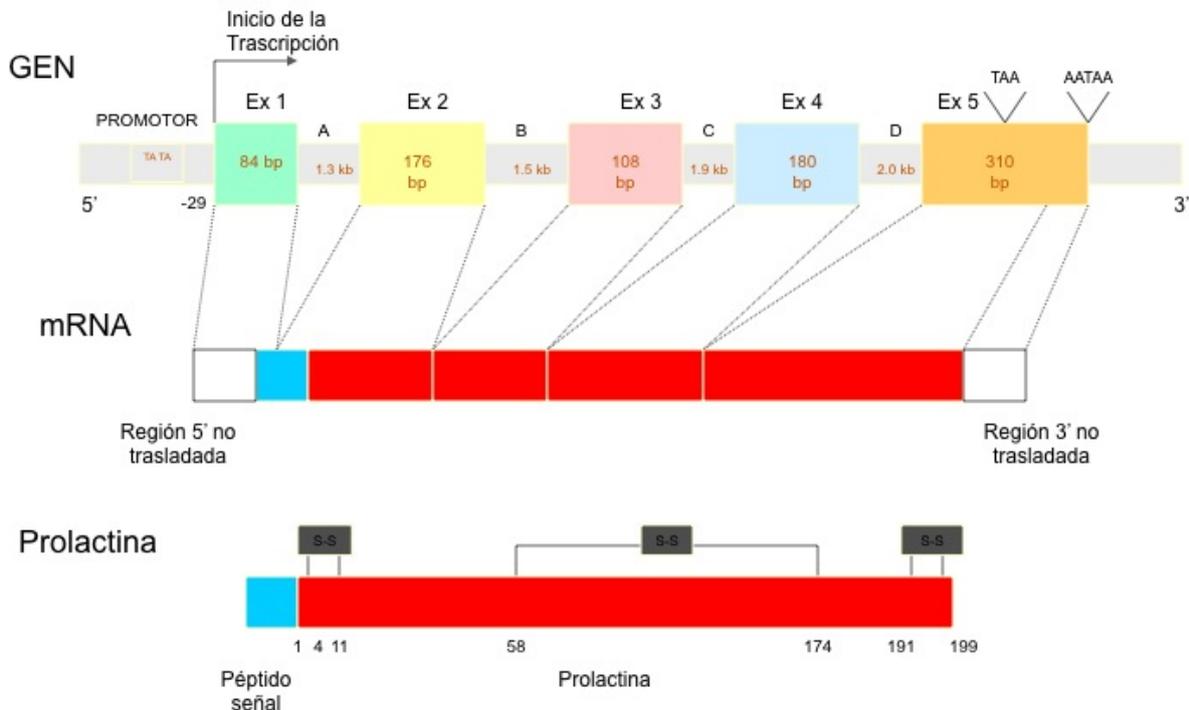


Figura1. Esquema de la estructura del gen de prolactina, su traslación al mRNA y la proteína resultante. Modificado de Molitch (2002).

El flanco 5' del gen es un gen promotor con alta homología entre humanos, roedores y bovinos (Camper y col., 1985; Wolf y col., 1990; Bole-Feysot y col., 1998).

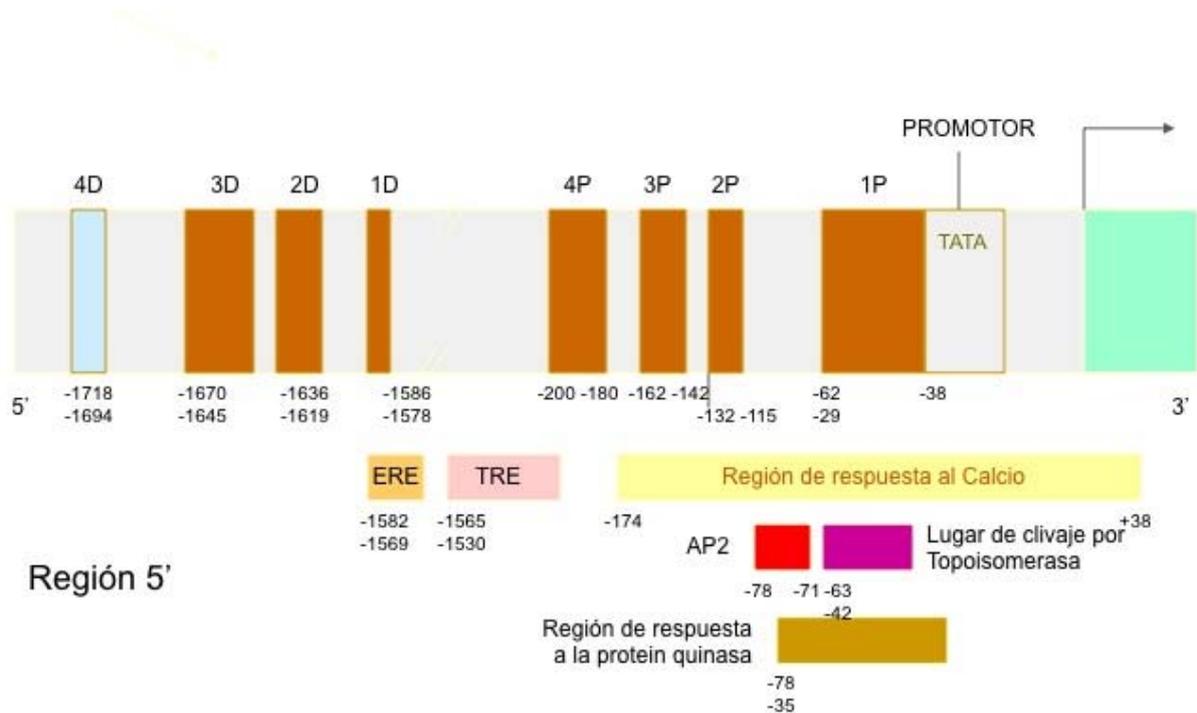


Figura2. Esquema de la estructura del promotor 5' del gen de prolactina.

Modificado de Molitch (2002).

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos, TRE: Elemento de respuesta a hormonas tiroideas, *P: lugares proximales de unión de Pit-1, *D: Lugares distales de unión de Pit-1.

Existen dos regiones responsables de que la transcripción de prolactina se dé únicamente a nivel hipofisario y no en otros tejidos. Uno de ellos, distal y situado en los pares de bases -1720 a -1580 es el responsable del 98% al 99% de esta actividad, mientras que el otro, proximal y situado en -422 a $+33$ bp, es responsable del 1% al 2% restante (Nelson y col., 1988; Ingraham y col., 1990).

En el interior de estos elementos hay secuencias de gran importancia, ya que sirven para el anclaje del activador específico Pit-1. Existen 4 de estos lugares de anclaje en la región proximal (denominados P1, P2, P3 y P4) y otros cuatro en la distal (D1, D2, D3 y D4). Aunque las regiones proximal y distal son capaces de dirigir acciones celulares específicas del gen prolactina, parecen actuar sinérgicamente (Ingraham y col., 1990).

Pit-1 está constituido por 291 aminoácidos con una masa molecular de 32.9 kDa (Ingraham y col., 1990). El cDNA de Pit-1 humano tiene una homología del 85% y más de un 95% de su secuencia de aminoácidos homóloga con las secuencias de rata, ratón y bovinas (Pfäffle y col., 1992; Lew y Elsholtz, 1991). Es parte de la familia de genes del dominio POU, formado por un dominio POU específico y un homodominio POU (Li y col., 1990). Para que haya regulación, Pit-1 debe estar anclado al promotor.

El papel activador de Pit-1 en la activación del gen de prolactina está modulado o puede ser modificado por otros factores como TRH, cAMP, EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Elsholtz y col., 1986; Day y Maurer, 1989a) o por los estrógenos (Schaufele, 1999).

En la región distal del promotor se encuentra el elemento de respuesta a estrógenos, situado en la región de -1582 a -1569 , a ella se une el complejo estrógeno-receptor estrogénico necesario para el estímulo de la transcripción de la molécula de prolactina. Existe un posible segundo elemento de respuesta a estrógenos situado en -1722 a -1709 .

El promotor presenta dos áreas ligadas a la promoción de la transcripción del gen de prolactina mediada por hormonas tiroideas. La primera de estas áreas se localiza en -1565 a -1530 y representa un lugar de unión para el complejo hormona tiroidea-receptor de hormona tiroidea (Glass y col., 1988; Day y Maurer, 1989b). Esta área está implicada en la estimulación de la transcripción de prolactina. La segunda se sitúa en -176 a -138 en la que, al contrario que en la anterior, su activación produce la inhibición indirecta de la transcripción actuando sobre otras proteínas (Day y Maurer, 1989b; Stanley, 1989).

En los 174 primeros pares de bases del extremo 5' reside la capacidad de regular la transcripción de prolactina debida a la concentración de calcio intracelular (Jackson y Bancroft, 1988). El calcio juega un papel fundamental en la regulación de la síntesis y liberación de prolactina. Sus efectos sobre la transcripción se llevan a cabo, en parte, mediante la fosforilación de topoisomerasa II que es una proteína quinasa dependiente de calmodulina ligada a calcio. El extremo 5' presenta cuatro regiones que reconocen la topoisomerasa II, situadas en $+1500$ a $+1600$, -42 a -63 , -1200 a -1300 y -2900 a -3000 (84). En el promotor existe una región que constituye un elemento de respuesta al calcio que queda dentro de los elementos que reconocen a la topoisomerasa (-42 a -63).

La ruta intracelular del fosfatidil inositol probablemente es la más relevante en la estimulación de la transcripción del gen de prolactina y actúa a través de un aumento del calcio intracelular y de la fosforilación de la proteína quinasa C que a través de ésteres de forbol desencadena la transcripción del gen actuando la región reguladora localizada de -74 a -30 (Elsholtz y col., 1986).

En el promotor hay una región donde se lleva a cabo el fenómeno de "down-regulation" por glucocorticoides sobre la transcripción del gen de prolactina en la rata, localizada entre -200 y $+75$ (Somasekhar y Gorski, 1988), localizándose en otros lugares dependiendo de la especie animal estudiada.

Al parecer este elemento tiene un estimulador de la transcripción que se anula cuando a él se unen los glucocorticoides (Sakai y col., 1988).

El cAMP es un elemento activador importante en la transcripción del gen de prolactina. La secuencia que media sus acciones se sitúa entre -127 y $+73$ (Keech y col., 1989).

Su acción se desarrolla a través de diferentes rutas como son a través de eventos dependientes del calcio intracelular (Waterman y col., 1985), activando la unión de AP-2 al promotor en la secuencia que va de -78 a -71 (Cooke y Baxter, 1982; Roesler y col., 1988; Iverson y col., 1990), por la unión de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP) a la secuencia -97 a -84 (Iverson y col., 1990), liberando un elemento inhibidor de -127 (Keech y Guitierrez-Hartmann, 1989) o aumentando Pit-1 (Waterman y col., 1985; Roesler y col., 1988).

Lógicamente con un promotor semejante al que acabamos de describir, existen diversos factores capaces de regular al gen que codifica la síntesis de prolactina. Algunos son capaces de actuar directamente sobre el gen, otros lo hacen actuando sobre receptores de membrana y desencadenando rutas de señal intracelular a través de cAMP o de fosfatidil inositol o bien aumentando o movilizándolo el calcio intracelular.

Entre los primeros están los estrógenos (Shupnik y col., 1979; Vician y col., 1979; Maurer, 1982, 1982b; Shull y Gorski, 1984; Carrillo y col., 1987), de interés para este estudio.

Al margen de pequeñas fracciones derivadas del clivaje de la proteína, la prolactina se presenta como un monómero, en torno al 80-90% de la hormona extraíble, como un dímero, del 8-20%, o como un polímero, de 1-5% (Suh y Frantz, 1974; Guyda, 1975; Garnier y col., 1978; Wallis y col., 1980; Whitaker y col., 1984). La polimerización se produce mientras que la hormona está almacenada en los granos de secreción maduros de las células de prolactina, por eso cuando hay un estímulo continuado de la liberación hormonal no llega a desarrollarse (Torres y Aoki, 1987).

También hay formas glicosiladas (Lewis y col., 1985) e incluso fosforiladas (Oetting y col., 1986; Brooks y col., 1990).

Células hipofisarias productoras de prolactina.

Aunque la prolactina puede producirse en otros lugares del organismo, la fuente principal de síntesis y liberación de la hormona es la hipófisis.

La hipófisis glandular o adenohipófisis está formada por un conjunto de células capaces de producir diferentes tipos hormonales en respuesta a factores de regulación centrales, hipotalámicos o periféricos. Uno de estos tipos celulares lo constituyen las células lactotropas o mamotropas, capaces de producir prolactina.

Embriológicamente la adenohipófisis es un derivado de la bolsa de Rathke en cuyo desarrollo y posterior diferenciación intervienen diferentes factores de transcripción y homeobox.

El listado de dichos factores y de su participación a lo largo del proceso se recoge en la figura 1 que resume los resultados obtenidos por diversos autores (Li y col., 1990; Voss y Rosenfeld, 1992; Pfäffle y col., 1992; Radovick y col., 1992; Bach y col., 1995; Sheng y col., 1996; Treier y Rosenfeld, 1996; Burrows y col., 1996; Sornson y col., 1996; Treier y col., 1998; Dattani y col., 1998; Wu y col., 1998; Cogan y col., 1998; Gaiddon y col., 1999; Rosenbloom y col., 1999; Schaufele, 1999; Wallis, 2000).

Cuando el engrosamiento de células epiblasticas, también conocidas como ectodérmicas primordiales, del techo del estomodeo se hunde por acción de Rpx se transforman en células propias de la bolsa de Rathke así conformada. Cuando estas células alcanzan el suelo del infundíbulo diencefálico, por acción de la proteína mineralizadora del hueso 4 (BMP4) se conforman las células prehipofisarias y ventral a ellas, el cartílago basiesfenoidal, de esta forma se aísla la bolsa que se transforma en la vesícula hipofisaria.

En las células prehipofisarias que conforman la vesícula por acción del FGF8, Wnt4 y Pit-1 se activa c-fos induciéndose la proliferación celular, principalmente de la pared ventral de la vesícula. A la vez, desde el infundíbulo se está conformando el futuro lóbulo neural de la hipófisis. De esta manera se forma el primordio hipofisario.

Las células del primordio hipofisario son células indiferenciadas que comienzan un proceso de diferenciación en el que participan, al menos, PTX1, P-OTX, Prop1, Pit-1, y Lhx3 para dar lugar a los diferentes tipos de células adenohipofisarias productoras de hormonas.

Cuando las células somatotropas, productoras de GH, expresan el receptor estrogénico, una parte de las mismas se transforma en células lactotropas, productoras de prolactina. Esto ocurre al final de la gestación, incluso en algunos roedores acontece en el primer día después del parto.

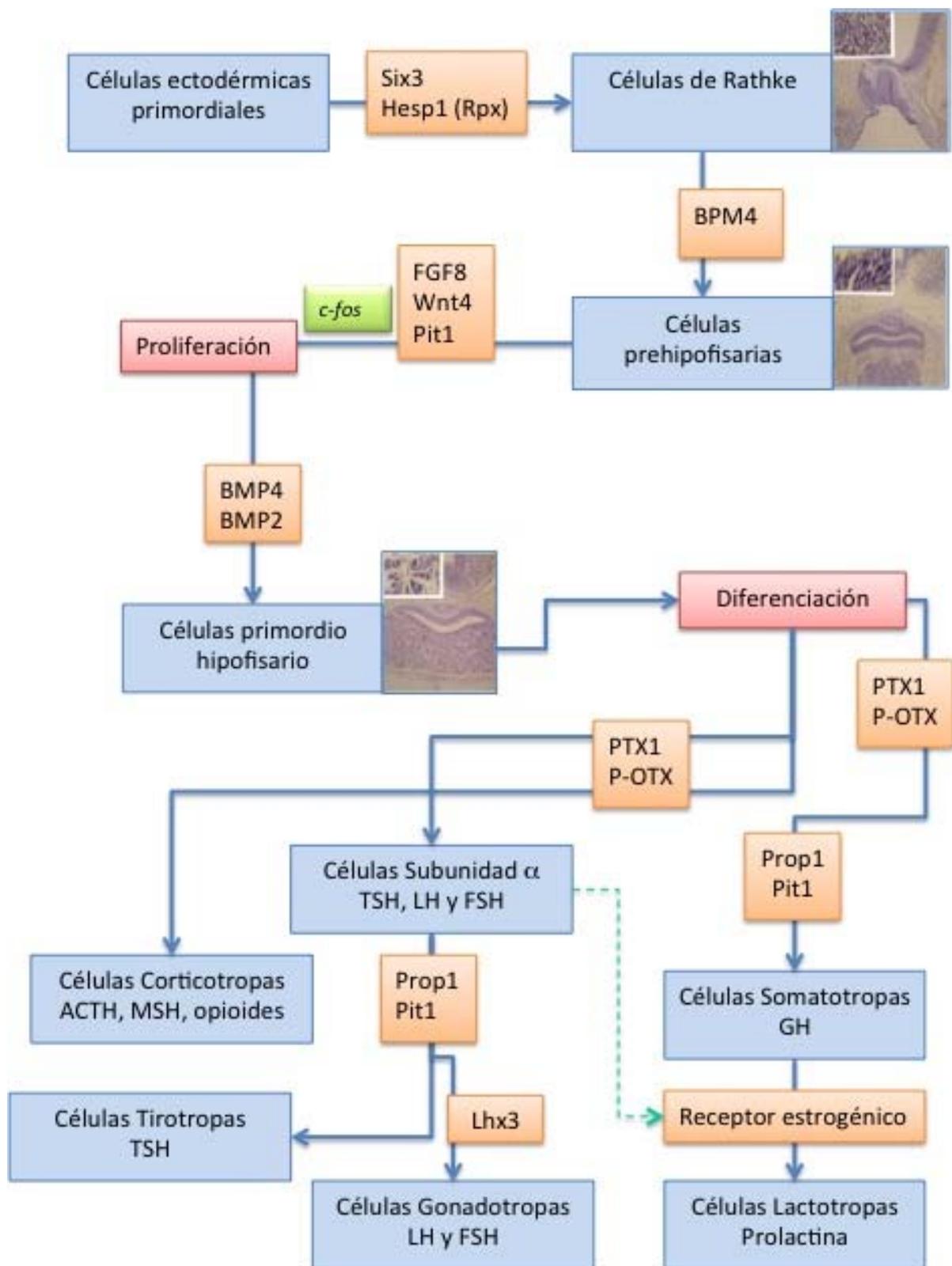


Figura 3. Desarrollo ontogénico de la hipófisis. Pasos secuenciales y participación de los diferentes factores de transcripción a lo largo de los mismos. Imágenes cedidas por José Carretero y colaboradores (1999b).

La prolactina se sintetiza y libera desde uno de los tipos celulares glandulares de la hipófisis comúnmente conocido como células lactotropas o células mamotropas.

Dependiendo de las técnicas empleadas para su estudio y de la especie de que se trate se han descrito variaciones en el porcentaje que representan las células lactotropas en relación con la población celular hipofisaria total. Una constante común e independiente de la especie es que el porcentaje de células lactotropas no varía con el sexo o con la edad, lo que hizo pensar que la prolactina tenía funciones independientes de la lactación.

En la especie humana, las células lactotropas suponen en torno al 25% de las células hipofisarias (Zimmerman y col., 1974; Halmi y col., 1975), mientras que en roedores se han descrito porcentajes más elevados ligeramente por encima del 30% (Dada y col., 1983).

Durante el embarazo y la lactación, este porcentaje se modifica de forma considerable, aumentando de forma progresiva al final del embarazo por proliferación celular activa y manteniéndose en valores de casi el 70% durante la lactación, para disminuir a valores normales una vez finalizada la misma (Goluboff y Ezrin, 1969; Scheithauer y col., 1990; Carretero et al., 2003). Estos hechos se sospecharon ya desde el comienzo de los estudios de la hipófisis, cuando se detectó que un tipo especial de células acidófilas aumentaba durante el embarazo y la lactación (Erdeheim y Stume, 1909; Dawson y Friedgood, 1938; Desclin, 1945; Dawson, 1946; Racadot, 1963; Pasteels, 1963; Girod y col., 1964; Amat y Muñoz-Barragán, 1974) por estar relacionado con la secreción láctea a estas células se las llamó células lactotropas.

Clásicamente, desde los años 50 (Farquhar y Rinehart, 1954a, 1954b; Hedinger y Farquhar, 1957) se ha admitido la presencia de unos rasgos particulares en las organelas citoplásmicas y en el núcleo de las células lactotropas que se han utilizado como criterios para identificar a este tipo celular dentro del pool de células endocrinas hipofisarias. Sin embargo, como veremos a continuación, existen variaciones en lo descrito por los diferentes autores.

Se ha descrito que el núcleo de la célula de prolactina suele ser redondeado u oval, situado en el centro de la célula y con nucleolo (Aumuller y col., 1978), aunque otros autores lo describen como ovoide y sin nucleolos evidentes (Beauvillain y col., 1977; Dekker, 1968; Deslex y col., 1976; Nakane, 1970, 1975; Saunders y col., 1983); para otros, el núcleo es excéntrico (Gracia-Navarro, 1980; Gracia-Navarro y Doerr-Schott, 1982; Leadem y Blask, 1982).

Se consideran como signos de aumentos en la actividad sintética o de la proliferación, el incremento de su tamaño (Aumuller y col., 1978, Saunders y col., 1983; Leatherland y Renfree, 1983a, 1983b; Carretero y col., 1995), su disposición excéntrica con polarización hacia el lado avascular (Saunders y col., 1983), una mayor evidencia del nucleolo (Leatherland y Ronald, 1978; Olivereau y col., 1980), la presencia de agrega-

dos densos de cromatina nuclear y el aumento en el número de poros en su membrana (Santolaya y col., 1979).

El aparato de Golgi es una de las organelas celulares más analizadas y un buen índice para analizar la actividad celular. Suele estar formado por varios dictiosomas de sacos paralelos que delimitan un área circular u ovalada en la que se encuentran granos de secreción irregulares, conocidos como granos de secreción inmaduros. Su apariencia, disposición dentro de la célula, la dilatación de los sacos dictiosomales, el número de granos de secreción inmaduros y la superficie ocupada por el área golgiana son signos que permiten valorar la actividad sintética de la célula (Hymer y col., 1961; Dekker, 1968; Pelletier y col., 1972; Von Lawzewitsch y col., 1972; Deslex y col., 1976; Stefan y Benakis, 1976; Chan y Nikitovichwiner, 1976; Fossum y Gautvik, 1977; Herbert y col., 1977a,b; Aumuller y col., 1978; Benjamin y Baker, 1978; Farquhar y col., 1978; Naik y Dinic, 1978; Santolaya y col., 1979; Aguado y col., 1979; Dacheux, 1980; Herbert, 1980; Tixier-Vidal y col., 1982; Leaden y Blask, 1982; Reifel y col., 1983; Saunders y col., 1983; Carretero y col., 1989).

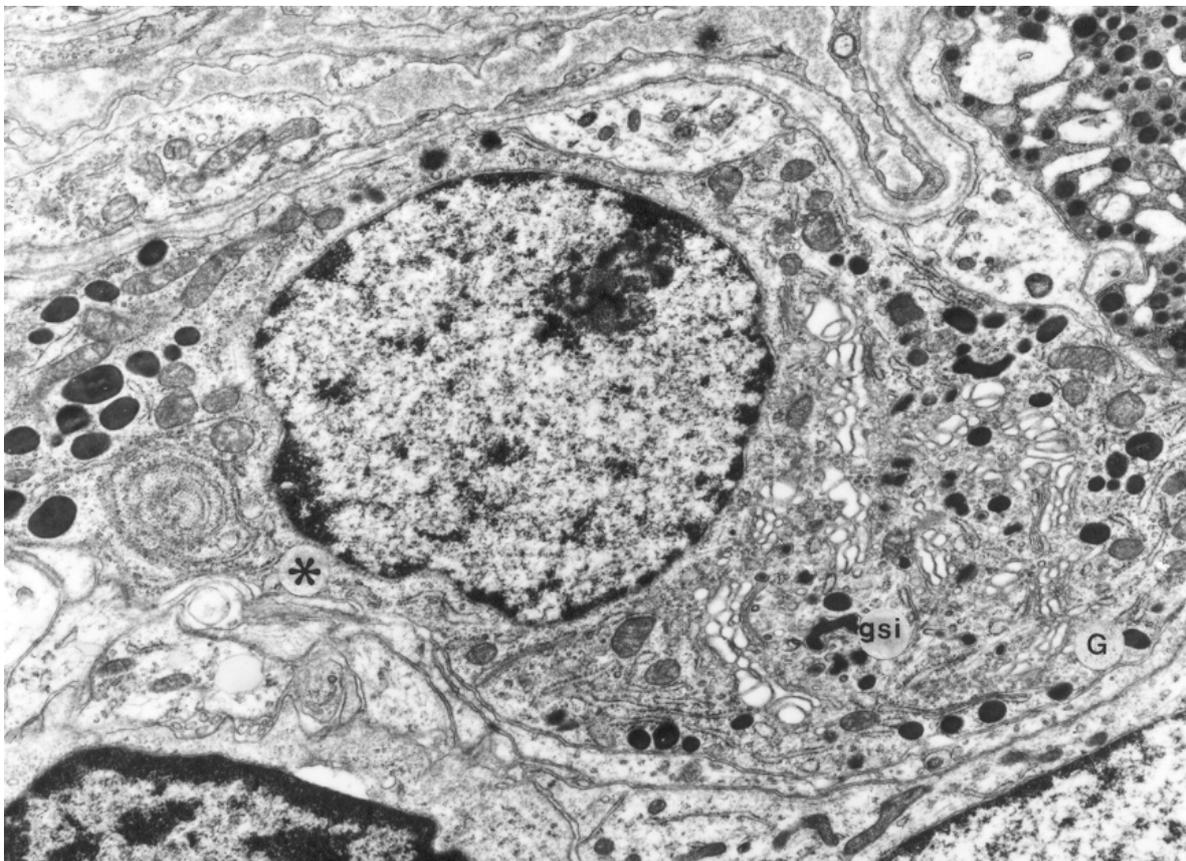


Figura 4. Imagen tomada con el microscopio electrónico de transmisión que muestra las organelas de una célula hipofisaria productora de prolactina de una rata hembra en proestro. Imagen cedida por Carretero y col. (1989).

Otra organela celular que adopta características especiales en las células productoras de prolactina es el retículo endoplásmico rugoso que suele alcanzar un desarrollo notable, sobre todo cuando la células está activada (Farquhar y Rinehardt, 1954a; Hedinger y Farquhar, 1957; Nakane, 1970, 1975; Moriarty, 1973; Chang y Nikitovich-

winer, 1976; Deslex y col., 1976; Seauvillain y col., 1977; Santolaya y col., 1979; Dacheux, 1980; Sasaki y Sano, 1980; Tixier-Vidal y col., 1982; Leadenhardt y Renfreee, 1983a).

Suele disponerse formando cisternas paralelas y aplanadas, generalmente en un polo celular (Von Lawzewitsch y col., 1972b; Aumüller y col., 1978; Benjamin y Baker, 1978; Herbert, 1980; Saunders y col., 1983). El estímulo de la síntesis hormonal provoca que las cisternas del retículo endoplásmico rugoso se enrollen en espiral, dando lugar a las denominadas imágenes de Nebenkern (Pantic, 1975; Aumüller y col., 1978; Leadem y Blask, 1982, Reifel y col., 1983; Saunders y col., 1983).

Las mitocondrias se distribuyen por todo el citoplasma y suelen ser alargadas, con numerosas crestas y matriz electrón densa (Aumüller y col., 1978).

Las células productoras de prolactina presentan vacuolas autofágicas y lisosomas que aumentan con la inhibición de la liberación hormonal (Farquhar, 1969; Harrison, 1979; Antakly y col., 1979; Tixier-Vidal y col., 1982; Reifely col., 1983; Saunders y col., 1983; Carretero y col., 1989).

La síntesis de prolactina se realiza en los ribosomas situados en el retículo endoplásmico rugoso desde donde pasa al aparato de Golgi, donde es empaquetada en gránulos de secreción (McShan, 1965; Salperter y Farquhar, 1981). Desde ellos, la hormona se libera al exterior mediante un proceso de exocitosis, pasando a situarse en el espacio intercelular o en el perivascular (Horvat y Kovacs, 1980; Pelletier y col., 1984; Carretero y col., 1989).

Excepto en los casos en que la liberación de prolactina está crónicamente estimulada, la liberación de la hormona se realiza mediante exocitosis al espacio intercelular o a los sinusoides fenestrados del sistema porta hipofisario (Farquhar, 1961; Herlant, 1964; Santolaya y col., 1979; Dacheux, 1980; Tixier-Vidal y Gourdjji, 1980; Roubos y Van der Wal-Divendal, 1980; Leaden y Blask, 1982; Tixier-Vidal y col., 1982).

La hormona sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, a partir de los granos de secreción inmaduros del área golgiana, se ve sometida a un proceso de polimerización y se almacena en granos de secreción grandes y ovalados que se disponen por el citoplasma celular. El tamaño, la forma y su densidad electrónica han servido para identificar a microscopía electrónica a las células hipofisarias productoras de prolactina (Farquhar y Wellings, 1957; Smith y Fraquhar, 1966, 1970; Foster, 1971; Shiino y col., 1972; Zanini y col., 1974; Pantic, 1975; Giannattasio y col., 1975; Tougard y col., 1980). Su densidad de volumen aumenta en los estados de estimulación de la síntesis y liberación de la hormona (Carretero y col., 1989).

En base a ello, Kovacs y colaboradores (1980) describieron dos tipos de células lactotropas: células tipo I, grandes, poliédricas y habitualmente cercanas a los capilares, que presentan granulaciones densas con microscopía electrónica de un tamaño de unos 250-800 nm y, células tipo II, pequeñas y medianas, angulosas y formando agrupaciones en los extremos posterolaterales de la hipófisis. En su interior pueden encontrarse, gránulos dispersos de alrededor de 200-350 nm.

Se cree que ambos tipos celulares son en realidad el mismo y que las diferencias apreciadas se deben al hecho de encontrarse células en momentos diferentes de la síntesis y secreción hormonal (Kovacs, 1984). Según esta teoría, las células del tipo I se encontrarían en una fase de reposo de la síntesis, mientras que las del segundo tipo serían células en fase de producción hormonal activa.

En la literatura se recogen más intentos de descripción diferenciando tipos celulares para las células productoras de prolactina, en general las variaciones descritas de unos autores a otros suelen deberse a que los estudios se realizaron en diferentes especies animales o empleando diferentes metodologías (Nakane, 1970; Yoshimura y col., 1974; Beauvillain y col., 1977; Sato, 1980; Nogami y Yoshimura, 1982).

Estrógenos y Prolactina

En páginas anteriores, ya se ha señalado que el promotor del gen que codifica la síntesis de prolactina presenta muy probablemente dos lugares de respuesta al complejo estrógeno-receptor estrogénico y que es muy posible que los estrógenos activen la unión de Pit-1 a sus lugares de anclaje en el promotor. También hemos comentado que la expresión de receptor estrogénico es necesaria para la diferenciación de este tipo celular.

Está claro pues que los estrógenos son agentes estimuladores importantes de la síntesis y liberación de prolactina.

No obstante, hay muchos más datos, algunos de gran relevancia, relacionados con el control estrogénico de la prolactina, empezando por los receptores estrogénicos.

Los efectos celulares de los estrógenos se producen mediante la vía clásica a través de los receptores de estrógenos ER1 o alfa y ER2 o beta, que están localizados en el núcleo y el citoplasma de las células diana (Kuiper y col., 1996; Mosselman y col., 1996).

Ambos receptores se distribuyen de manera diferente en los tejidos y juegan papeles fisiológicos distintos. Pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción inducidos por hormonas y que determinan la transactivación de genes estrógeno dependientes (Mangelsdorf y col., 1995; Akingbemi, 2005).

Son codificados por dos genes separados (ESR1 y ESR2), pero comparten la arquitectura estructural común de los receptores nucleares y exhiben una estructura de dominio que se ha conservado a lo largo de la evolución (Heldring y col., 2007). En el dominio central, que es el que se une al DNA, ambos receptores de estrógeno comparten la más alta similitud de secuencia (95%), lo que les permite unirse a elementos de respuesta de DNA idénticos. Los dominios de unión al ligando-C-terminal poseen un 60% de similitud, y son los que permiten que exista especificidad para diferentes ligandos.

Los estrógenos también ejercen efectos rápidos “no genómicos” que producen una alteración de los mecanismos intracelulares de transducción de señales. Se ha sugerido que podrían estar mediados por receptores de estrógeno extranucleares o por receptores de membrana no clásicos tales como el receptor acoplado a la proteína G (GPR30/GPER), que ha sido identificado como un nuevo receptor de estrógeno (Prossnitz y col., 2009).

A través del GPER, el estradiol actúa rápidamente a tres niveles: activación de la guanilato ciclasa, movilización de los depósitos de calcio intracelular y activación de la proteína quinasa mitógeno activada, conocida como MAPK, y la fosfoinositol 3-quinasa, conocida como PI3K (Prossnitz y col., 2008; Lappano y col., 2013).

No obstante, el objetivo común de muchas de estas vías de señalización es la fosforilación de un factor clave de la transcripción, la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) (Kwakowsky y col., 2013).

Otro aspecto de especial interés son los efectos que los estrógenos desarrollan sobre la síntesis y secreción de prolactina.

En animales hembras, se ha comprobado que la liberación aumentada de prolactina durante la fase del proestro se debe a un pico estrogénico previo (Neill y col., 1971) y que la administración de estrógenos provoca un aumento de la síntesis de prolactina (Baker y col., 1963; MacLeod y col., 1969; Maurer y Gorsky, 1977).

In vivo o in vitro, los estrógenos inducen un aumento del mRNA y de la síntesis de prolactina (Shupnik y col., 1979; Vician y col., 1979; Maurer, 1982; Shull y Gorski, 1984; Carrillo y col., 1987).

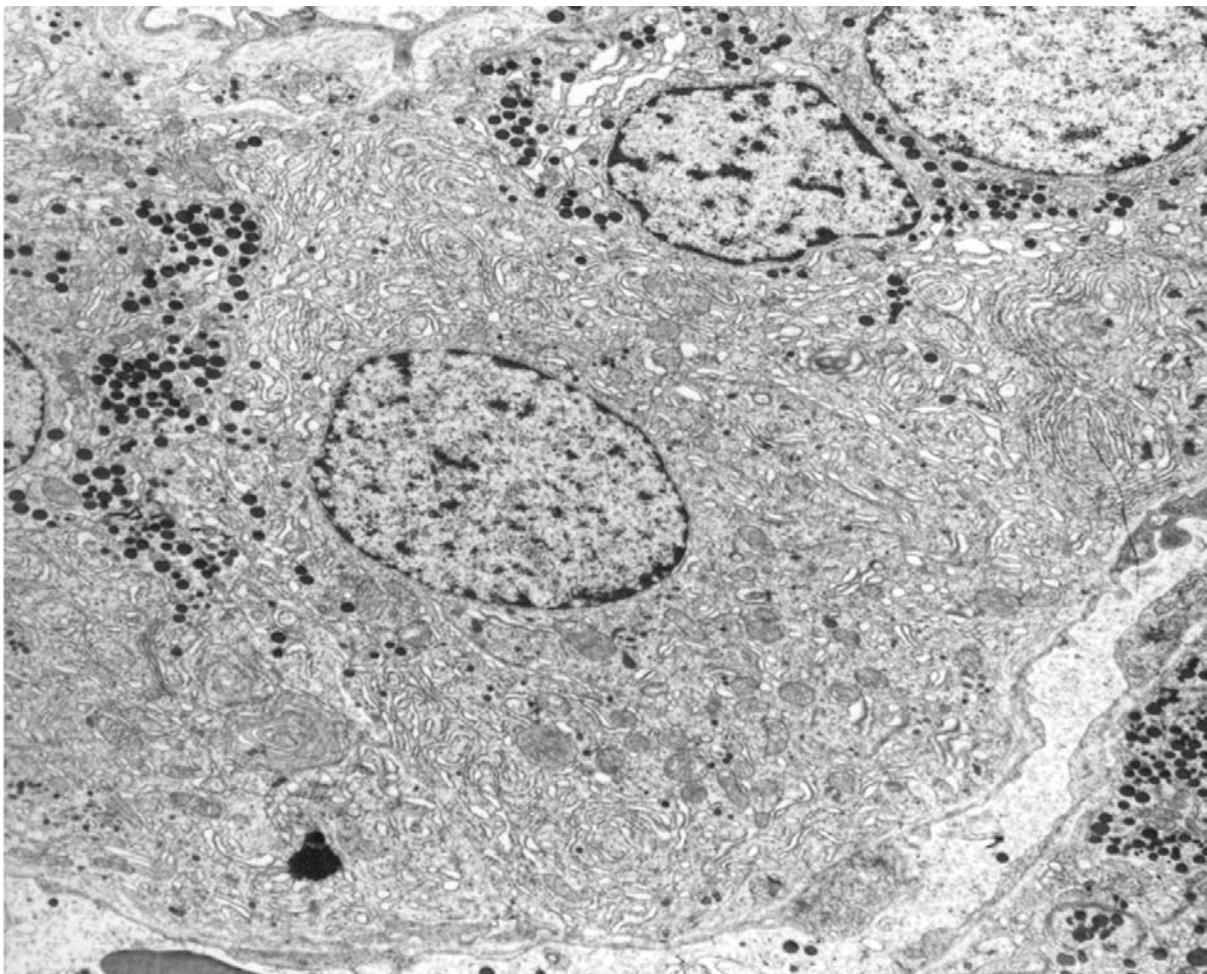


Figura 5. Imagen tomada con el microscopio electrónico de transmisión que muestra las organelas de una célula hipofisaria productora de prolactina de una rata tratada con estradiol. Imagen cedida por Carretero y col. (2015).

Los efectos sobre la transcripción del gen son bifásicos, desarrollándose una fase inicial que se debe a la unión directa del complejo estrógeno-receptor estrogénico con el promotor, y una fase tardía que implica síntesis proteica y podría deberse a la capaci-

dad de los estrógenos de inhibir los receptores dopaminérgicos o de modular los efectos del cAMP (Shull y Gorki, 1985; 1986; 1989).

La administración de estrógenos provoca un estímulo de la actividad mitótica, aumentando la síntesis de DNA y la proliferación de las células lactotropas (Lloyd y col., 1975; Yamamoto y col., 1986; Amara y col., 1987; Lloyd y col., 1988).

Pudiendo estar implicados en la proliferación de las células lactotropas durante la gestación tardía (Carretero y col., 2003).

Además, los estrógenos actúan sobre factores hipofisarios ligados a la síntesis y secreción de prolactina. Varían otros factores reguladores hipofisarios de la prolactina, como la galanina (Ponchon y col., 2000).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que modifican la respuesta de la prolactina a los opioides endógenos (Carretero y col., 1990b) y la expresión hipofisaria de receptores opioides μ (Carretero y col., 2004), estimulan la secreción de VIP hipofisario (Carretero y col., 1995) y estimulan la proliferación de las células vipérgicas de la hipófisis (Carretero y col., 1998), además de modificar el patrón sexual secretor de GH (Carretero y col., 1990b, 1992).

Hipótesis y Objetivos del Estudio

Antecedentes

De las dos vías de metabolización de los andrógenos, la reducción y la aromatización, la última depende de la presencia de un enzima, la aromatasa P450, que pertenece a la superfamilia del citocromo P450, y tiene como consecuencia la transformación de la testosterona en estradiol en la propia célula o en células vecinas.

El estradiol es un esteroide gonadal con capacidad reguladora a nivel hipofisario, actuando sobre el hipotálamo o sobre la propia hipófisis, e interviene en la regulación de la síntesis y secreción de varias hormonas, principalmente, las gonadotropinas LH y FSH, la prolactina y la hormona del crecimiento (GH), así como de distintos péptidos reguladores auto-paracrinós hipofisarios como el VIP.

Sobre las células hipofisarias productoras de prolactina, los estrógenos actúan principalmente sobre tres acontecimientos: aumentan la susceptibilidad de la célula a la acción de Pit-1 y probablemente aumenten la producción de dicho factor de transcripción, activan a la adenilato ciclasa y se unen a receptores estrogénicos, el complejo estrógeno-receptor recién formado se une a la región activadora 5'. Además, los estrógenos activan la síntesis de DNA y la proliferación celular e, incluso, producen hiperplasias y prolactinomas.

Los adenomas hipofisarios espontáneos son frecuentes en las ratas viejas (Berkvens y col., 1980; McComb y col., 1984; Herzog y Schlote, 1992) y, dentro de ellos, los prolactinomas tienen la mayor incidencia, llegando en algunas series a alcanzar hasta un 80% de las ratas de edad avanzada (Meites, 1982; Sarkar y col., 1982).

Se sabe que la manipulación experimental de la regulación dopaminérgica y estrogénica de la célula de prolactina da lugar a que la dopamina anule el efecto proliferativo del estradiol (McComb y col., 1986; Phelps e Hymer., 1988; Kovacs y col., 1991) y a que los estrógenos y los antagonistas dopaminérgicos se sumen sinérgicamente para inducir dicha proliferación e inducir la aparición de prolactinomas (Pérez y col., 1986; Pasolli y col., 1992; Oliveira y col., 1996; Southgate y col., 2000).

El déficit de receptores D2 podría sumarse a una producción local aumentada del estradiol, por efecto de la aromatasa P450, para inducir la génesis tumoral e incluso dicha génesis podría ser debida a un efecto estrogénico, ya que los efectos de la dopamina son bloqueados parcialmente por los estrógenos (Raymond y col., 1978; West y Dannies, 1980; Bression y col., 1985) que, además, en la rata, disminuyen el número de receptores dopaminérgicos (Pasqualini y col., 1986).

Entre otros factores, en la génesis de los prolactinomas se ha implicado a los esteroides gonadales, en particular a los estrógenos (Lloyd y col., 1991; Heaney y col., 2002). Desde hace tiempo se sabe que el tratamiento crónico con estradiol induce, en una primera fase, hiperplasia de las células de prolactina, constituyéndose, en una segunda fase, el prolactinoma, dependiendo del tiempo de duración del tratamiento (McEuen y col., 1936; Dunning y col., 1947; Clifton y col., 1956; Stone y col., 1979). Estudios posteriores han confirmado que los estrógenos inducen la formación de prolactinomas y VIPomas (Phelps y Hymer, 1983, 1988; Hsu y col., 1989; Lloyd y col., 1990, 1991).

En nuestro laboratorio, como resultado de cuatro proyectos de investigación, uno financiado por la Unión Europea (BIOMED-1, no BMH1-CT94-1536, n° proyecto PL931536), otro por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (JCyL, SA58/98) y otros dos financiados por el FIS (FIS 99/1187, FIS PI021803) empleando un anticuerpo anti Aromatasa P450 altamente específico, hemos demostrado la expresión inmunohistoquímica de la aromatasa P450 en la hipófisis de la rata (Carretero y col., 1999). Esta expresión está directamente relacionada con el género, siendo más alta en machos que en hembras (Carretero y col., 1999).

Además, existe una expresión diferente dependiendo de la edad del animal: prenatalmente, su expresión comienza en el día 17 del desarrollo, se mantiene en etapas postnatales tempranas, expresándose igual en machos que en hembras. Prepuberalmente, la expresión disminuye en hembras y se mantiene en machos y, en la rata adulta, apenas se expresa en la hembra, pero sí en el macho (Carretero y col., 1998a).

Junto a ello, hemos comprobado que las hipófisis no tumorales de ratas viejas no expresan el enzima (Carretero y col., 1998a), lo que podría ser una característica de la evolución postnatal del enzima en respuesta a déficits de la secreción de testosterona o a la aromatización periférica de la testosterona en el periodo senil (Harman y Tsitouras, 1980).

Al contrario, un porcentaje muy alto de los adenomas espontáneos que aparecen en estos animales sí expresan el enzima, lo que sugiere que dicha expresión podría guardar estrecha relación con el tumor. Así, de una serie de 105 adenomas espontáneos de hipófisis, el 66%, fueron inmunorreactivos a la aromatasa, sin que ello guardara relación con algún tipo anatomopatológico del adenoma. Considerando solo los prolactinomas, el 86.67% presentaron reacción a la aromatasa, llamando la atención que el 100% de los prolactinomas puros fueron aromatasa positivos, mientras que solo el 60% de los múltiples expresaron el enzima (Carretero y col., 1998b; Carretero y col., 2002b). Hallazgos semejantes han sido comprobados en prolactinomas humanos (Carretero, 2005) relacionados con la actuación del estradiol producido localmente en la hipófisis e implicando al factor mitogénico AIB1 (Carretero y col., 2013).

La gran proporción de tumores que, en nuestros estudios previos, expresan conjuntamente la aromatasa y la prolactina sugiere la posibilidad de que exista una relación entre la expresión del enzima y el desarrollo del tumor.

La alta prevalencia de los tumores hipofisarios, originados a partir de células glandulares, del 10 al 23% de los tumores intracraneales (Molitch y Russel, 1990) y que, dentro de ellos, los prolactinomas alcanzan la mayor frecuencia de los tumores funcionantes; unido a los resultados de nuestro laboratorio, hacen que sea sumamente interesante discernir si la presencia de la aromatasa se asocia o no en la génesis de los adenomas espontáneos en roedores, empleando ratones knock out para el gen de la aromatasa.

En un estudio reciente, en nuestro laboratorio hemos constatado que los antagonistas o bloqueantes de la aromatasa, in vivo e in vitro, inducen cambios en las células hipofisarias productoras de prolactina, con un descenso de su actividad sintética y liberadora a la vez que disminuyen la proliferación celular (Carretero y col., 2014).

Dado que los estrógenos circulantes en los machos son muy bajos y que la testosterona induce la expresión de aromatasa en la hipófisis, no es descabellado pensar que la aromatización local hipofisaria de la testosterona a estradiol pueda jugar un importante papel en el mantenimiento de la población celular hipofisaria productora de prolactina al igual que ocurre en las hembras. Por ello en este estudio nos planteamos analizar los cambios que acontecen en las células productoras de prolactina en ratones knock out para aromatasa, machos y hembras.

Objetivos del estudio.

El trabajo que se propone está englobado dentro de una línea de investigación cuyo objetivo principal es demostrar o descartar que algunos de los posible mecanismos reguladores de la expresión de la aromatasa hipofisaria y si dicho enzima induce a través de la producción de estradiol, que actuaría sobre receptores estrogénicos alfa de hipófisis normales o génicamente condicionadas (deficitarias de aromatasa, deficitarias del receptor dopaminérgico D2 o deficitarias de la proteína kip-p27), la génesis de prolactinomas espontáneos y si el factor de trascrición Pit-1 interviene en dicho proceso.

Siendo los objetivos específicos de este trabajo:

- 1.- Determinar si la ausencia de la Aromatasa P450 en ratones knock out para el enzima modifica los patrones normales de expresión, distribución y morfología de las células hipofisarias productoras de prolactina.
- 2.- Determinar si la ausencia de la Aromatasa P450 en ratones knock out para el enzima modifica los patrones normales de proliferación de las células hipofisarias productoras de prolactina.
- 3.- Analizar si los ratones trasgénicos para la aromatasa desarrollan prolactinomas.

Materiales y Métodos Empleados

Animales empleados para el estudio experimental.

El Dr. Harada nos cedió gentilmente heterocigotos machos y hembras para poder obtener la colonia de ratones knock out para el gen de la Aromatasa P450.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones estándar de estabulario, con temperatura ambiente de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, ritmo de luz oscuridad 12:12 horas, y acceso a la comida (pienso estándar rata/ratón) y la bebida ad libitum.



Figura 6. Condiciones del estabulario

Dado que los progenitores knock out para la aromatasa son estériles, los animales se obtuvieron a partir de progenitores heterocigotos, de esta manera obtuvimos camadas en las que el 49.66% fueron heterocigotos, el 24.14% fueron wild type y el 26.21% fueron knock out.

Para alcanzar los objetivos propuestos y llevar a cabo el diseño experimental, hemos estudiado 120 ratones (60 por sexo, y de cada sexo, 30 eran wild type [wt] y 30 knock out [ko]). El número elevado de ratones se debió al análisis detallado por edades del desarrollo de adenomas hipofisarios, sacrificando los animales a los 14, 16, 18, 20, 22 y 25 meses de edad (10 animales wt y 10 ko en cada una de las edades, 5 de cada sexo).

Los veinte ratones de 16 meses de edad, 10 wt y 10 ko (5 de cada sexo) fueron empleados para el estudio de las células hipofisarias positivas a prolactina.

Genotipaje.

La determinación de la delección-sustitución del gen para la aromatasa P450 se realizó mediante PCR. Para ello, cuando los ratones tenían 1 mes de edad, se tomó el fragmento distal de la cola para aislar el DNA.

Extracción, aislamiento y purificación del DNA.

La extracción, aislamiento y purificación del DNA se realizó empleando el kit de Roche® siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5mL y libre de nucleasas se añadieron: de 2 a 5 mm de la cola del ratón, 200µl del tampón de lisis de tejidos y 40 µl de proteinasa K reconstituida.

Se mezcló e incubó durante 3 horas a 55°C.

Transcurrido ese tiempo se procedió a obtener el lisado mediante aspiración-eyeción repetida de la muestra, con una jeringa de 1 mL, libre de nucleasas.

Una vez obtenido el lisado, se añadieron 200µl de tampón de unión y 100 µl de isopropanol; para después centrifugar 5 minutos a 13000 xg.

Tras insertar un tubo de alto filtrado en un tubo de recogida, se pipeteó el líquido de la muestra en el reservorio superior del tubo de filtrado. Todo el tubo ensamblado se centrifugó 1 minuto a 8000 xg. Después de centrifugar, se retiró el tubo de filtrado del tubo de recogida y se desecharon el líquido filtrado y el tubo de recogida.

Se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron, al reservorio superior del tubo de filtrado, 500µl del tampón inhibidor de remoción, para centrifugar 1 minuto a 8000 xg.

Se procedió al lavado de la muestra, para lo que, por duplicado, después de centrifugar y retirar el tubo de filtrado del tubo de recogida y desechar el tubo de recogida y el líquido filtrado, se colocó de nuevo el tubo de filtrado en un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500 µl de tampón de lavado al reservorio superior del tubo de filtrado. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 8000 xg.

Al finalizar el segundo lavado, se centrifugó durante 10 segundos a velocidad máxima y se desechó el tubo de recogida.

Tras insertar el tubo de filtrado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio y estéril, se añadieron, en el reservorio superior del tubo de filtrado, 200 µl del tampón de elución precalentado y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 xg.

Para los centrifugados se ha empleado la centrífuga para eppendorf Hermle Z233 M-2.

Después de esta sucesión de pasos, el tubo de microcentrífuga contenía ya el DNA eluido que se utilizó inmediatamente o fue almacenado entre 2-8°C o bien entre -15° y -25° para análisis posteriores (dependiendo del tiempo a transcurrir hasta la realización del análisis).

Amplificación del DNA purificado, PCR.

Una vez aislado el DNA se procedió a realizar la amplificación del fragmento de DNA para detectar la delección-sustitución del gen de aromatasa P450 por el recombinante.

Empleando el kit PCR Master mix de Promega®, con un volumen de 5 µl de DNA aislado y empleando como primers:

Superior-Recombinante: ctt ggc tac cat gtt gtt att gtc

Inferior-Silvestre: agc tct gga ggt tta ctt tcc tag

La reacción de amplificación se realizó mediante 30 ciclos (94°C-65°C-72°C) en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler®.

Una vez amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 150 mV, utilizando una muestra de 20µl de cada producto amplificado en tampón de carga, con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se fotografiaron bajo luz ultravioleta.

En todos los casos se incluyó un control negativo sin primers.

La figura 7 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras la electroforesis.

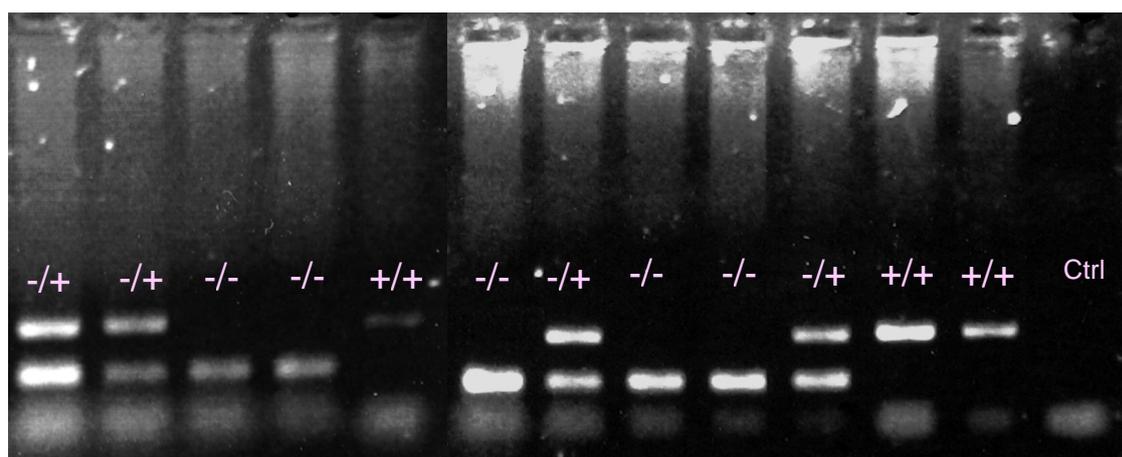


Figura 7. Electroforesis del DNA amplificado por PCR para el gen de aromatasa P450.

En la imagen se aprecian las bandas de electroforesis obtenidas tras el producto de amplificación con PCR del gen silvestre y el recombinante para Aromatasa P450, de los animales empleados en el estudio. -/+ : heterocigoto, +/+ : wild type, -/- : knock out.

Sacrificio de los animales, Extracción y Procesado de las muestras.

Una vez que los animales alcanzaron la edad de 16 meses, los animales fueron sacrificados por decapitación y, después de la apertura meticulosa de la calota encefálica, se procedió a extraer la hipófisis, mediante disección cuidadosa. Las muestras para el estudio histológico se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (0.1M, pH: 7.4) durante 8 horas.

Una vez fijadas, se lavaron en el mismo tampón durante 4 horas y se procedió a su deshidratación en etanoles crecientes en concentración (70, 80, 96 y 100%).

Ya deshidratadas, se procedió a su aclaramiento en benceno para su posterior inclusión en parafinas. La deshidratación, el aclaramiento y la inclusión se realizó en un procesador histológico Leica®.

De los bloques obtenidos se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor empleando un microtomo Microm HM35, que se fijaron con gelatina al alumbre de cromo en portas de vidrio.

Inmunocitoquímica.

La inmunocitoquímica se ha empleado para detectar las células hipofisarias positivas a prolactina, mediante marcaje simple; para determinar las células positivas a prolactina en proliferación, mediante marcaje doble para prolactina y PCNA.

Marcaje simple para prolactina.

Los cortes obtenidos se incubaron en estufa a 58°C durante 1 hora, tras lo que se procedió a la desparafinización en xileno y rehidratación en alcoholes decrecientes, terminado el proceso con un lavado en agua destilada y desionizada durante 5 minutos.

Para evitar falsos positivos derivados de la posible existencia de peroxidasa endógena en el tejido, el enzima se bloqueó sumergiendo las muestras en un baño de Metanol-Agua oxigenada al 3% (200ml/30ml), durante 20 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron, en agua destilada, a temperatura ambiente, mediante 2 lavados de 10 minutos cada uno.

Se acondicionaron las muestras para las sucesivas reacciones, sumergiendo los cortes en tampón TBS (Trizma base, Sigma®, 0.01M, pH 7.4, con 0.09% de NaCl), durante 20 minutos, y, por último, en TBS durante 5 minutos.

Para inhibir reacciones inespecíficas, los cortes se incubaron con suero no inmune obtenido en cabra (diluido 1:30 en TBS), durante 20 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con suero policlonal anti-prolactina obtenido en conejo (Dako®, diluido 1:300 en TBS), a 4°C toda la noche.

Transcurrido el periodo de incubación, los cortes se lavaron 2 veces en TBS de 5 minutos.

El suero policlonal se detectó incubando con suero biotinado de cabra anti IgG de conejo (Dako®, diluido 1:100 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con el complejo peroxidasa anti-peroxidasa (Dako®, diluido 1:100 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 3-3'diaminobencidina (Sigma[®], al 25% en TB: Trizma base 0.01M, pH 7.4) a la que se añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Tras lavado en agua destilada, las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y tras su lavado en agua, se deshidrataron y aclararon en etanol-xilol y se montaron con DePeX.

Marcaje doble para PCNA y prolactina.

Los cortes obtenidos se incubaron en estufa a 58°C durante 1 hora, tras lo que se procedió a la desparafinización en xileno y rehidratación en alcoholes decrecientes, terminado el proceso con un lavado en agua destilada y desionizada durante 5 minutos.

Para evitar falsos positivos derivados de la posible existencia de peroxidasa endógena en el tejido, el enzima se bloqueó sumergiendo las muestras en un baño de Metanol-Agua oxigenada al 3% (200ml/30ml), durante 20 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron, en agua destilada, a temperatura ambiente, mediante 2 lavados de 10 minutos cada uno.

Se acondicionaron las muestras para las sucesivas reacciones, sumergiendo los cortes en tampón TBS (Trizma base, Sigma[®], 0.01M, pH 7.4, con 0.09% de NaCl), durante 20 minutos, y, por último, en TBS durante 5 minutos.

Para inhibir reacciones inespecíficas, los cortes se incubaron con suero no inmune obtenido en cabra (diluido 1:30 en TBS), durante 20 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con suero policlonal anti-PCNA obtenido en ratón (Dako[®], diluido 1:2000 en TBS), a 4°C toda la noche.

Transcurrido el periodo de incubación, los cortes se lavaron 2 veces en TBS de 5 minutos.

El suero policlonal se detectó incubando con suero biotinado de cabra anti IgG de ratón (Caltag[®], diluido 1:150 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con estrepto-avidina-peroxidasa (Caltag[®], diluido 1:300 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 3-3'diaminobencidina (Sigma[®], al 25% en TB: Trizma base 0.01M, pH 7.4) a la que se añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Tras lavado en agua destilada, las preparaciones fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y tras su lavado en agua, se procedió a eluir las inmunoglobulinas de la primera reacción.

La elución se realizó sumergiendo los portas en tampón glicina 0.1M a pH 2.2 durante la noche a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, los cortes se lavaron 2 veces en TBS de 5 minutos.

A continuación, se procedió con la reacción inmunocitoquímica, para lo que las muestras se incubaron con suero policlonal anti-prolactina obtenido en conejo (Dako®, diluido 1:300 en TBS), a 4°C toda la noche.

Transcurrido el periodo de incubación, los cortes se lavaron 2 veces en TBS de 5 minutos.

El suero policlonal se detectó incubando con suero biotinado de cabra anti IgG de conejo (Dako®, diluido 1:100 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

Por último se procedió a incubar con el complejo peroxidasa anti-peroxidasa (Dako®, diluido 1:100 en TBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente; seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos.

El revelado de la reacción se hizo con 4-cloro-naftol (Sigma®) diluido en etanol (1mg/5ml) y posteriormente en 100ml de TB, a la mezcla se le añadió un 0.03% de agua oxigenada inmediatamente antes de su empleo.

Controles de las reacciones inmunocitoquímicas.

En todas las reacciones se realizaron test de control, para ello, se sustituyó el suero primario específico por suero no inmune de conejo, diluido en TBS a la misma concentración que se diluyó el suero inmune; o bien con suero preabsorbido con prolactina 10nM durante 12 horas a 4°C.

En todos los casos, no se obtuvo positividad al finalizar el proceso.

Estudio de las muestras.

Una vez desarrollada la reacción inmunocitoquímica, los cortes se estudiaron con un microscopio de luz transmitida Zeiss Axiophot®, obteniendo micrografías digitales con una cámara digital acoplada, Olympus DP70, y el captador de imágenes DPController v1.1.1.65, a aumentos de x10, x20, x40, x60 y x100.

Morfometría.

Todos los estudios morfométricos realizados en este estudio se hicieron empleando el software libre de NIH Image J.

Para ello se trabajó sobre imágenes digitales a resolución de 300 ppi que se homogeneizaron en brillo-contraste con el software adobe photosop CS5®, con umbrales de entrada-salida idénticos.

Todo el estudio se realizó con un ordenador dotado de un procesador PentiumV doble core® y 16Mb de RAM, tarjeta gráfica Nvidia de 5Mb y monitor Sony Bravia de alta resolución.

Las mediciones fueron realizadas a doble ciego, por el doctorando y el director de la Tesis Doctoral, con un error intraensayo de 1.76%.

Los valores obtenidos se expresan en micras cuadradas.

Análisis morfométrico de los cortes histológicos.

Para el análisis morfométrico de los cortes histológicos se eligieron micrografías a partir de secciones transversales de cada animal, bien conservadas en su estructura y separadas al menos por 35 μm ; trabajando a aumentos de microscopio de x100 en zoom de pantalla x3.5.

Fueron requisitos de elección de las células a medir que el contorno celular y el nuclear fueran nítidos en el plano de sección.

En cada sección se trazaron los perfiles del contorno celular y del contorno nuclear de las células positivas a prolactina, lo que permitió calcular, tras el calibrado de la aplicación Image J, las dimensiones de las áreas celular y nuclear.

De esta manera se midieron 100 células por animal, lo que supuso un total de 500 células por sexo y grupo de estudio. Las células se eligieron por azar y por separado, de cada una de las regiones hipofisarias estudiadas, tal y como se expone al comienzo del capítulo de resultados.

Los valores obtenidos se expresan en micras cuadradas en cada una de las gráficas que aparecen en el capítulo de resultados.

Análisis planimétrico, cuantificación celular.

Para el estudio planimétrico, de cada una de las regiones hipofisarias estudiadas, elegidas conforme a los criterios que se exponen al comienzo del capítulo de resultados, se emplearon micrografías digitales de alta resolución a aumentos de microscopio x40 y 3.5 de zoom de pantalla.

En dichas imágenes se contaron las células positivas y las células negativas a prolactina del área a estudiar. De manera que se contaron 4000 células de cada región a estudiar en cada animal. Lo que supuso un total de 20000 células por sexo y grupo de estudio.

Conociendo el total de células se calculó el porcentaje de células positivas a prolactina o PCNA; así como el porcentaje de las células positivas a PCNA y prolactina. Todos los valores correspondientes a la cuantificación celular se expresan en porcentaje en el capítulo de resultados.

Análisis Estadístico de los resultados.

Empleando la aplicación Prisma GraphPad, de los valores obtenidos, clasificados por sexo y grupo experimental, se obtuvieron las medidas de centralización (media aritmética) y dispersión (desviación típica y error estándar de la media).

Las diferencias observadas entre los ratones wild type y los ratones knock out, del mismo sexo, y para cada región hipofisaria estudiada, se contrastaron aplicando el análisis de la t de Student, aceptando como significativos valores menores de $p < 0.05$.

Las diferencias observadas entre las diferentes regiones hipofisarias a estudiar, entre sexos y entre los ratones wild type y los ratones knock out, para cada región hipofisaria estudiada, se contrastaron aplicando el análisis de la varianza y el test F de Scheffé, aceptando como significativos valores menores de $p < 0.05$.

Resultados

Células positivas a Prolactina.

Distribución general.

Aunque las células hipofisarias positivas a prolactina se distribuyen por toda la hipófisis, su distribución presenta un patrón diferencial con agrupamientos de unas regiones a otras de la pars distalis de la glándula, que con muy pequeñas variaciones se mantiene independientemente del género y de si el animal estudiado era wild type o knock out.

Como se muestra en el esquema (figura 8), para su estudio hemos diferenciado en la pars distalis una porción dorsal, otra lateral y otra medial.

En la porción dorsal, situada por encima de la caverna hipofisaria (ch) que hemos diferenciado la región dorsal tuberal (DT), lateralmente a ella diferenciamos la región dorsal (D), e inmediatamente por debajo de la caverna hipofisaria la región dorsal infracavitaria (DIC).

En la porción lateral de la hipófisis diferenciamos las regiones lateral (L), central lateral (CL), polar (P) y ventral lateral (VL).

Por último, en porción medial distinguimos la región ventral medial (VM), la central medial (CM) y la medial próxima a la pars intermedia (MPI).

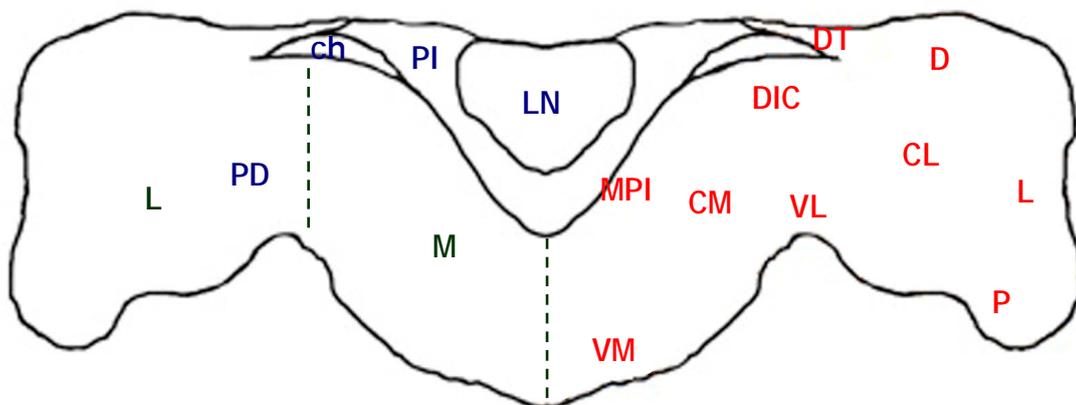
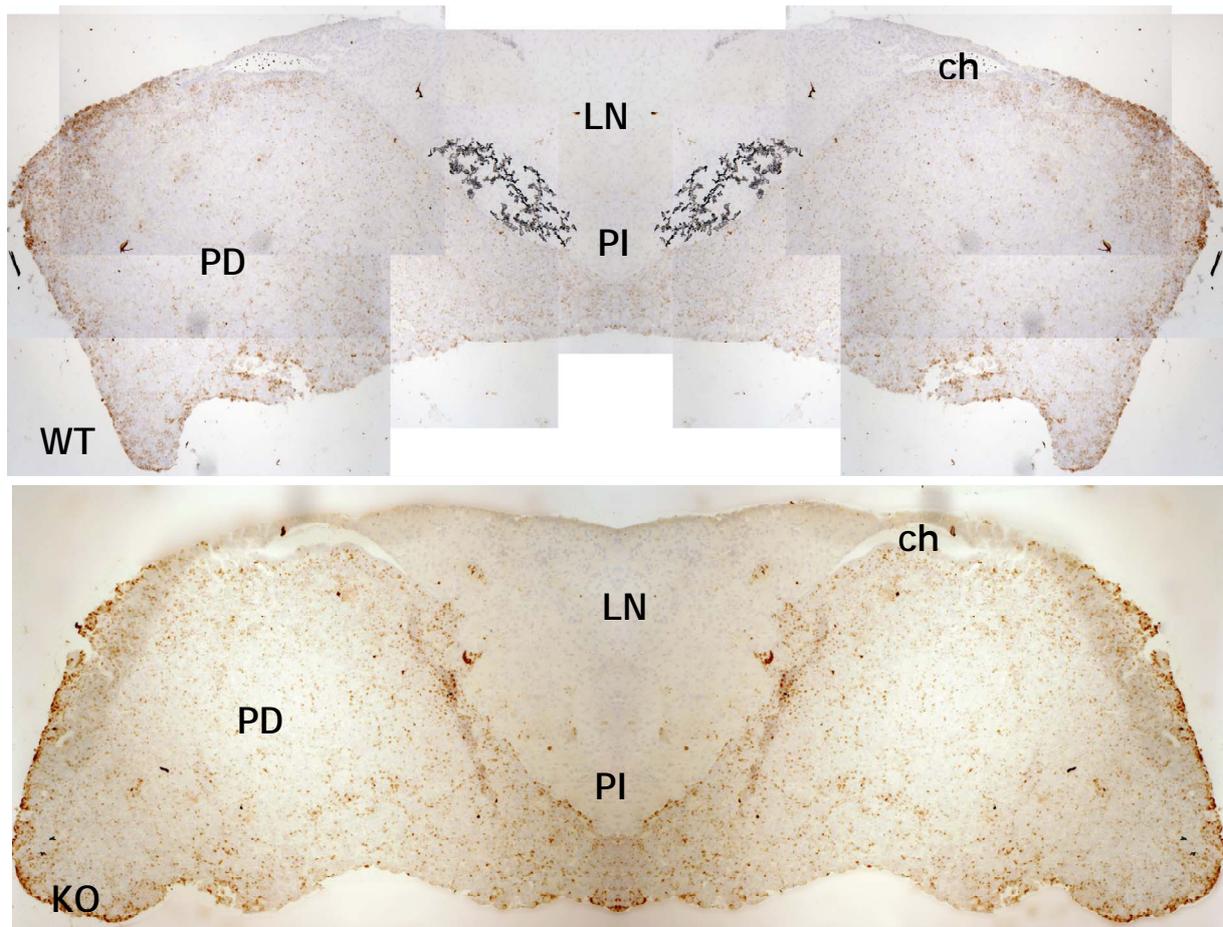


Figura 8. Esquema que representa las diferentes partes de la hipófisis del ratón en un corte frontal.

PD: Pars distalis, PI: Pars intermedia, LN: Lóbulo neural, ch: caverna hipofisaria. M: región medial, L: región lateral. En la parte derecha del esquema se representan las regiones de estudio de las células positivas a prolactina que se describen en el texto.

Células positivas a Prolactina en las hembras de 22 meses de edad.

El aspecto general de visu que se obtiene al analizar a bajos aumentos la hipófisis de ratones hembras de 22 meses de edad es muy semejante en lo que se refiere a los patrones de distribución de las células positivas a prolactina en los animales wild type y en los knock out. Como puede apreciarse en las figuras 9 y 10.



Figuras 9 y 10. Micrografías que muestran las características generales de la positividad a prolactina que se observan en los cortes frontales de la hipófisis de ratones hembras de 22 meses de edad que se describen en el texto.

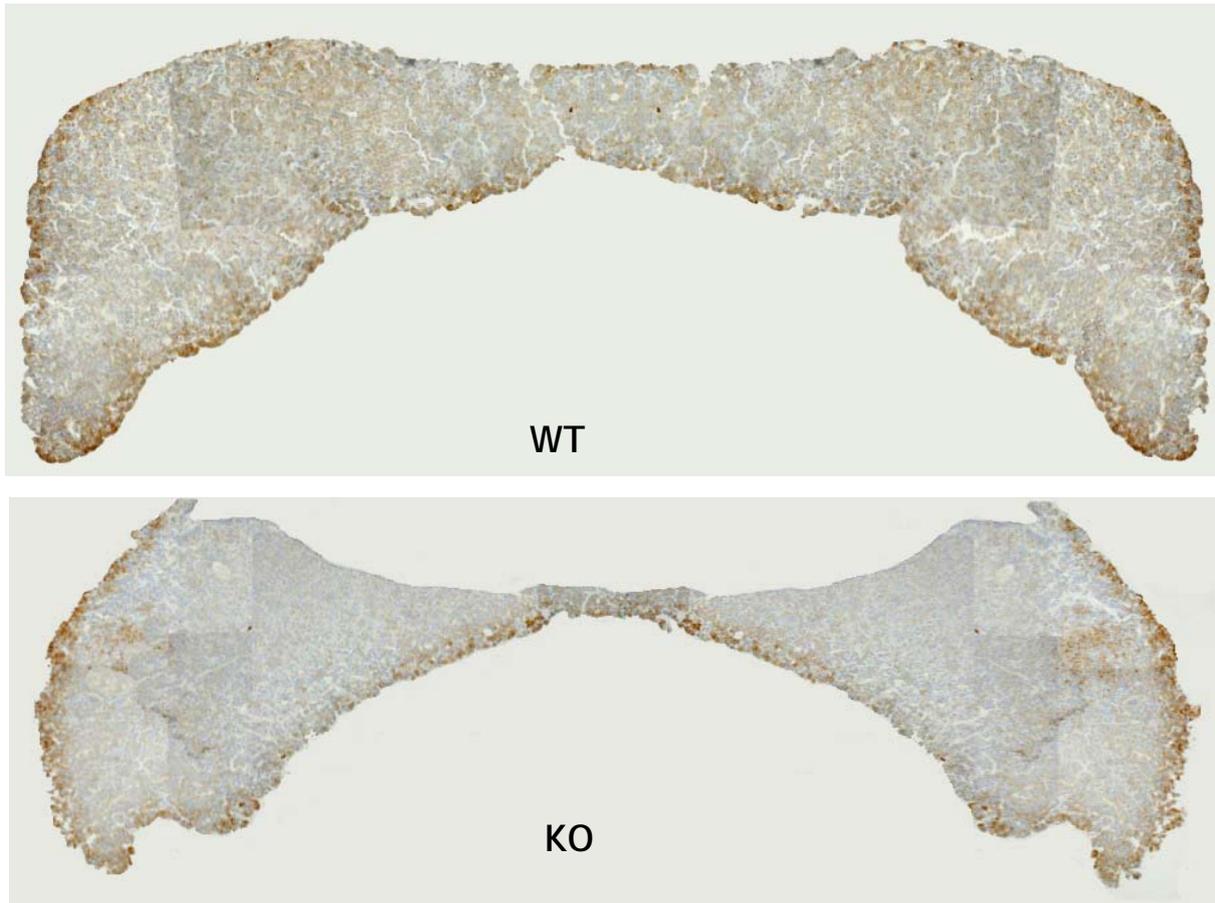
WT: wild type (R2).

KO: knock out (R3).

PD: Pars Distalis, PI: Pars Intermedia, LN: Lóbulo Neural, ch: caverna hipofisaria.

Células positivas a Prolactina en los machos de 22 meses de edad.

Al igual que sucedía en las hembras, el aspecto general al visualizar a bajos aumentos la hipófisis de ratones machos de 22 meses de edad es muy semejante en lo que se refiere a los patrones de distribución de las células positivas a prolactina en los animales wild type y en los knock out. Como puede apreciarse en las figuras 11 y 12.



Figuras 11 y 12. Micrografías que muestran las características generales de la positividad a prolactina que se observan en los cortes frontales de la hipófisis de ratones machos de 22 meses de edad que se describen en el texto.

WT: wild type (R3).

KO: knock out (R4).

PD: Pars Distalis, PI: Pars Intermedia, LN: Lóbulo Neural, ch: caverna hipofisaria.

Análisis Planimétrico de las Células de Prolactina.

Porcentaje de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en hembras wild type y knock out para aromatasa.

El porcentaje de células positivas a prolactina en la hipófisis de las hembras wild type fue elevado, de manera que el $37.13 \pm 1.19\%$ de las células glandulares de la hipófisis de estos animales presentaron reacción inmunocitoquímica (figura 13).

Las hembras knock out para aromatasa presentaron un porcentaje de $31.63 \pm 1.29\%$, aunque elevado, este porcentaje fue significativamente menor ($p < 0.01$) que el observado en las hipófisis de las hembras wild type (figura 13).

Los porcentajes de células positivas a prolactina no fueron uniformes de una región a otra dentro de la hipófisis, a lo largo de este capítulo, al describir cada una de las regiones se indicarán las variaciones.

Densidad numérica de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en hembras wild type y knock out para aromatasa.

La densidad numérica referida a número de células positivas a prolactina en $100 \mu\text{m}^2$ de superficie de corte de la hipófisis (figura 14) fue de 1.130 ± 0.04 , significativamente mayor ($p < 0.01$) que la observada en las hembras knock out en las que fue de 0.996 ± 0.04 .

Al igual que ocurría con los porcentajes, también se observaron variaciones de unas regiones a otras dentro del mismo grupo de animales o en las diferencias entre wild type y knock out que se irán exponiendo a lo largo de los resultados.

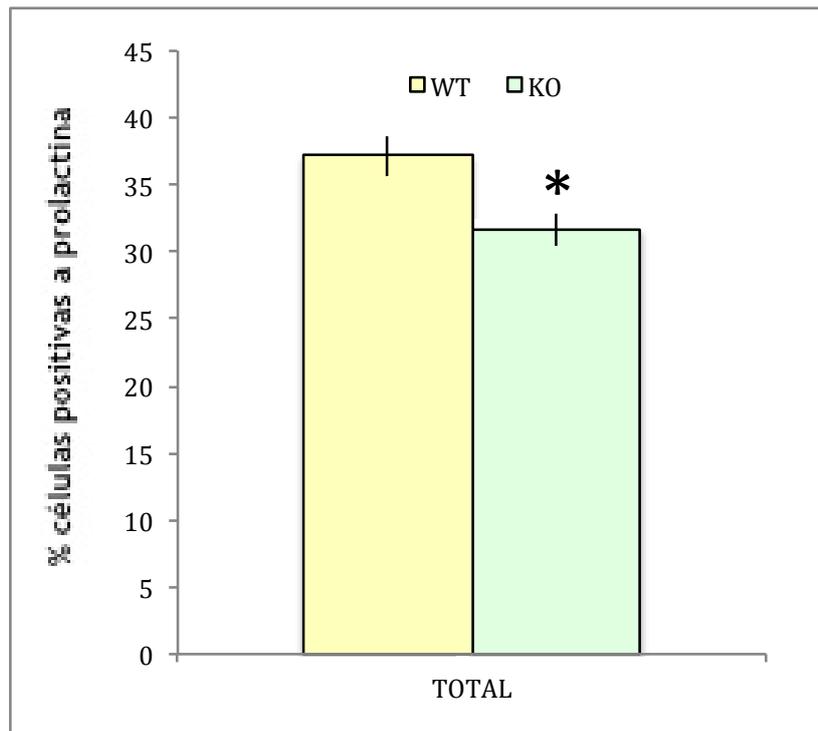


Figura 13. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la hipófisis de los ratones hembra.

Grupos de animales a estudiar: WT: Wild Type, KO: Knock Out.

*: $p < 0.01$

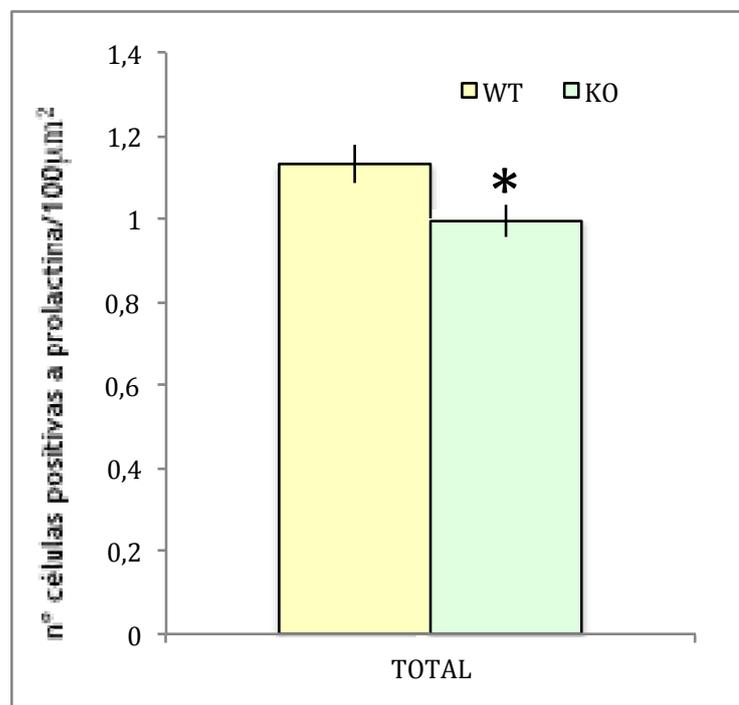


Figura 14. Gráfica que muestra la densidad numérica (n° células/100 μm^2) de células positivas a prolactina en la hipófisis de los ratones hembra.

Grupos de animales a estudiar: WT: Wild Type, KO: Knock Out.

*: $p < 0.01$

Porcentaje de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en machos wild type y knock out para aromatasa.

El porcentaje de células positivas a prolactina en la hipófisis de los machos wild type también fue elevado, de manera que el $40.98 \pm 1.76\%$ de las células glandulares de la hipófisis de estos animales presentaron reacción inmunocitoquímica (figura 15).

Los machos knock out para aromatasa presentaron un porcentaje de $35.62 \pm 1.22\%$, aunque elevado, este porcentaje fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el observado en las hipófisis de los machos wild type (figura 15).

Al igual que ocurría en las hembras, los porcentajes de células positivas a prolactina no fueron uniformes de una región a otra dentro de la hipófisis, cuestión que se irá analizando detenidamente en cada región.

Densidad numérica de población celular hipofisaria correspondiente a las células de prolactina en machos wild type y knock out para aromatasa.

La densidad numérica referida a número de células positivas a prolactina en $100 \mu\text{m}^2$ de superficie de corte de la hipófisis (figura 16) fue de 1.045 ± 0.04 , significativamente mayor ($p < 0.05$) que la observada en los machos knock out en los que fue de 0.942 ± 0.03 .

Las diferencias regionales de la densidad numérica se irán exponiendo más adelante.

Aunque el porcentaje celular y la densidad numérica fueron discretamente superiores en machos que en hembras, las diferencias observadas no fueron significativas.

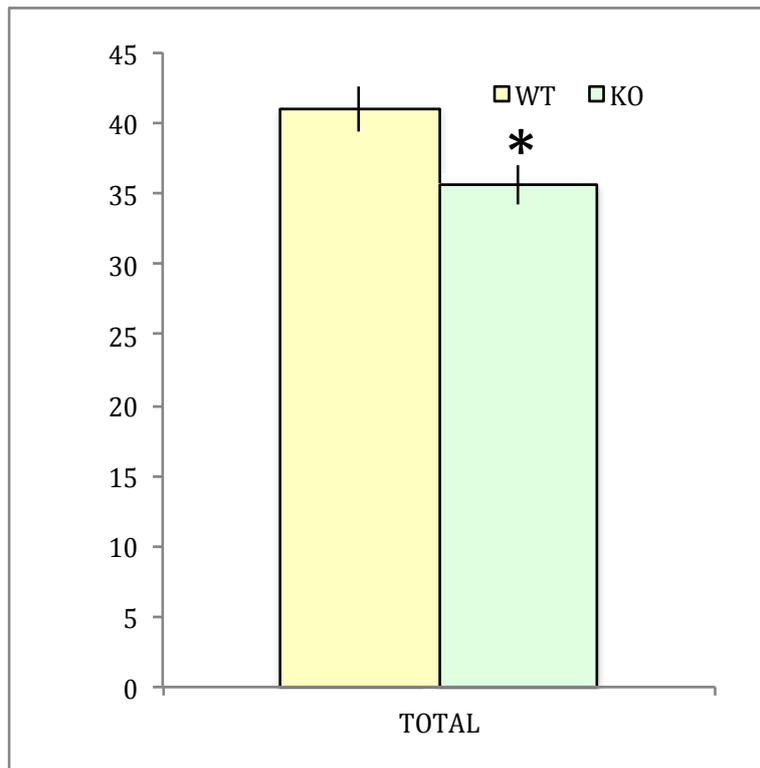


Figura 15. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la hipófisis de los ratones machos.

Grupos de animales a estudiar: WT: Wild Type, KO: Knock Out.

*: $p < 0.05$

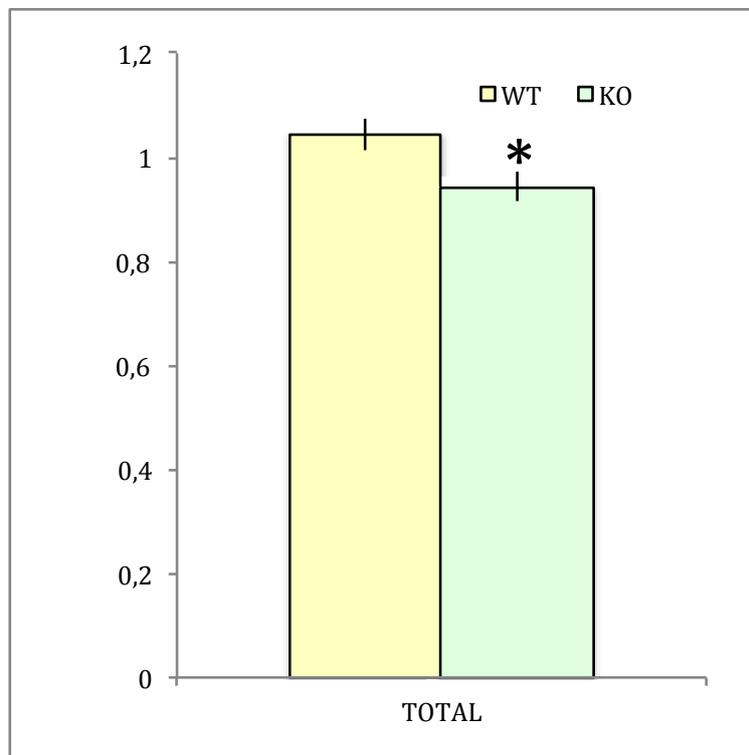


Figura 16. Gráfica que muestra la densidad numérica (nº células/100 µm²) de células positivas a prolactina en la hipófisis de los ratones machos.

Grupos de animales a estudiar: WT: Wild Type, KO: Knock Out.

*: $p < 0.05$

Análisis Morfométrico de las Células de Prolactina.

Áreas celular y nuclear de células de prolactina en hembras wild type y knock out para aromatasa.

Como muestra la figura 17, las células de prolactina de las hembras wild type presentaron un área celular de $54.57 \pm 0.28 \mu\text{m}^2$, con valores que oscilaron entre 24.53 y $89.33 \mu\text{m}^2$, y un área nuclear media de $16.96 \pm 0.13 \mu\text{m}^2$, con valores que oscilaron entre 7.08 y $34.46 \mu\text{m}^2$.

Las hembras knock out presentaron células de prolactina cuyo área celular fue significativamente menor ($p < 0.001$) que el observado en las wild type, $42.95 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$, con valores que oscilaron entre 21.5 y $83.17 \mu\text{m}^2$.

Algo muy parecido se observó al analizar las áreas nucleares de ambos grupos de animales. En las hembras wild type el área nuclear presentó un valor medio de $16.96 \pm 0.13 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 7.08 y $34.46 \mu\text{m}^2$; mientras que las hembras knock out tenían un área nuclear significativamente menor ($p < 0.001$), con un valor medio de $12.69 \pm 0.12 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 4.28 y $29.59 \mu\text{m}^2$.

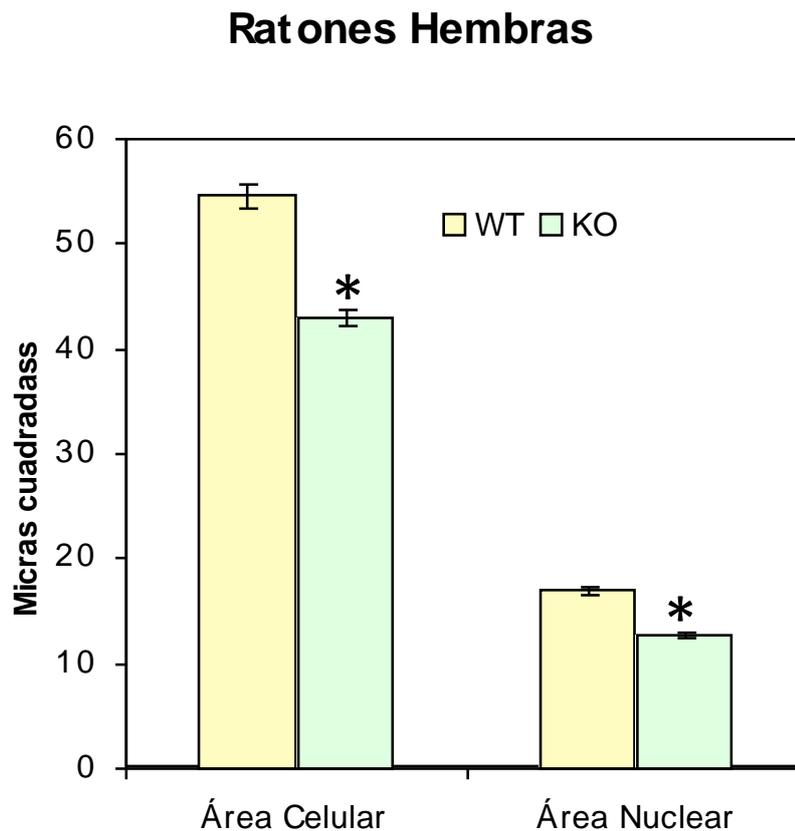


Figura 17. Gráfica que muestran el tamaño celular y nuclear, expresado en micras cuadradas de las células de prolactina en los ratones hembras.

WT: wild type, KO: knock out

*: $p < 0.001$

Áreas celular y nuclear de células de prolactina en machos wild type y knock out para aromatasa.

En la figura 18, se aprecia claramente que las células de prolactina de los machos wild type presentaron un área celular muy parecido al de las hembras wild type, con un valor medio de $53.99 \pm 0.62 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 26.46 y $125.14 \mu\text{m}^2$.

No ocurrió así al analizar las áreas nucleares, ya que en los machos wild type estas áreas fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que en las hembras wild type. Alcanzo un valor medio de $13.76 \pm 0.15 \mu\text{m}^2$.

Los machos knock out presentaron células de prolactina cuyo área ($47.09 \pm 0.58 \mu\text{m}^2$) fue significativamente menor ($p < 0.001$) que el observado en los wild type.

Algo muy parecido se observó al analizar las áreas nucleares. Los machos presentaron núcleos de menor tamaño que las hembras ($p < 0.05$). El área nuclear media en los machos wild type fue $13.76 \pm 0.15 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor ($p < 0.01$) que la observada en los machos knock out $12.19 \pm 0.16 \mu\text{m}^2$.

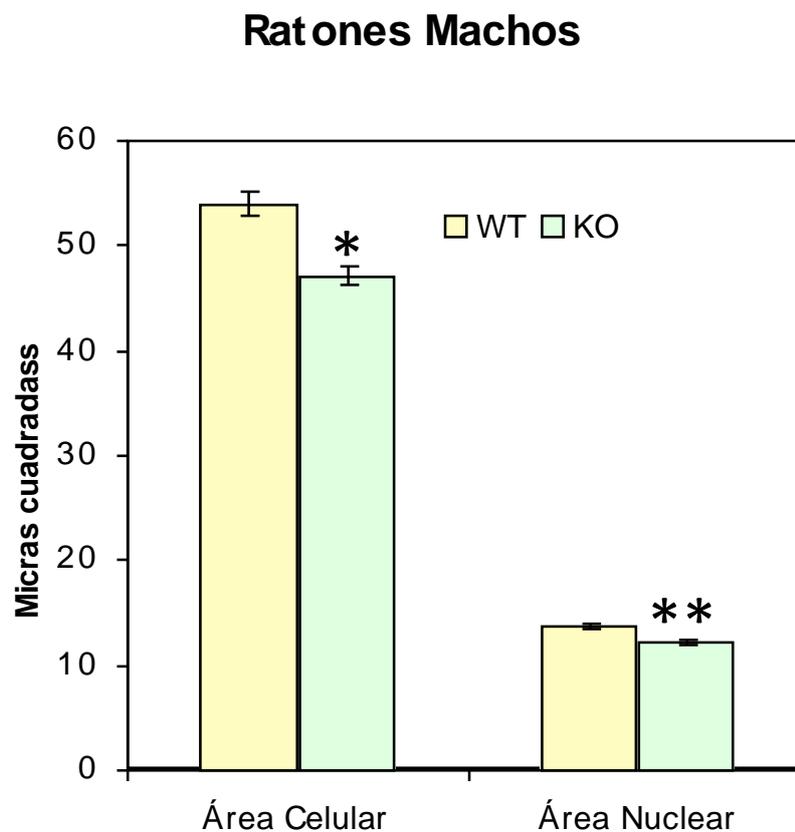


Figura 18. Gráfica que muestran el tamaño celular y nuclear, expresado en micras cuadradas de las células de prolactina en los ratones machos.

WT: wild type, KO: knock out

*: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$

Proliferación celular.

Células de prolactina en proliferación, positivas a prolactina y PCNA.

Hembras.

Mediante doble marcaje inmunocitoquímico para PCNA (reacción nuclear en marrón) y prolactina (reacción citoplásmica en gris azulado) se pudo determinar el porcentaje de las células de prolactina que estaban en proliferación en los ratones hembras (figuras 19 a 21).

Las células de prolactina que aparecieron positivas a PCNA en las hembras wild type representaban algo más de la cuarta parte de las células positivas a prolactina ($27.39 \pm 2,21\%$).

En las hembras knock out, este porcentaje fue significativamente menor ($p < 0.001$) ya que supusieron el $4.69 \pm 0.47\%$ de las células de prolactina.

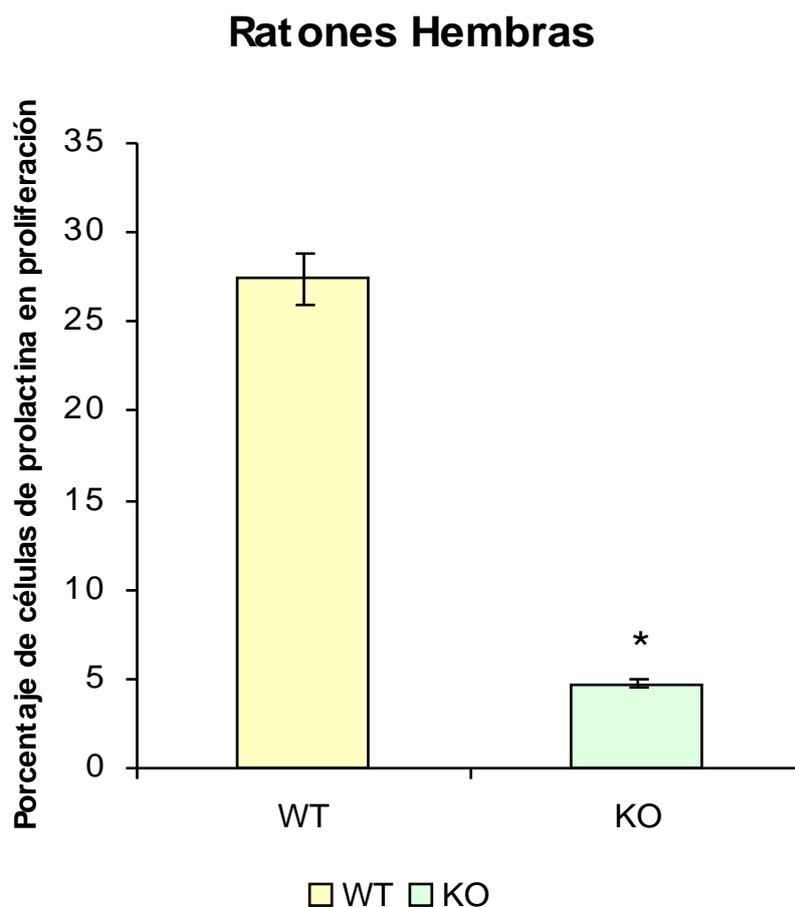


Figura 19. Gráfica que muestra los porcentajes de células hipofisarias positivas a PCNA observados en las hipófisis de los ratones machos.

WT: Wild type, KO: Knock out.

*: $p < 0.001$

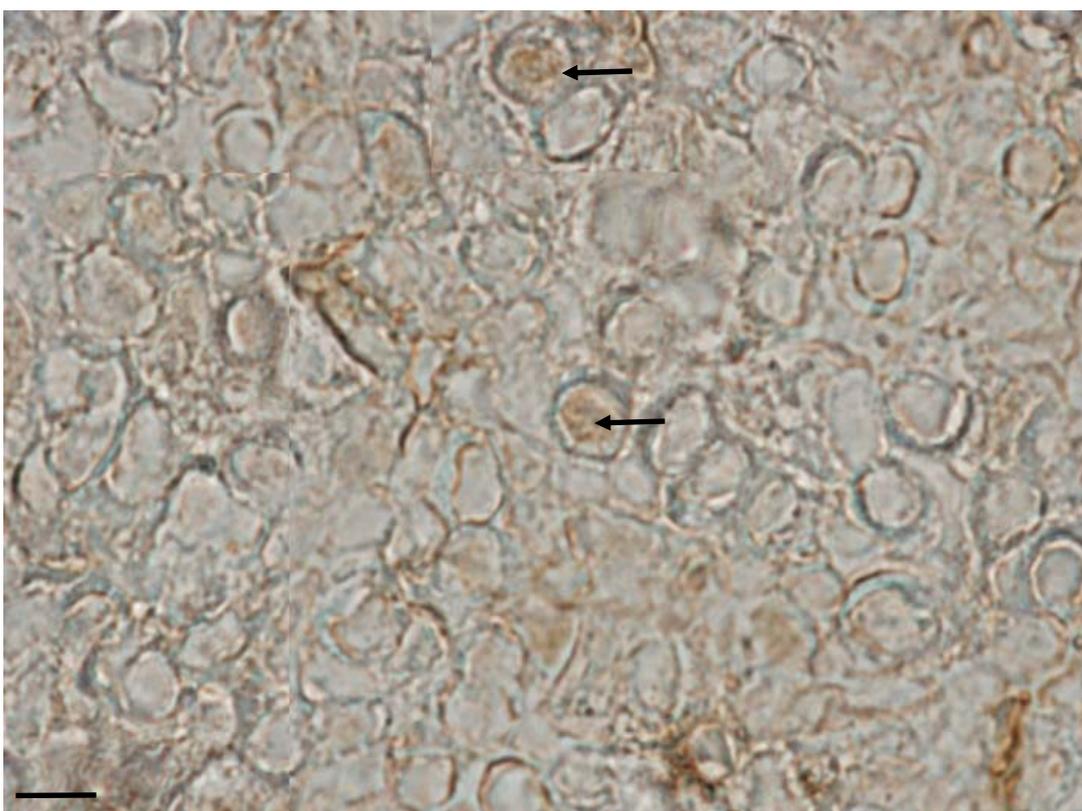
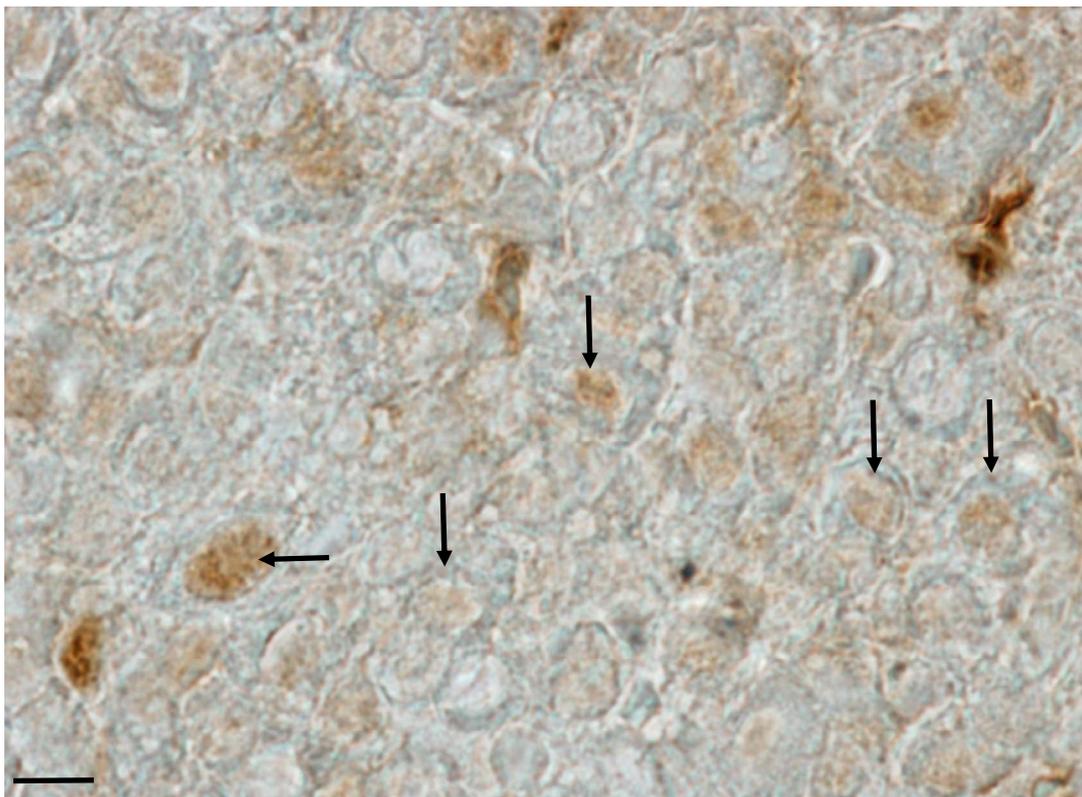


Figura 20. Micrografía mostrando el doble marcaje a PCNA (marrón) y prolactina (azul grisáceo) en la hipófisis de una hembra wild type.

Figura 21. Micrografía mostrando el doble marcaje a PCNA (marrón) y prolactina (azul grisáceo) en la hipófisis de una hembra knock out.

Flechas: células positivas a prolactina en proliferación.

Barra de escala: 5 μ m.

Machos.

Al igual que en las hembras, en los ratones machos las células positivas a PCNA presentaron reacción nuclear en marrón, y las positivas a prolactina mostraban una reacción citoplásmica en gris azulado (figuras 23 y 24).

El porcentaje de células de prolactina en proliferación en los machos wild type ($10.83 \pm 0.62\%$) fue significativamente menor que el observado en los ratones hembras wild type ($p < 0.01$).

En los machos knock out, este porcentaje fue significativamente menor ($p < 0.001$) ya que supusieron el $3.90 \pm 0.34\%$ de las células de prolactina (figura 22).

A diferencia de los wild type, no hubo diferencias significativas entre machos y hembras knock out ($p < 0.17$).

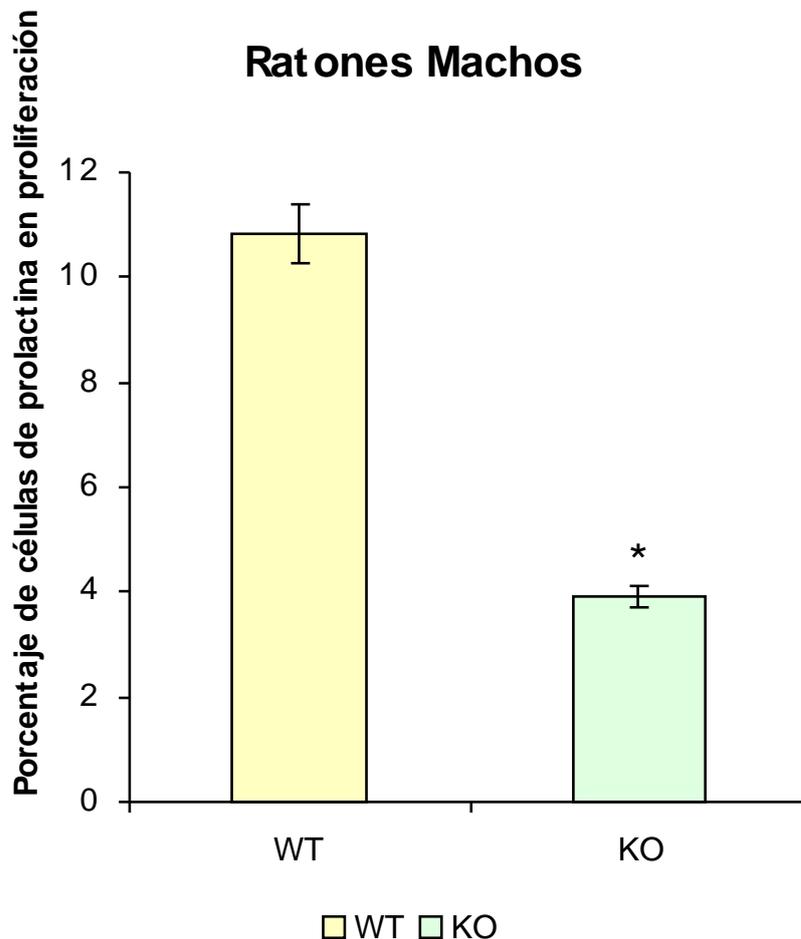


Figura 22. Gráfica que muestra los porcentajes de células hipofisarias positivas a PCNA observados en las hipófisis de los ratones machos.

WT: Wild type, KO: Knock out.

*: $p < 0.001$

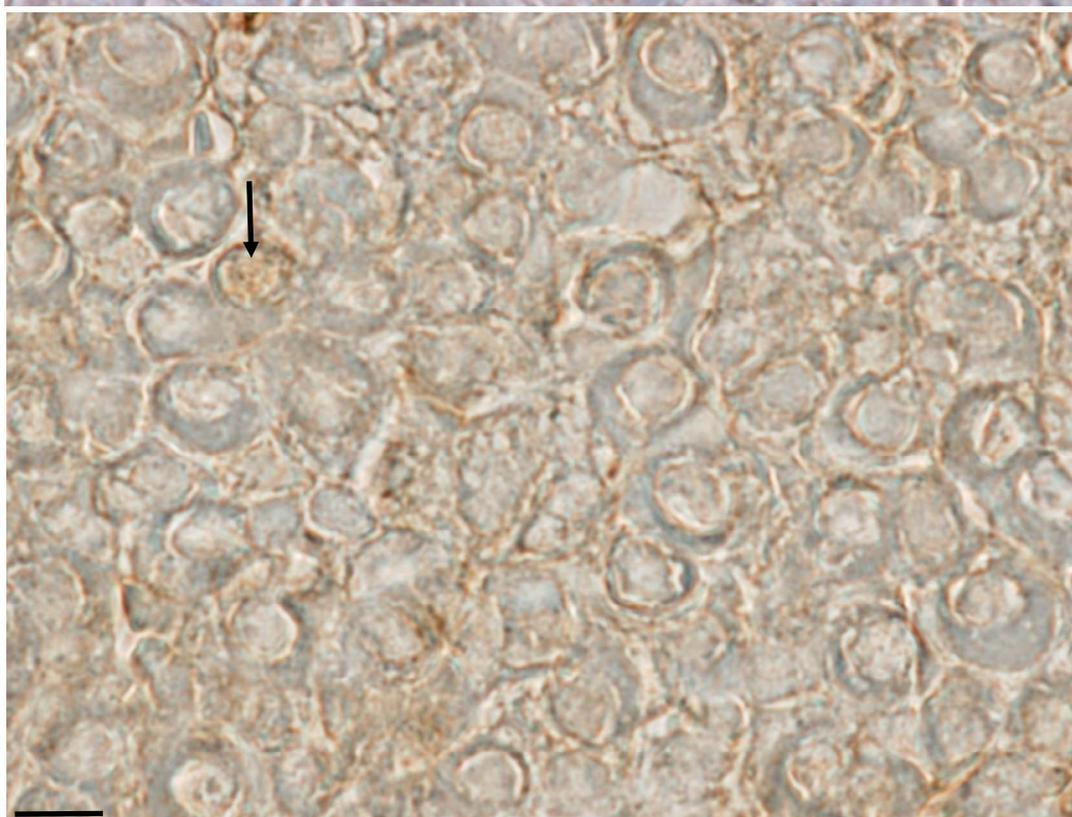
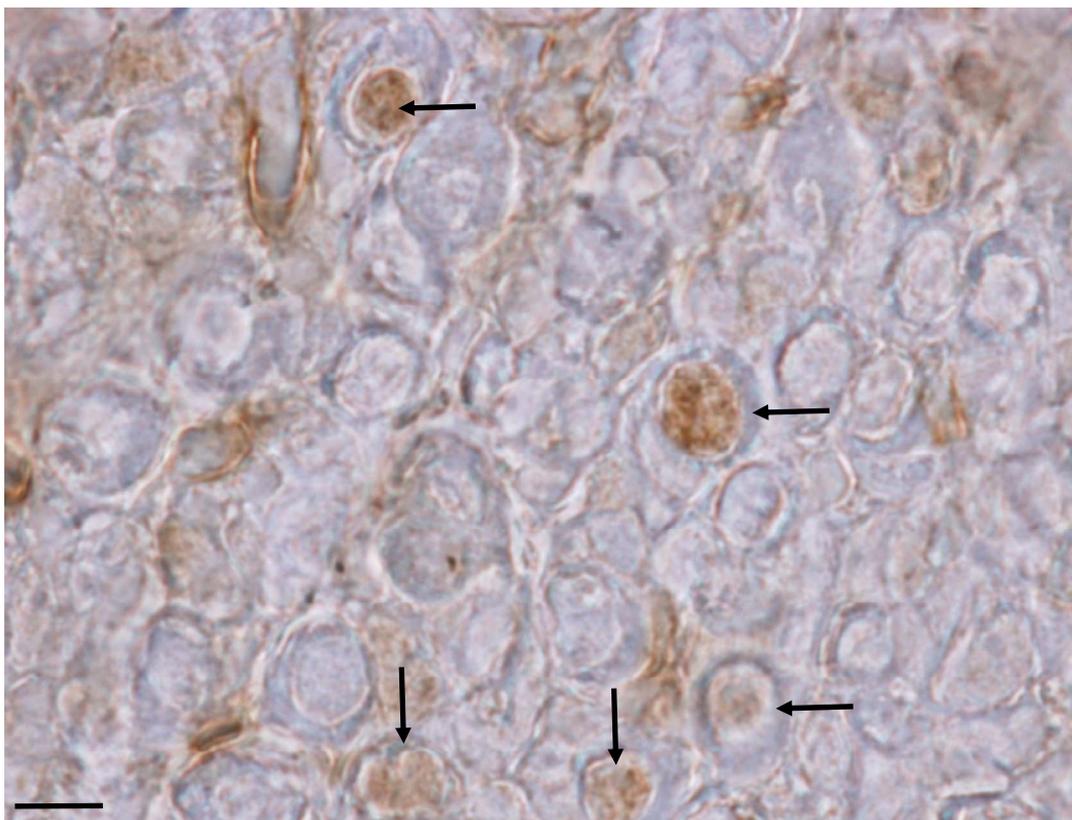


Figura 23. Micrografía mostrando el doble marcaje a PCNA (marrón) y prolactina (azul grisáceo) en la hipófisis de un macho wild type.

Figura 24. Micrografía mostrando el doble marcaje a PCNA (marrón) y prolactina (azul grisáceo) en la hipófisis de un macho knock out.

Flechas: células positivas a prolactina en proliferación.

Barra de escala: 5 μ m.

Análisis Morfológico de las Células de Prolactina.

Células de prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de hembras.

En la región dorsal tuberal de la hipófisis de los ratones hembra wild type una gran parte de las células fueron positivas a prolactina (figuras 25, 27 y 28), presentando un porcentaje considerable de células positivas ($41.61 \pm 4.36\%$).

Con una densidad numérica (figura 26) de 1.19 ± 0.22 células/ $100 \mu\text{m}^2$.

En las hembras knock out, en lo que se refiere al porcentaje ($42.83 \pm 2.95\%$) no se apreciaron diferencias significativas (figura 25); mientras que la densidad numérica (figura 26) fue significativamente menor (1.05 ± 0.09 células/ $100 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$).

En esta región las células se agruparon en zonas en las que había una gran cantidad de células positivas y junto a ellas hay grandes zonas en las que no se observaron células de prolactina (flechas en figuras 28 y 29).

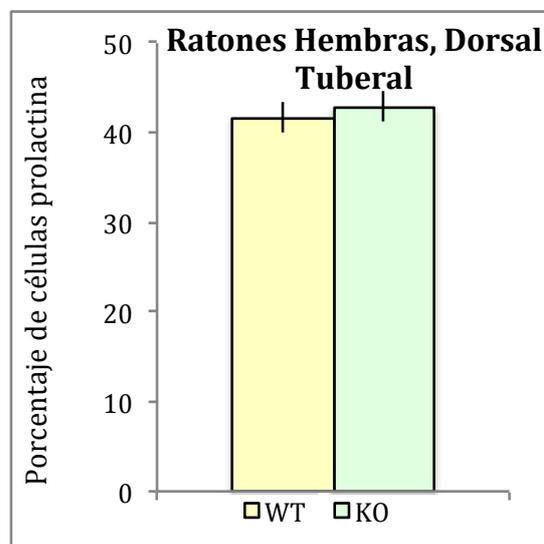


Figura 25. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

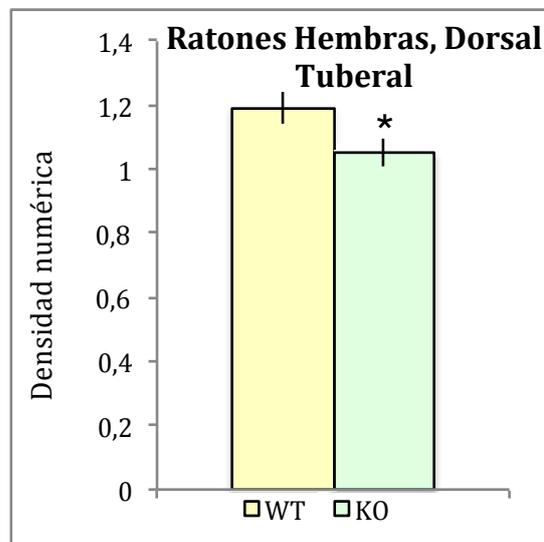
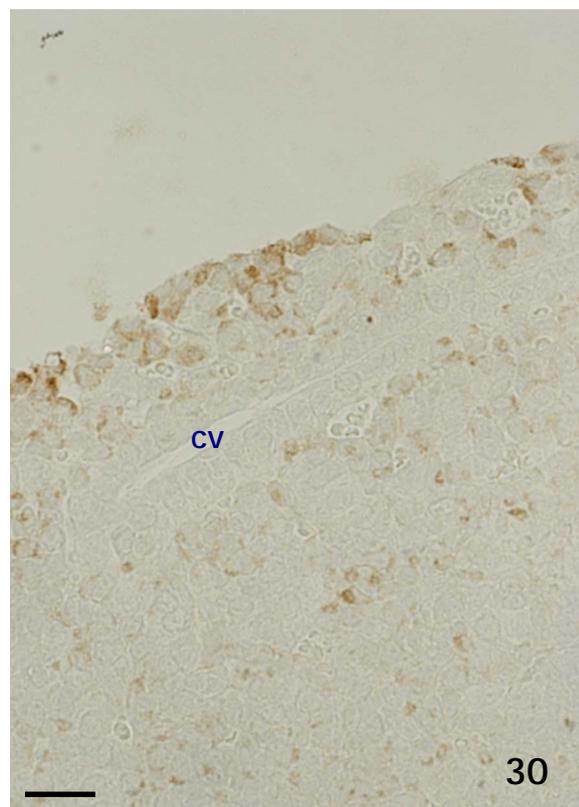
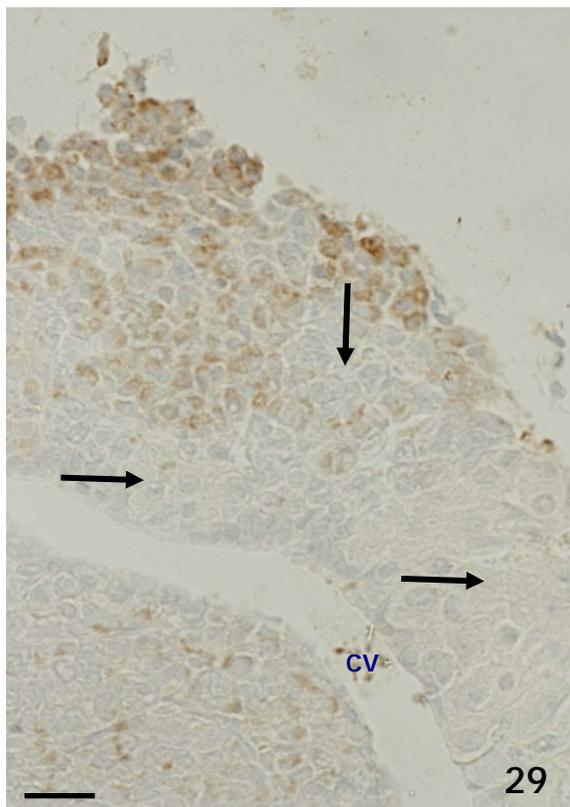
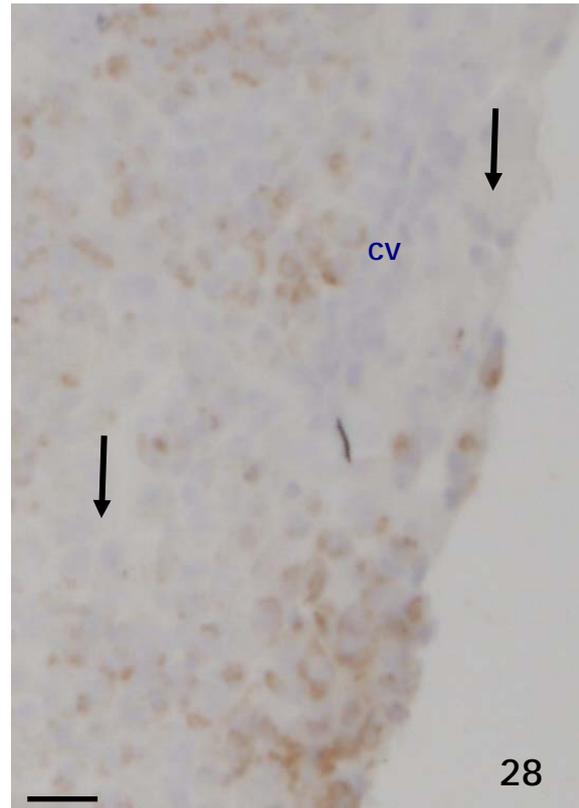
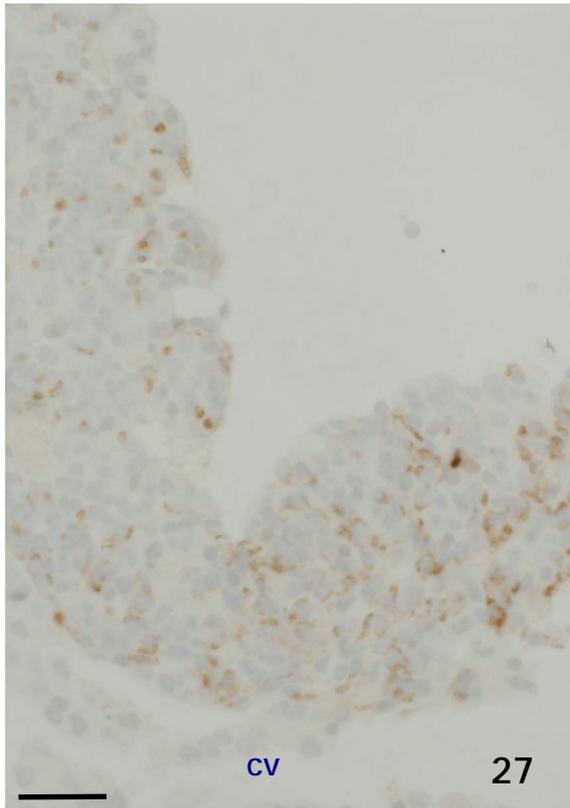


Figura 26. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

*: $p < 0.05$



Figuras 27 a 30. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 27 y 28**) y knock out (**figuras 29 y 30**).

ch: caverna hipofisaria

barra en figura 27: 50 μ m, **barra en figuras 28 a 30:** 20 μ m

Las células positivas a prolactina localizadas en la región dorsal tuberal de la hipófisis de las hembras wild type presentaron un área celular de $54.98 \pm 0.87 \mu\text{m}^2$ y un área nuclear media de $16.73 \pm 0.36 \mu\text{m}^2$ (figura 31).

Ambos parámetros (figura 31) disminuyeron significativamente ($p < 0.001$) en esta misma región hipofisaria en las hembras knock out, que presentaron un área celular de $44.53 \pm 0.36 \mu\text{m}^2$ y un área nuclear de $12.14 \pm 0.39 \mu\text{m}^2$.

Un dato llamativo es que la variabilidad en el tamaño celular de las hembras knock out fue mucho mayor que la de las wild type.

En las primeras las células oscilaron entre $27.85 \mu\text{m}^2$ y $62.45 \mu\text{m}^2$, y los núcleos entre $4.80 \mu\text{m}^2$ y $21.71 \mu\text{m}^2$; mientras que en las wild type el área celular osciló entre $36.01 \mu\text{m}^2$ y $75.65 \mu\text{m}^2$, y los núcleos entre $9.33 \mu\text{m}^2$ y $23.47 \mu\text{m}^2$.

Como puede apreciarse en las figuras 32 y 33, el patrón de reacción inmunocitoquímica intracelular de las hembras wild type no fue homogéneo. En unos animales se observó que la mayoría de las células positivas presentaban una reacción compacta, de aspecto uniforme y morfología ovalada, localizada en una zona citoplásmica yuxtannuclear (flecha en figura 32). En otros la reacción presentaba un aspecto granular grueso que afectaba a casi la totalidad del citoplasma lo que daba un aspecto granular a las células (flechas en figura 33).

En el caso de las hembras knock out, todos los animales presentaron un patrón de reacción semejante con aspecto granular grueso distribuido irregularmente por el citoplasma (flechas en figuras 34 y 35).

Las células fueron poligonales u ovaladas en los dos grupos de animales estudiados y se agruparon formando islotes o cordones celulares próximos a vasos sanguíneos (v en figuras 32 y 35). Los núcleos eran generalmente ovalados, algo más polarizados en los wild type que en los knock out.

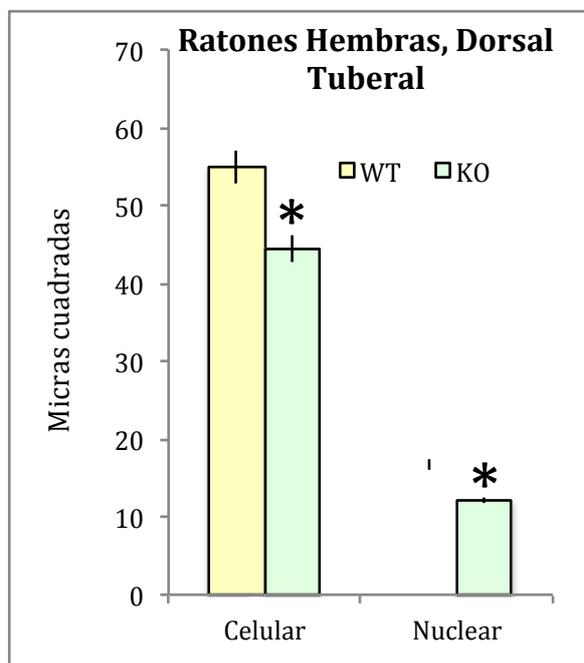
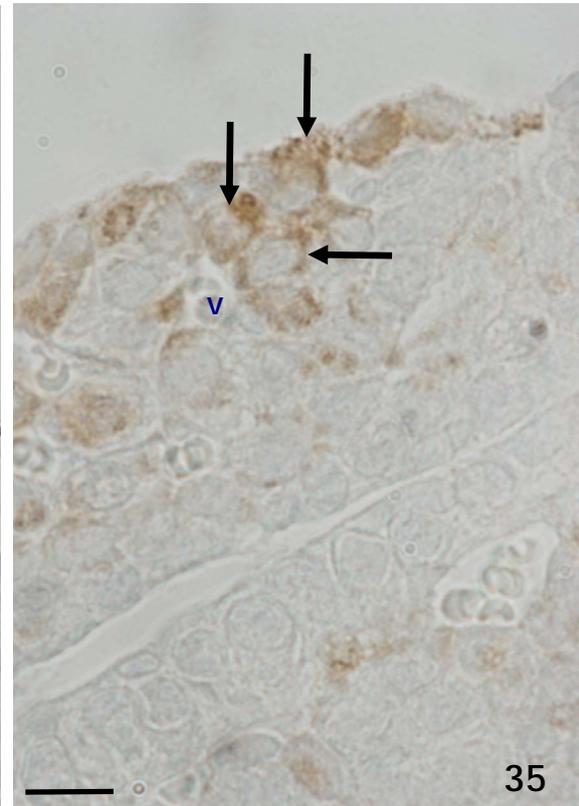
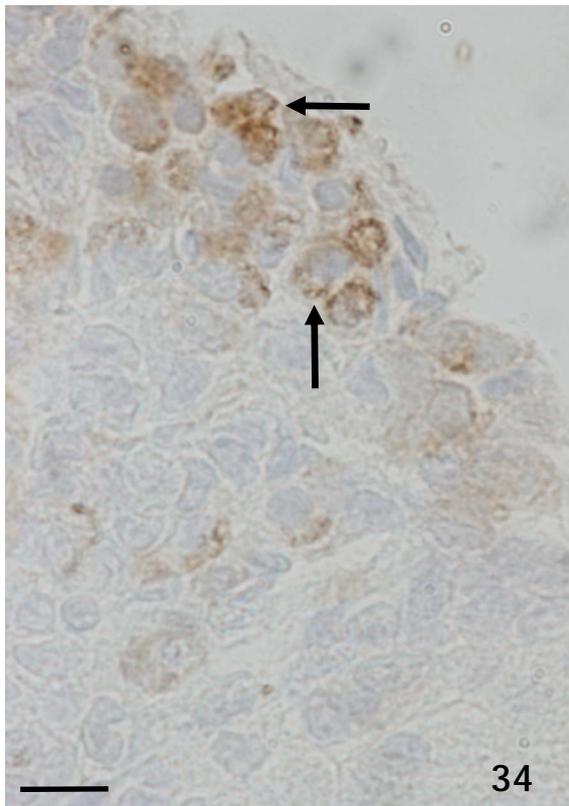
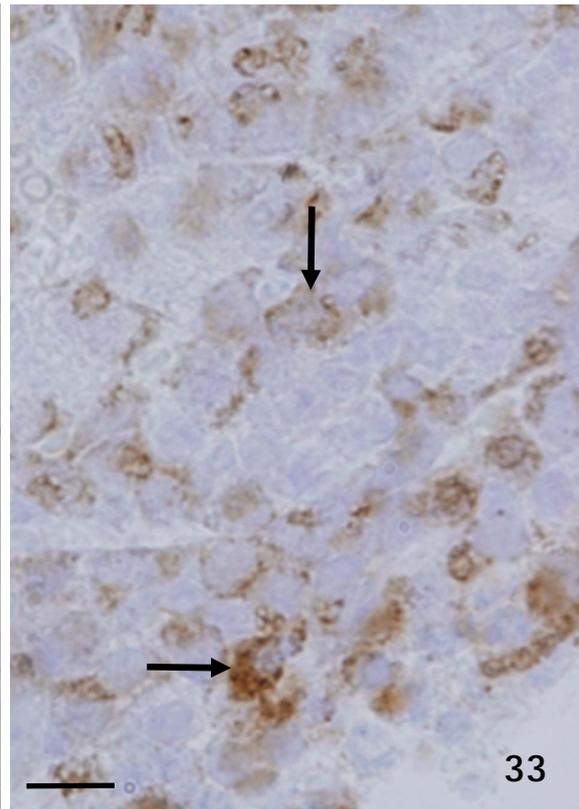
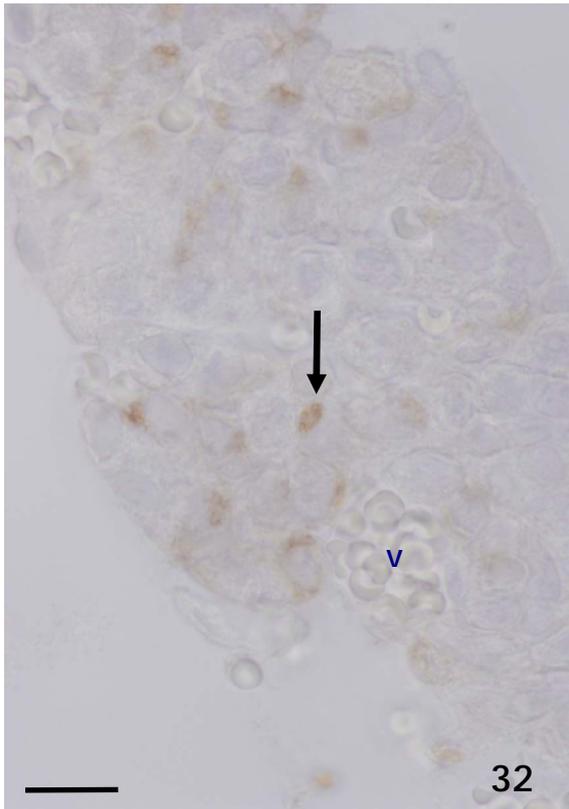


Figura 31. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$



Figuras 32 a 35. Micrografías que muestran el patrón de reacción intracelular de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 32 y 33**) y knock out (**figuras 34 y 35**).
V: vaso sanguíneo.
barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región dorsal de la hipófisis de hembras.

En la región dorsal de la hipófisis de los ratones hembra wild type algo más de un tercio de las células glandulares fueron positivas a prolactina (figuras 36, 38 y 39), presentando un porcentaje medio de $39.48 \pm 3.7\%$.

Con una densidad numérica (figura 37) de 1.26 ± 0.13 células/ $100 \mu\text{m}^2$.

En esta región hipofisaria, las hembras knock out presentaron una disminución significativa ($p < 0.001$) del porcentaje de células positivas ($20.42 \pm 2.84\%$) y de su densidad numérica (0.71 ± 0.10 células/ $100 \mu\text{m}^2$) (figuras 36 y 37).

La región dorsal de la hipófisis de las hembras wild type (figuras 38 y 39) presentó células positivas a prolactina desperdigadas por toda la región localizadas en el margen de la región y hacia el interior de la glándula, y en ocasiones formaban cordones celulares próximos a vasos sanguíneos.

En las hembras knock out (figuras 40 y 41) las células fueron preferentemente marginales, siendo más escasas hacia el interior de la glándula. En los márgenes de la región dorsal fue frecuente encontrar grupos celulares compactos (figura 41).

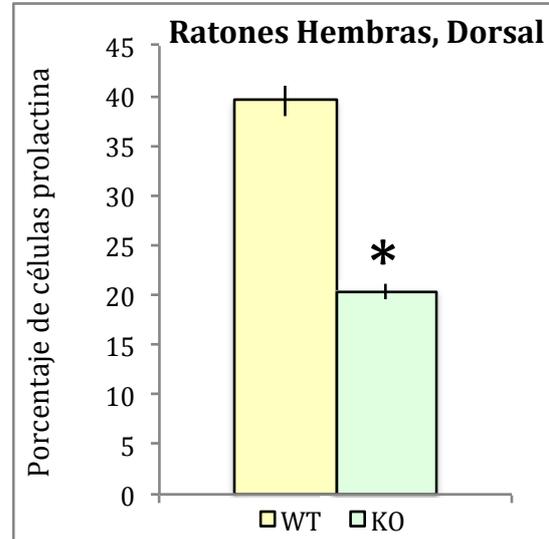


Figura 36. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

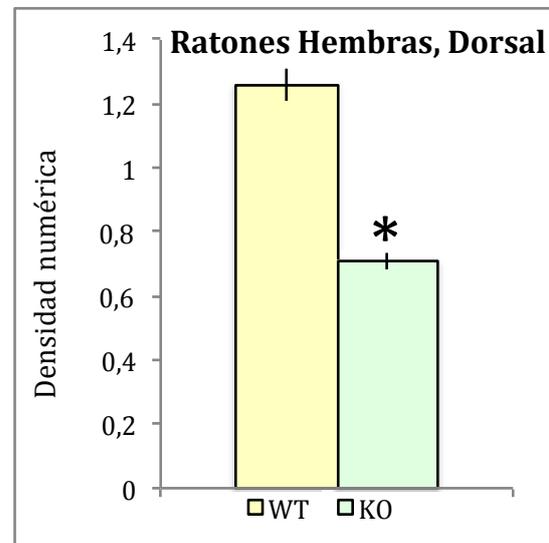


Figura 37. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

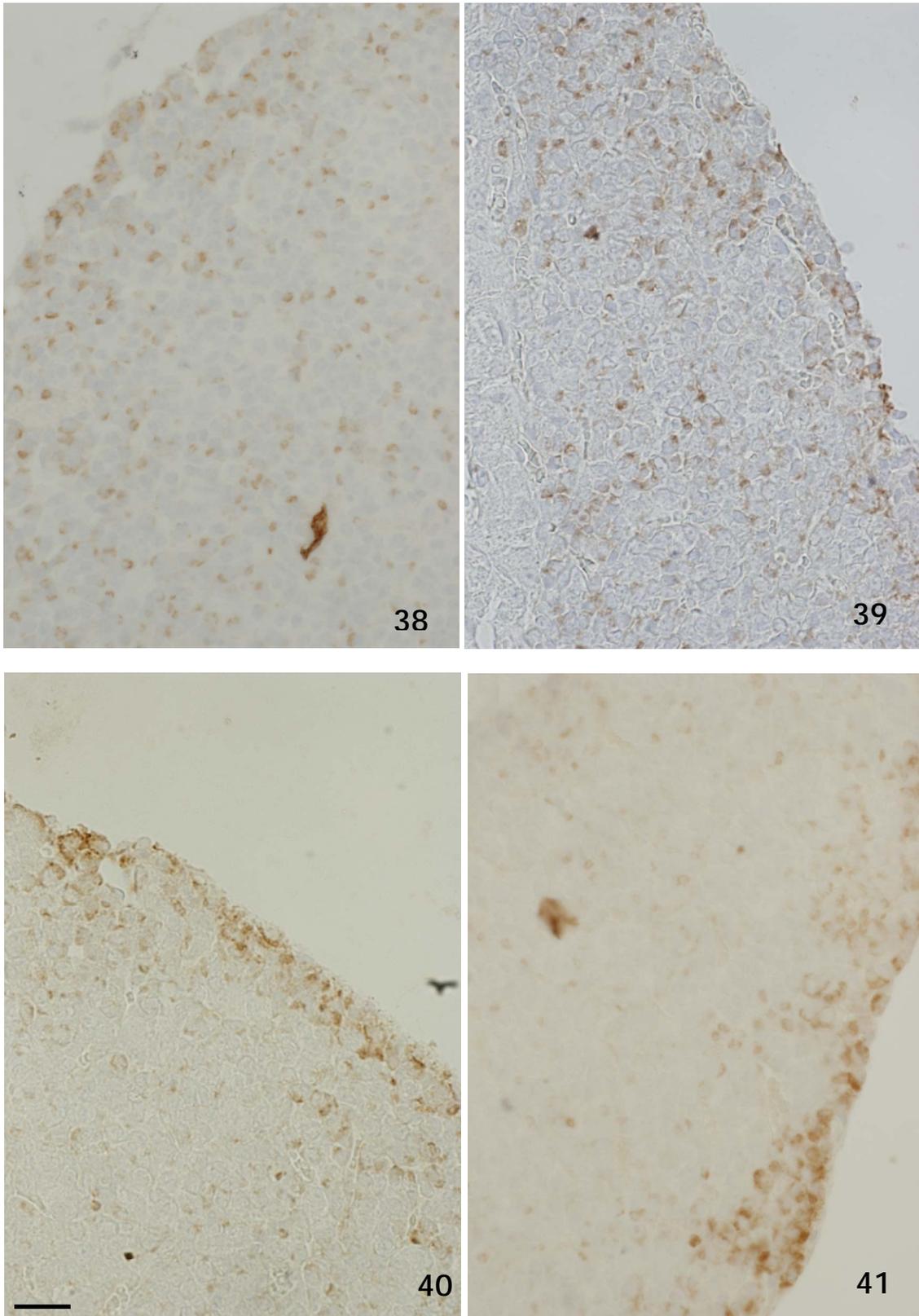


Figura 38 a 41. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 38 y 39**) y knock out (**figuras 40 y 41**).
barra: 50 µm.

Las células positivas a prolactina de la región dorsal de la hipófisis de las hembras wild type presentaron un área celular de $53.65 \pm 0.91 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 34.02 y $79.66 \mu\text{m}^2$, y un área nuclear media de $16.26 \pm 0.30 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 8.63 y $23.49 \mu\text{m}^2$ (figura 42).

Ambos parámetros (figura 42) disminuyeron significativamente en esta misma región hipofisaria en las hembras knock out, que presentaron un área celular de $47.50 \pm 0.97 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.01$) y un área nuclear de $15.37 \pm 0.29 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.05$).

En las hembras knock out el área celular osciló entre 29.79 y $66.88 \mu\text{m}^2$ y la nuclear entre 7.76 y $20.01 \mu\text{m}^2$.

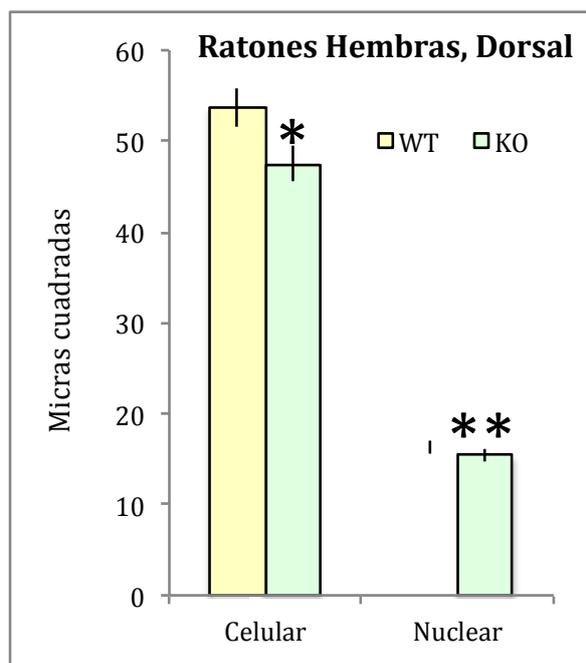


Figura 42. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

*: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$

El patrón de reacción inmunocitoquímica de las células positivas a prolactina de la región dorsal fue muy semejante al comparar las hembras wild type con las knock out. Los citoplasmas presentaban una granulación fina dispersa y no homogénea que generalmente ocupaba zonas discontinuas.

Las células positivas se intercalaban con células negativas o bien formaban cordones lineales de 5 a 10 células en el borde marginal de la región dorsal de la hipófisis (flechas en figuras 43 a 46).

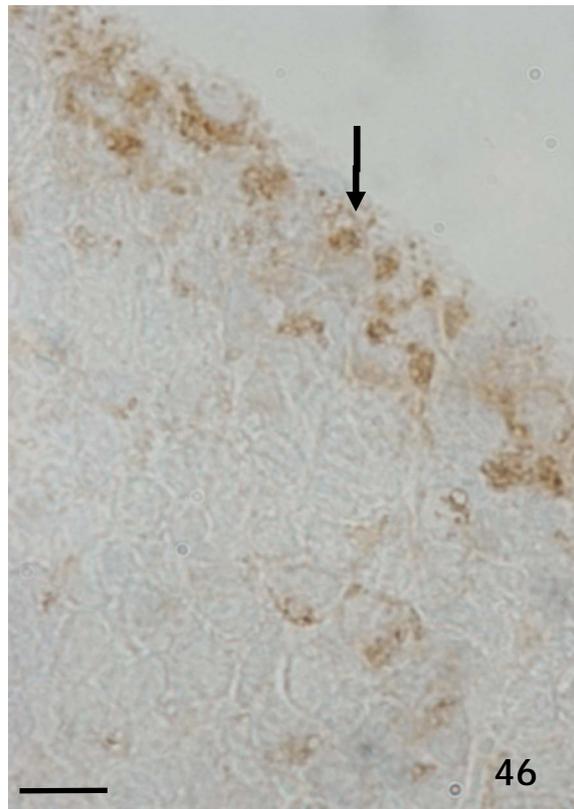
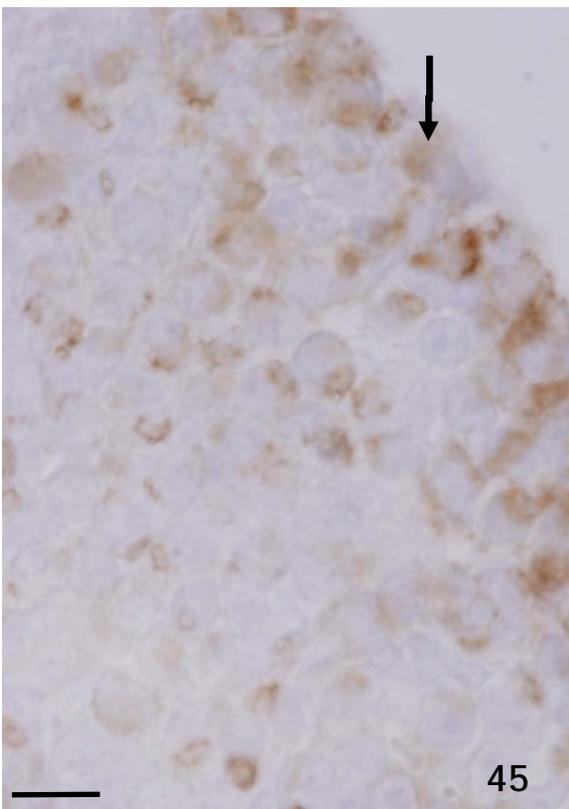
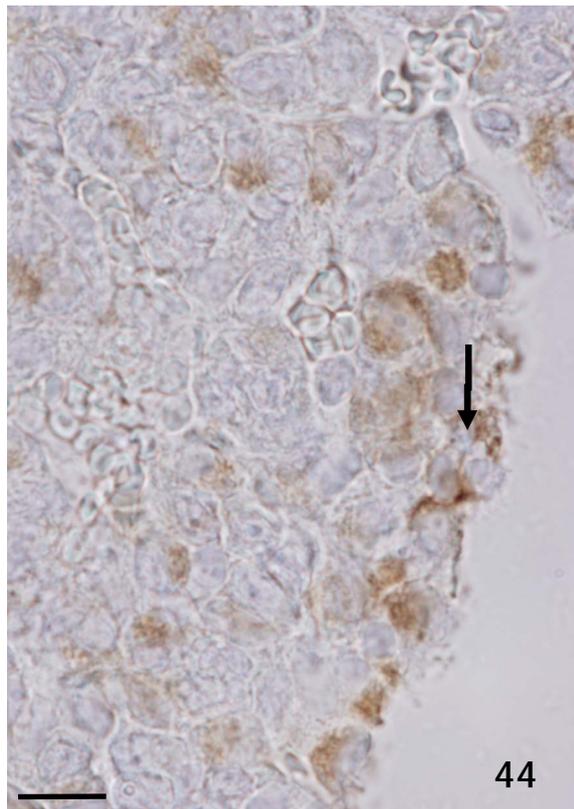
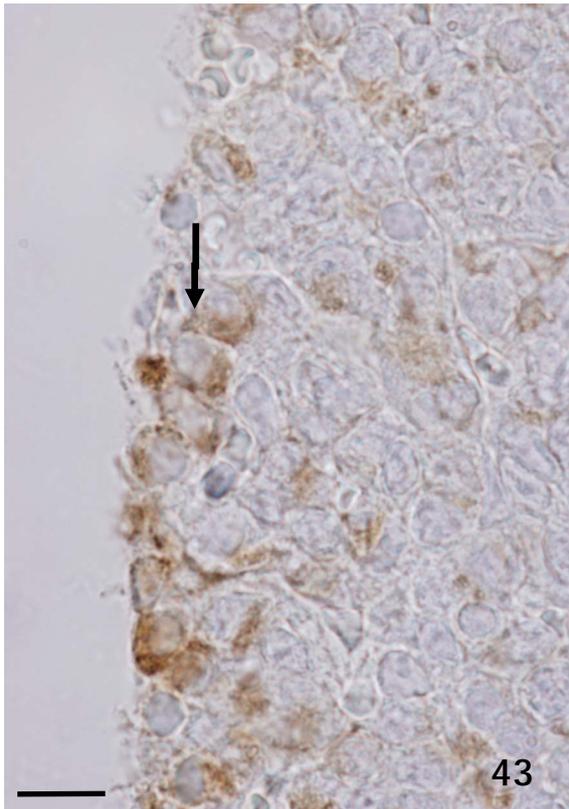


Figura 43 a 46. Micrografías que muestran el patrón de reacción intracelular de las células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 43 y 44**) y knock out (**figuras 45 y 46**).
barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región lateral de la hipófisis de hembras.

El porcentaje de células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis de las hembras wild type alcanzó el $40.37 \pm 2.97\%$, significativamente ($p < 0.001$) este porcentaje fue menor en las hembras knock out: $26.67 \pm 0.44\%$.

Similares diferencias fueron apreciadas al estudiar la densidad numérica que fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en las hembras wild type que en las knock out (1.24 ± 0.11 cels/ $100 \mu\text{m}^2$ vs 1.024 ± 0.01 cels/ $100 \mu\text{m}^2$).

La distribución de estas células dentro de la región varió de unos animales a otros y, en ocasiones, dentro del mismo animal según se analizara la región derecha o la izquierda.

Dentro de la variabilidad ya comentada, la figura 49, perteneciente a una hembra wild type, muestra células aisladas y repartidas por toda la región.

En ocasiones, como muestran las figuras 50 y 51, pertenecientes a una hembra wild type y a una knock out, respectivamente, las células eran más abundantes y formaban grupos o cordones celulares en las zonas más marginales de la región, siendo más escasa hacia el interior.

La figura 52 tomada a mayor aumento que las figuras anteriores, muestra como en algunas zonas de esta región, en las hembras knock out, las células positivas a prolactina estaban prácticamente ausentes.

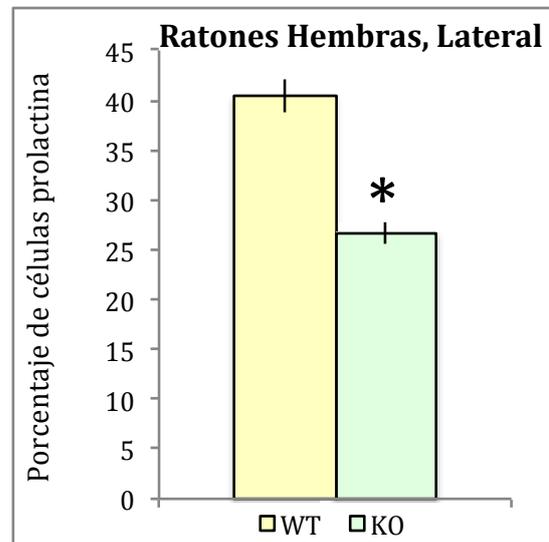


Figura 47. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

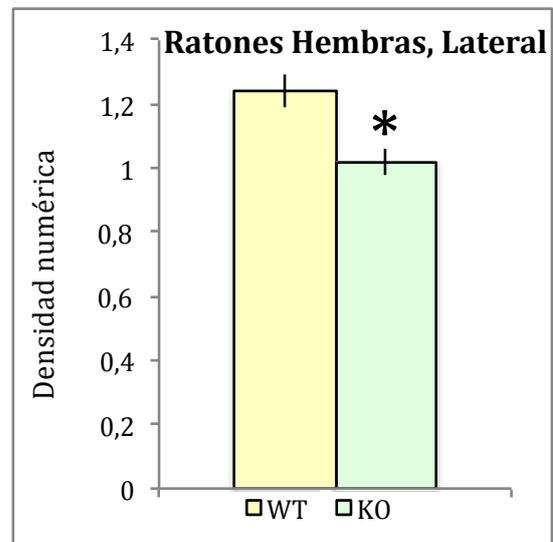
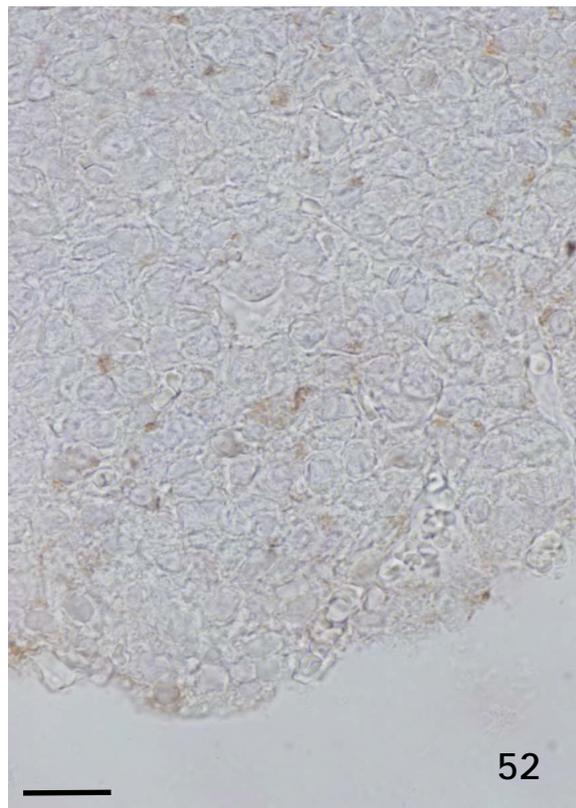
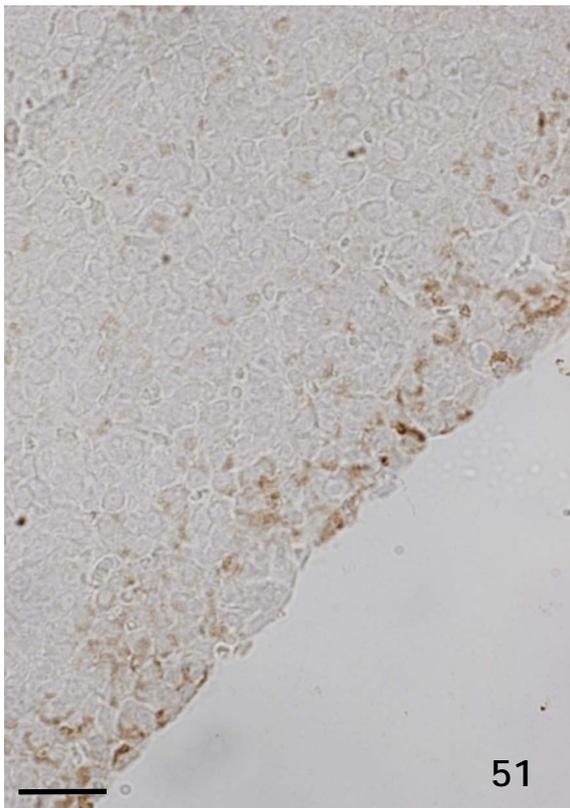
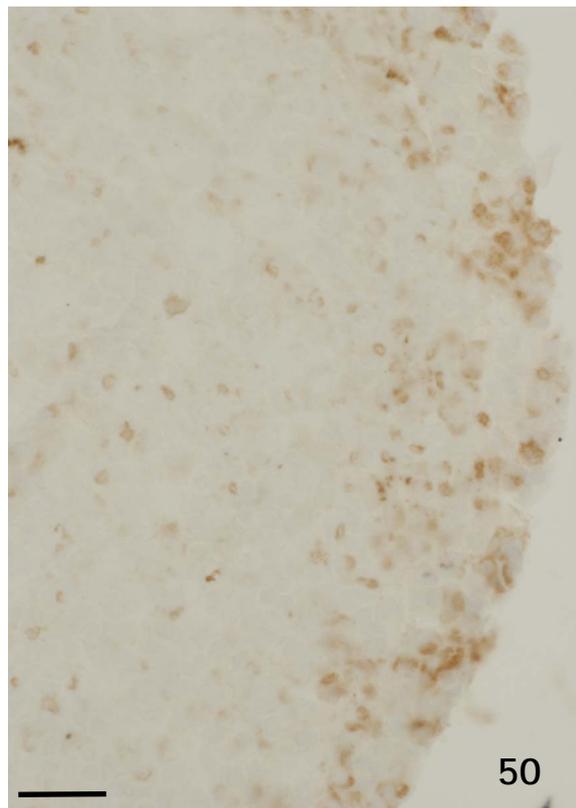
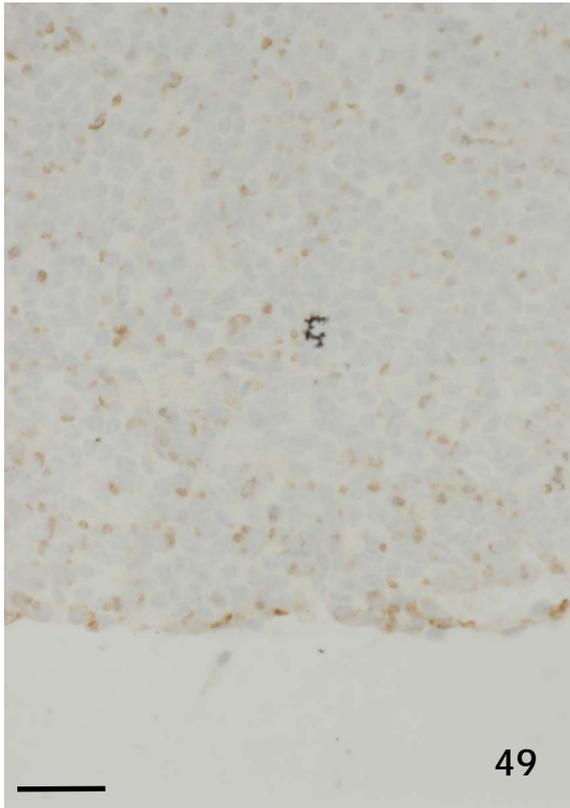


Figura 48. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$



Figuras 49 a 52. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 49 y 50**) y knock out (**figuras 51 y 52**).

barra en figuras 49, 50 y 51: 50 μm , barra en figura 52: 25 μm

Las células positivas a prolactina ubicadas en la región lateral de la hipófisis de las hembras wild type (figura 53) presentaron un área celular media de $58.64 \pm 1.24 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 34.84 y $89.33 \mu\text{m}^2$.

En estas células, algo más del 27% de la superficie celular estaba ocupada por el núcleo cuya área media fue de $16.05 \pm 0.42 \mu\text{m}^2$, con valores que oscilaban entre 9.03 y $24.04 \mu\text{m}^2$.

Al analizar estos mismo parámetros, en los animales knock out (figura 53) se apreció un descenso significativo en ambos, $p < 0.01$ para el área celular y $p < 0.05$ para el área nuclear.

El área celular media en las hembras knock out fue de $47.12 \pm 0.89 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 31.96 y $67.09 \mu\text{m}^2$.

En las hembras knock out, este descenso afectó por igual a toda la célula ya que el núcleo ocupaba algo más del 27% del total celular, presentando un valor medio de $12.90 \pm 0.36 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 6.40 y $21.20 \mu\text{m}^2$.

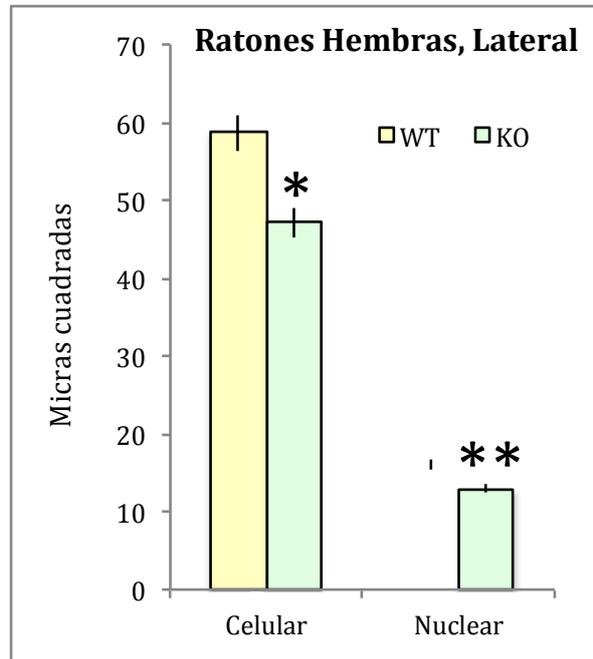


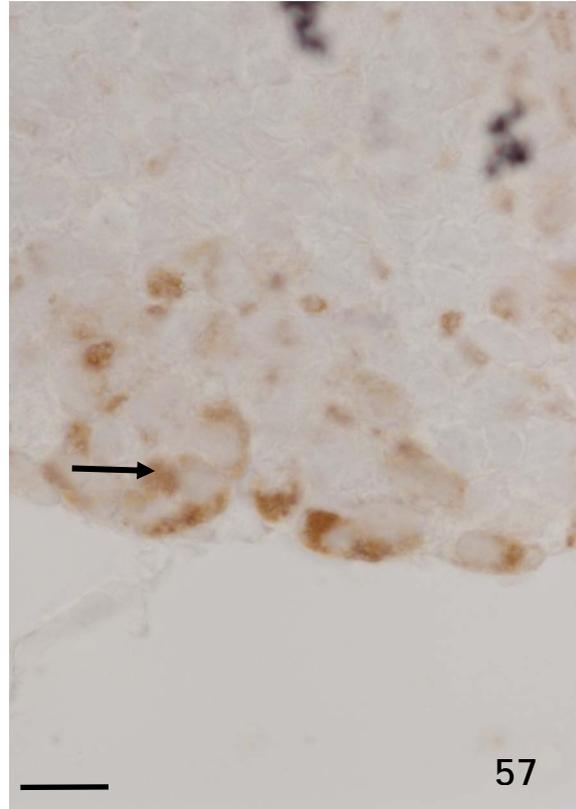
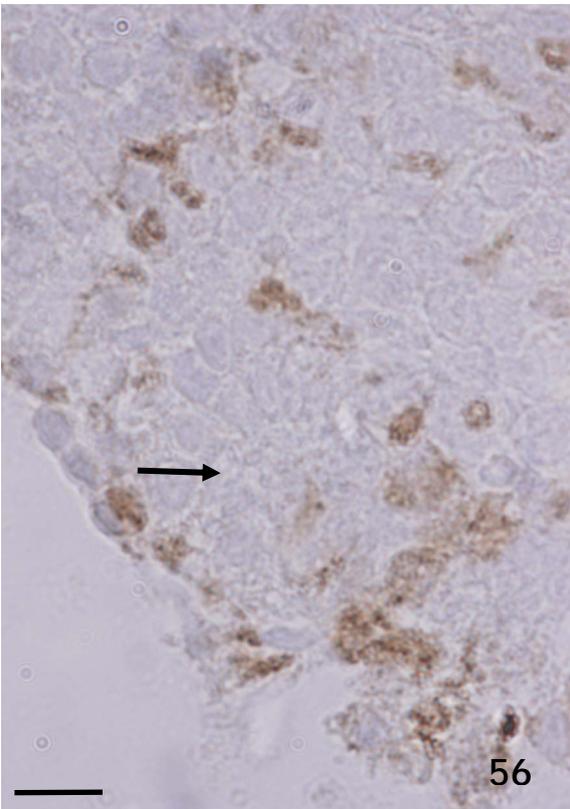
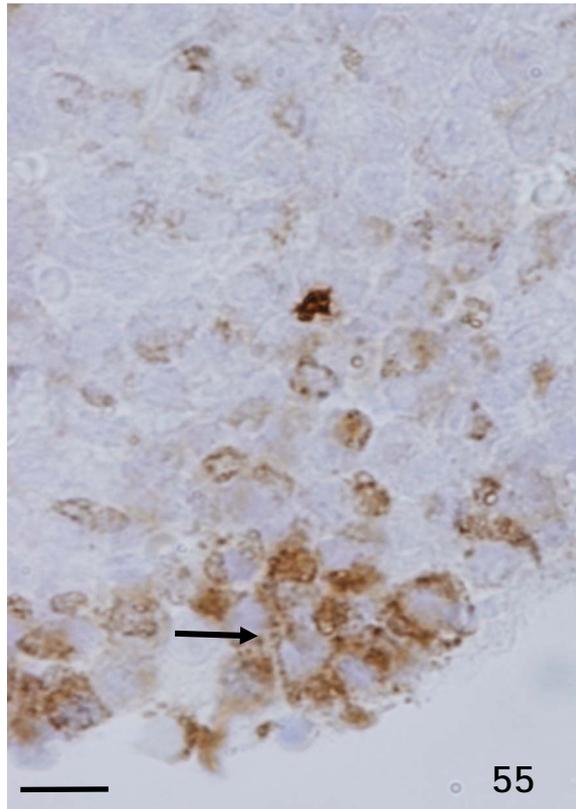
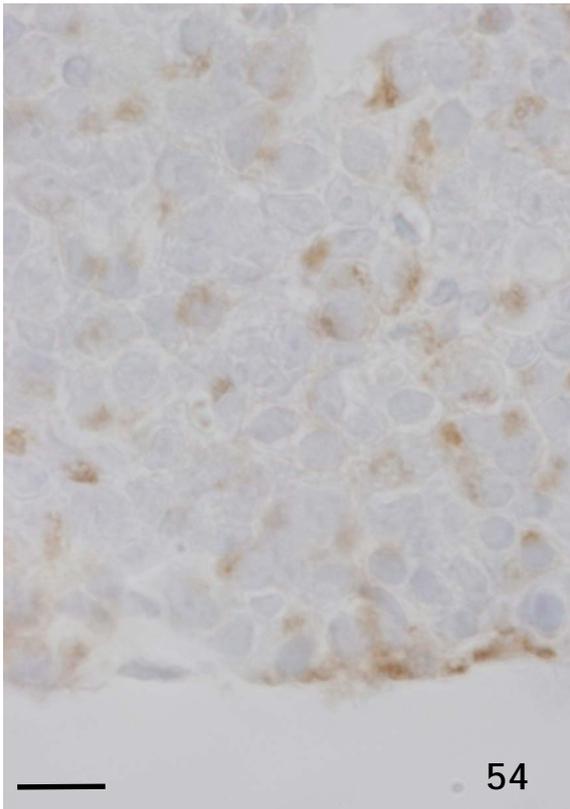
Figura 53. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out.
*: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$

Como muestran las figuras 54 a 57, la variabilidad descrita en la locación de las células positivas a prolactina de la región lateral de las hembras también se da en lo referente a su forma y patrón de reacción inmunocitoquímica.

Las células que aparecían dispersas y aisladas por la región lateral, en las hembras wild type o en las knock out, se caracterizaron por presentar una reacción citoplásmica más o menos granular que no afectaba a la totalidad del citoplasma.

Las células agrupadas en los márgenes de la región (flechas en figura 55 en el caso de las hembras wild type y 57 en el caso de las knock out) presentaban células de forma oval con una reacción granular que ocupaba la casi totalidad del citoplasma. Si bien en las hembras wild type muchas células presentaron una imagen negativa del aparato de Golgi próximo al núcleo que apenas pudo observarse en las células de las hembras knock out.

A veces, en las hembras knock out aparecieron claustros irregulares de células positivas rodeando células sin reacción (flecha en figura 56).



Figuras 54 a 57. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 54 y 55**) y knock out (**figuras 56 y 57**).
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región polar de la hipófisis de hembras.

Las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis de las hembras wild type fueron el $43.86 \pm 2.59\%$ del total celular, siendo esta región, de las diez estudiadas, la que presentó mayor número de células positivas (siendo significativamente mayor este porcentaje $p < 0.01$ o $p < 0.05$, que los observados en las regiones ventromedial medial próxima a la pars intermedia y centrales medial y lateral de las hipófisis de las hembras wild type).

En las hembras knock out, este porcentaje disminuyó significativamente $p < 0.01$ con respecto a las hembras wild type ($29.25 \pm 1.41\%$), de forma que en las hembras knock out, la región polar no presentó el mayor porcentaje ni las diferencias significativas en el porcentaje de células positivas con respecto a otras regiones hipofisarias, descritas en las hembras wild type.

La densidad numérica pasó de ser 1.42 ± 0.12 a ser de 1.03 ± 0.11 cels/ $100 \mu\text{m}^2$, descenso estadísticamente significativo $p < 0.05$.

La región polar de la hipófisis se caracterizó por presentar amplias zonas sin células positivas a prolactina. Sin embargo, aparecen otras zonas con grupos celulares en islotes o formando cordones.

En lo que respecta a la distribución de las células por la región, no se apreciaron grandes diferencias entre las hembras wild type (figura 60) y las hembras knock out (figura 61).

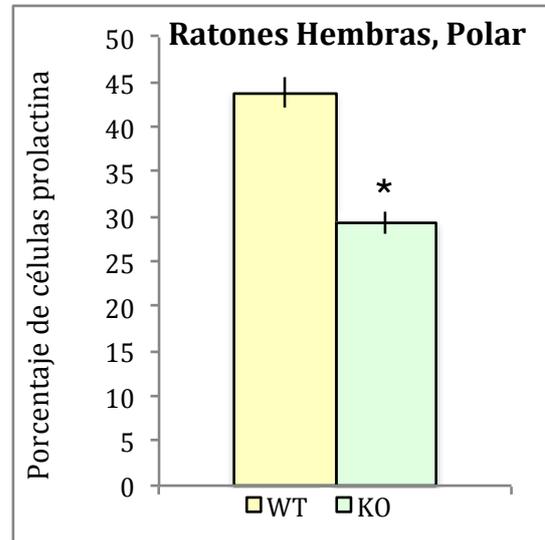


Figura 58. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$

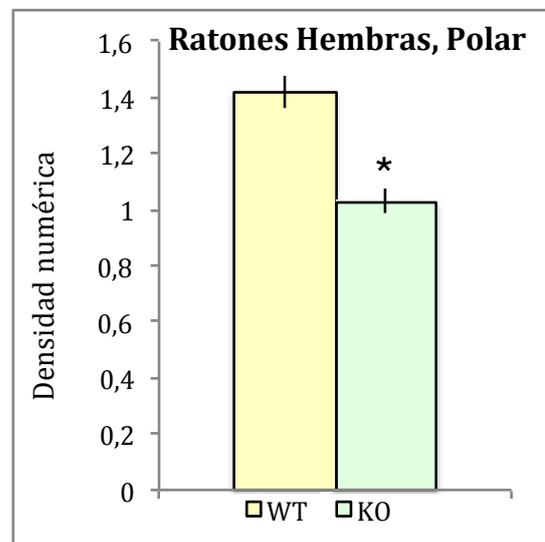
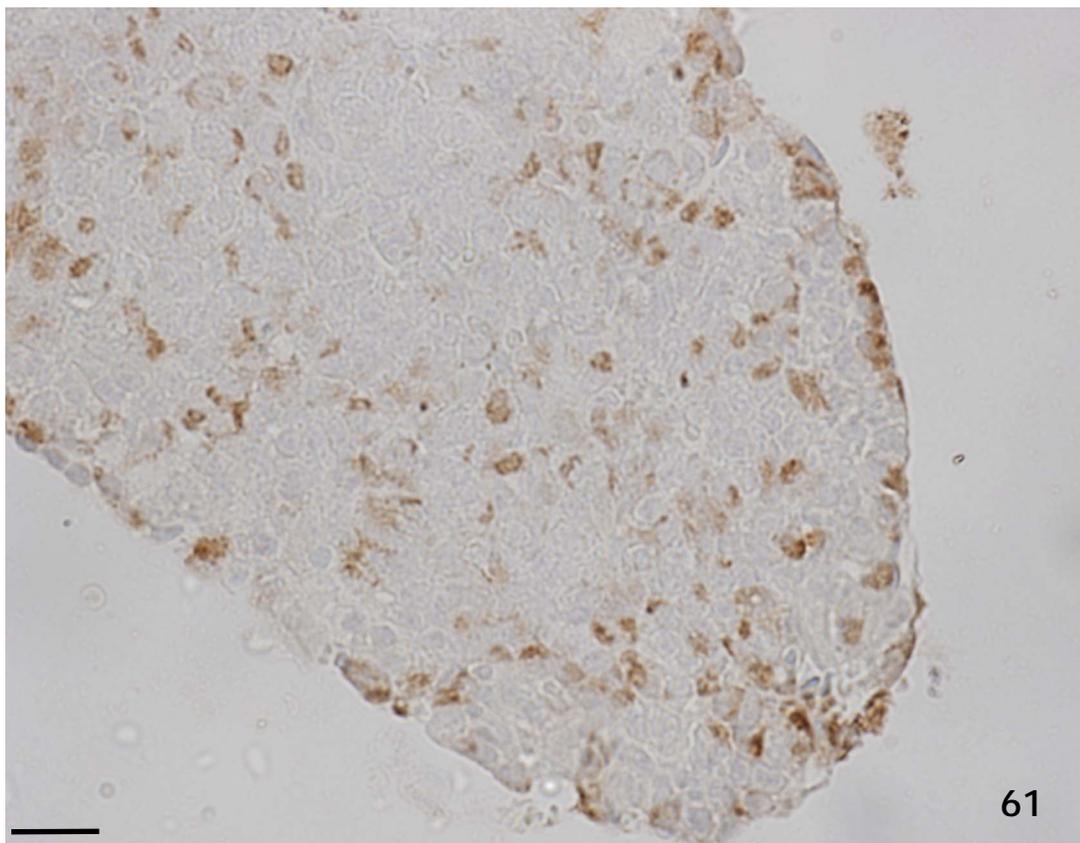
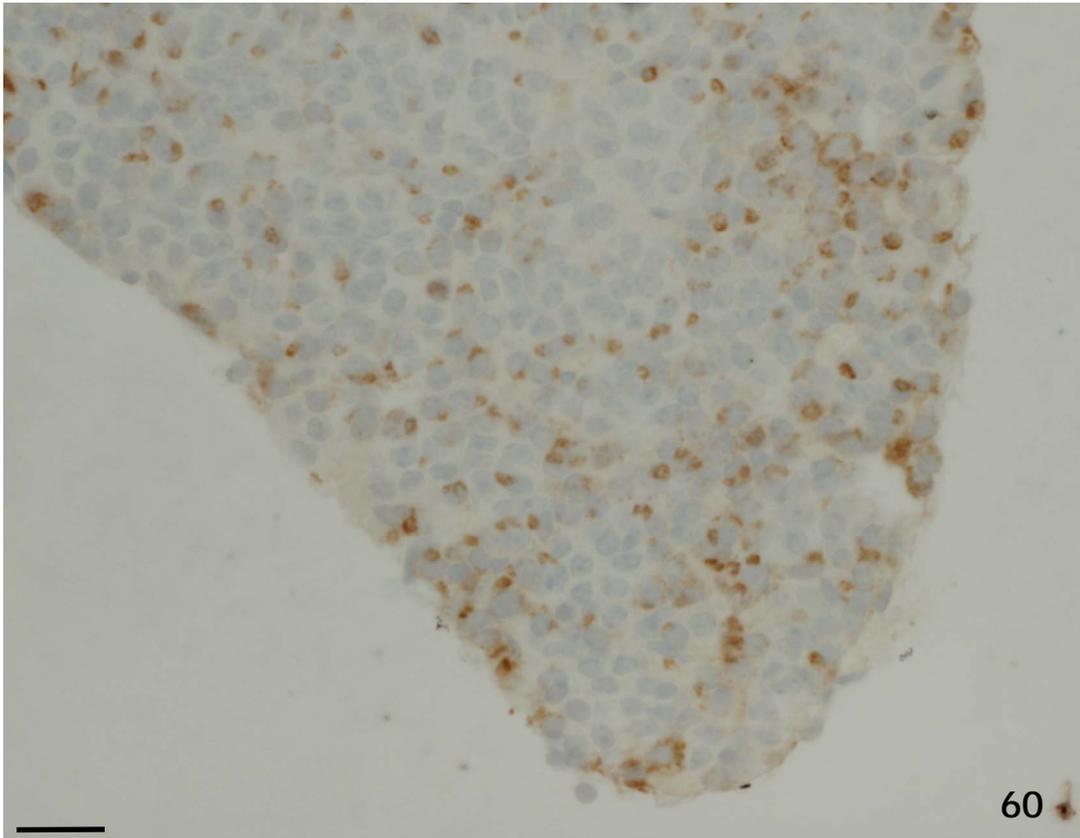


Figura 59. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.05$



Figuras 60 a 61. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis de hembras wild type (**figura 60**) y knock out (**figura 61**).
barra en figuras: 50 μ m

El área celular media en la región polar de las hembras wild type fue de $55.90 \pm 1.02 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 30.53 y $77.52 \mu\text{m}^2$.

Este parámetro disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en las hembras knock out que presentaron un valor medio de $45.25 \pm 0.63 \mu\text{m}^2$, oscilando entre un mínimo de $35.99 \mu\text{m}^2$ y un máximo de $59.37 \mu\text{m}^2$.

En las hembras wild type, el núcleo alcanzó una dimensión considerable, ya que ocupó más del 31% de la célula, presentando un valor medio de $17.51 \pm 0.41 \mu\text{m}^2$.

El área nuclear observada en la región polar de la hipófisis de las hembras knock out se caracterizó por ser significativamente menor ($p < 0.01$) que la de las hembras wild type, con unos valores medios de $12.53 \pm 0.14 \mu\text{m}^2$.

Junto al descenso en el valor absoluto, destaca el hecho de que de forma relativa la dimensión del núcleo dentro del total celular es mucho menos relevante que en las hembras wild type ya que tan solo ocupaba el 27% del total celular.

Las figuras 63 y 64 muestran a gran aumento las células positivas a prolactina de la región polar en las hembras wild type, destacando su forma ovalada o poligonal con núcleos grandes y citoplasmas pequeños con una reacción granular que en ocasiones afectaba a toda su superficie (flecha en figura 64).

En las hembras knock out, las células aparecieron más veladas con reacción en parte del citoplasma (figuras 65 y 66).

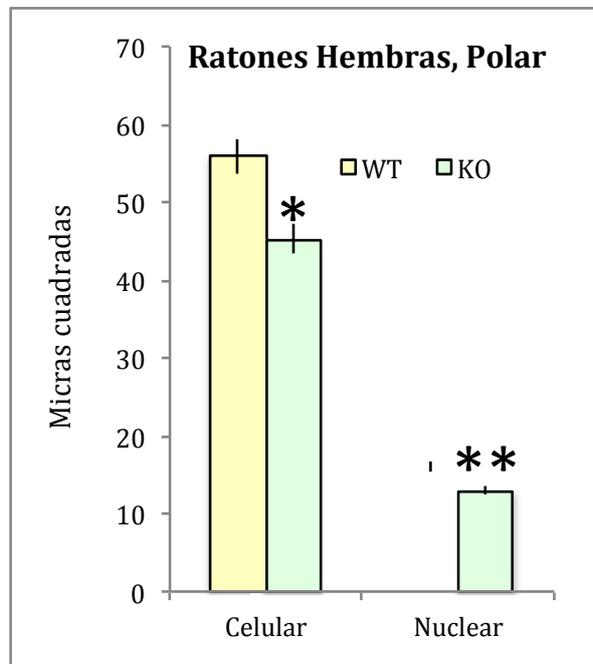
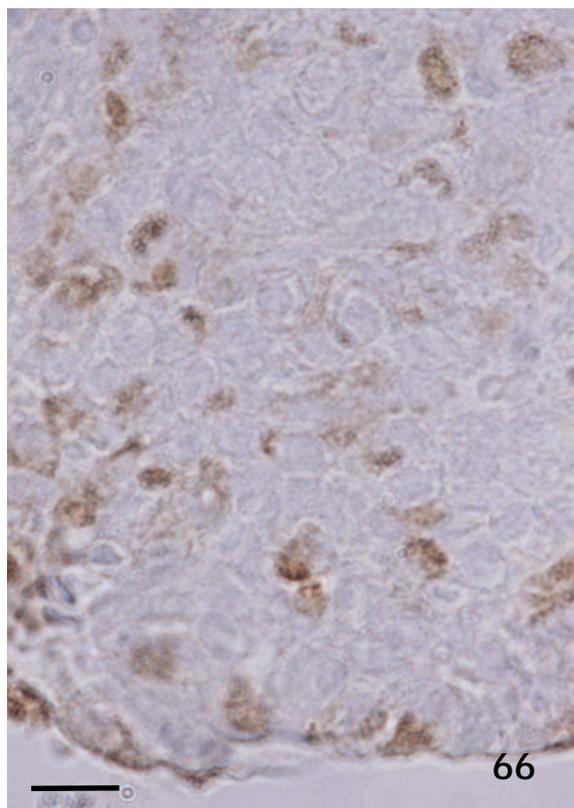
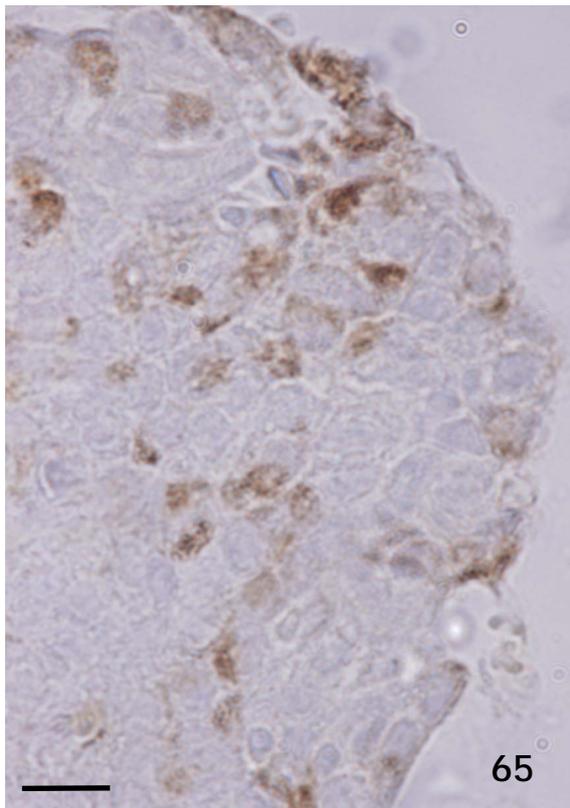
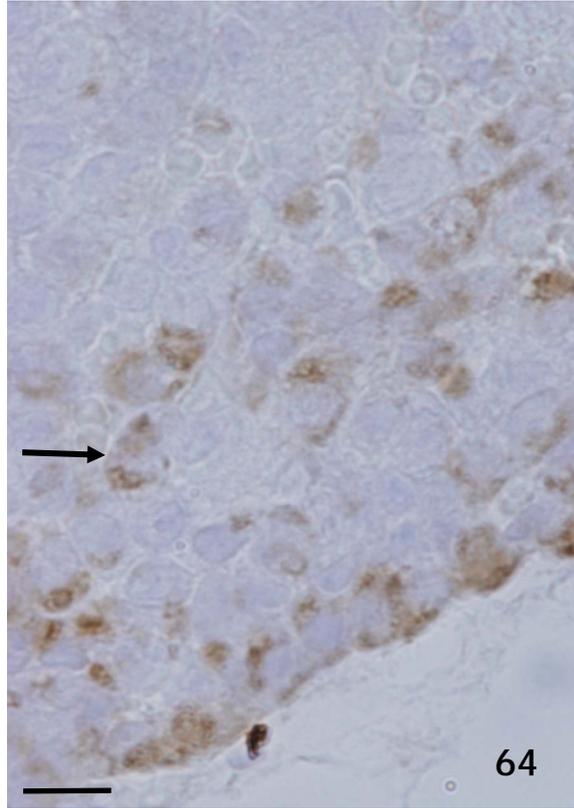
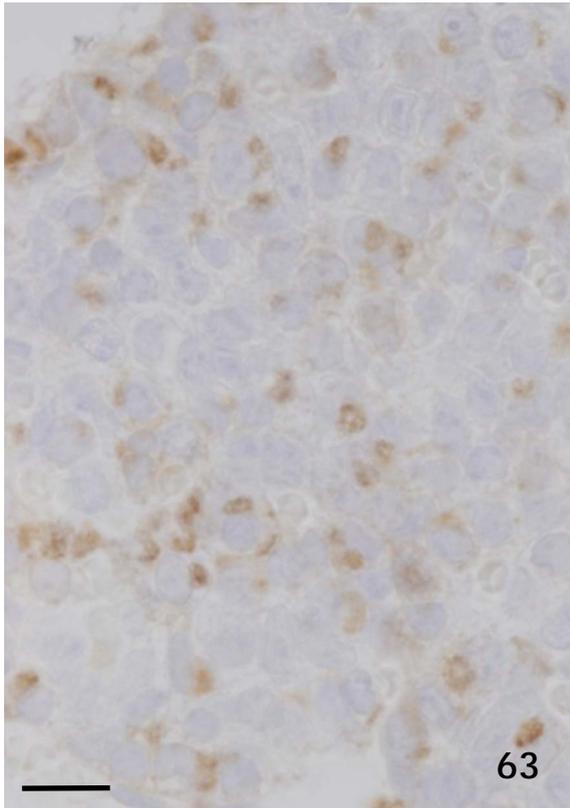


Figura 62. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out.
*: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$



Figuras 63 a 66. Micrografías que muestran las características morfológicas más relevantes de las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 63 y 64**) y knock out (**figuras 65 y 66**).
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de hembras.

Como se puede apreciar en la gráfica de la figura 67 para el porcentaje de células positivas a prolactina y en la de la figura 68 para la densidad numérica, en la región ventral lateral de la hipófisis el valor medio del porcentaje ($42.02 \pm 4.57\%$ vs $44.44 \pm 2.05\%$) y el de la densidad numérica (1.14 ± 0.1 cels/ $100 \mu\text{m}^2$ vs 1.19 ± 0.1 cels/ $100 \mu\text{m}^2$), siendo discretamente superiores en los animales knock out que en los wild type, no presentaron diferencias significativas entre las hembras wild type y las hembras knock out.

Las células positivas a prolactina de esta región se dispusieron principalmente en el margen periférico de la glándula de los animales wild type (figura 69) y en la de los knock out (figura 70).

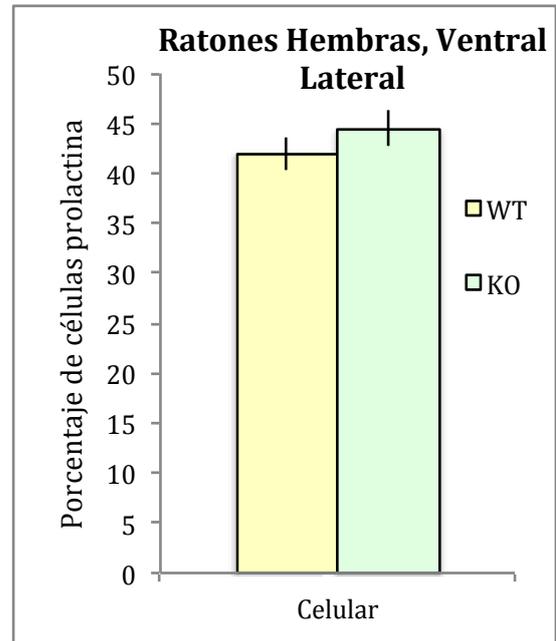


Figura 67. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

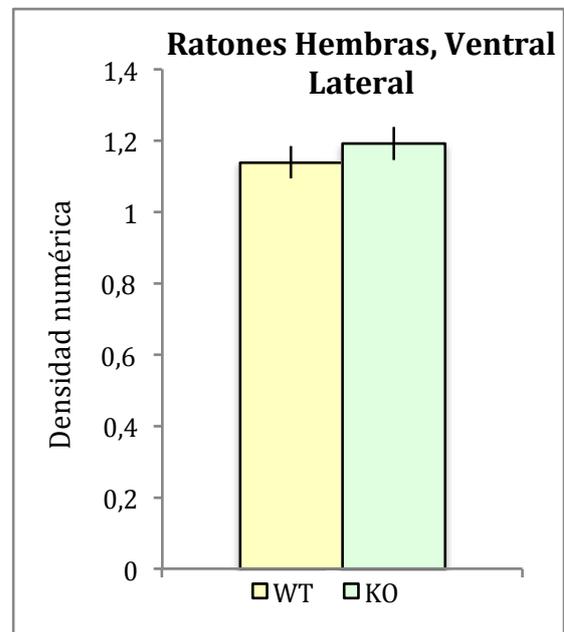
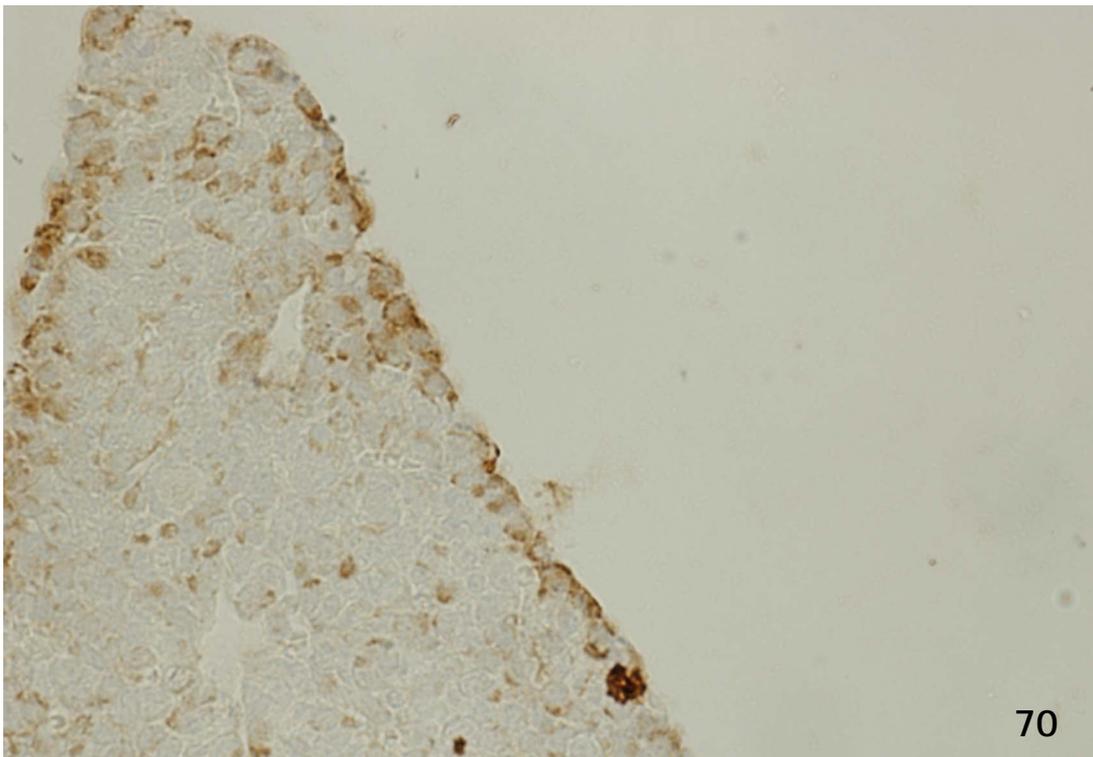
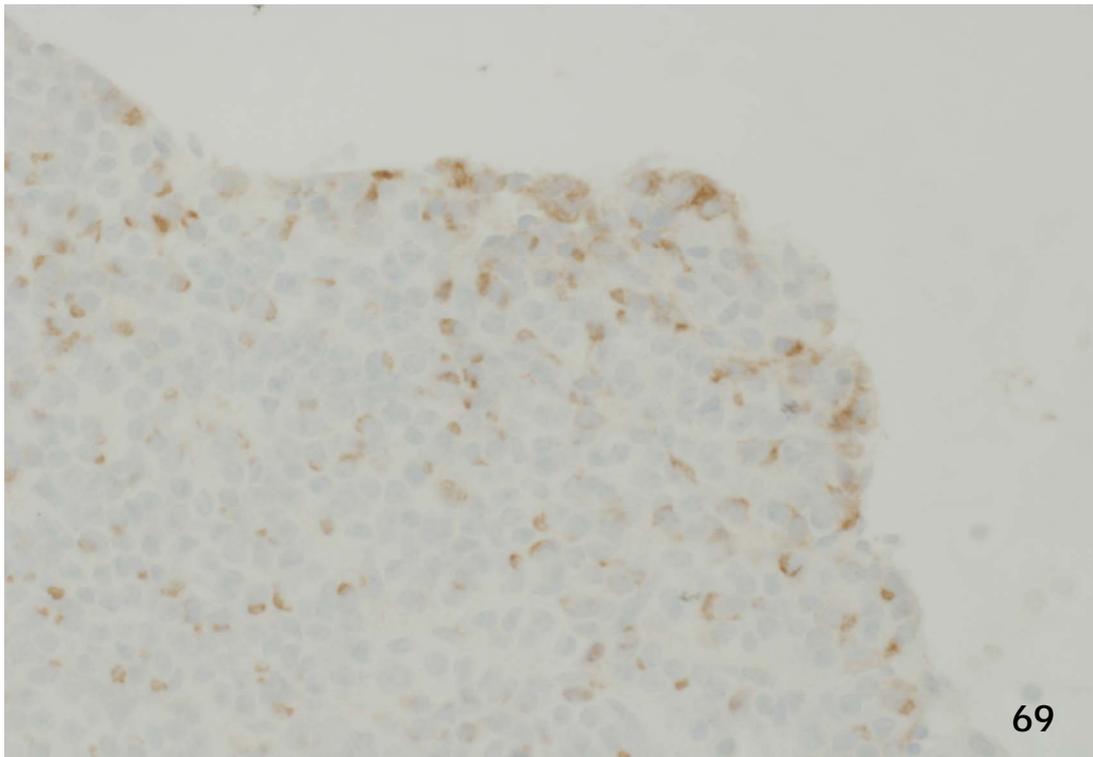


Figura 68. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 69 a 70. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de hembras wild type (**figura 69**) y knock out (**figura 70**).
barra en figuras: 50 μ m

Al contrario de lo que ocurría al analizar el porcentaje de células reactivas o la densidad numérica, los parámetros morfométricos analizados (área celular y área nuclear) sí presentaron variaciones significativas en la región ventral lateral entre las hembras wild type y las knock out.

En las hembras wild type, el área celular media alcanzó un valor medio de $51.34 \pm 1.09 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 35.10 y $78.72 \mu\text{m}^2$.

El núcleo ocupó en torno al 27% de la célula presentando un área media de $13.98 \pm 0.28 \mu\text{m}^2$, oscilando en valores comprendidos entre 9.75 y $24.83 \mu\text{m}^2$.

El área celular media en las hembras knock out $39.88 \pm 0.61 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 30.42 y $52.90 \mu\text{m}^2$. Significativamente menor que la observada en las wild type ($p < 0.001$).

En estos animales, el área nuclear media fue de $11.52 \pm 0.28 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 6.90 y $16.94 \mu\text{m}^2$. Significativamente menor que la observada en las hembras wild type ($p < 0.01$).

En ambos grupos las células positivas presentaron una reacción granular de su citoplasma (figuras 72 a 75) que en las células marginales ocupa la totalidad del mismo (flechas en figuras 73 y 75).

En las hembras wild type, el núcleo, redondeado se dispuso en un polo celular (flecha en figura 73); mientras que en las hembras knock out el núcleo más ovalado solía adoptar una posición central (flecha en figura 75).

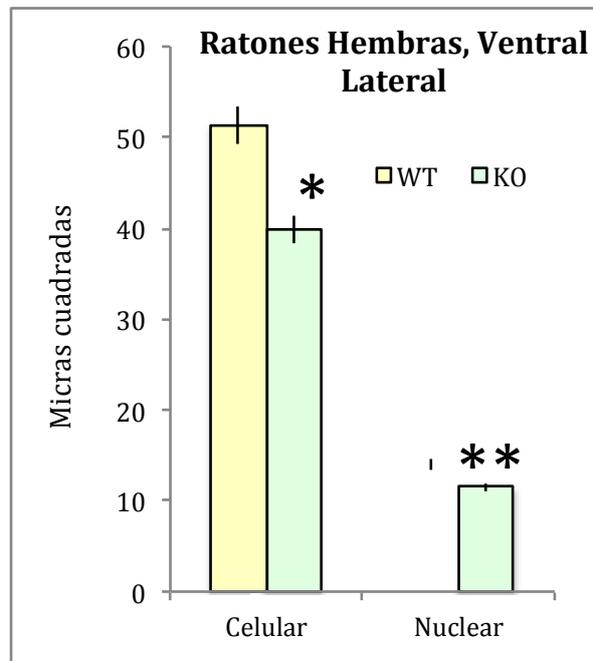
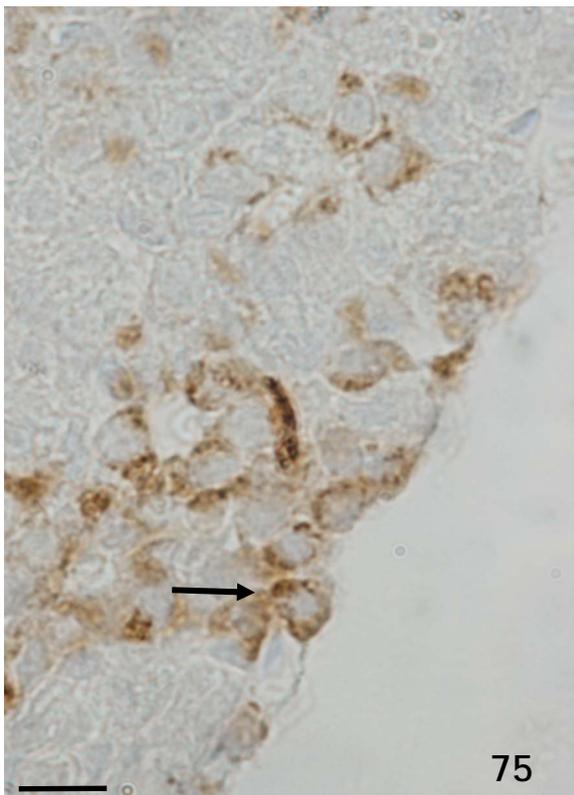
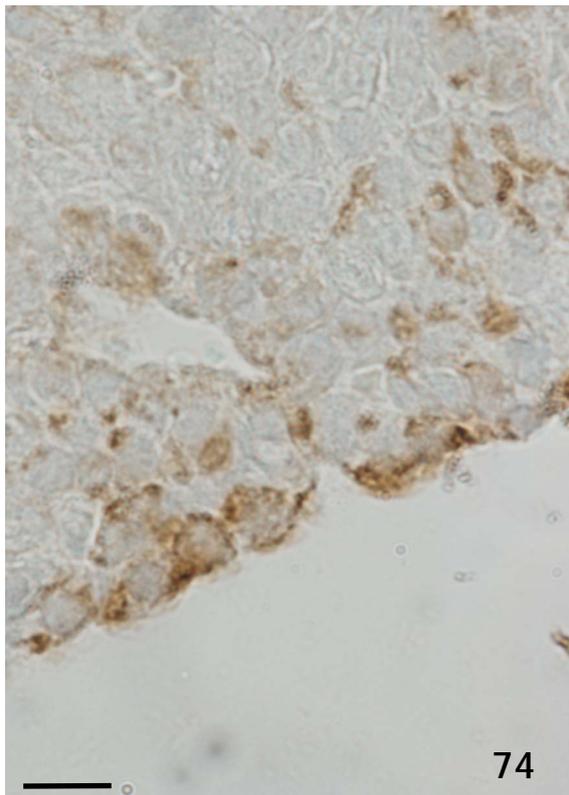
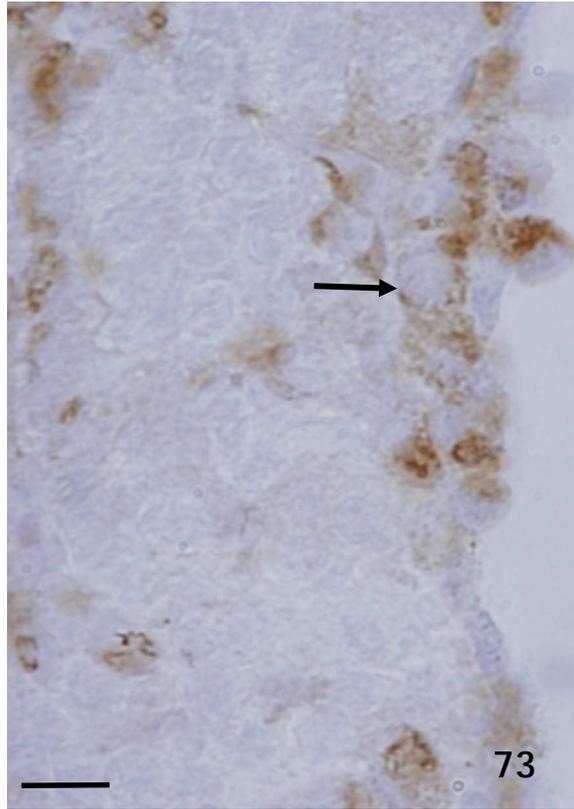
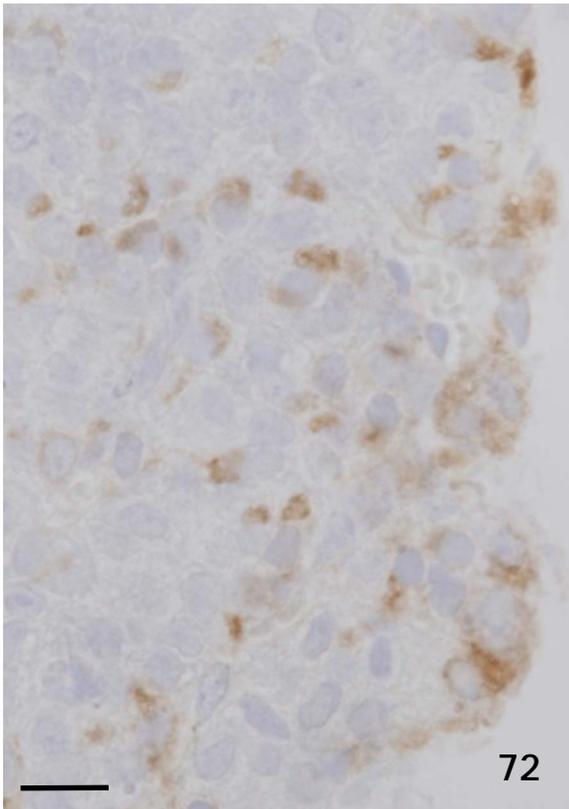


Figura 71. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$



Figuras 72 a 75. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 72 y 73**) y knock out (**figuras 74 y 75**).
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de hembras.

La región ventral medial de la hipófisis de las hembras wild type presentó los porcentajes celulares y la densidad numérica más bajos de los observados en las regiones de la hipófisis de estos animales (figuras 76 y 77).

El porcentaje medio fue de $29.61 \pm 2.75\%$ y la densidad numérica de 0.81 ± 0.09 cels/ $100 \mu\text{m}^2$.

Ello es debido a que, como puede apreciarse en la figura 78, las células positivas a prolactina aparecieron muy dispersas dejando amplias zonas ocupadas por células no reactivas y, las células positivas en los márgenes de la glándula eran casi inexistentes.

Las hembras knock out, presentaron un porcentaje celular medio (figura 76) muy parecido al de las hembras wild type ($30.3 \pm 2.51\%$) sin que las diferencias observadas entre las medias alcanzaran valores estadísticamente significativos.

No ocurrió así al analizar la densidad numérica (figura 77). La presencia de células marginales positivas y de grupos compactos de células de prolactina hizo que la densidad numérica en estos animales fuera mayor ($p < 0.01$) que la observada en las wild type, alcanzando valores de 1.11 ± 0.16 cels/ $100 \mu\text{m}^2$.

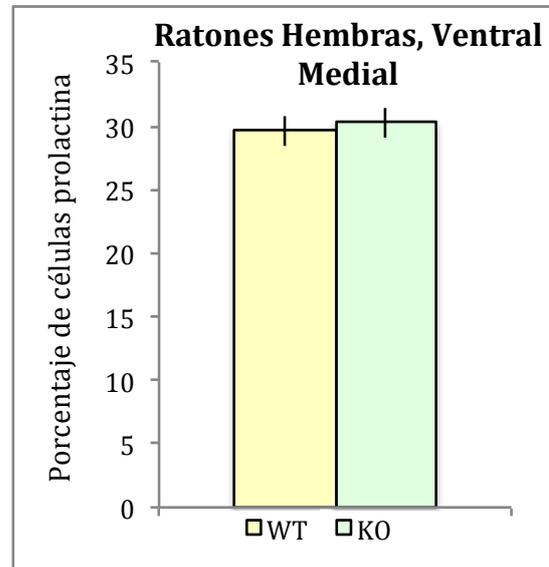


Figura 76. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out.

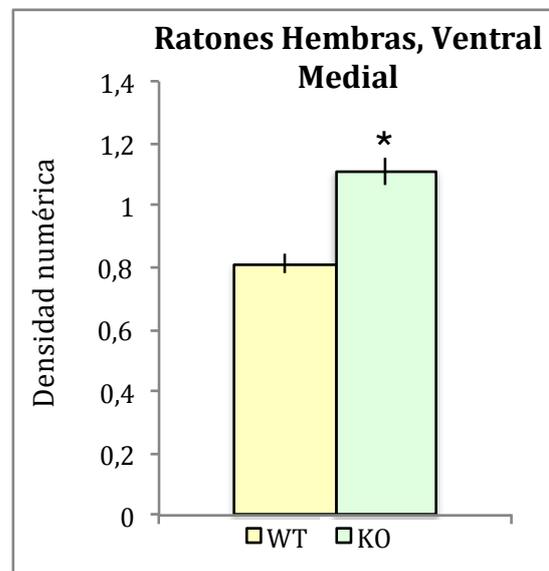
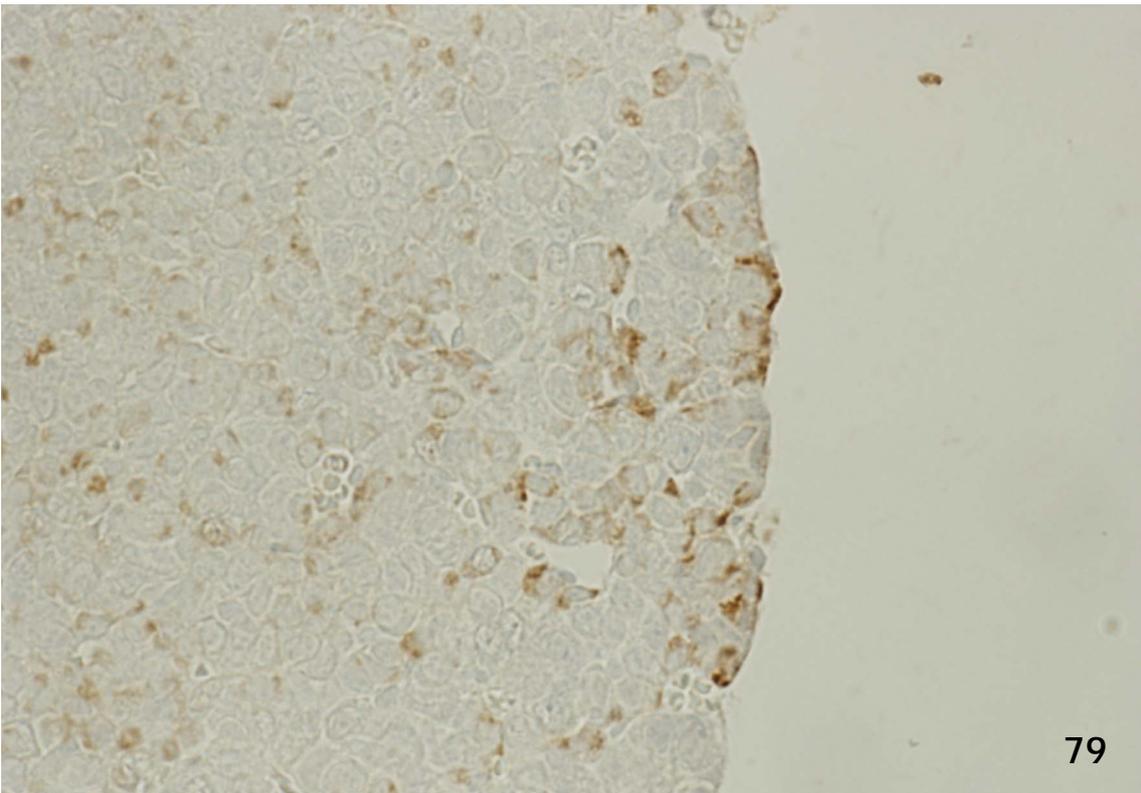
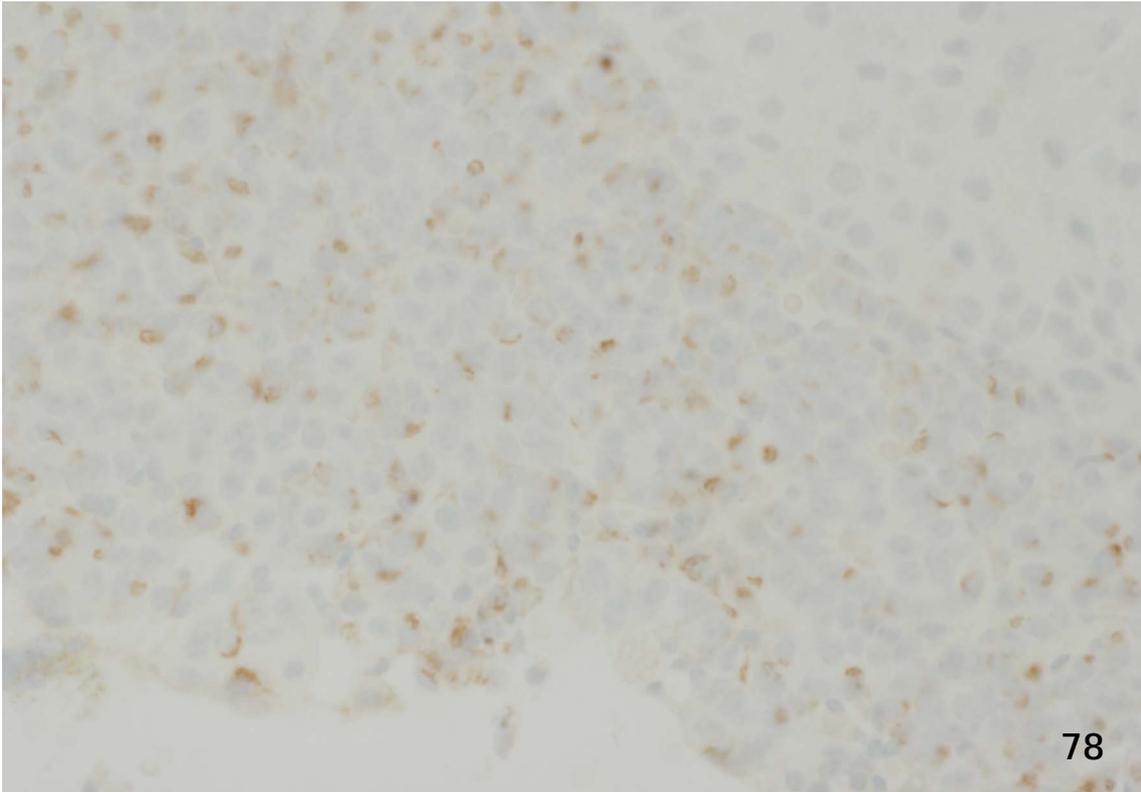


Figura 77. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región ventral medial tuberal de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$



Figuras 78 a 79. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de hembras wild type (**figura 78**) y knock out (**figura 79**).

barra en figuras: 50 μ m

La figura 81 muestra a mayores aumentos la escasa presencia de células positivas a prolactina en los márgenes de la hipófisis de las hembras wild type. Junto a ello, no se apreciaron grupos compactos de células positivas que generalmente aparecían aisladas (figura 82).

En estos animales, las células positivas a prolactina presentaron un área celular media de $57.74 \pm 1.05 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 36.45 y $81.06 \mu\text{m}^2$ (figura 80).

Sus núcleos fueron de un tamaño relativamente grande, ya que más del 33% de la células está ocupada por el núcleo, presentando un área nuclear media de $19.17 \pm 0.54 \mu\text{m}^2$.

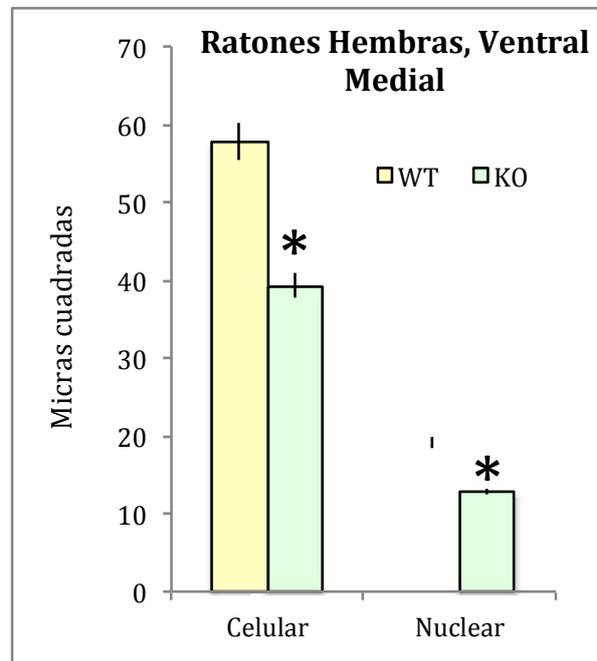
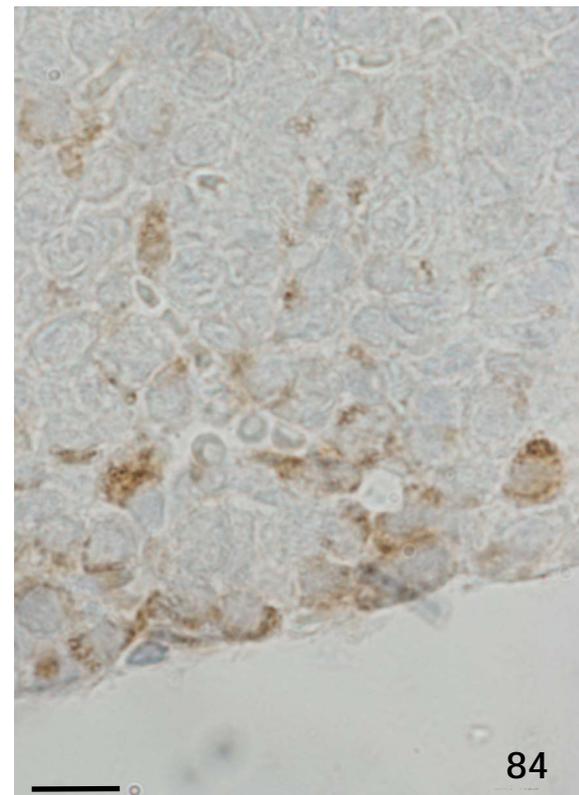
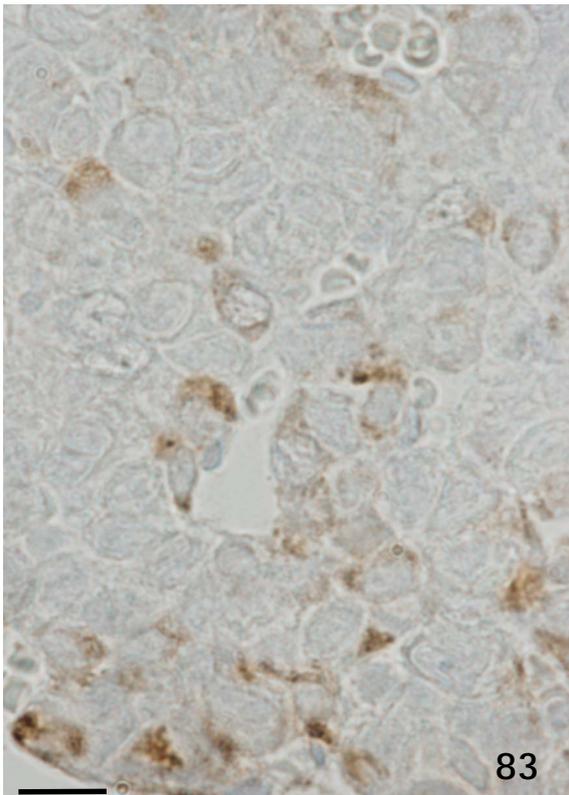
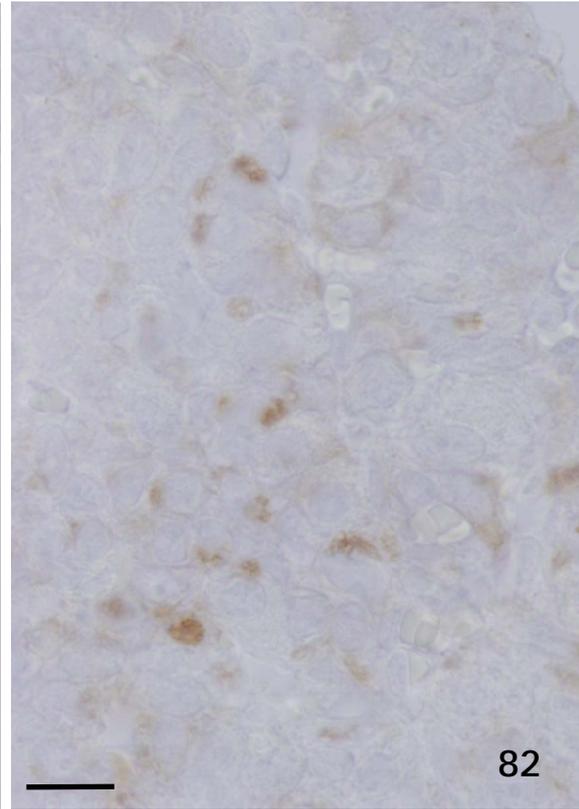
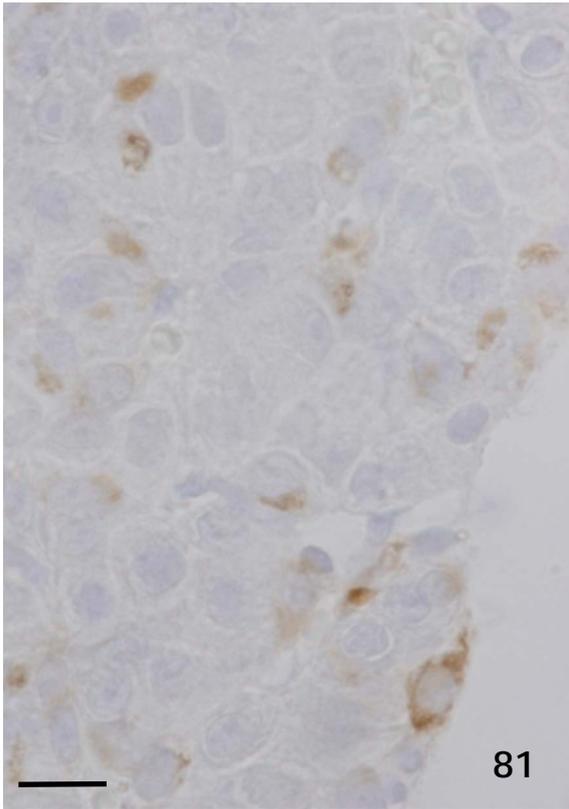


Figura 80. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

Las figuras 83 y 84 muestran a grandes aumentos la presencia marginal y la formación de claustrros de células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis las hembras knock out. Estas células presentaron mayor intensidad de reacción que en las hembras wild type, en las que la reacción solía disponerse en pequeñas zonas de su citoplasma.

El área celular en las hembras knock out fue significativamente menor ($p < 0.001$) que la observada en las wild type, con un valor medio de $39.21 \pm 0.71 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 24.22 y $52.47 \mu\text{m}^2$.

En las hembras knock out, también se observó un descenso significativo del área nuclear ($p < 0.01$) que presentó un valor medio de $12.84 \pm 0.32 \mu\text{m}^2$ (figura 80).



Figuras 81 a 84. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 81 y 82**) y knock out (**figuras 83 y 84**).
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de hembras.

La región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis es una zona de confluencia entre la región ventral medial, la región central medial y la región dorsal infracavitaria. Probablemente por ello, presenta características morfológicas, morfométricas y planimétricas que combinan las de las tres regiones antes citadas.

Es la única región de la hipófisis en la que hemos encontrado que el porcentaje de células positivas a prolactina (figura 85) y su densidad numérica (figura 86) fue mayor en las hembras knock out (38.46 ± 2.8 y 1.12 ± 0.13 , respectivamente) que los observados en las hembras wild type (31.11 ± 2.93 y 1.08 ± 0.09), aunque estas diferencias no alcanzaron valores estadísticamente significativos.

La distribución celular también fue muy parecida entre los dos grupos de hembras estudiados, más agrupadas en la proximidad a la pars intermedia y la caverna hipofisaria y dispersas al aproximarse a la región central medial (figuras 87 y 88).

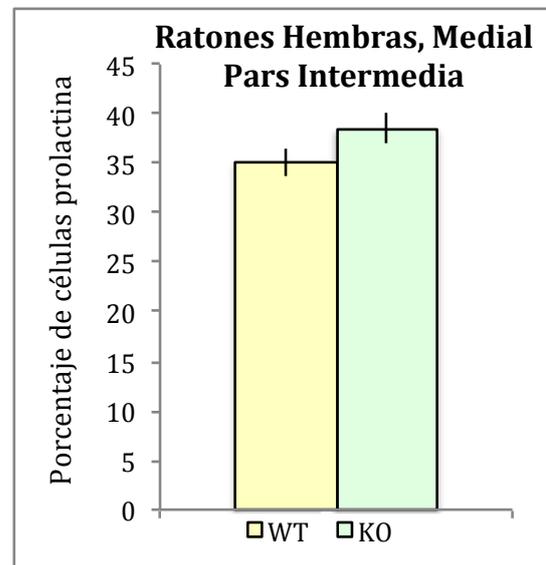


Figura 85. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out.

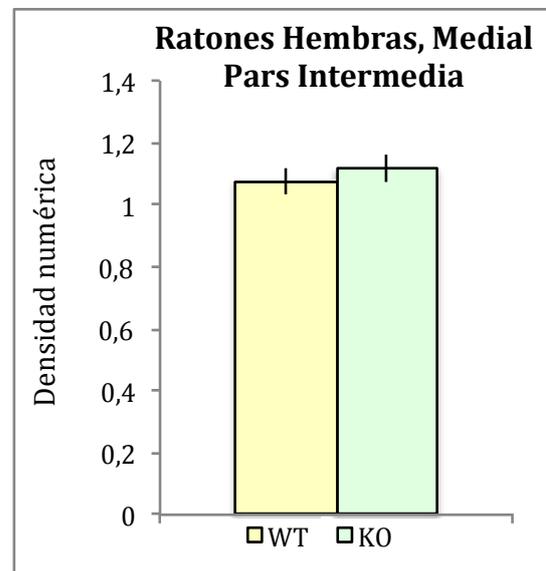
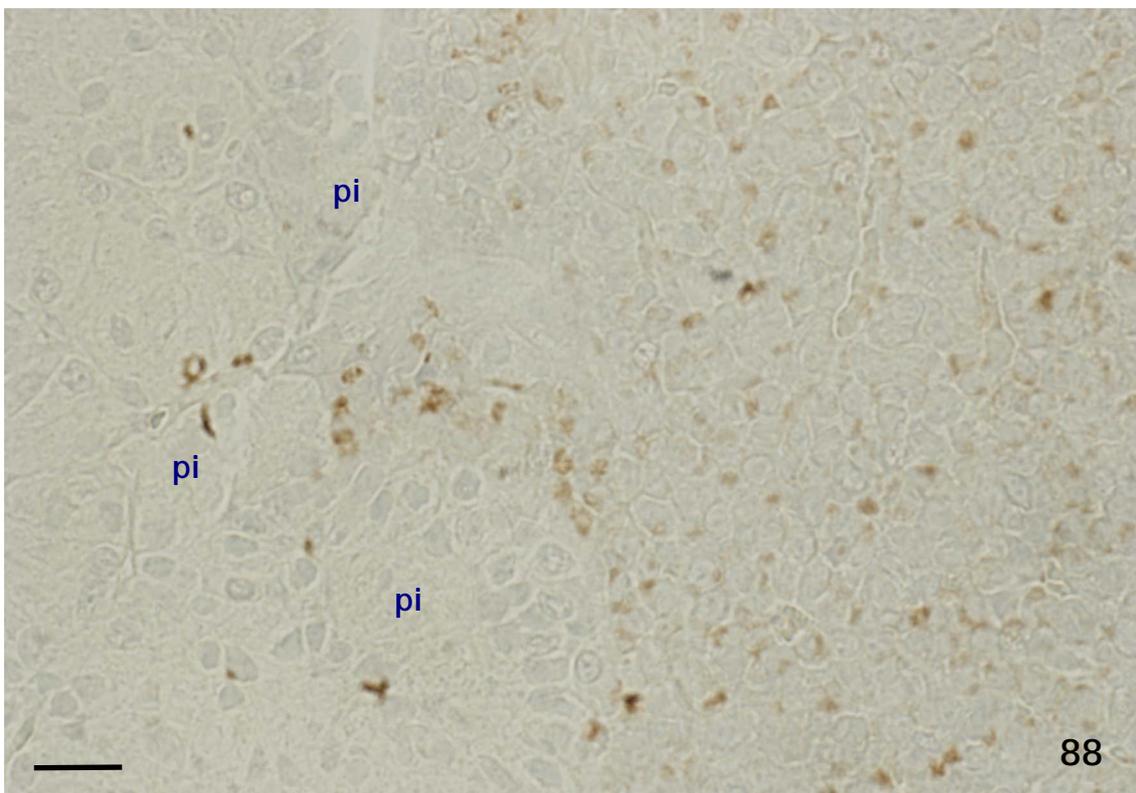
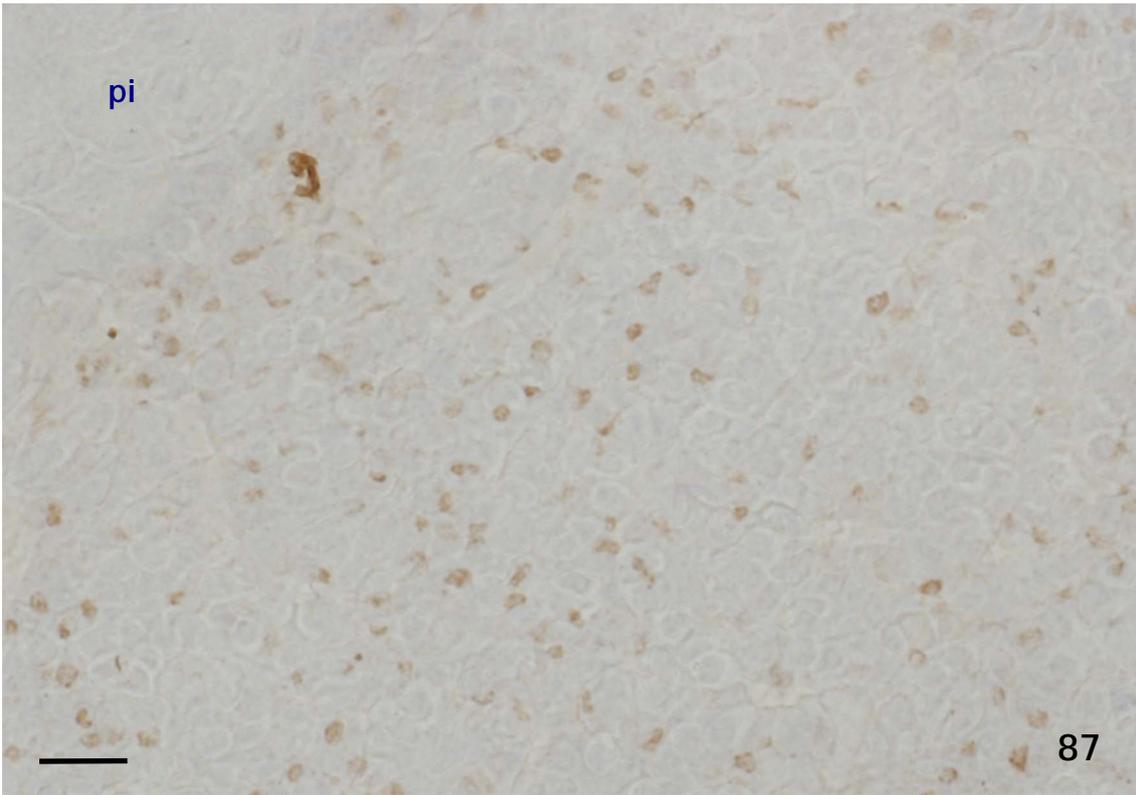


Figura 86. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out



Figuras 87 a 88. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de hembras wild type (figura 87) y knock out (figura 88).
pi: pars intermedia de la hipófisis
barra en figuras: 50 μ m

Independientemente del número de células, al analizarlas morfológicamente se apreció una variación estadísticamente significativa para las células positivas a prolactina de la región medial próxima a la pars intermedia entre las hembras wild type y la knock out (figura 89).

Las hembras wild type presentaron células cuyo área media fue de $56.27 \pm 0.94 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 43.94 y $85.12 \mu\text{m}^2$.

Algo más del 30% de la célula estaba ocupado por el núcleo cuya área media fue $17.18 \pm 0.37 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 10.88 y $27.95 \mu\text{m}^2$.

Las hembras knock out tenían un área celular media significativamente menor ($p < 0.001$) de $39.31 \pm 0.71 \mu\text{m}^2$. Siendo el valor mínimo de 25.10 y el máximo de $54.66 \mu\text{m}^2$.

En esta región de la hipófisis de los animales knock out, el núcleo presentó un área media de $12.59 \pm 0.34 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 6.69 y $19.27 \mu\text{m}^2$. Significativamente menor que el hallado en las hembras wild type ($p < 0.01$).

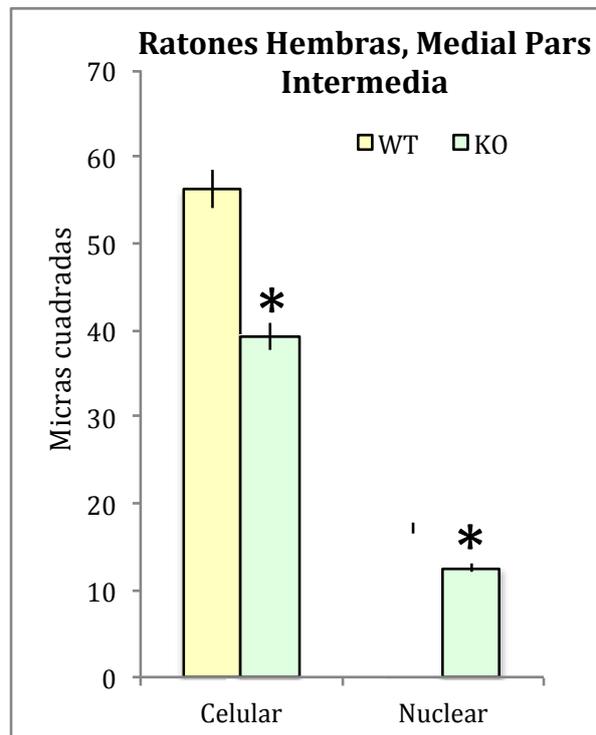
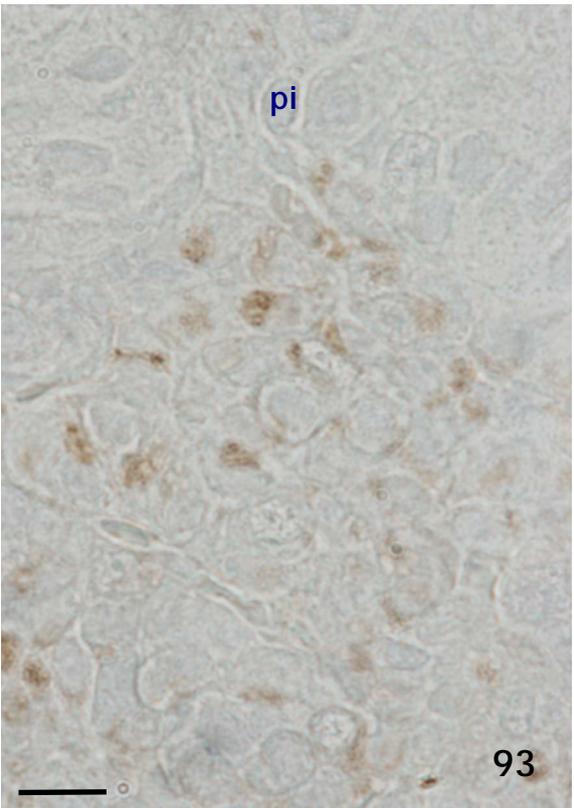
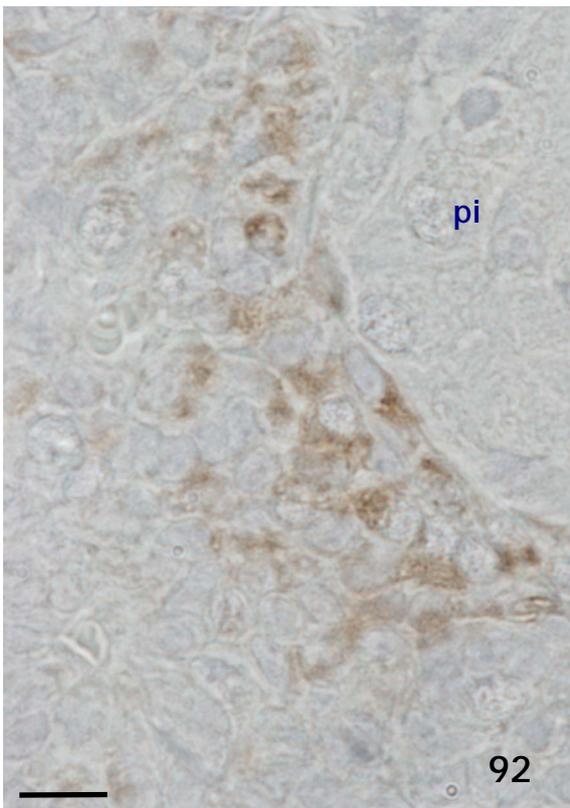
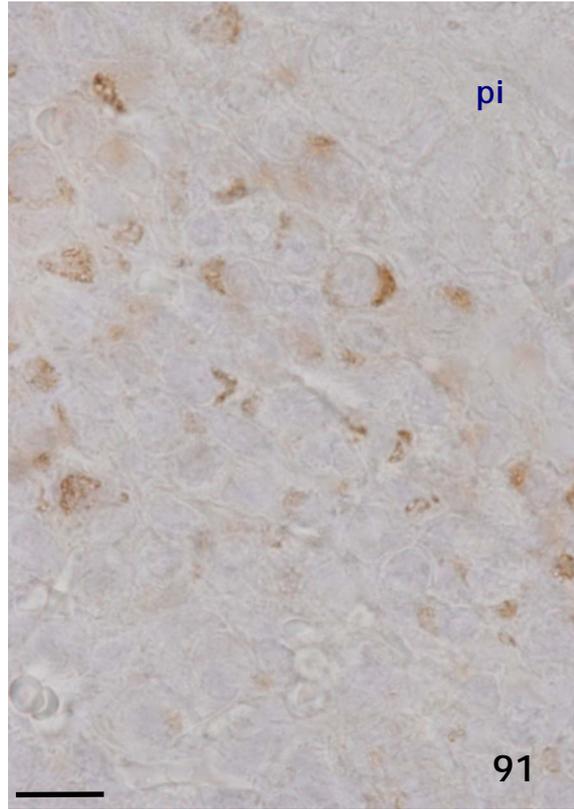
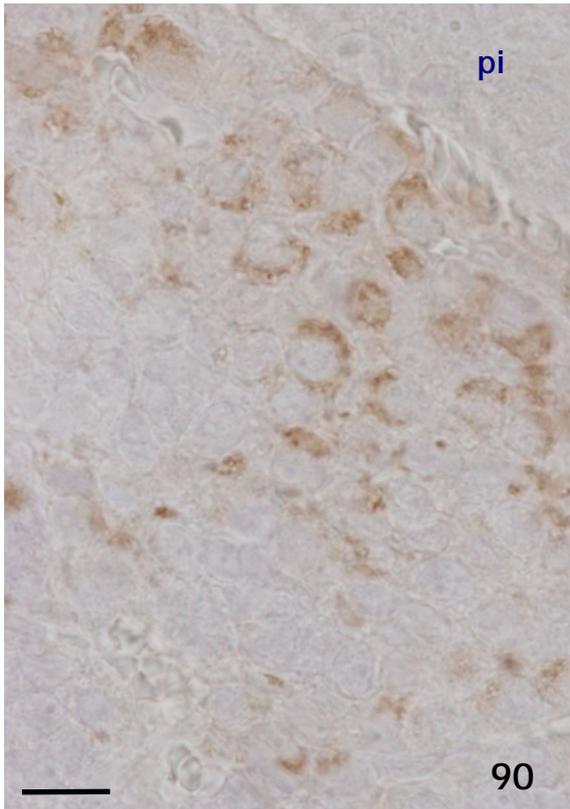


Figura 89. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

Morfológicamente la diferencia más notable entre las células positivas a prolactina de las hembras wild type y las de las knock out en esta región fue la distribución de la reacción dentro del citoplasma. En los animales knock out (figuras 92 y 93), lo más frecuente era que la reacción se encontrara en una parte del citoplasma celular, mientras que en las células de las hembras wild type la reacción estaba esparcida por casi todo el citoplasma (figuras 90 y 91).

Además, en las hembras wild type los núcleos eran redondeados, mientras que en las knock out eran rectangulares o irregulares.



Figuras 49 a 52. Micrografías que muestran las células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 90 y 91**) y knock out (**figuras 92 y 93**).
Pi: pars intermedia de la hipófisis
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de hembras.

Las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria presentan una disposición desigual al recorren la región de cefálico a caudal.

No obstante, las células son claamente más abundantes en las hembras wild type que en las knock out, como puede apreciarse a simple vista en las figuras 96 y 97.

Tras su cuantificación, el porcentaje celular (figura 94) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en las hembras wild type 40.18 ± 3.45 que en las knock out 32.76 ± 0.92 .

La valoración con respecto a la superficie glandular, la densidad numérica, también presentaba valores significativamente mayores ($p < 0.01$) en las hembras wild type 1.17 ± 0.07 , que en las knock out 1.02 ± 0.15 (figura 95).

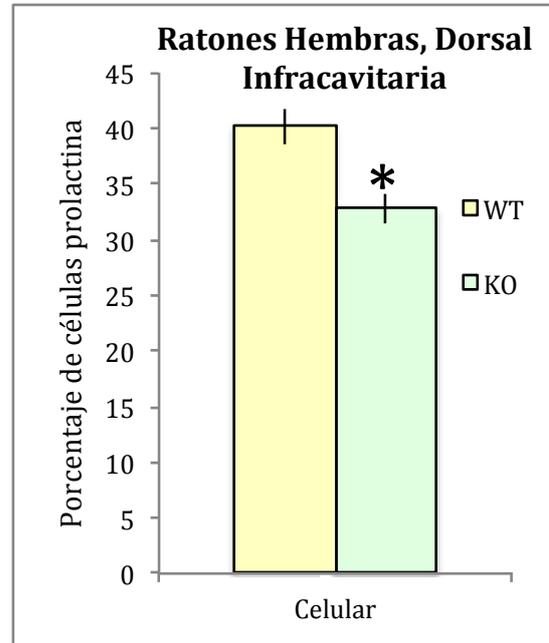


Figura 94. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.005$

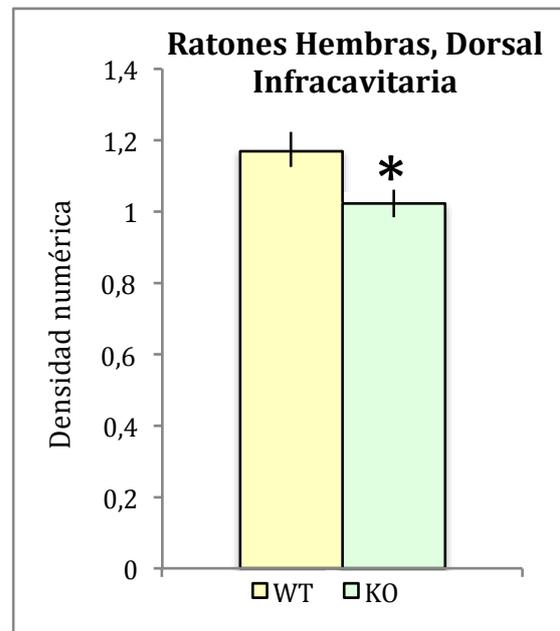
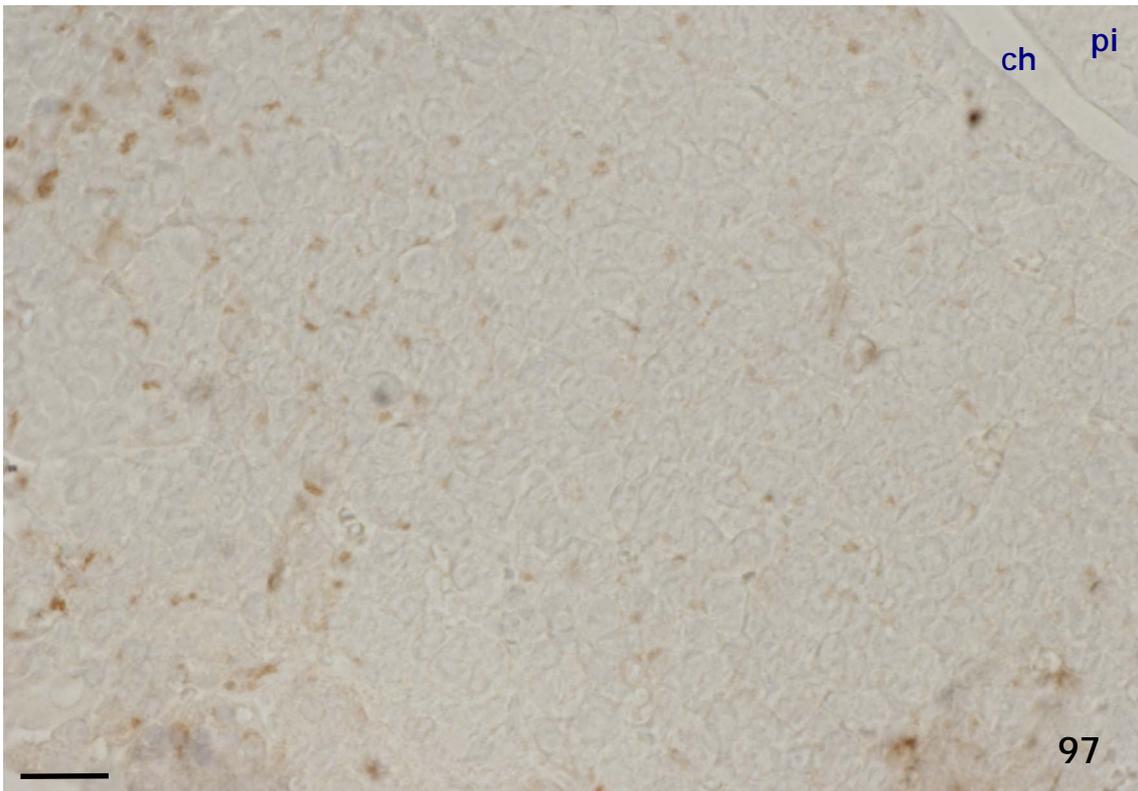
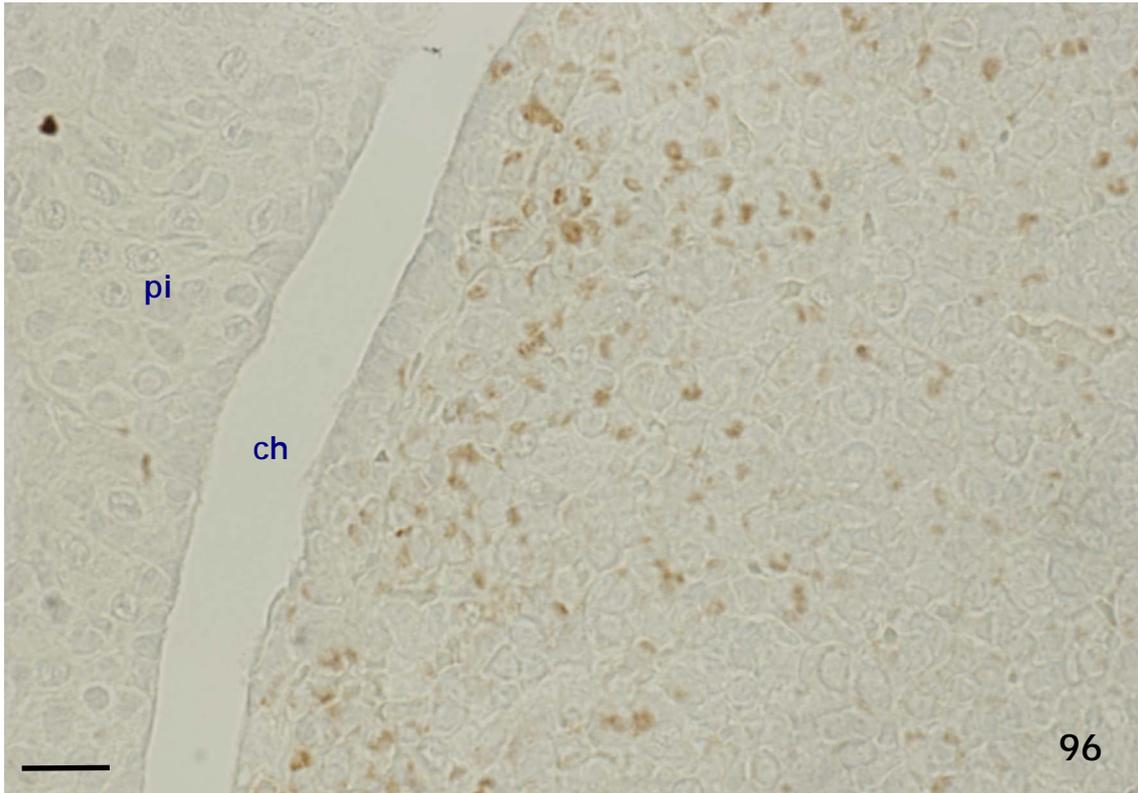


Figura 95. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$



Figuras 96 y 97. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de hembras wild type (**figura 96**) y knock out (**figura 97**).

ch: caverna hipofisaria, **pi:** pars intermedia. **Pi:** pars intermedia de la hipófisis
barra en figuras: 25 μm

Morfométricamente, las células positivas a prolactina en la región infracavitaria de los animales hembra wild type presentaron un área celular media de $52.66 \pm 0.83 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 44.31 y $78.69 \mu\text{m}^2$.

El área nuclear media en estas células fue de $16.60 \pm 0.41 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 8.42 y $26.68 \mu\text{m}^2$.

Las hembras knock out, presentaron células significativamente menores que las observadas en las wild type ($p < 0.001$).

El área celular media en las hembras knock out fue de $45.69 \pm 0.79 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 31.49 y $69.32 \mu\text{m}^2$.

Hallazgos semejantes se encontraron al estudiar el área nuclear media, que fue de $12.51 \pm 0.32 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 8.10 y $19.66 \mu\text{m}^2$.

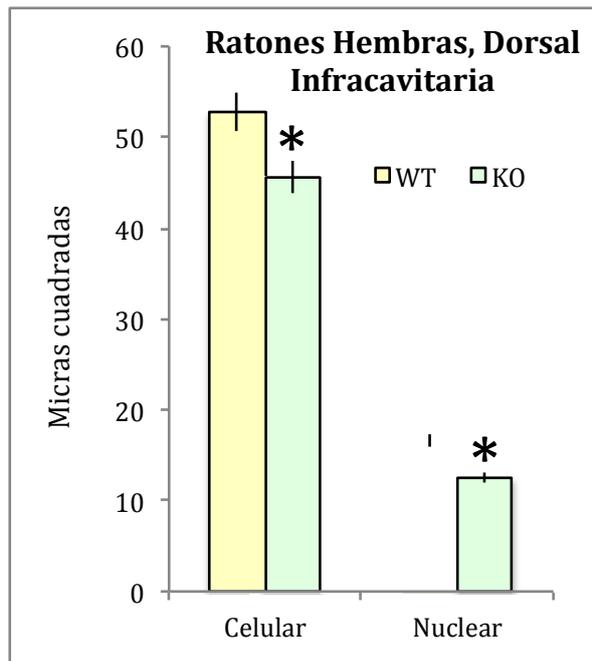


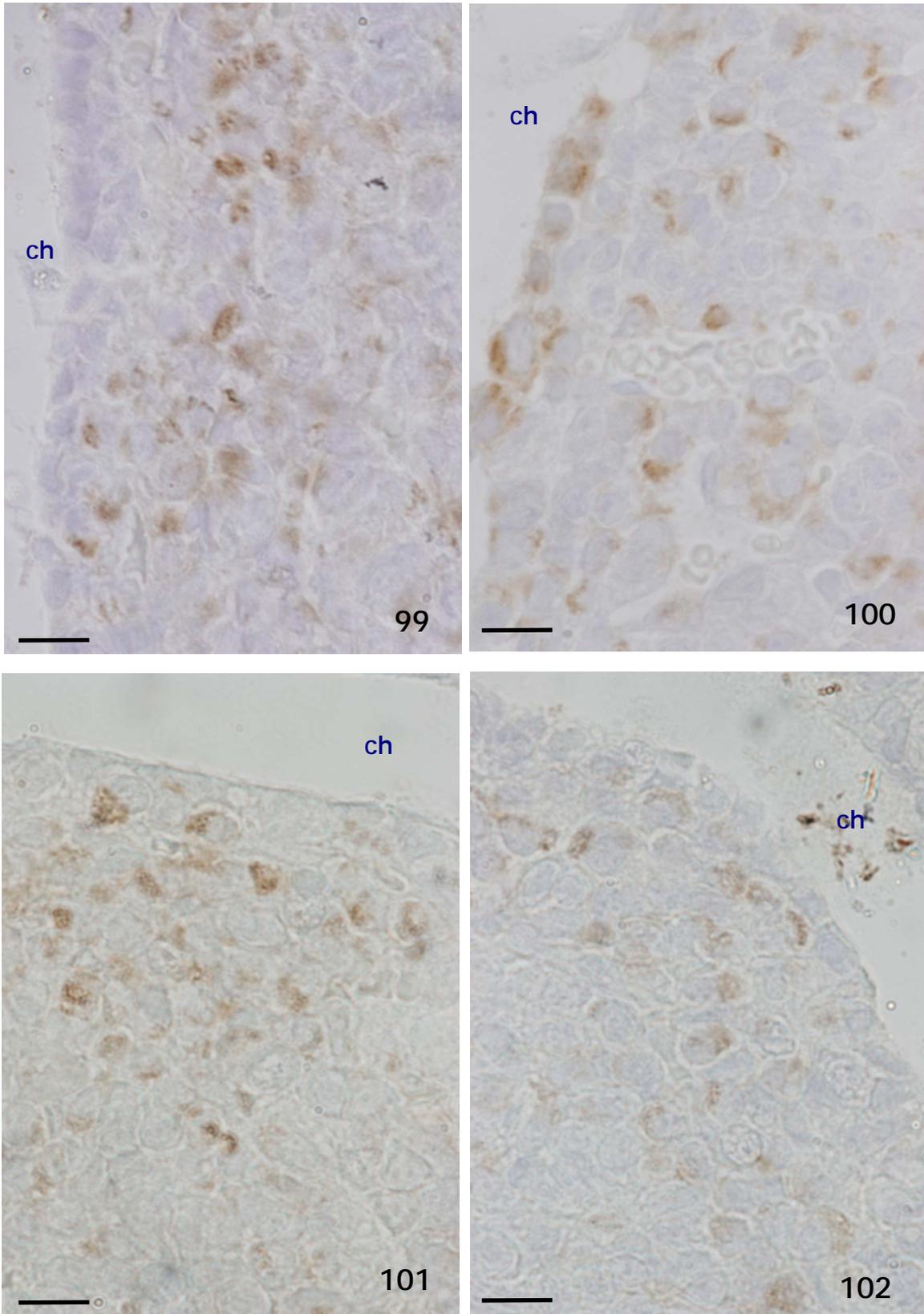
Figura 98. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

En las hembras wild type, las células positivas presentaron depósitos citoplásmicos irregulares que ocupaban parcialmente la superficie del mismo.

Se disponían próximas a vasos sanguíneos formando cordones o claustrs (figuras 99 y 100). En ocasiones guardaron una íntima relación con la luz de la caverna hipofisaria (Figura 100).

Las células positivas en las hembras knock out, rara vez contactaban con la luz de la caverna y solían aparecer formando cordones lineales discontinuos en relación con vasos sanguíneos (figuras 101 y 102).

En general la reacción citoplásmica se disponía hacia un polo de la célula y su intensidad de coloración era menor que en las hembras wild type.



Figuras 99 a 102. Micrografías que muestran las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 99 y 100**) y knock out (**figuras 101 y 102**).
ch: caverna hipofisaria
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región central medial de la hipófisis de hembras wild type.

Como se aprecia en las figuras 105 y 106, correspondientes a hembras wild type y knock out respectivamente, las células positivas a prolactina de la región central medial de la hipófisis aparecían dispersas por toda la región.

Tras su cuantificación, en las hembras wild type las células positivas a prolactina representaban el $33.77 \pm 2.67\%$ de las células de esta región, con una densidad numérica de 0.999 ± 0.11 (figuras 103 y 104).

Ambos parámetros fueron significativamente menores en las hembras knock out con respecto a las hembras wild type ($p < 0.001$).

Las hembras knock out presentaron un porcentaje medio de 23.07 ± 0.66 y una densidad numérica de 0.762 ± 0.03 (figuras 103 y 104).

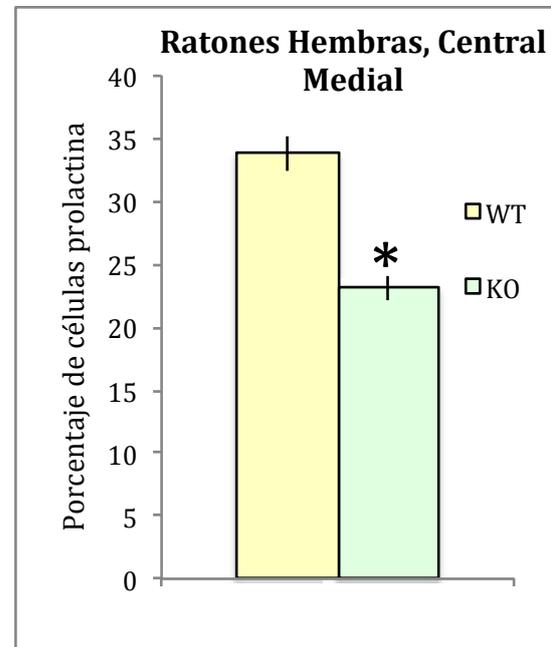


Figura 103. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

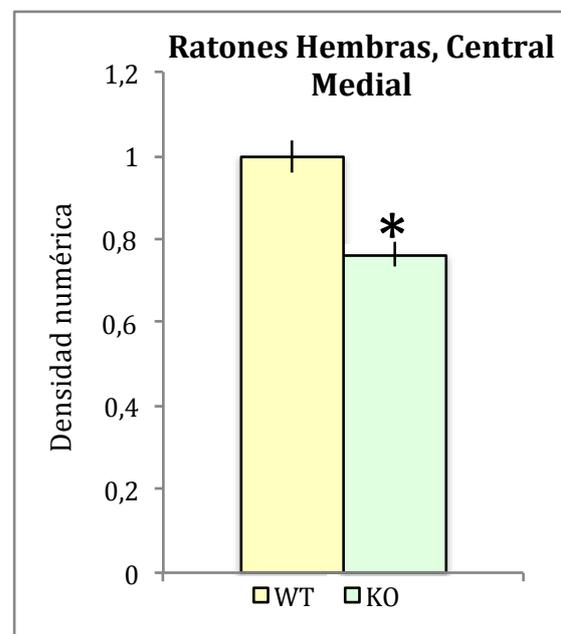
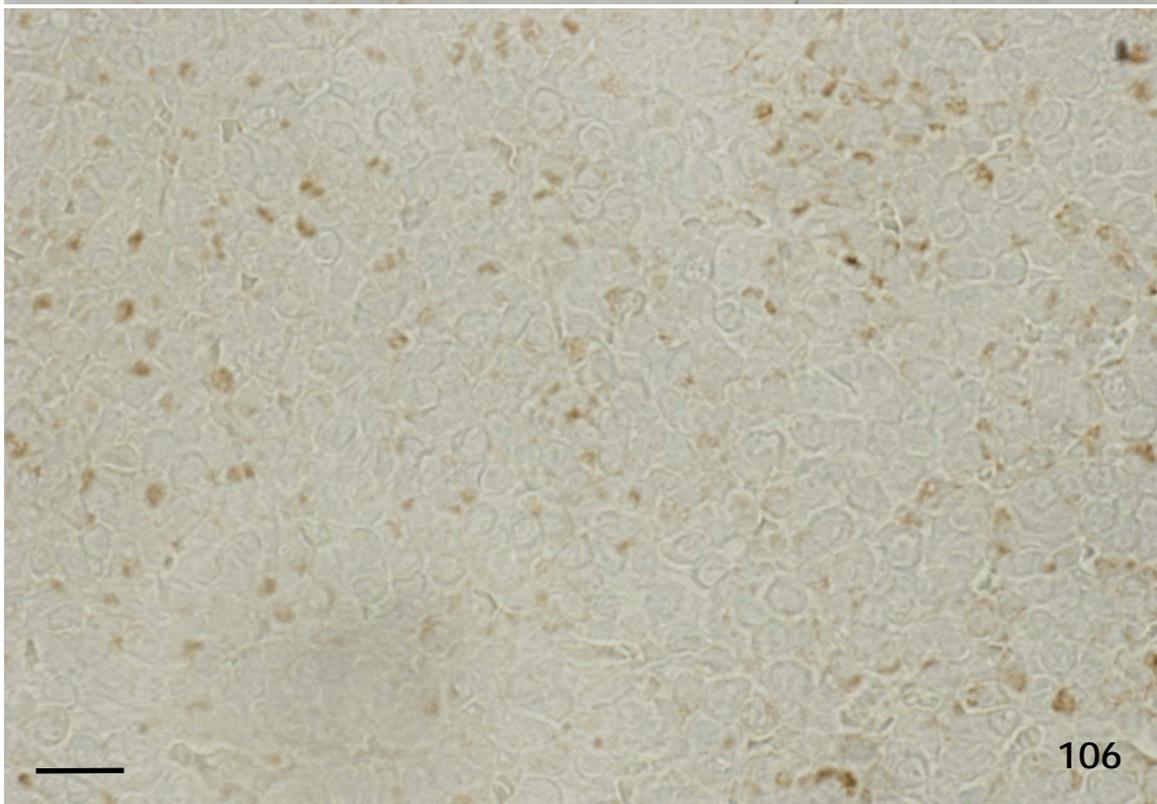
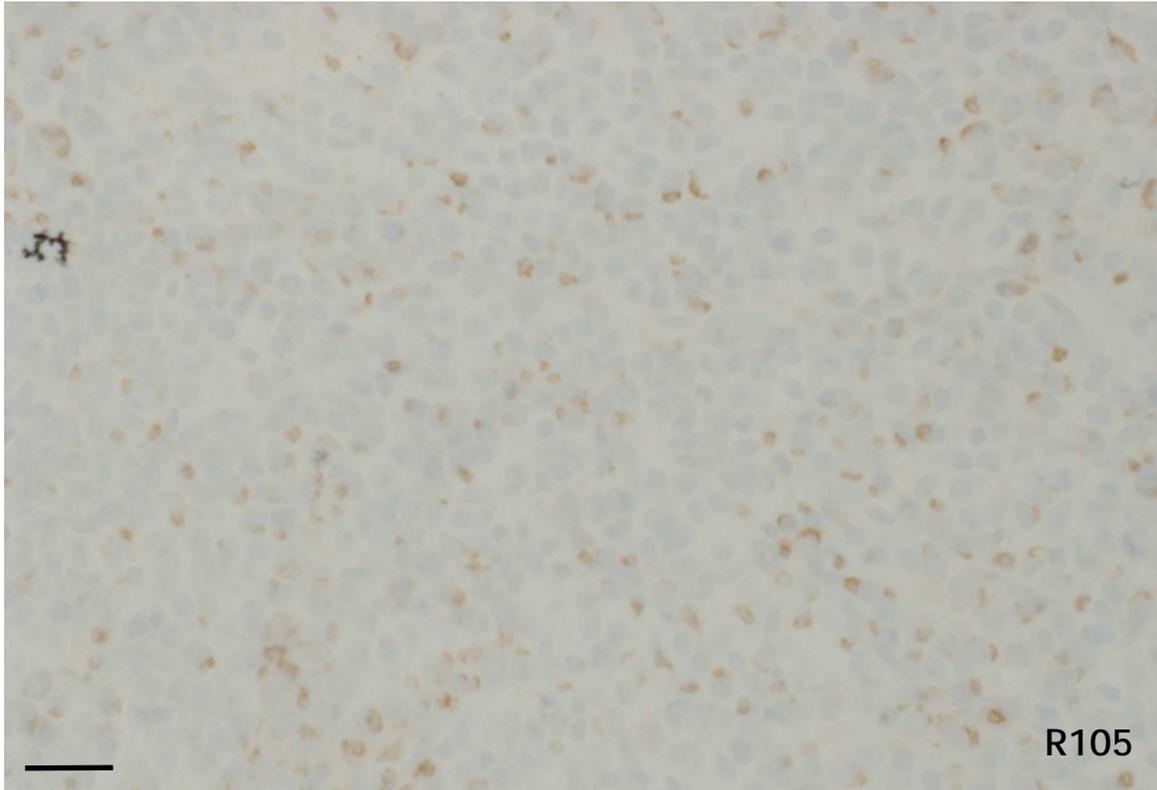


Figura 104. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región entral medial de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$



Figuras 105 y 106. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis de hembras wild type (**figura 105**) y knock out (**figura 106**).

barra en figuras: 25 μ m

Las áreas de las células positivas a prolactina de esta región de la hipófisis fueron difíciles de medir debido a que por lo general eran células irregulares y, en muchas ocasiones, se observaban fragmentos citoplásmicos positivos y no células enteras (figuras 108 a 111). Cuando las células eran poligonales o redondeadas su delimitación fue más sencilla, siendo estas las células que se usaron mayoritariamente para hacer los cálculos morfométricos.

Las células de las hembras wild type tenían un área celular media de $55.25 \pm 0.88 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 36.74 y $74.05 \mu\text{m}^2$.

En las hembras knock out, la variabilidad de tamaño fue muy grande, oscilando entre 26.45 y $83.17 \mu\text{m}^2$, con un área celular media de $46.32 \pm 1.41 \mu\text{m}^2$ (figura 107).

El área nuclear media en las hembras wild type fue de $19.01 \pm 0.43 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 11.02 y $27.02 \mu\text{m}^2$.

Las células de prolactina en las hembras knock out presentaron un núcleo significativamente ($p < 0.001$) más pequeño que el de las wild type, con un área nuclear media de $14.01 \pm 0.52 \mu\text{m}^2$, oscilando desde 6.98 hasta $29.59 \mu\text{m}^2$ (figura 107).

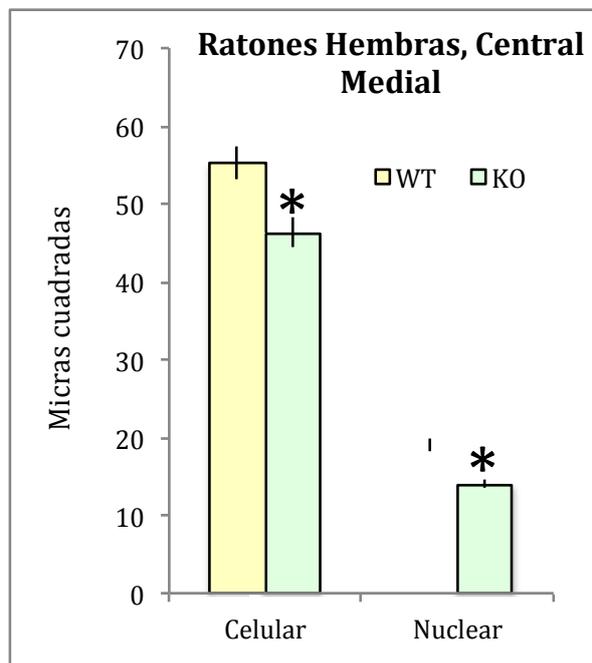
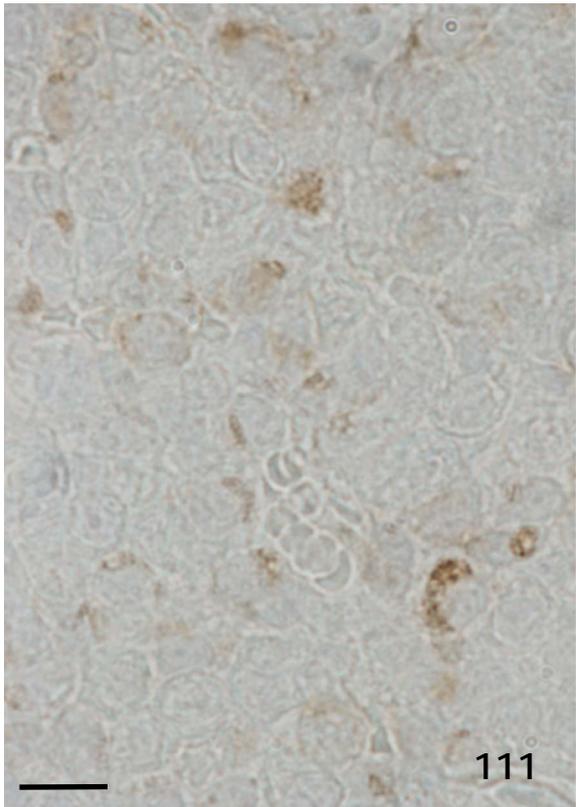
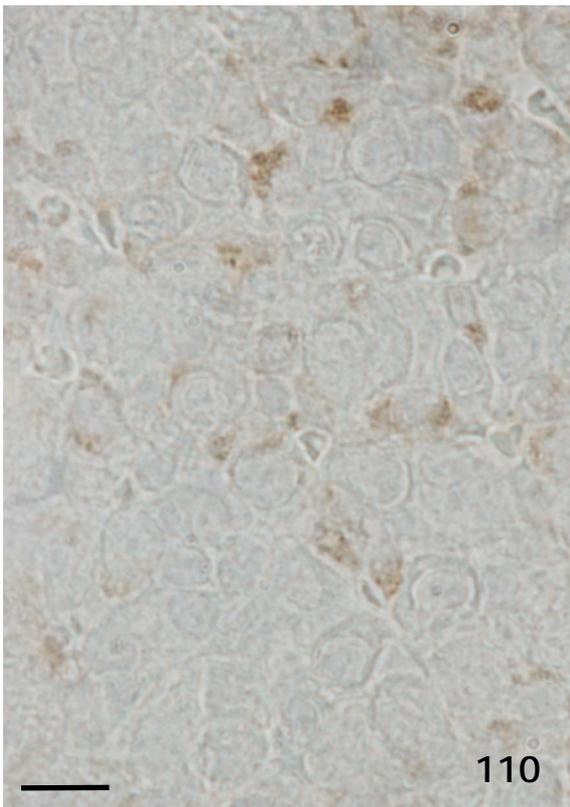
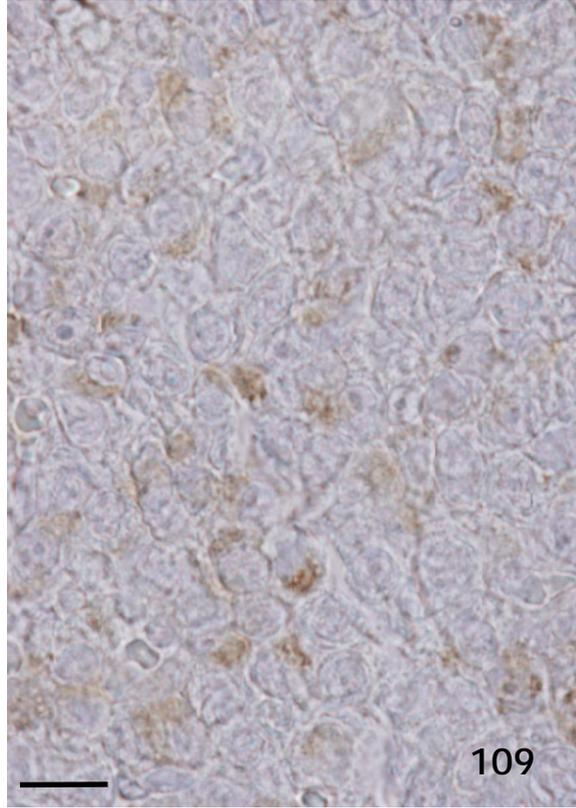
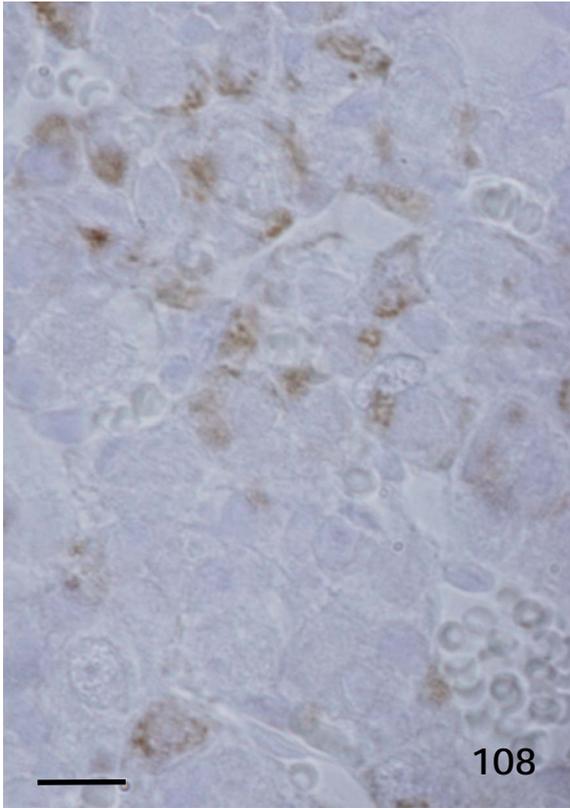


Figura 107. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$



Figuras 108 a 111. Micrografías que muestran las células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 108 y 109**) y knock out (**figuras 110 y 111**).
barra en figuras: 10 μ m

Células de prolactina en la región central lateral de la hipófisis de hembras wild type.

Como se aprecia en las figuras 114 y 115 (wild type y knock out, respectivamente) la disposición de las células positivas a prolactina en la región central lateral fue muy dispersa, las células estaban separadas unas de otras y una vez cuantificadas no se apreciaron diferencias significativas entre los dos grupos de animales estudiados (figuras 112 y 113).

Los grupos celulares ventrales que se observan en la figura 115 pertenecen a la región ventral lateral.

El porcentaje medio en las hembras wild type fue de 32.66 ± 1.69 y la densidad numérica de 1.022 ± 0.07 .

En las hembras knock out fueron de 31.56 ± 1.05 y 1.034 ± 0.02 , respectivamente.

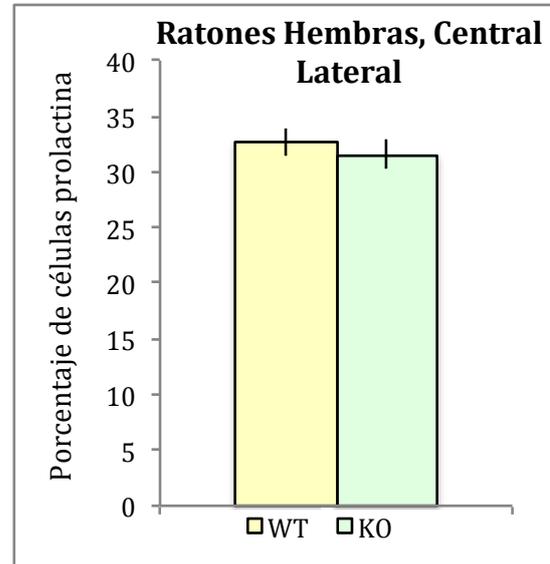


Figura 112. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out.

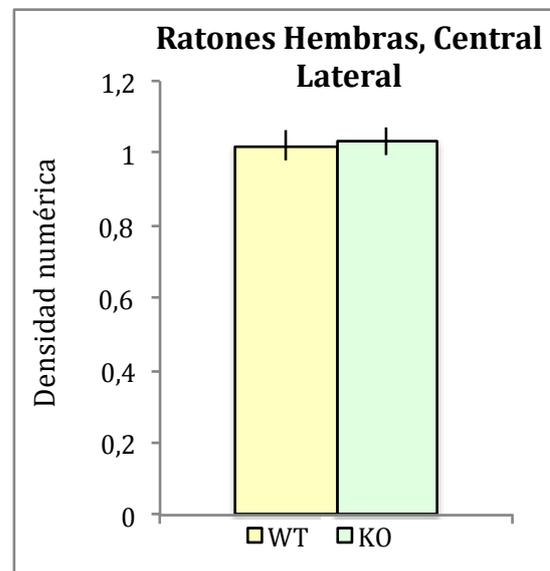
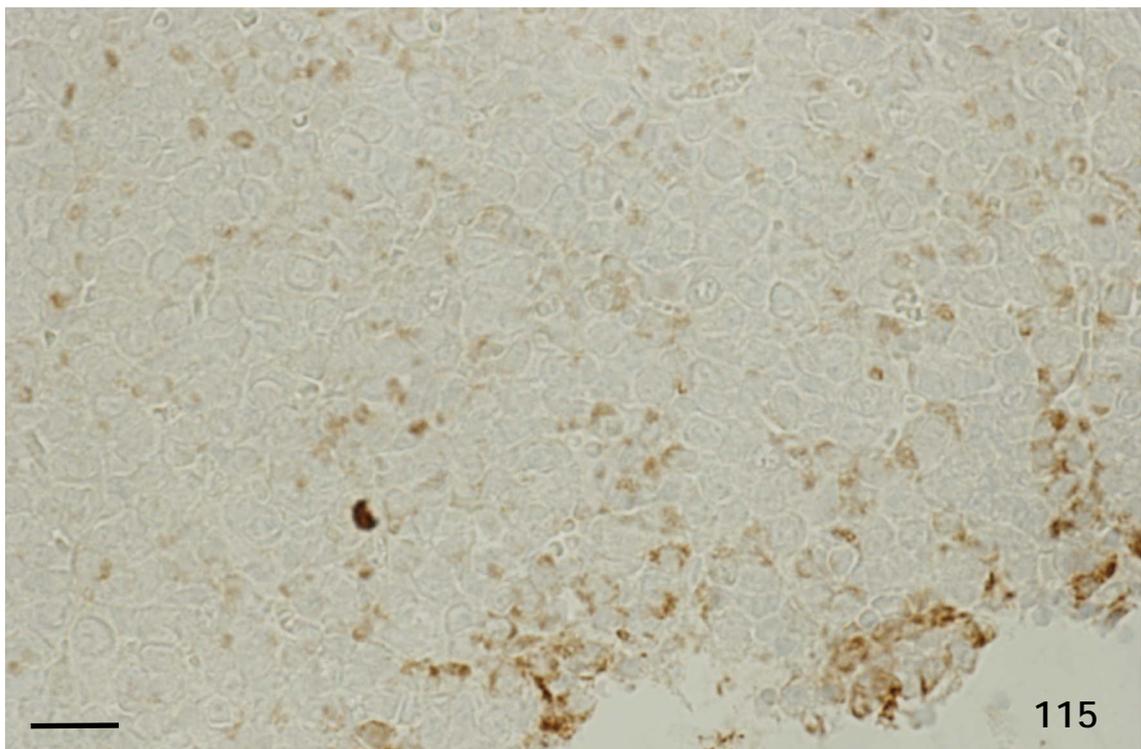
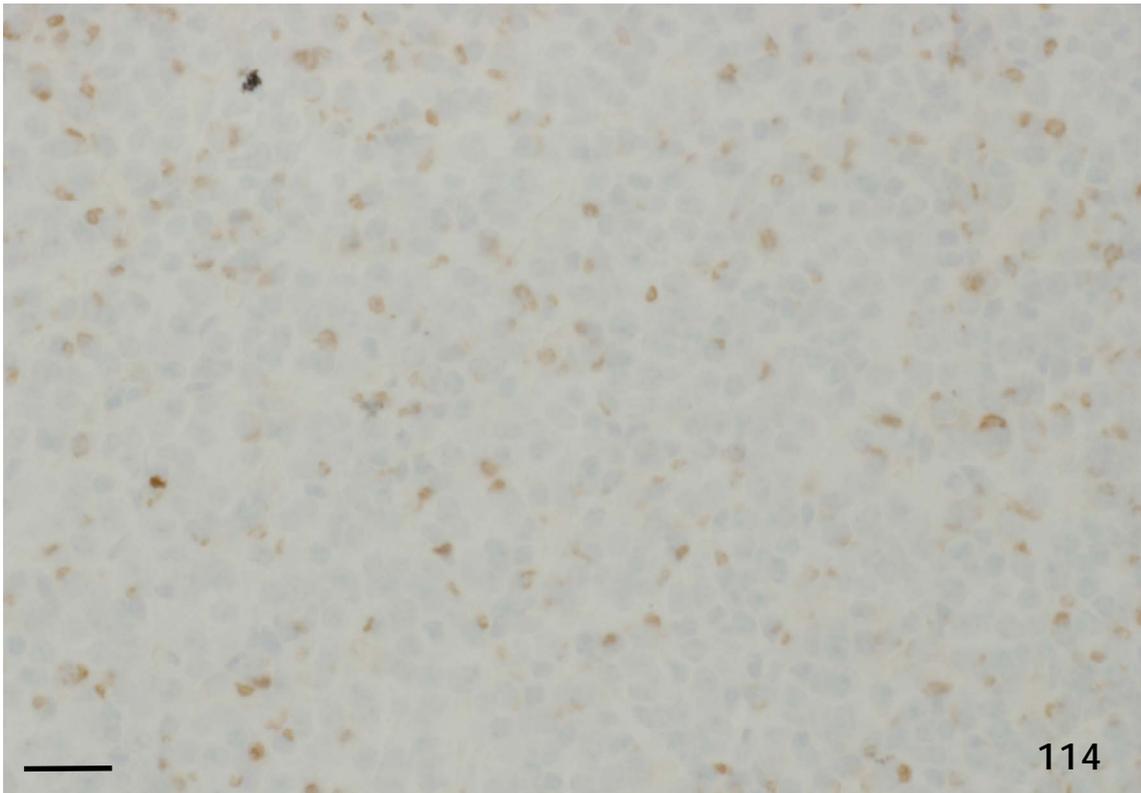


Figura 113. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región ventral medial tuberal de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 114 y 115. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis de hembras wild type (**figura 114**) y knock out (**figura 115**).
barra en figuras: 25 μ m

Las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región central lateral se asemejan mucho a las de las observadas en la región central medial, también eran células irregulares y en muchas ocasiones se observaban fragmentos citoplásmicos y no células enteras (figuras 117 a 120).

A diferencia de lo que ocurría al analizar el porcentaje y la densidad numérica, si se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) al estudiar el tamaño celular nuclear (Figura 116).

Las hembras wild type presentaron un área celular media de $50.32 \pm 0.67 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 38.86 y $63.80 \mu\text{m}^2$; mientras que en las knock out el área celular media fue de $38.41 \pm 0.91 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 21.51 y $55.27 \mu\text{m}^2$.

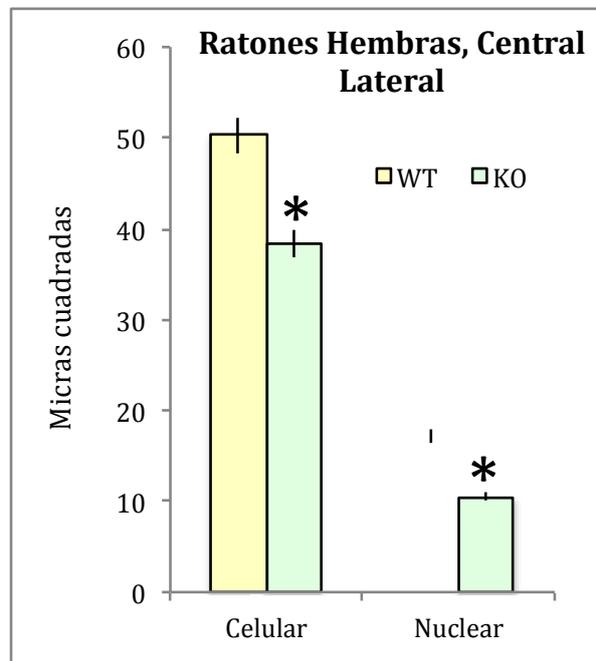
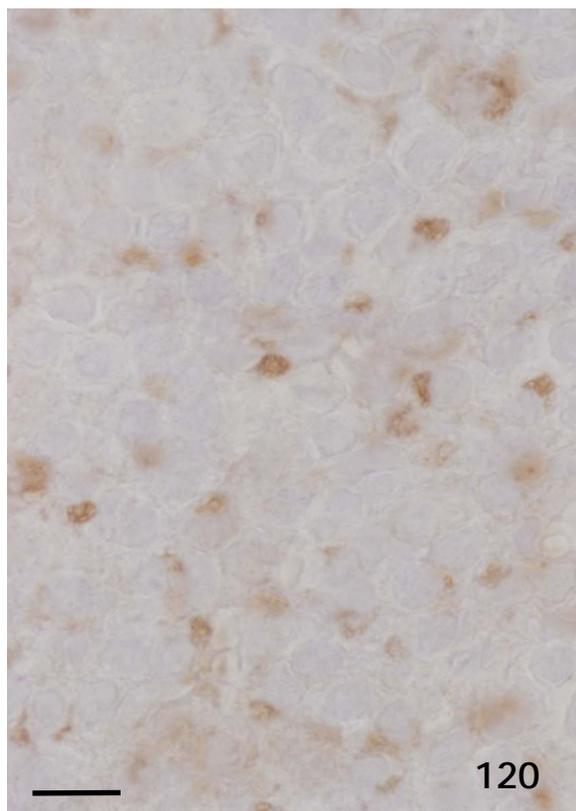
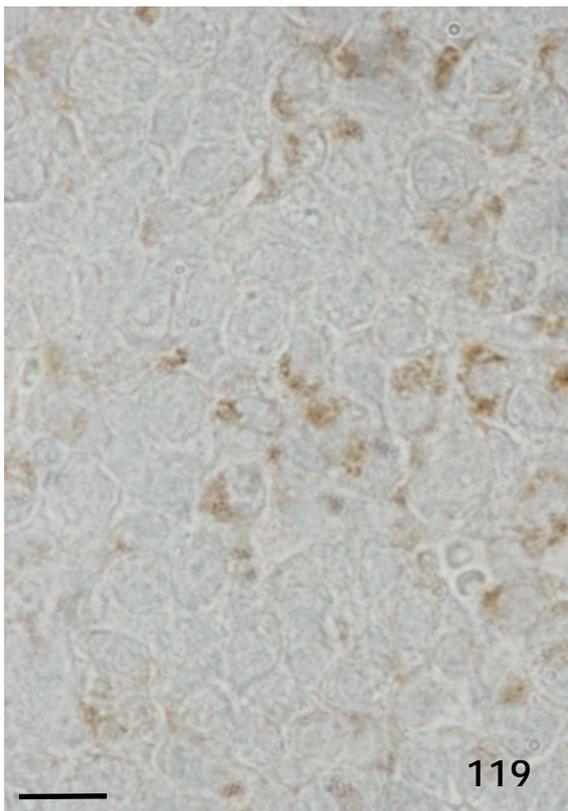
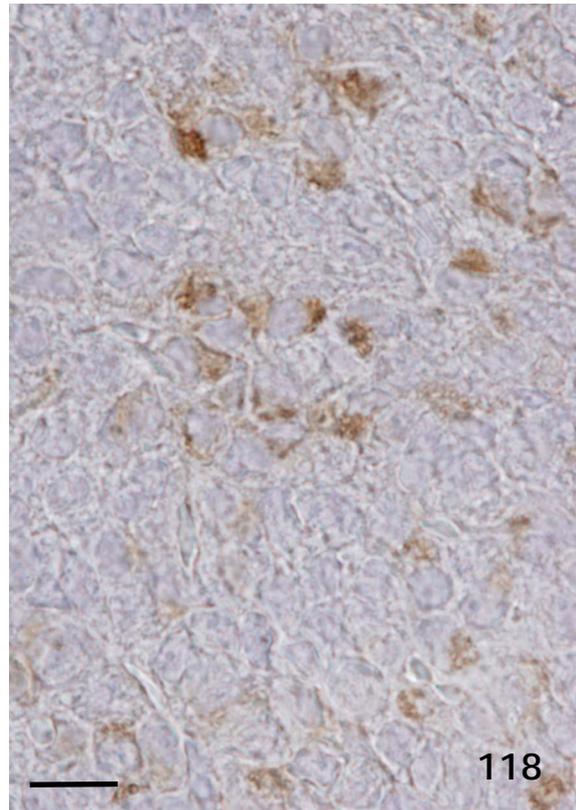
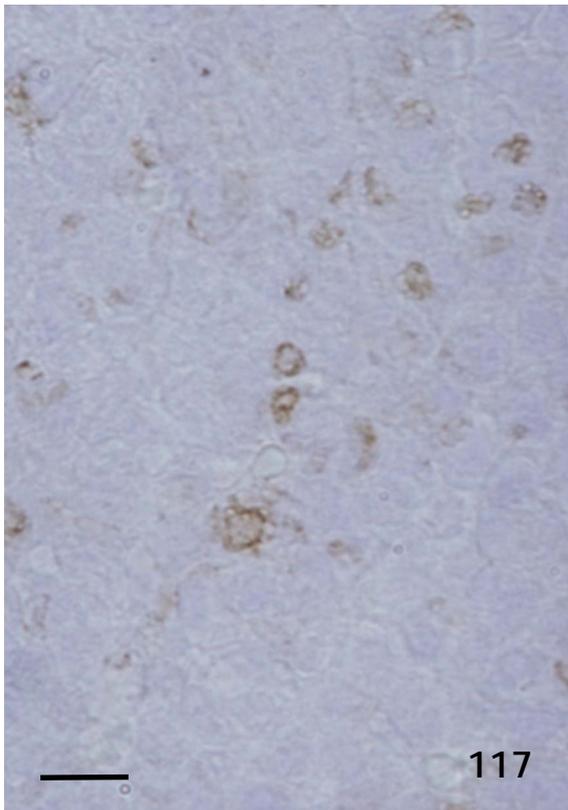


Figura 116. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$



Figuras 117 a 120. Micrografías panorámicas que muestran las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de hembras wild type (**figuras 117 y 118**) y knock out (**figuras 119 y 120**).
barra en figuras: 10 μ m

Análisis Morfológico de las Células de Prolactina.

Células de prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de machos.

La región dorsal tuberal de la hipófisis de los ratones machos, wild type y knock out, presenta células de prolactina agrupadas principalmente en el punto de confluencia de esta región con la región dorsal (figuras 123 y 124).

Prácticamente no se encontraron células positivas que contactaran con la luz de la caverna hipofisaria (ch en figuras 123 y 124).

Las células de esta región fueron más reactivas en los animales wild type (figura 123) que en los knock out (flecha en figura 124).

El porcentaje de células de la región dorsal tuberal positivas a prolactina en los machos wild type fue del $45.30 \pm 3.34\%$ (figura 121) y su densidad numérica fue de 1.033 ± 0.02 (figura 122).

Como se aprecia en dichas figuras, tanto el porcentaje, 31.58 ± 2.20 como la densidad numérica 0.804 ± 0.05 , fueron significativamente menores en los ratones machos knock out ($p < 0.005$).

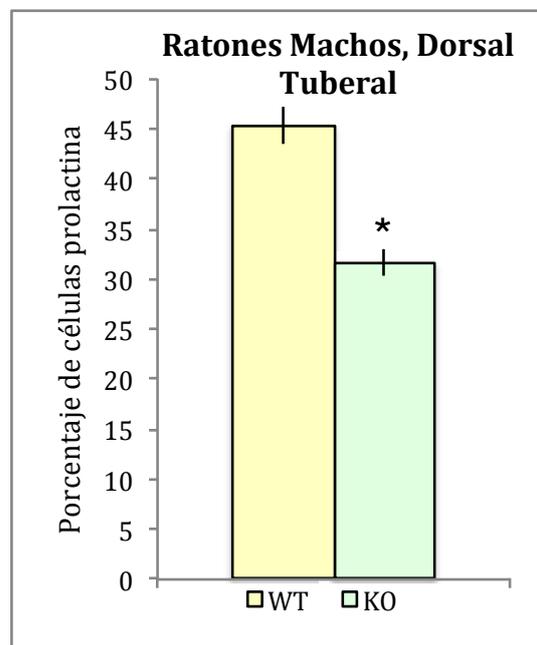


Figura 121. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.005$

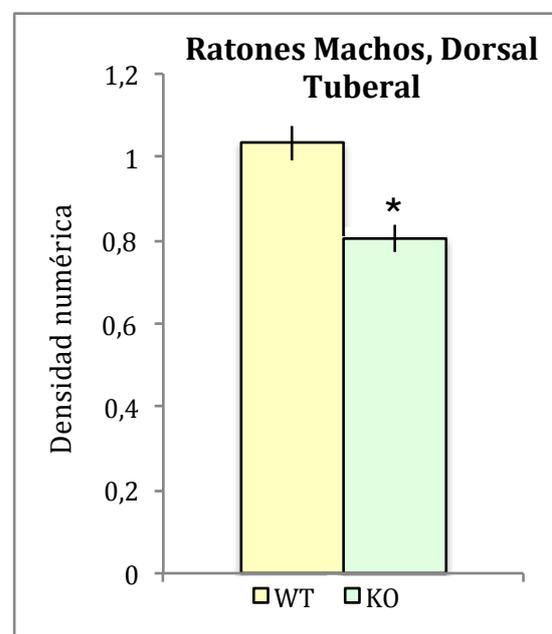
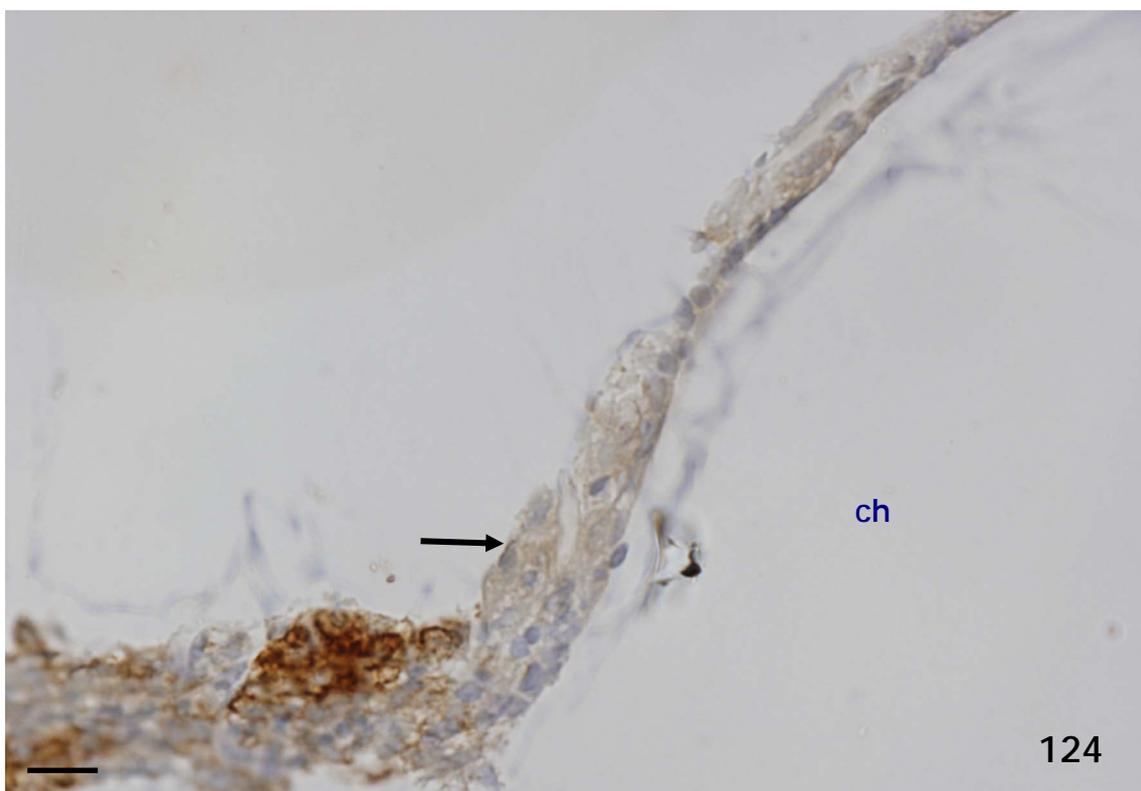
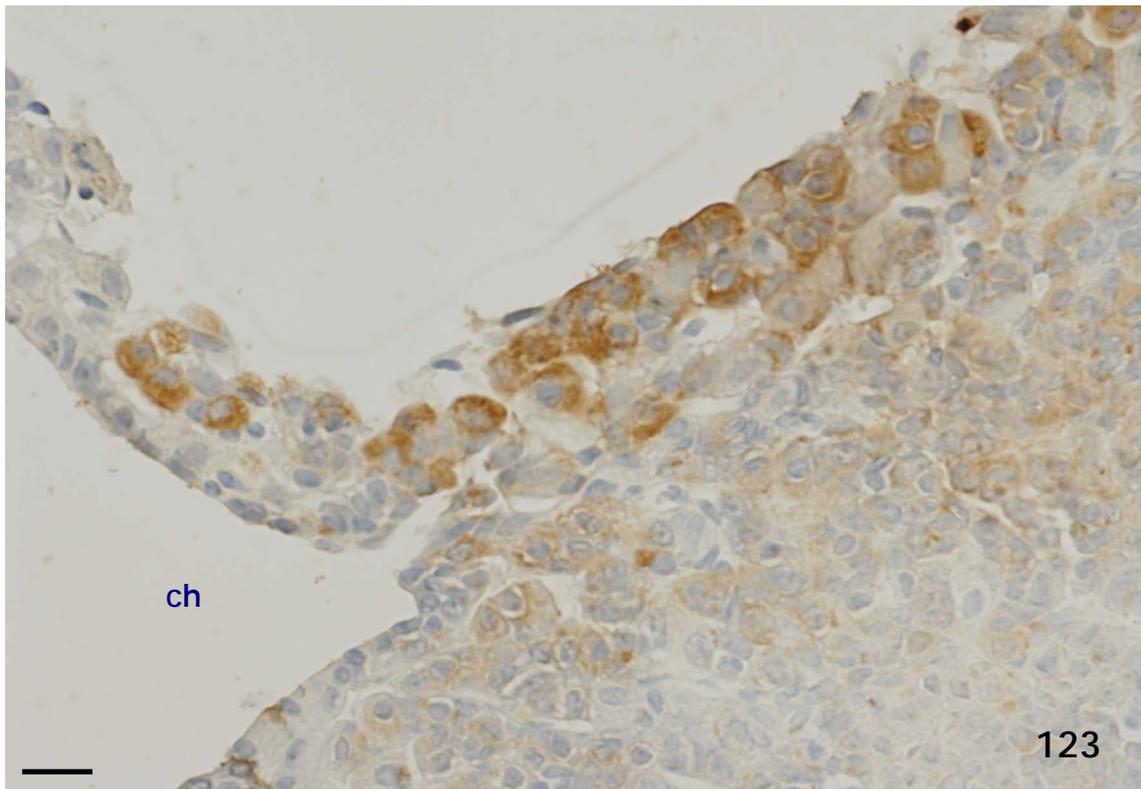


Figura 122. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.005$



Figuras 123 a 124. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de machos wild type (**figura 123**) y knock out (**figura 124**).

ch: caverna hipofisaria

barra: 25 μ m

Las células positivas a prolactina de esta región en los ratones wild type eran ovaladas o redondeadas con un citoplasma bien reactivo que dejaba un halo no reactivo yuxtenuclear, área negativa del aparato de Golgi.

En los machos knock out, la mayoría de las células aparecieron como células veladas escasamente reactivas. Junto a ellas, en la intersección con la región dorsal se observaron células bien teñidas y agrupadas.

Los animales wild type presentaron un área celular significativamente ($p < 0.001$) mayor en los machos wild type $61.14 \pm 1.09 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 37.29 y $85.56 \mu\text{m}^2$; que la observada en los machos knock out $44.46 \pm 1.36 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 29.55 y $84.86 \mu\text{m}^2$.

En torno al 24% del área celular está ocupada por un núcleo redondeado y de disposición central.

En los machos wild type, el área nuclear media fue de $14.54 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor ($p < 0.01$) que la de los machos knock out $13.14 \pm 0.35 \mu\text{m}^2$.

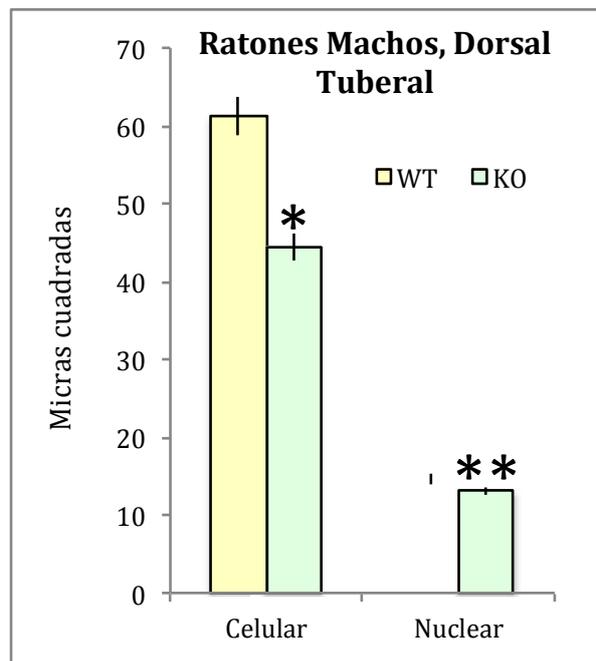
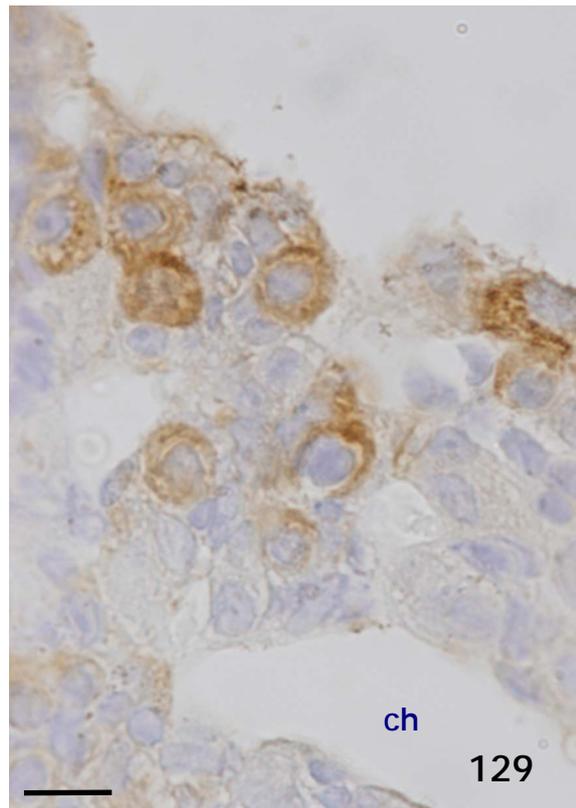
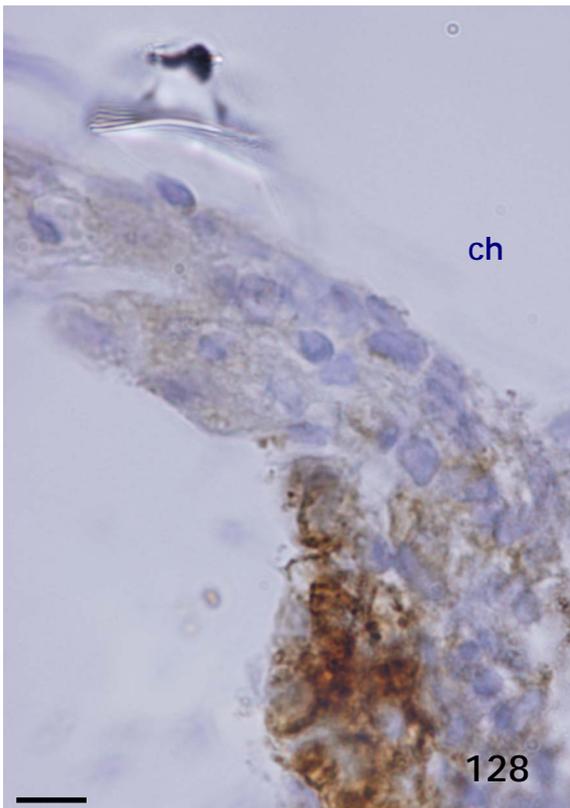
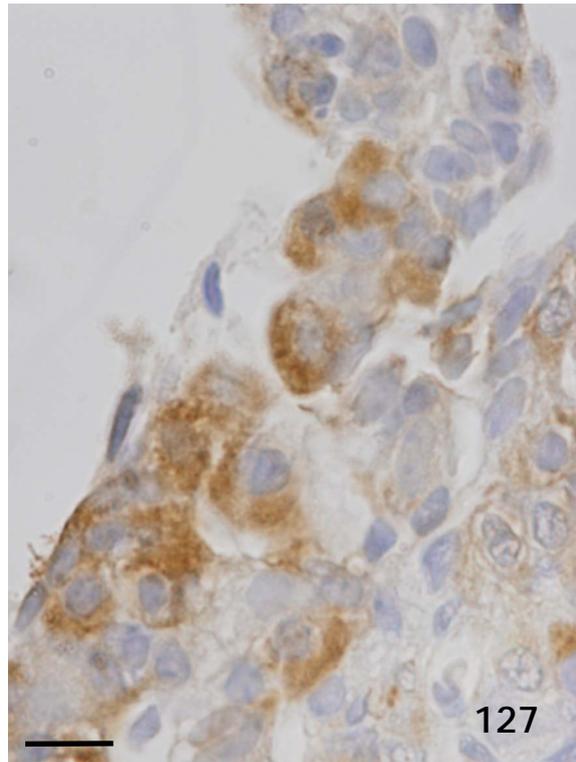
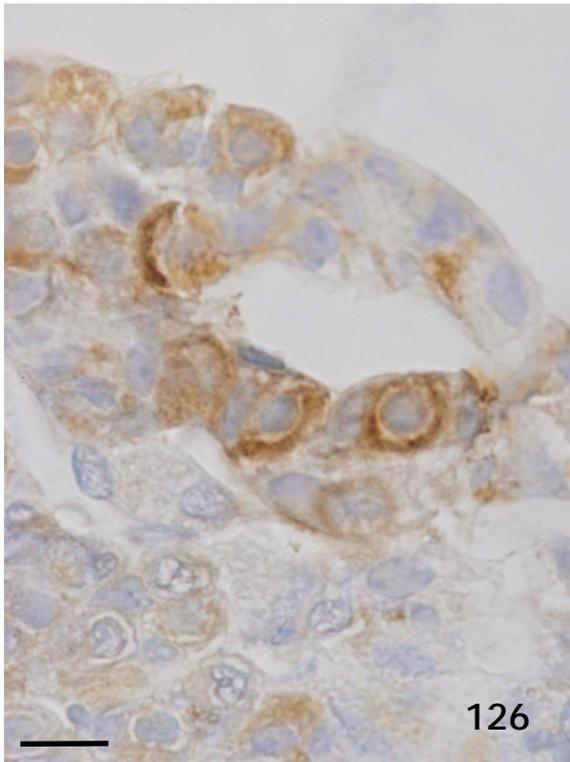


Figura 125. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$



Figuras 126 a 129. Micrografías panorámicas que muestran las características más llamativas de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de machos wild type (**figuras 126 y 127**) y knock out (**figuras 128 y 129**).

ch: caverna hipofisaria

barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región dorsal de la hipófisis de machos.

La región dorsal en los machos está muy poblada de células positivas a prolactina en su zona marginal, disminuyendo considerablemente las células positivas según se interioriza (figuras 132 y 133).

El porcentaje medio (figura 130) de células positivas en los machos wild type fue de 45.46 ± 2.04 , significativamente mayor ($p < 0.01$) que el observado en los machos knock out, 38.20 ± 2.33 .

Hallazgos semejantes se encontraron al analizar la densidad numérica (figura 131) que fue de 1.24 ± 0.04 en los wild type, significativamente mayor ($p < 0.01$) que en los knock out en los que alcanzó valores de 1.033 ± 0.03 .

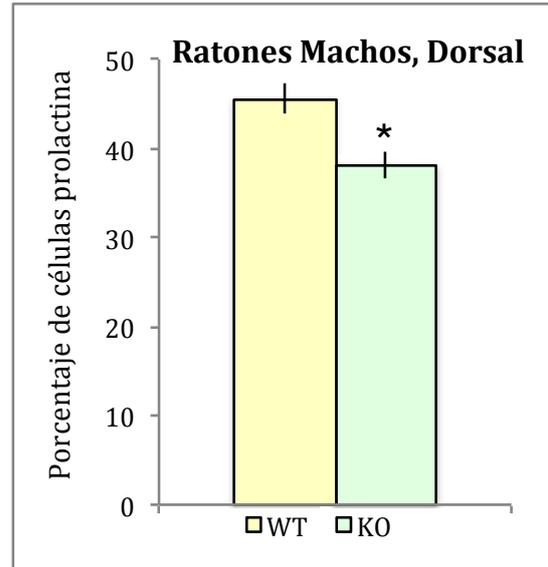


Figura 130. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$

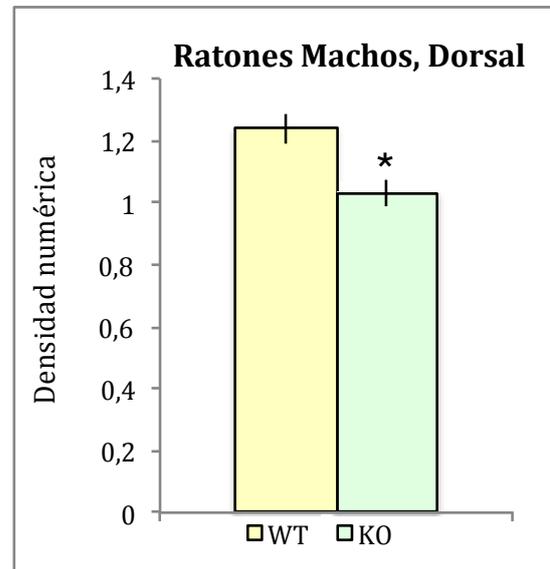
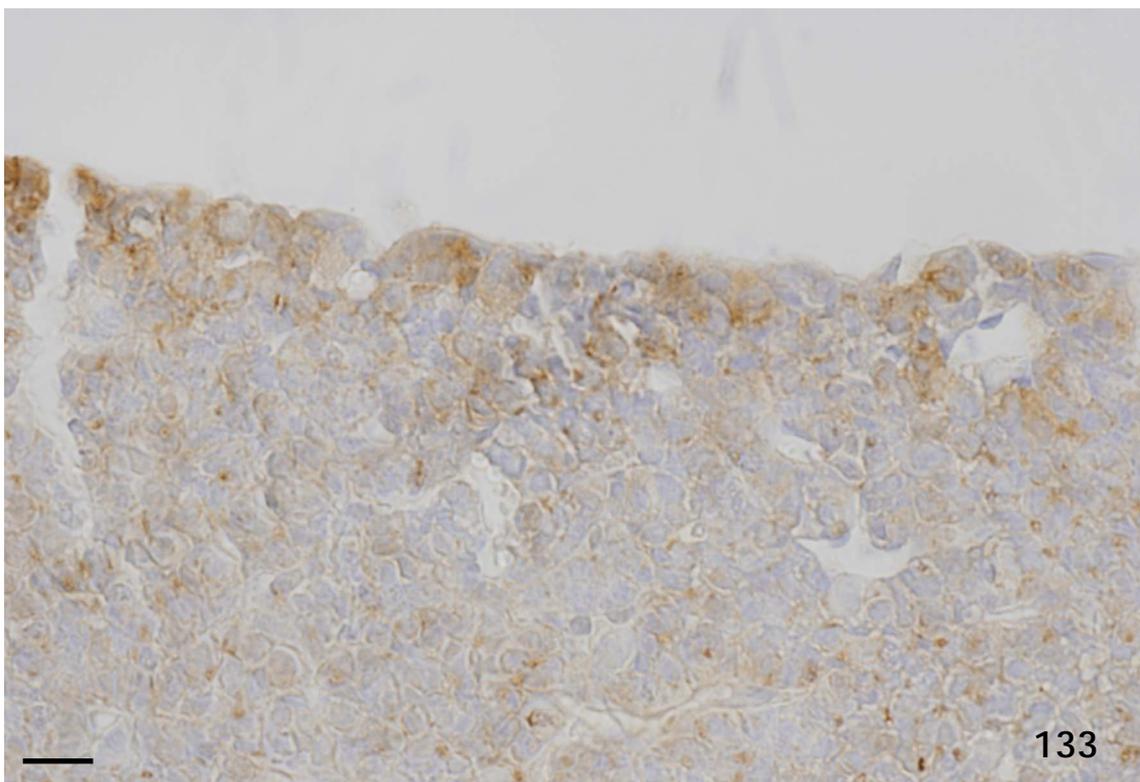
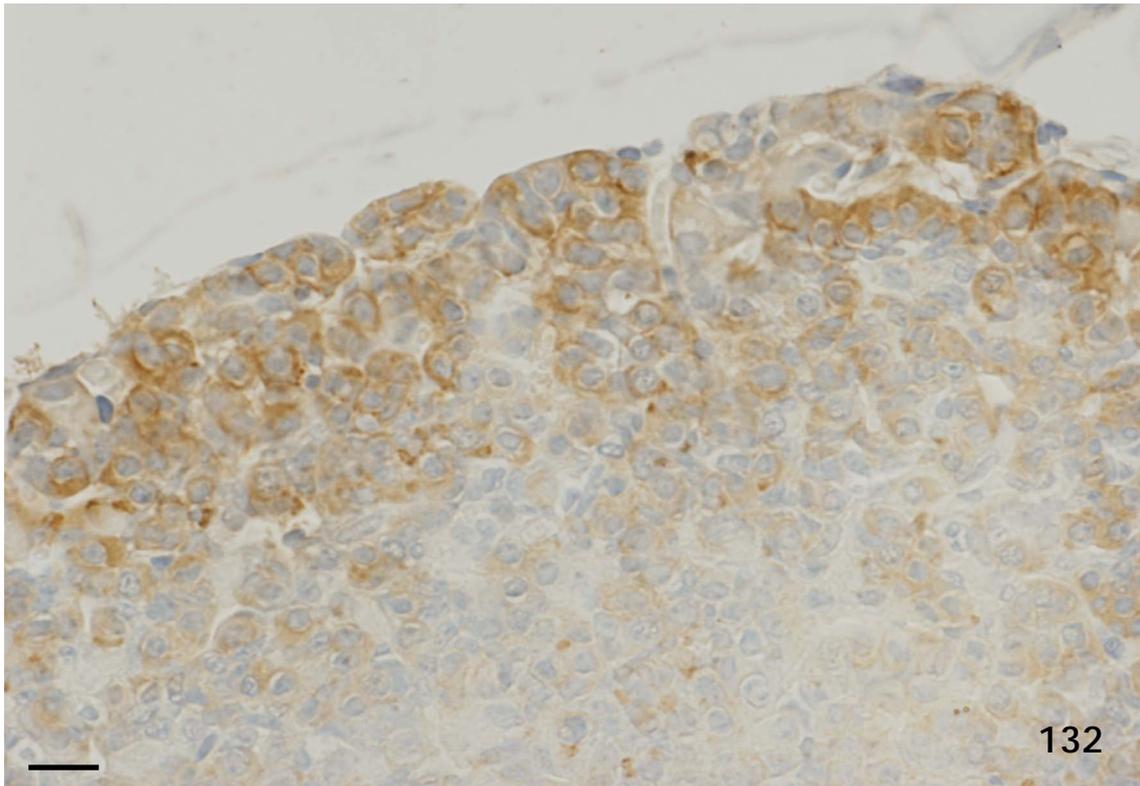


Figura 131. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$



Figuras 132 a 133. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis de machos wild type (**figura 132**) y knock out (**figura 133**).
ch: caverna hipofisaria
barra: 25 μ m

Como se aprecia en las figuras 135 y 136 las células positivas a prolactina en la región dorsal de los machos wild type fueron células redondeadas o poligonales, con un núcleo central y un citoplasma bien teñido, el área negativa del aparato de Golgi era evidente y dispuesta perinuclearmente.

Los machos knock out presentaron células intensamente reactivas, más irregulares en su forma y generalmente con un área golgiana menos manifiesta que en los wild type. Pero junto a ellas aparecían células más pequeñas, mucho menos reactivas (flechas en figuras 137 y 138).

El área celular media en los machos wild type fue de $52.35 \pm 0.62 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 29.59 y $83.09 \mu\text{m}^2$.

Los machos knock out presentaron un área celular significativamente menor ($p < 0.001$), alcanzando un valor medio de $44.73 \pm 1.66 \mu\text{m}^2$ y oscilando entre 24.12 y $100.58 \mu\text{m}^2$.

El área nuclear media en los wild type fue de $13.51 \pm 0.35 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor ($p < 0.001$) que la hallada en los machos knock out, $11.80 \pm 0.35 \mu\text{m}^2$.

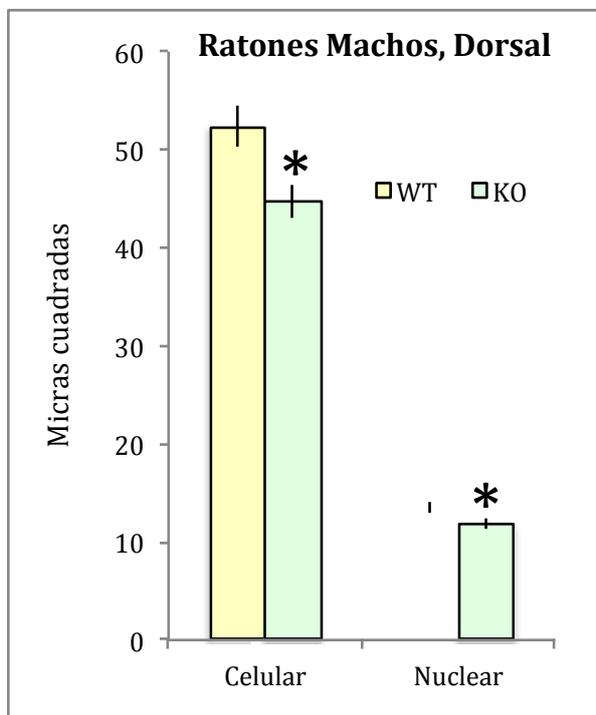
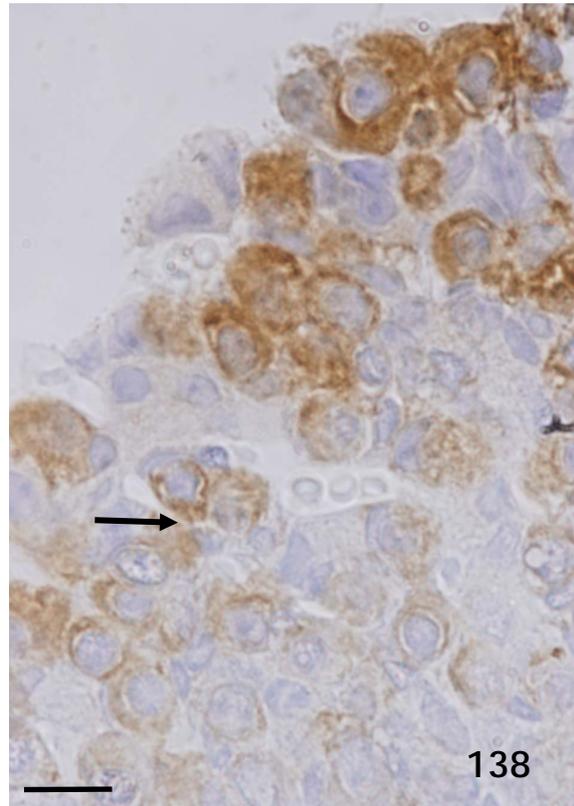
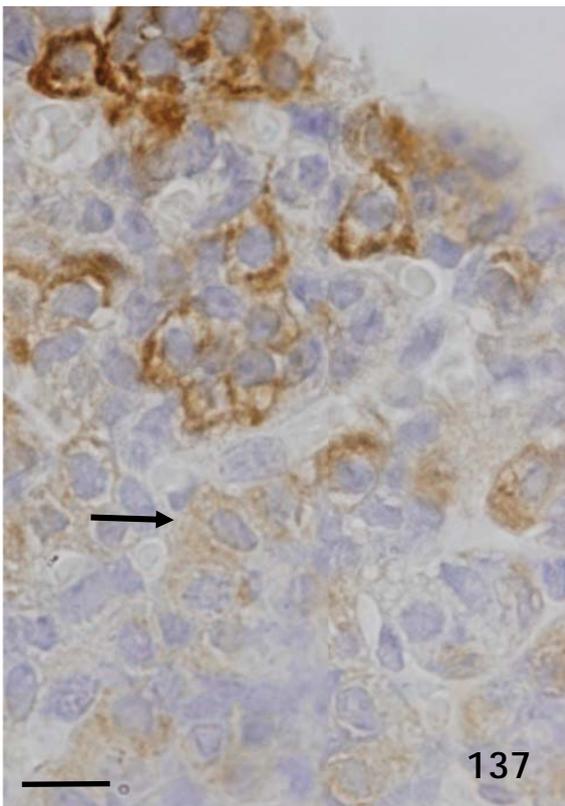
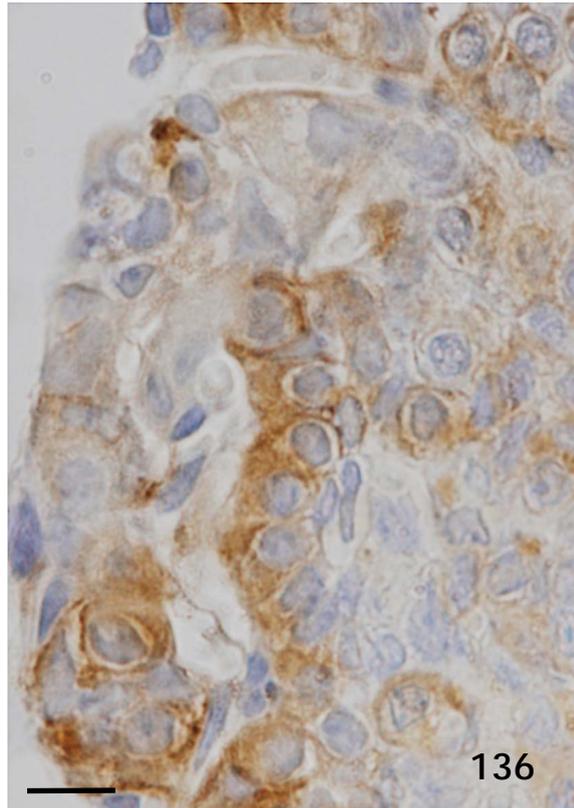
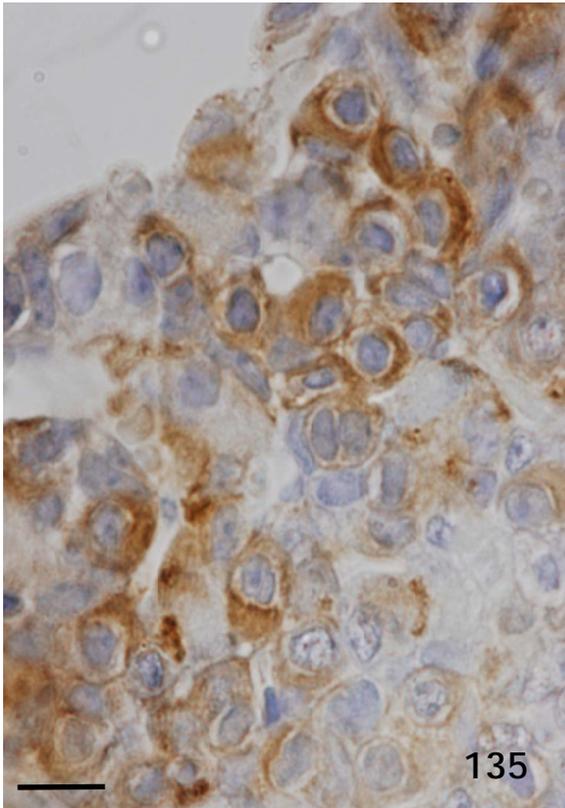


Figura 134. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región dorsal de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$



Figuras 135 a 138. Micrografías panorámicas que muestran las características más llamativas de las células positivas a prolactina en la región dorsal tuberal de la hipófisis de machos wild type (**figuras 135 y 136**) y knock out (**figuras 137 y 138**).
ch: caverna hipofisaria
barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región lateral de la hipófisis de machos.

De forma parecida a lo que acontecía en la región dorsal de la hipófisis, en la región lateral las células positivas a prolactina se agrupan preferentemente en las zonas marginales, sin que en este hallazgo haya diferencias entre los animales wild type (figura 141) y los knock out (figura 142).

Aunque las diferencias observadas en el porcentaje de células positivas (figura 139) y la densidad numérica (figura 140) entre los machos wild type y los knock out eran menores que en otras regiones de la hipófisis, las diferencias fueron significativas ($p < 0.01$).

El porcentaje medio en los machos wild type fue 47.21 ± 1.04 y en los knock out fue 38.91 ± 1.82 .

La densidad numérica en los wild type fue 1.293 ± 0.05 y, en los knock out, 0.963 ± 0.04 .

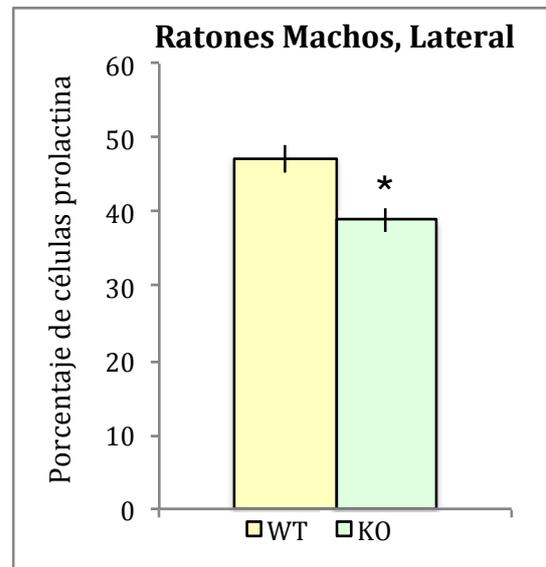


Figura 139. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$

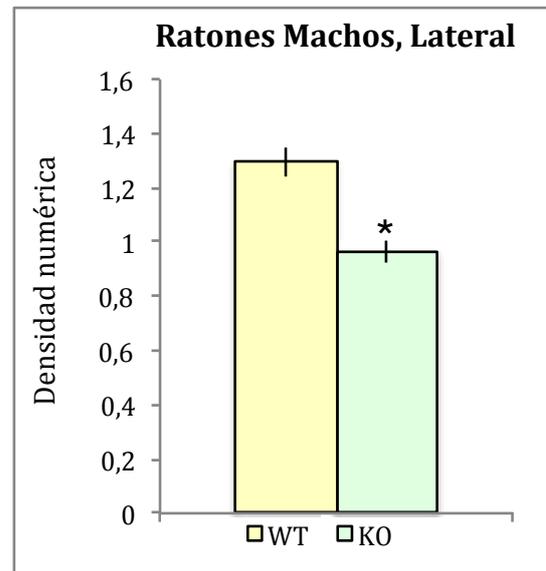
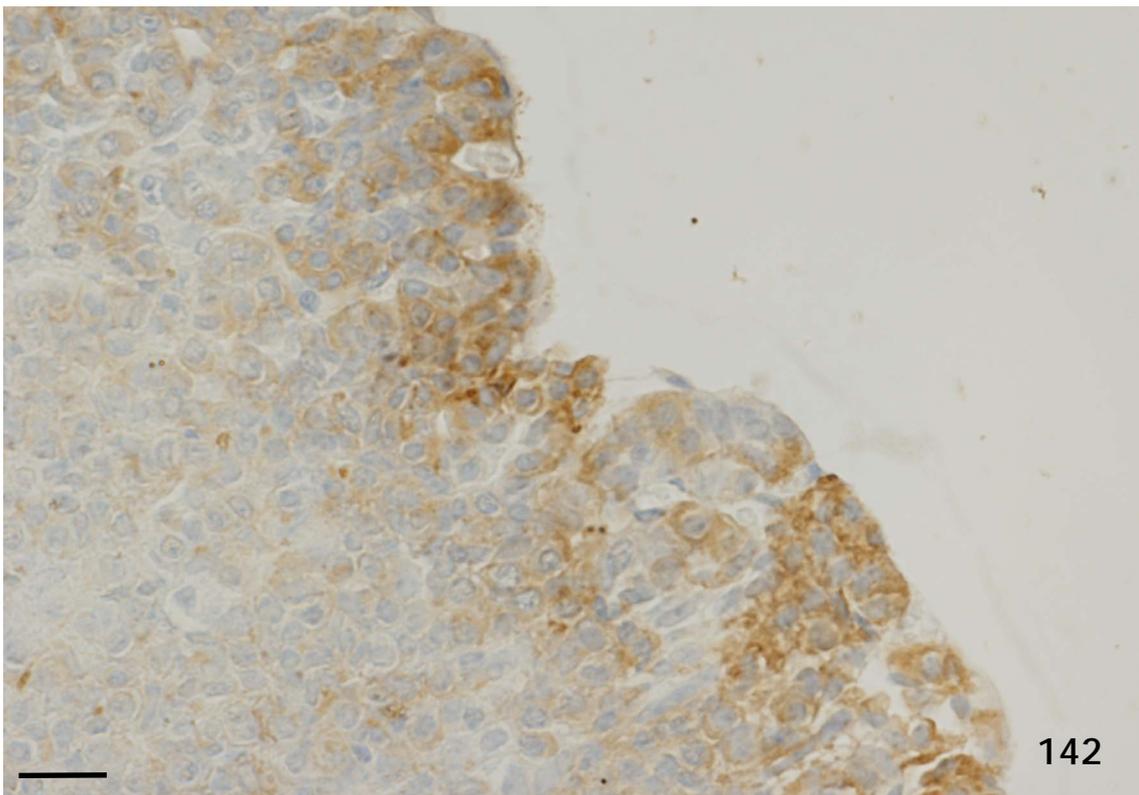
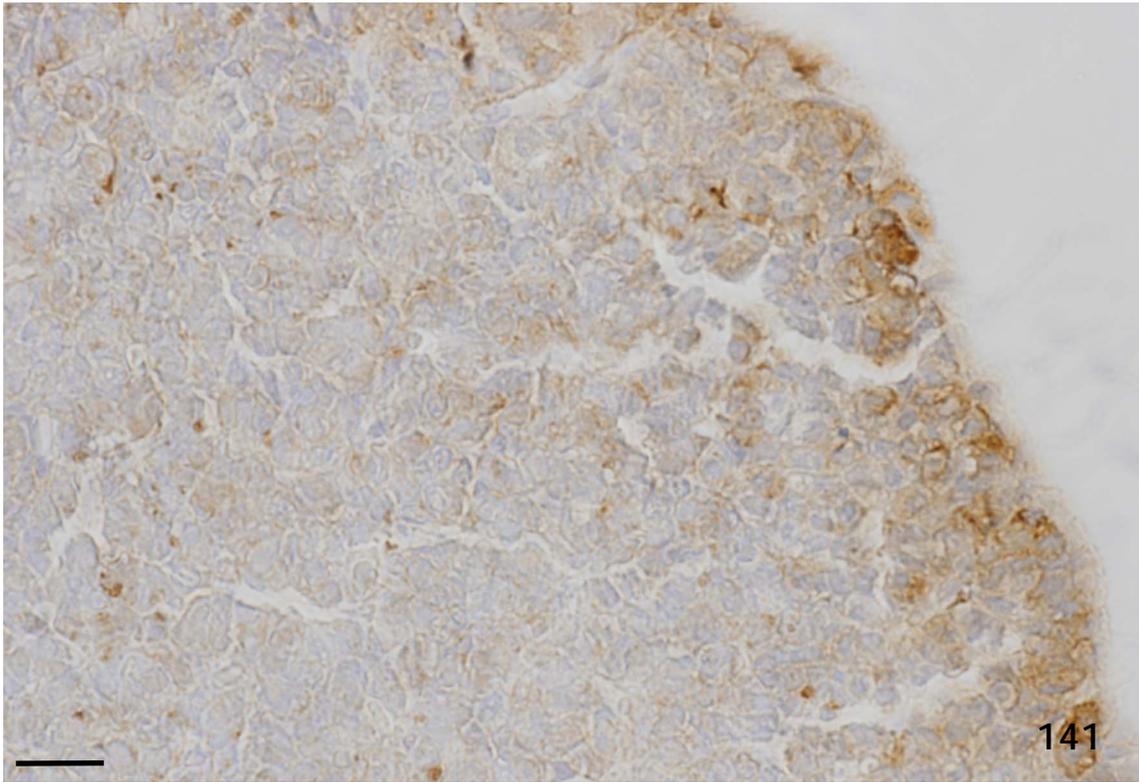


Figura 140. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$



Figuras 141 a 142. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis de machos wild type (**figura 141**) y knock out (**figura 142**). barra: 25 μ m

A diferencia de lo que ocurría en las hembras, la región lateral de la hipófisis de los machos no mostró diferencias significativas en el tamaño del área celular o del área nuclear entre animales wild type y animales knock out (figura 143).

Los machos wild type presentaron un área celular media de $43.12 \pm 0.80 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 30.13 y $69.4 \mu\text{m}^2$.

En torno al 28% de la célula estaba ocupada por el núcleo que presentaba un área nuclear media de $12.03 \pm 0.28 \mu\text{m}^2$.

Estos núcleos eran ovalados y muchas veces presentaban nucleolo (figura 144).

En los machos knock out, el área celular media fue de $43.74 \pm 1.17 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 18.01 y $72.04 \mu\text{m}^2$, de las que el núcleo ocupaba $11.12 \pm 0.31 \mu\text{m}^2$.

En estos animales los núcleos eran redondeados o irregulares y generalmente sin nucleolo.

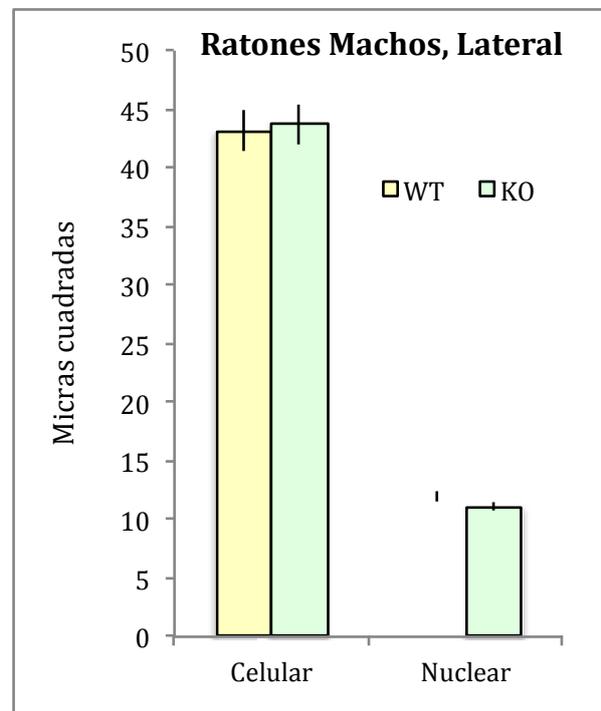
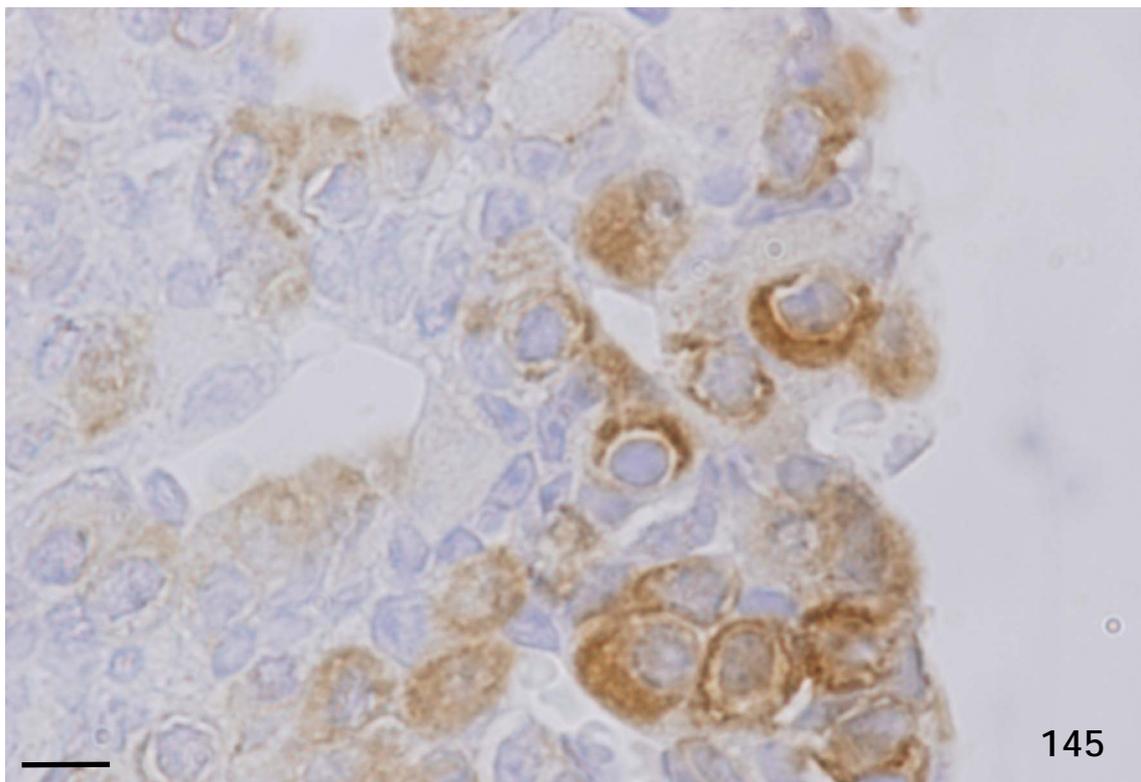
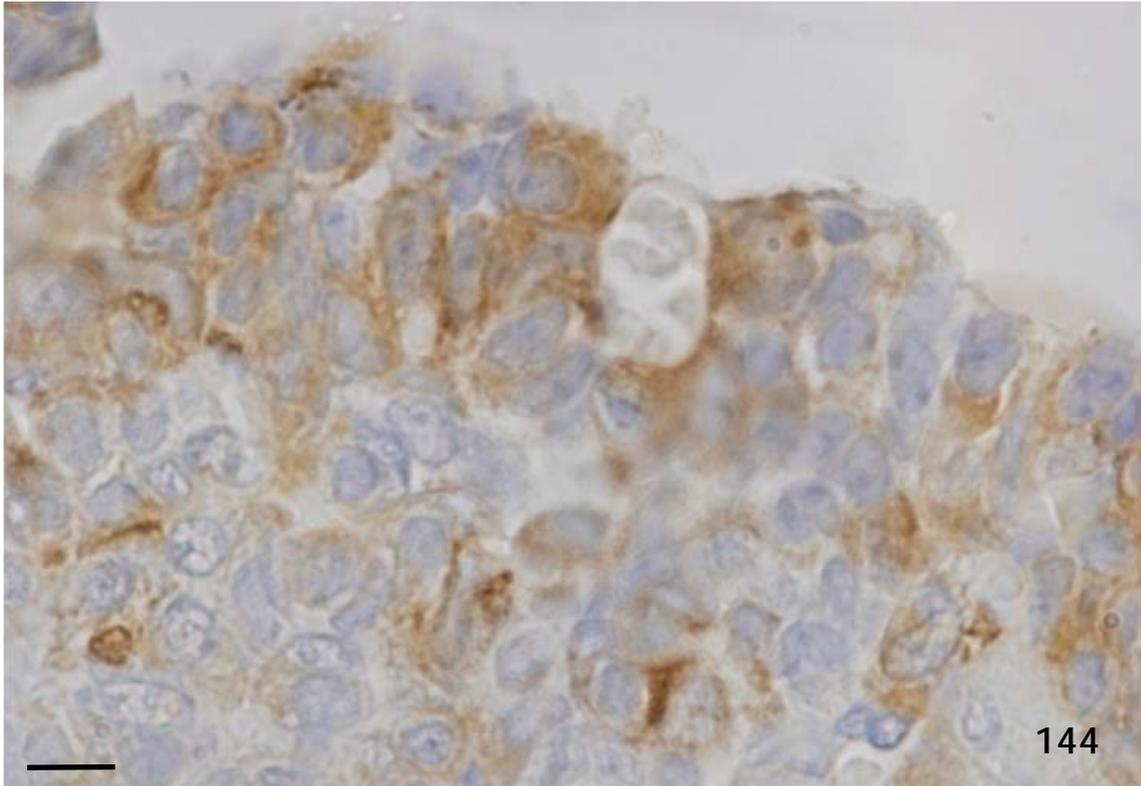


Figura 143. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 144 a 145. Micrografías panorámicas que muestran las características más llamativas de las células positivas a prolactina en la región lateral de la hipófisis de machos wild type (**figura 144**) y knock out (**figura 145**).
ch: caverna hipofisaria
barra: 10 μm

Células de prolactina en la región polar de la hipófisis de machos.

Aunque el porcentaje de células positivas a prolactina (figura 146) y su densidad numérica (figura 147) son parecidos a la observada en las hembras, la distribución de las células en la región polar de la hipófisis de los machos fue muy diferente, con grupo celulares compactos dispuestos sobre todo en las zonas marginales (figuras 148 y 149).

Un animal knock out presentó un quiste hipofisario situado dorsalmente a esta región (asterisco en figura 149). Este quiste no fue positivo a prolactina en su epitelio o su contenido. Tampoco afectó a la morfología celular, al número de células o a su tamaño, por lo que fue incluido en el estudio. Siendo excluido en el estudio de la región central lateral que se veía muy afectada ya que ocupaba casi por entero la misma.

El porcentaje de células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis de los machos wild type fue 56.78 ± 3.13 (figura 146), el mayor de los observados en los machos wild type. Su densidad numérica (figura 147) también fue la más alta, alcanzando un valor medio de 1.412 ± 0.01 .

En los machos wild type, el porcentaje y la densidad numérica observados en la región polar también fueron los más altos de todas las regiones de la hipófisis de los machos, pero fueron significativamente menores ($p < 0.01$) que los observados en los machos wild type, alcanzando valores medios de 46.26 ± 5.37 y 1.183 ± 0.2 , respectivamente.

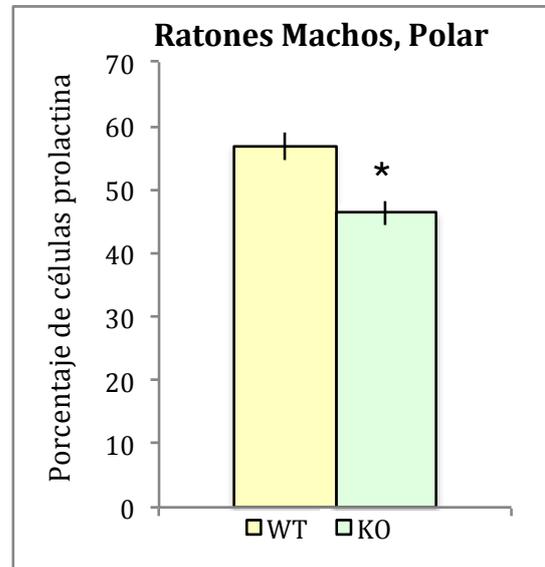


Figura 146. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

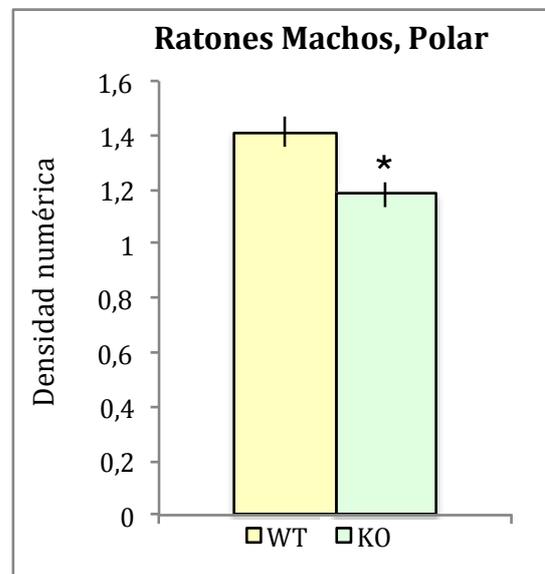
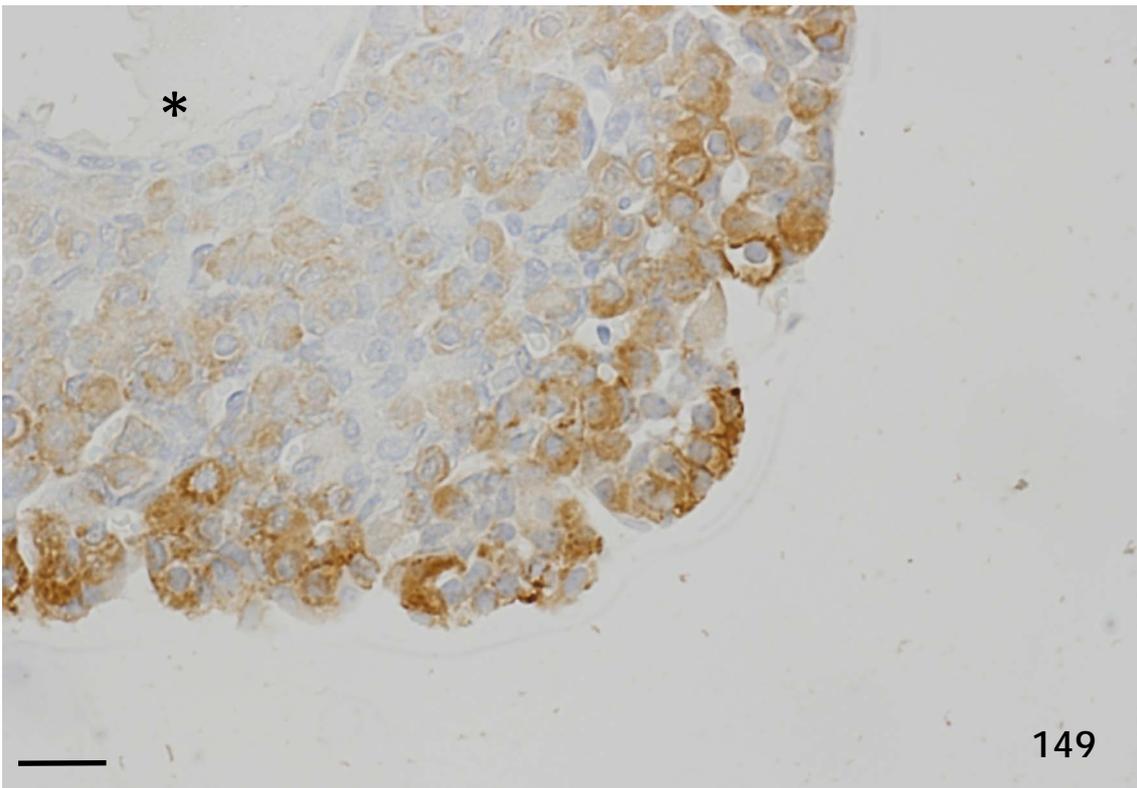
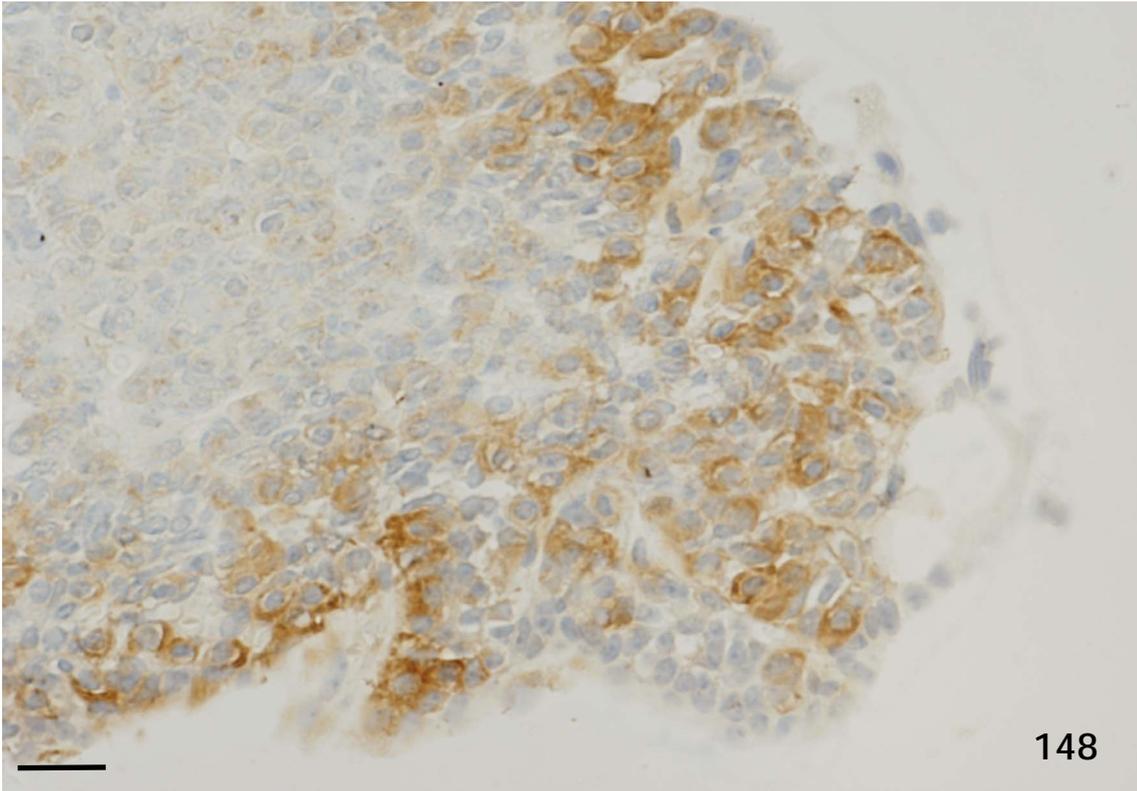


Figura 147. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$



Figuras 148 a 149. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis de machos wild type (**figura 148**) y knock out (**figura 149**). barra: 25 μ m

En los machos wild type, las células positivas a prolactina de esta región presentaron un área celular media de $50.87 \pm 1.23 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 29.10 y $88.66 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor ($p < 0.05$) que la observada en los machos knock out, $46.61 \pm 1.22 \mu\text{m}^2$, que a su vez oscilaba entre 21.61 y $84.98 \mu\text{m}^2$.

El área nuclear media en los wild type fue de $13.59 \pm 0.29 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor ($p < 0.05$) que la observada en los machos knock out, $11.92 \pm 0.34 \mu\text{m}^2$.

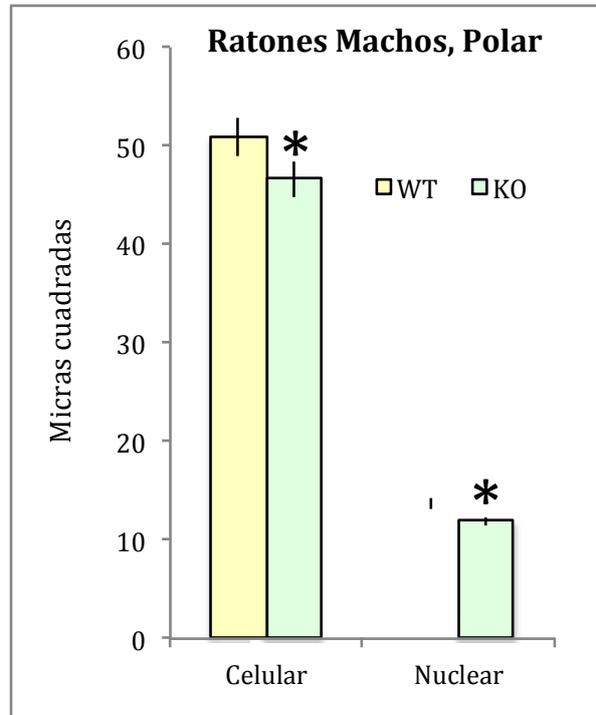
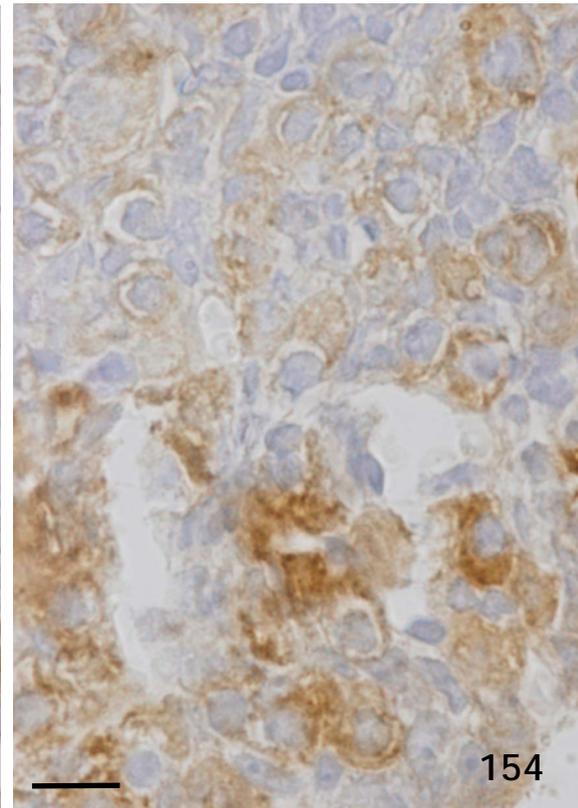
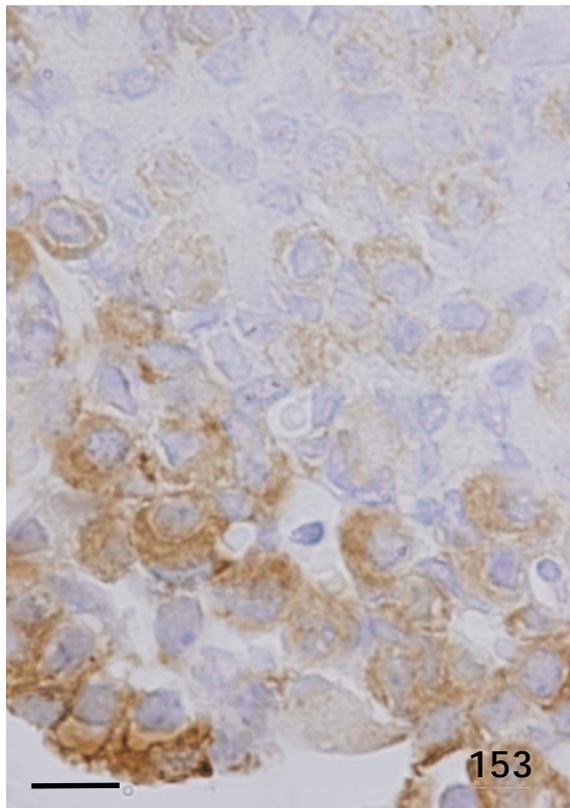
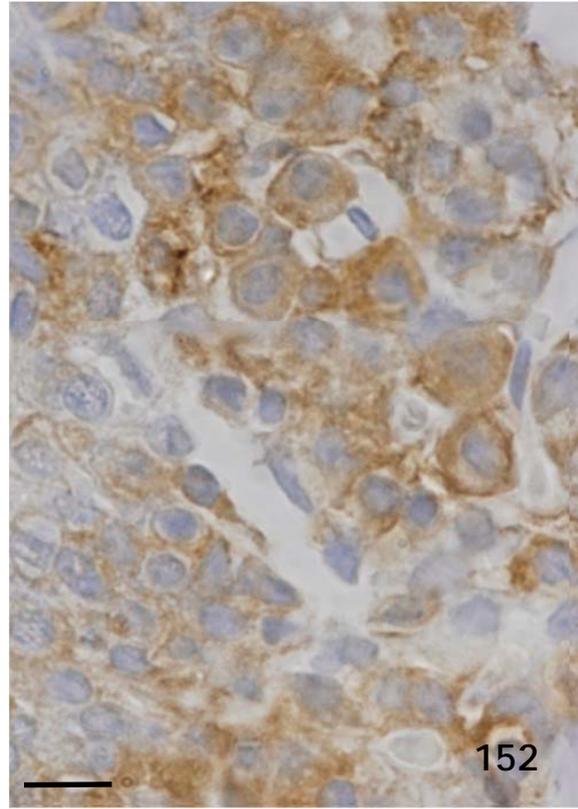
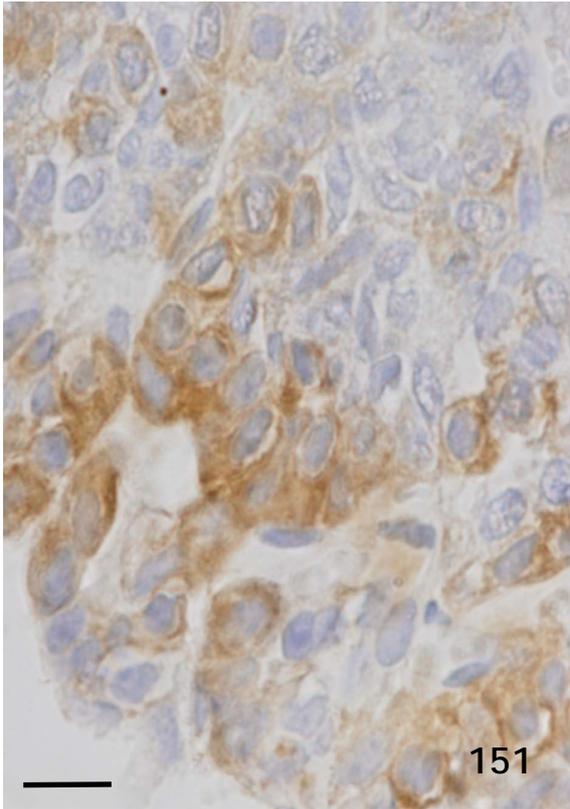


Figura 150. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.05$

Las células positivas en los machos wild type se agrupaban en islotes de células poligonales (figura 152) o claustrs de células cilíndricas (figura 151).

En los machos knock out formaban cordones de células redondeada o poligonales (figura 153) o claustrs de células irregulares (figura 154).



Figuras 151 a 154. Micrografías panorámicas que muestran las características más llamativas de las células positivas a prolactina en la región polar de la hipófisis de machos wild type (**figuras 151 y 152**) y knock out (**figuras 153 y 154**).
barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de machos.

El porcentaje medio de células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis (figura 155) de los machos wild type fue de 49.43 ± 3.77 , significativamente mayor ($p < 0.01$) que el observado en la misma región de los machos knock out, 40.53 ± 6.4 .

La distribución de las células en esta región fue mucho más homogénea en los machos wild type (figura 157), en lo que se disponían marginalmente, que en los knock out (figura 158) en los que había zonas marginales con muchas células y otras que prácticamente carecían de células positivas.

Esta irregularidad en la distribución es la razón principal de que al analizar el número de células referidas a la superficie, siendo mayor en los machos wild type, 1.035 ± 0.13 , que en los knock out, 0.992 ± 0.13 , las diferencias no alcanzaran significación estadística.

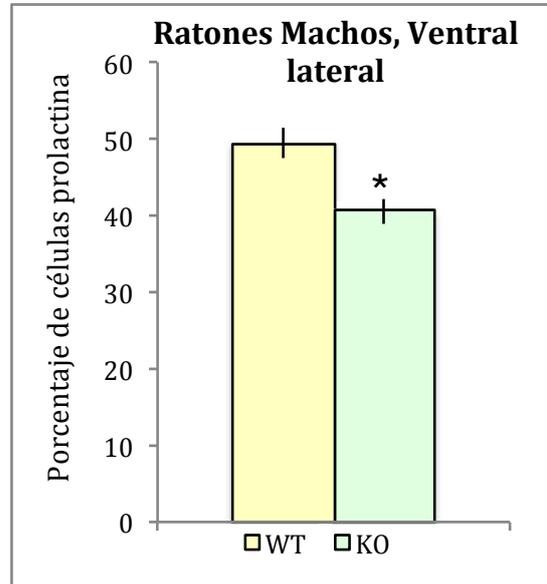


Figura 155. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$

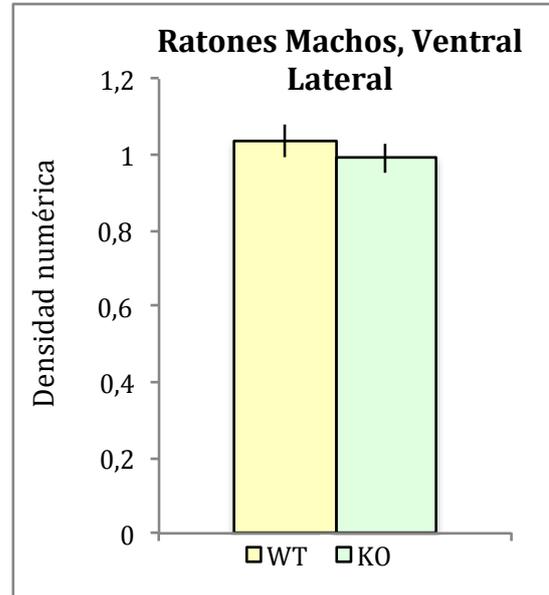
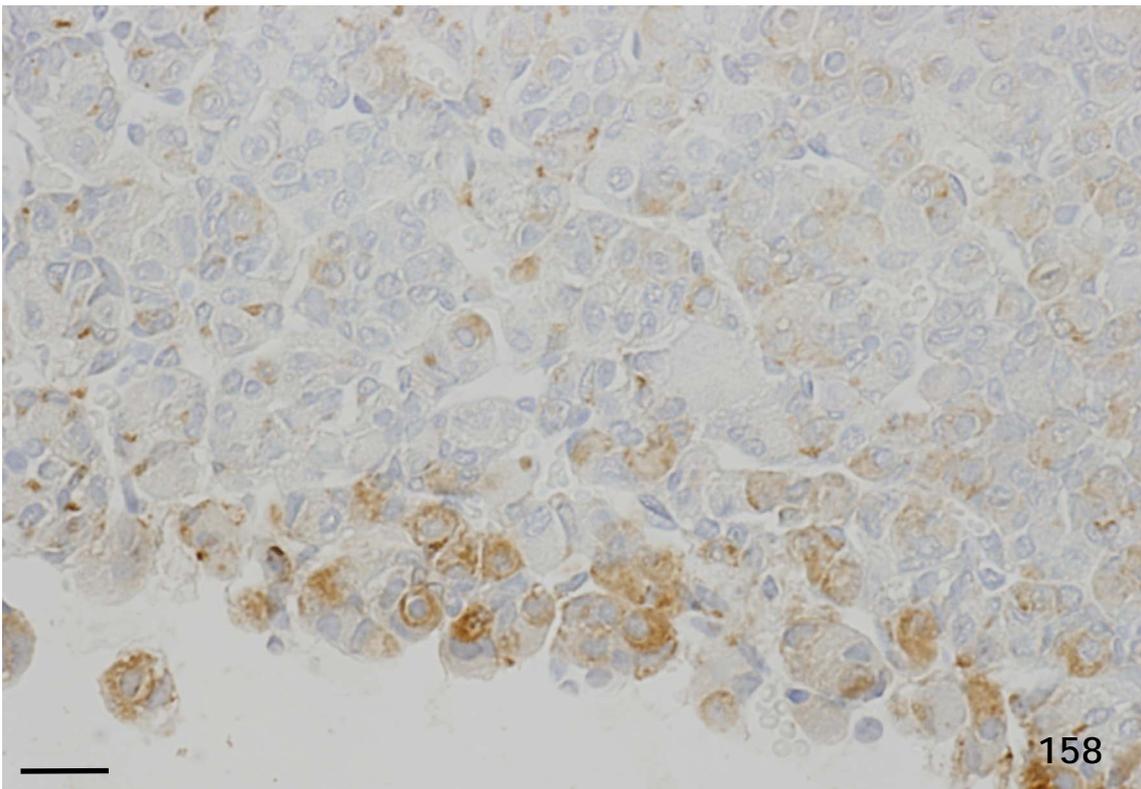
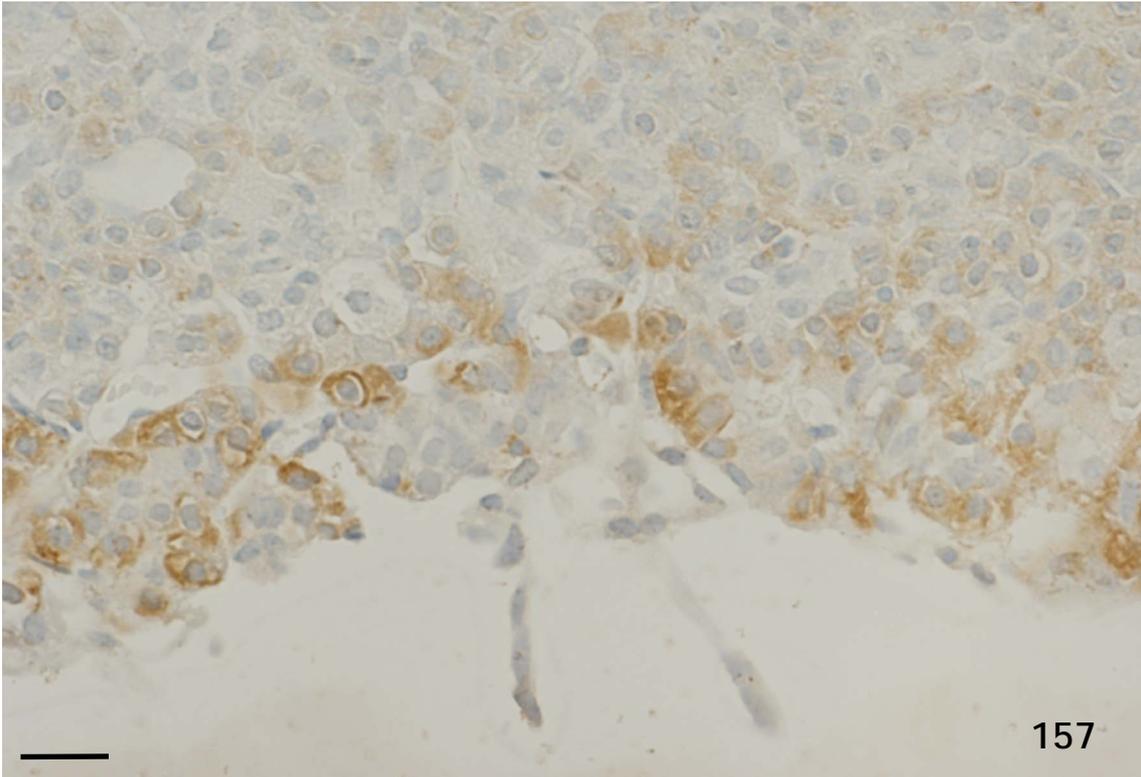


Figura 156. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 157 a 158. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de machos wild type (**figura 157**) y knock out (**figura 158**).
barra: 25 μ m

Si se observan las figuras 160 a 163, se aprecia claramente que la región ventral lateral de la hipófisis de los machos presenta células positivas a prolactina muy diversas en su forma, el patrón de reacción citoplásmica, o la forma y disposición del núcleo.

Principalmente debido al tamaño de las células marginales de esta región, el área celular media de las células positivas en los machos wild type (figura 159) fue de $56.32 \pm 1.28 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 33.67 y $95.02 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor ($p < 0.01$) que la observada en los machos knock out en los que alcanzó un valor de $48.00 \pm 1.51 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 20.16 y $110.07 \mu\text{m}^2$, valores extremos mínimo y máximo que ponen de manifiesto la gran variabilidad celular en estos animales.

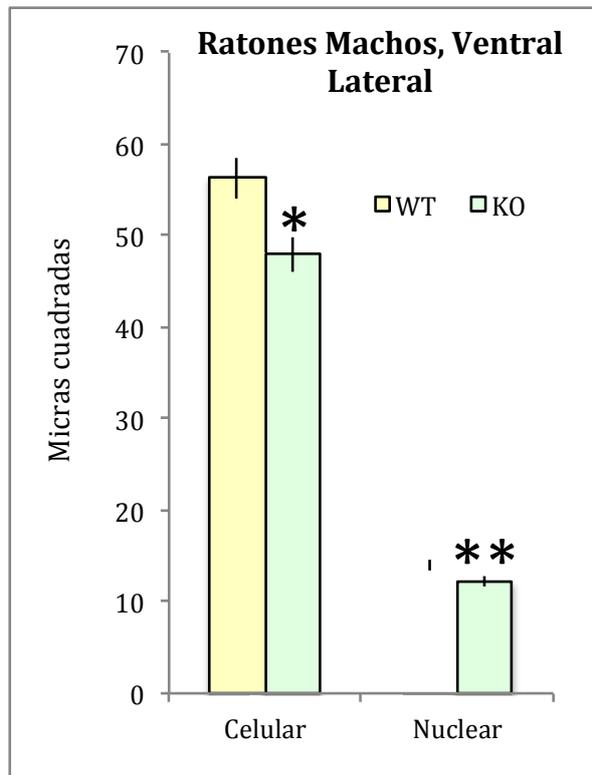
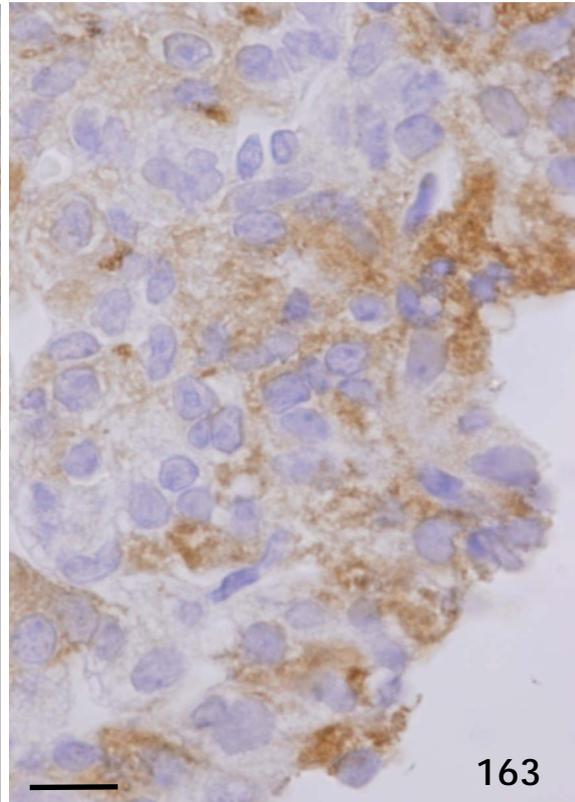
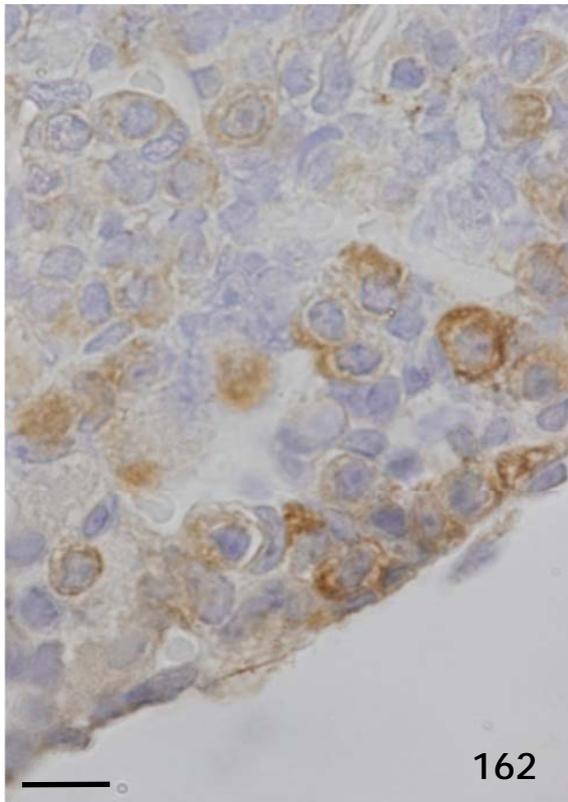
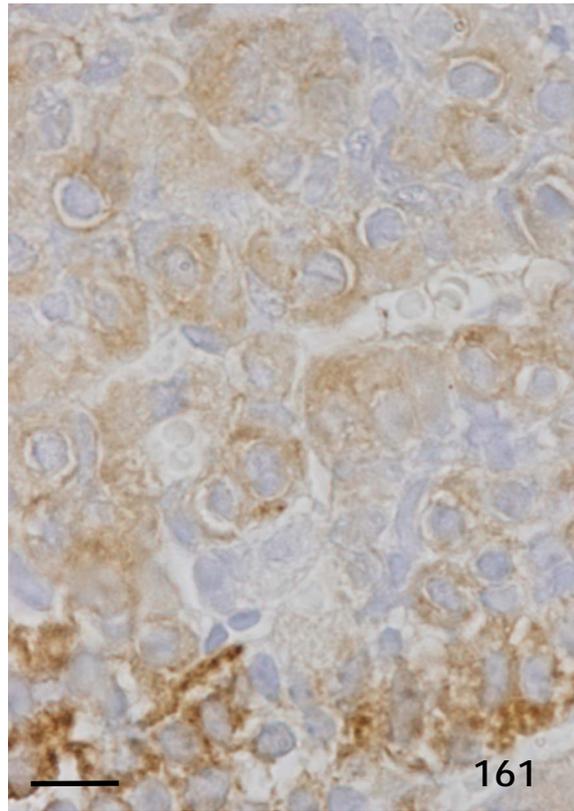
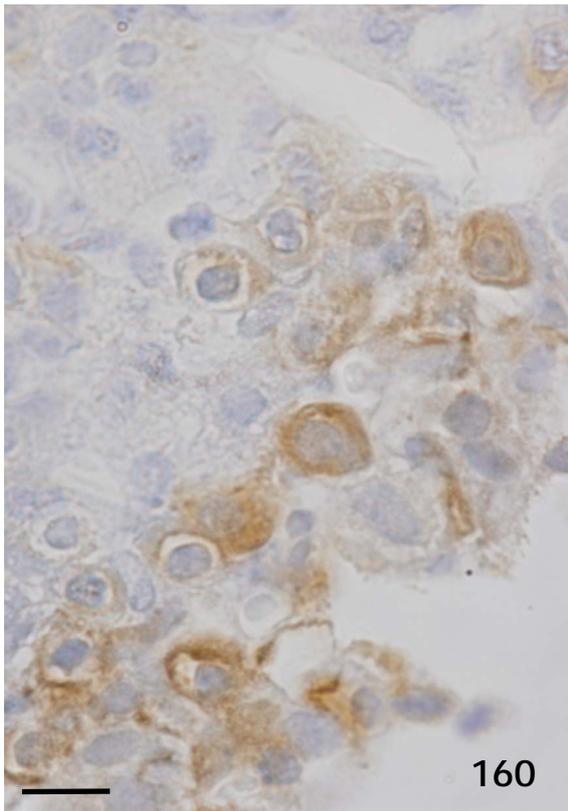


Figura 159. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.01$; **: $p < 0.05$

La variabilidad en el tamaño nuclear no fue tan manifiesta, siendo significativamente ($p < 0.05$) más grandes los núcleos en los animales wild type que en los knock out.

El área nuclear media en los machos wild type fue de $13.98 \pm 0.43 \mu\text{m}^2$ y en los knock out de $12.18 \pm 0.32 \mu\text{m}^2$.



Figuras 160 a 163. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región ventral lateral de la hipófisis de machos wild type (figuras 160 y 161) y knock out (figuras 162 y 163). barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de machos.

Al igual que ocurría en la región ventral lateral de la hipófisis, en la región ventral medial se observa un alto porcentaje de células positivas a prolactina.

El $44.95 \pm 3.55\%$ de las células de esta región hipofisaria en los machos wild type fueron células positivas a prolactina, siendo la densidad numérica media de 0.951 ± 0.08 .

En los ratones knock out para aromatasa, el $40.69 \pm 5.68\%$ de las células de esta región eran positivas a prolactina, mientras que la densidad numérica era del 0.951 ± 0.14 .

Como se aprecia en las figuras 164 y 165, ninguno de estos parámetros mostró diferencias estadísticamente significativas entre los animales wild type y los knock out para aromatasa.

En esta región y en los dos grupos estudiados, también eran más llamativas las células dispuestas marginalmente que las del interior de la glándula (figuras 166 y 167).

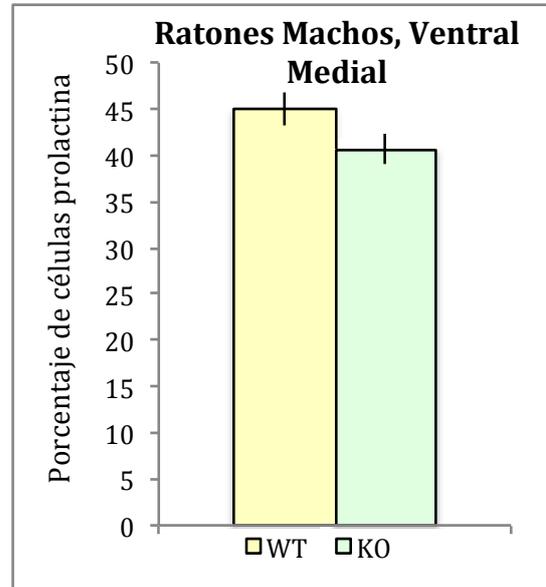


Figura 164. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

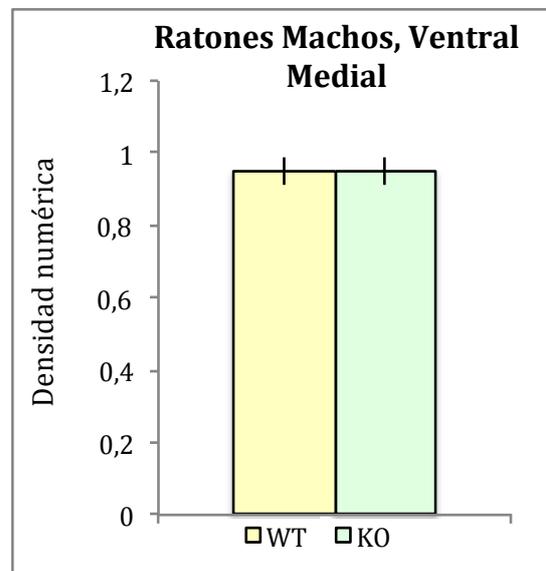
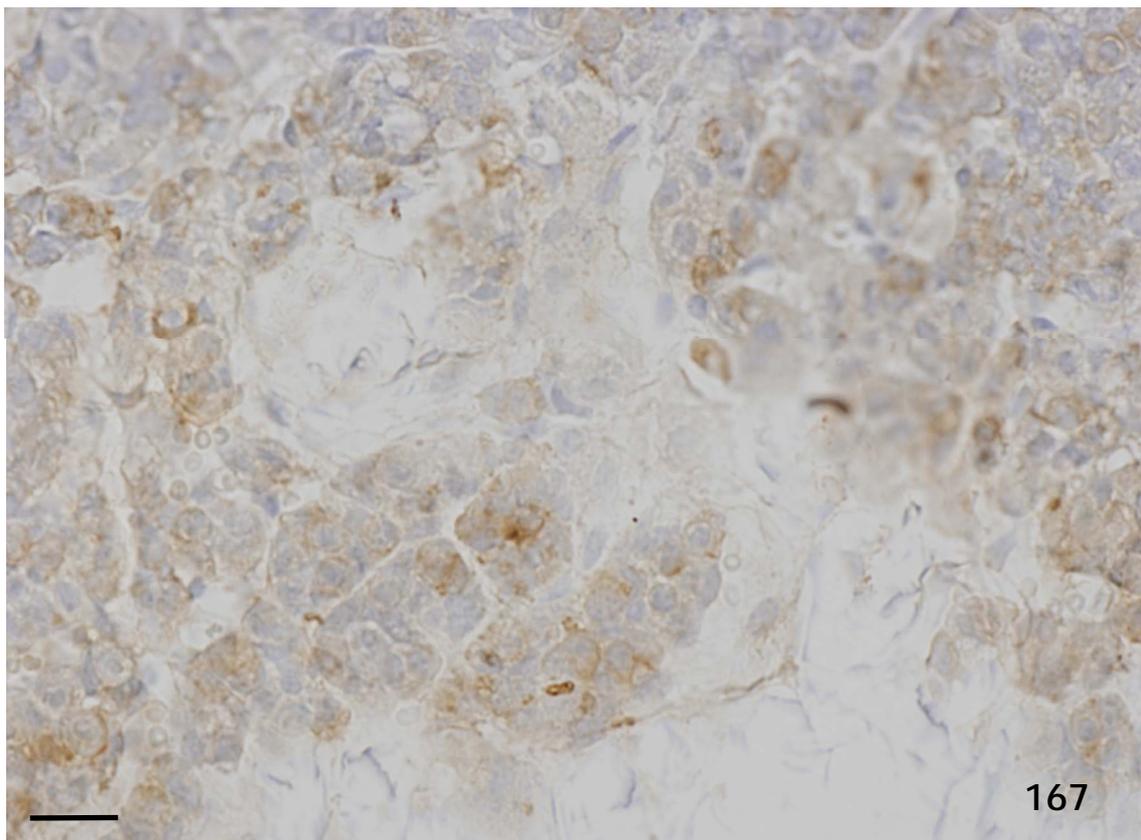
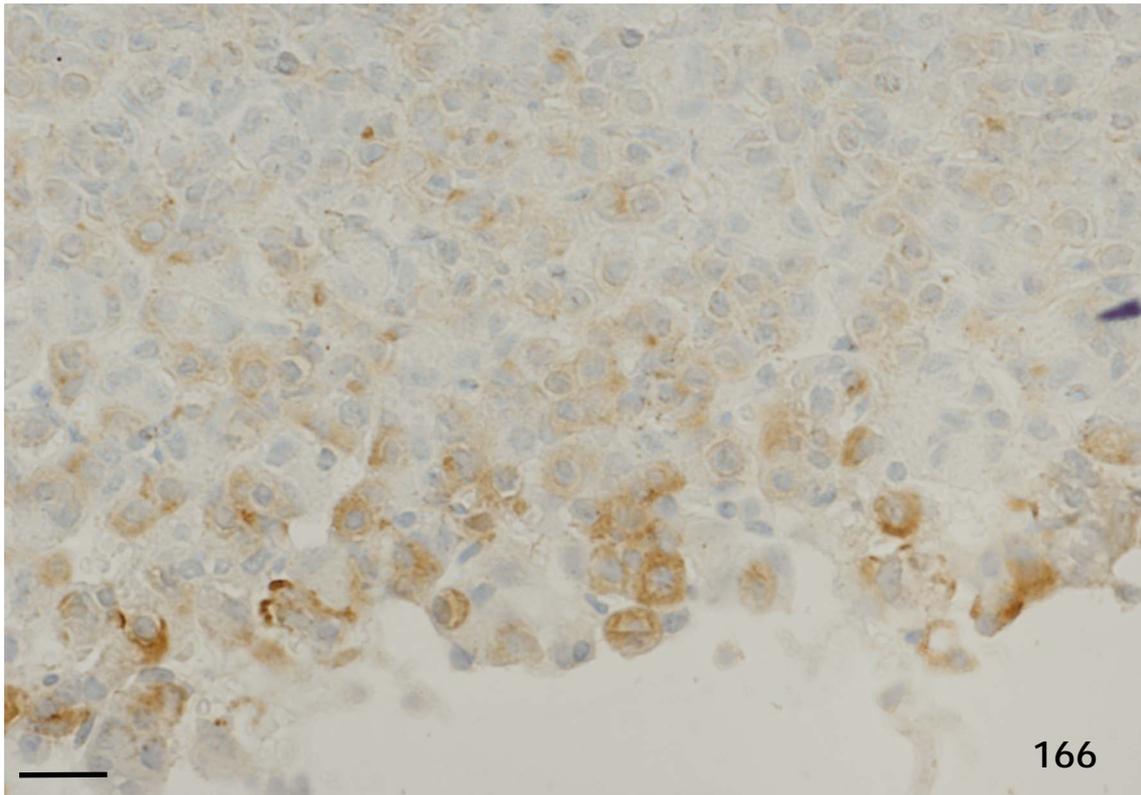


Figura 165. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 166 a 167. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de machos wild type (**figura 166**) y knock out (**figura 167**).
barra: 25 μ m

En los machos wild type (figura 168), el área celular media de las células positivas a prolactina fue $64.15 \pm 0.74 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 28.99 y $125.14 \mu\text{m}^2$, en esta región se encontraron las células positivas a prolactina de mayor tamaño, como lo demuestra su valor medio y el valor máximo. El área nuclear también presentó las mayores dimensiones de todas las regiones hipofisarias de los animales wild type, siendo el área nuclear media de $15.09 \pm 0.35 \mu\text{m}^2$.

La región ventral medial de la hipófisis de los machos knock out presentó las células positivas a prolactina de mayor tamaño al compararlas con las de otras regiones de la hipófisis; sin embargo, el área celular media fue significativamente inferior ($p < 0.05$) a la observada en los wild type, alcanzando un valor medio de $57.26 \pm 1.66 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 29.12 y $116.56 \mu\text{m}^2$.

En esta región el área nuclear presentó un tamaño semejante al observado en los animales wild type, siendo su área nuclear media de $15.27 \pm 0.34 \mu\text{m}^2$.

Como se aprecia en las figuras 169 a 172, en la región ventral medial de la hipófisis, las células tienden a agruparse formando islotes. Suelen ser células redondeadas o cuadradas con un núcleo redondeado de disposición central, excepto en aquellas células en las que el contacto con el vaso es evidente en la que se suele polarizar hacia el lado contrario (figura 170).

Las células de los animales knock out presentaron una reacción citoplásmica granular más gruesa que la observada en los animales wild type (figuras 171 y 172).

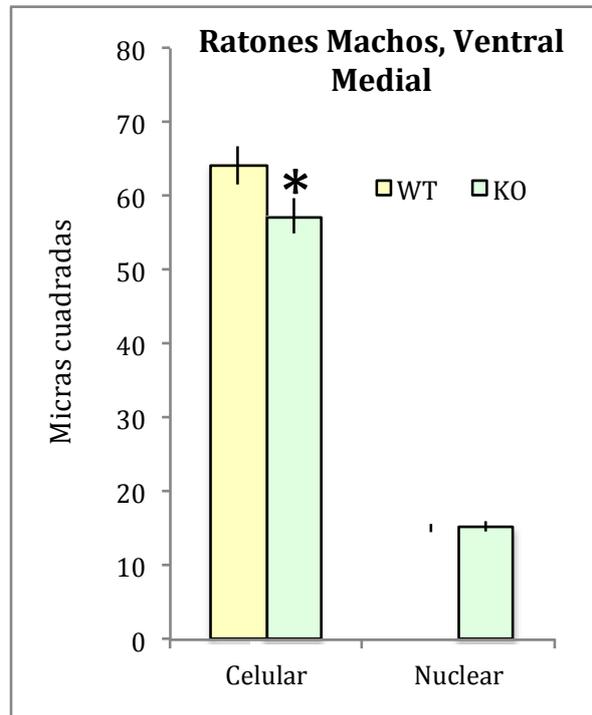
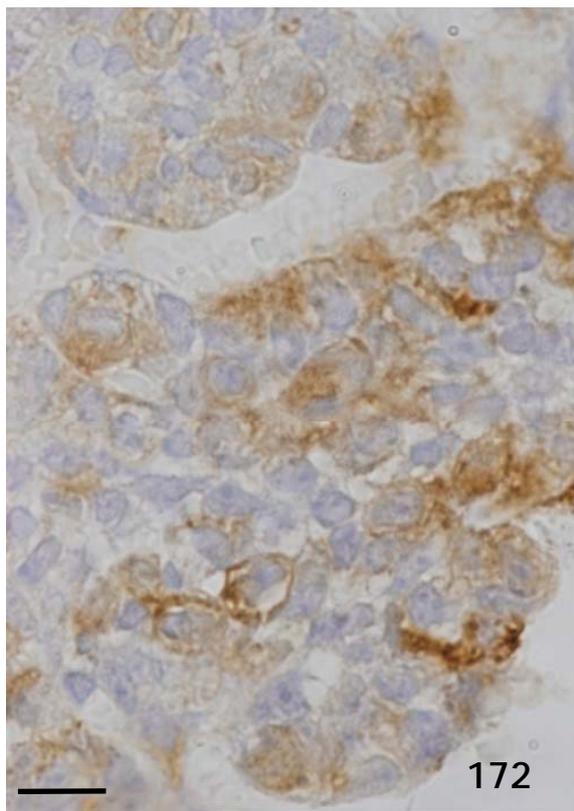
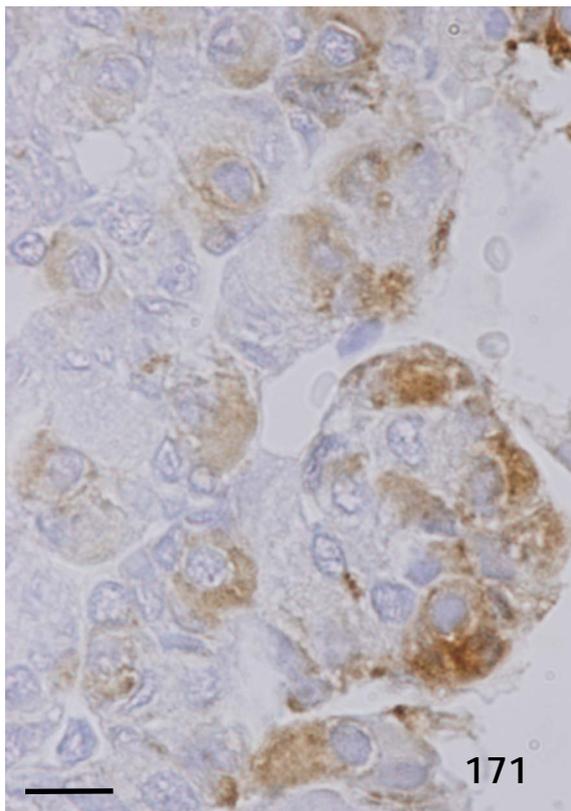
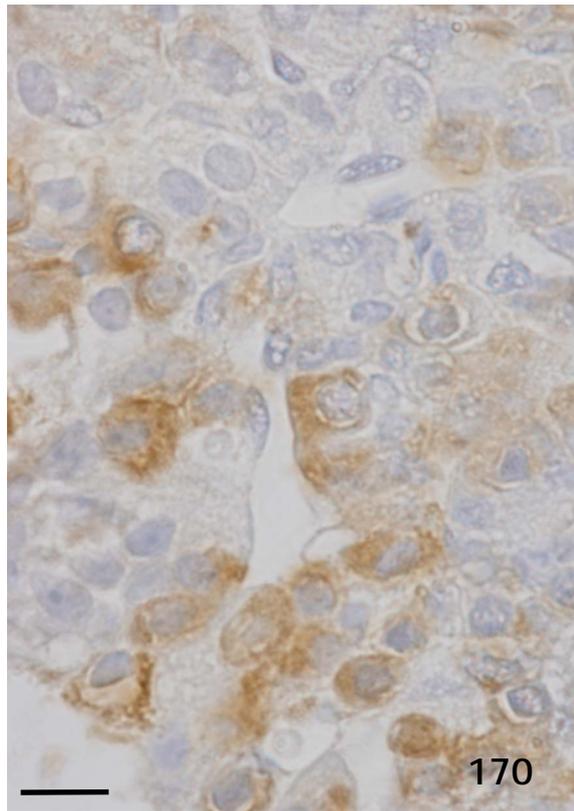
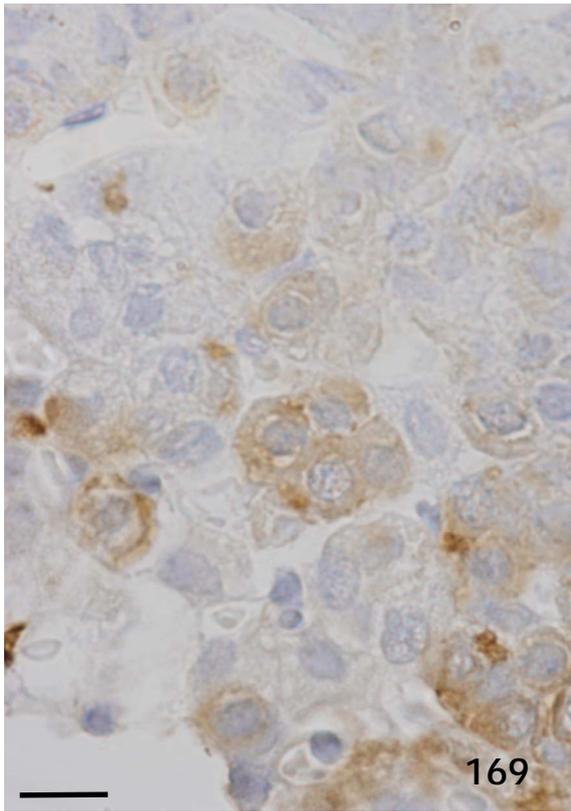


Figura 168. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.05$



Figuras 169 a 172. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región ventral medial de la hipófisis de machos wild type (**figuras 169 y 170**) y knock out (**figuras 171 y 172**). barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de hembras wild type.

Las células de prolactina de la región medial próxima a la pars intermedia presentaron como hallazgo más llamativo su débil intensidad de reacción. Este hallazgo se observó en los dos grupos de machos estudiados, aunque fue más llamativo en los animales wild type (figura 175) que en los knock out (figura 176).

El porcentaje de células positivas en los animales wild type fue de $29.27 \pm 2.45\%$ y en los machos knock out de $27.28 \pm 2.29\%$ (figura 173) sin que se observaran diferencias significativas entre los dos grupos.

Al analizar la densidad numérica, las diferencias fueron aún menores, con una densidad numérica media de 0.812 ± 0.04 en los wild type y de 0.843 ± 0.17 en los knock out, diferencias que no fueron significativas (figura 174).

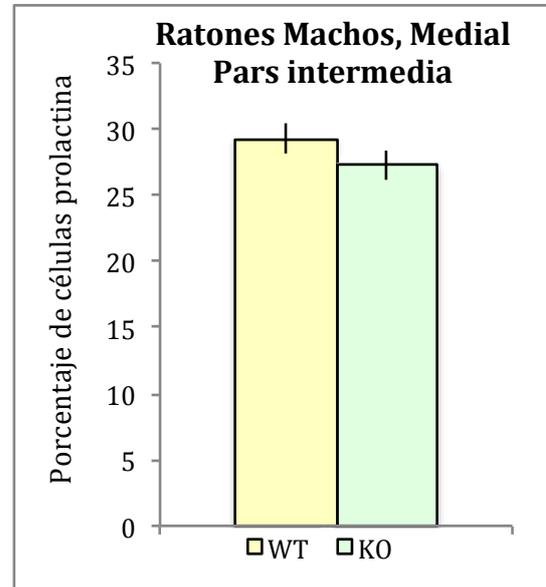


Figura 173. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out.

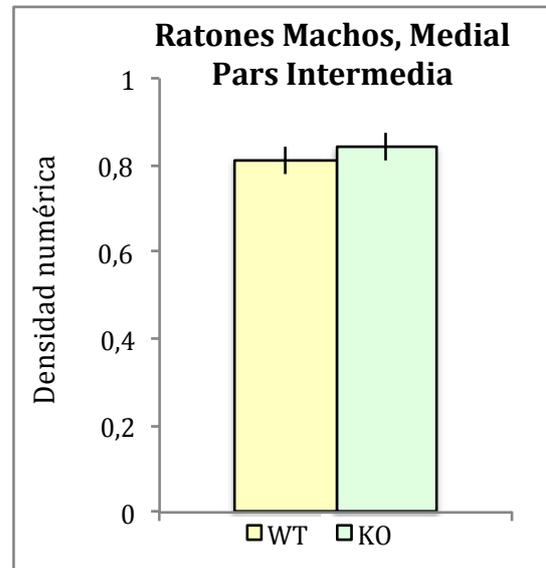
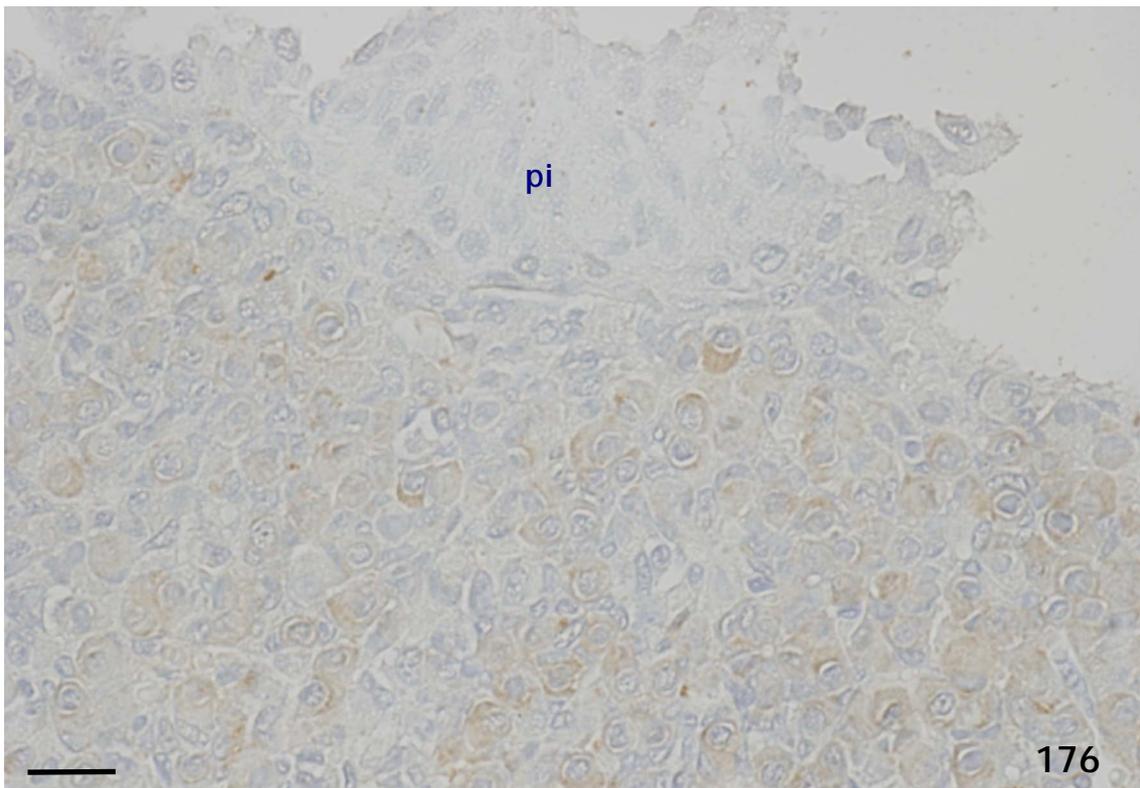
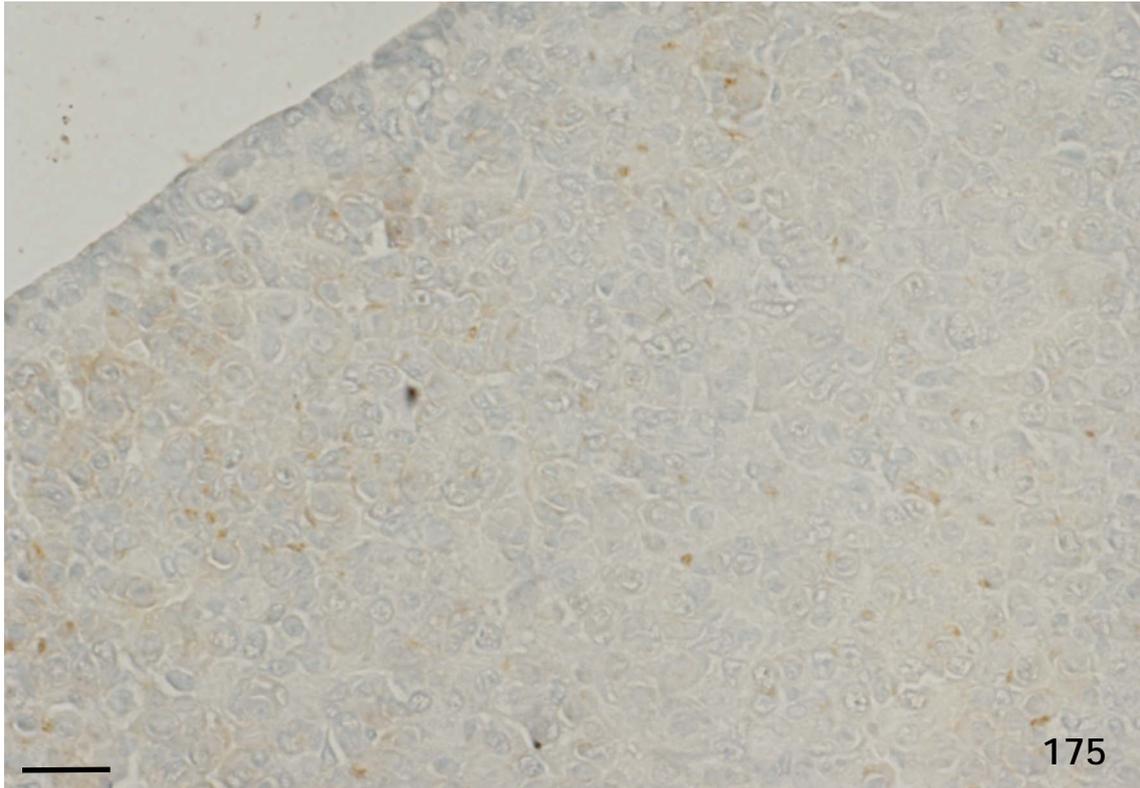


Figura 174. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 175 a 176. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de machos wild type (**figura 175**) y knock out (**figura 176**).

pi: pars intermedia

barra: 25 μ m

Las células positivas a prolactina en esta región hipofisaria de los animales wild type se caracterizaron por presentar una reacción débil y puntiforme que afectaba a pequeñas zonas del citoplasma celular, siendo negativo el resto de la célula (figuras 178 y 179).

En los animales knock out, la reacción estaba más expandida, con un aspecto granular fino y baja intensidad de reacción, aunque esta última, en general, fue superior que la observada en los wild type (Figuras 180 y 181).

En ambos grupos de animales, los núcleos variaban mucho en su forma y no presentaban nucleolo.

El área celular media en los machos wild type alcanzó valores de $51.35 \pm 1.11 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 26.46 y $75.22 \mu\text{m}^2$.

Como muestra la gráfica de la figura 177, en los machos knock out el área celular media fue significativamente menor ($p < 0.05$) que la observada en los wild type, alcanzando valores de $45.99 \pm 1.09 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 31.13 y $64.29 \mu\text{m}^2$.

Algo semejante se apreció al estudiar las áreas nucleares cuyo valores medios fueron de $14.96 \pm 0.39 \mu\text{m}^2$ en los wild type y de $13.17 \pm 0.32 \mu\text{m}^2$ en los knock out ($p < 0.05$).

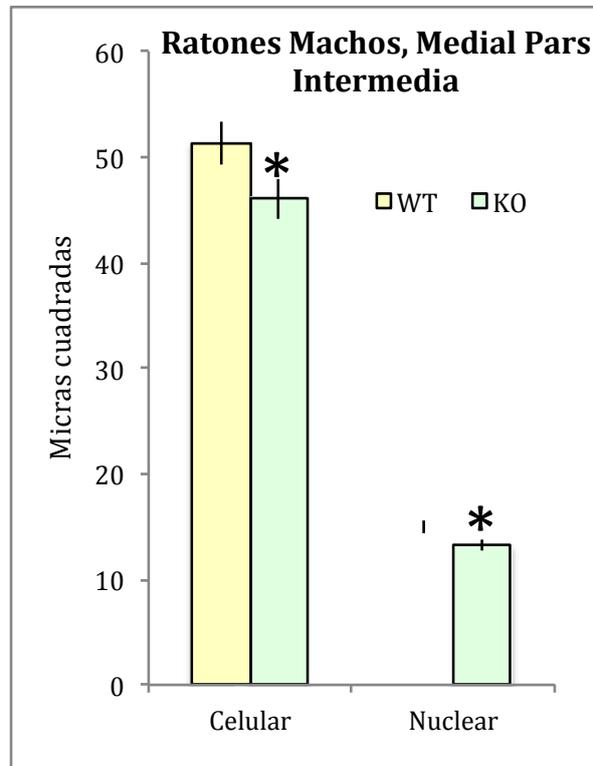
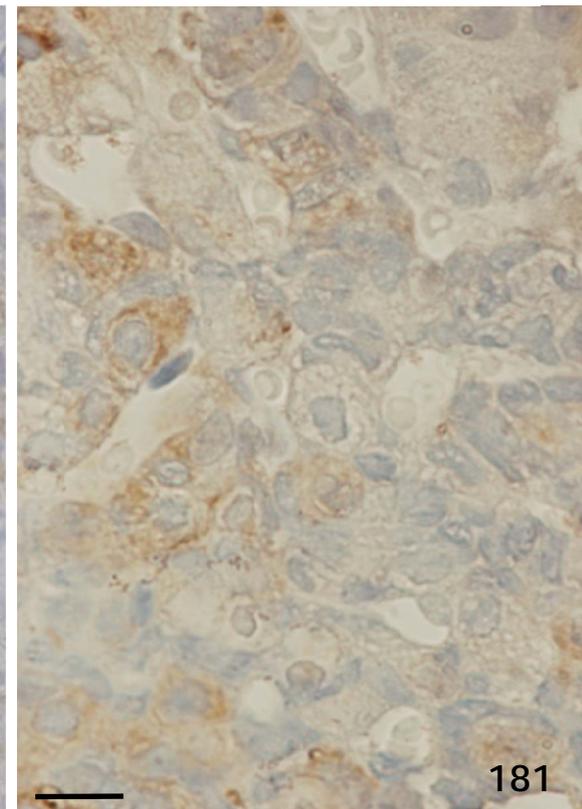
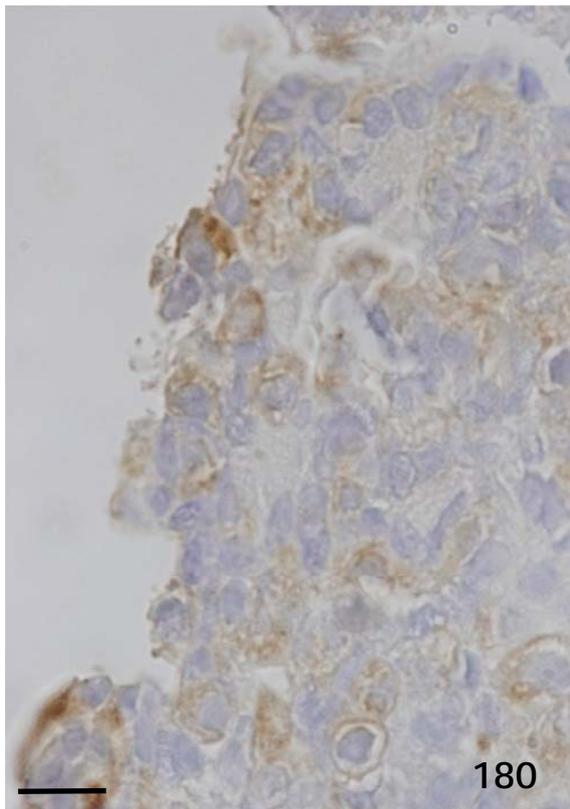
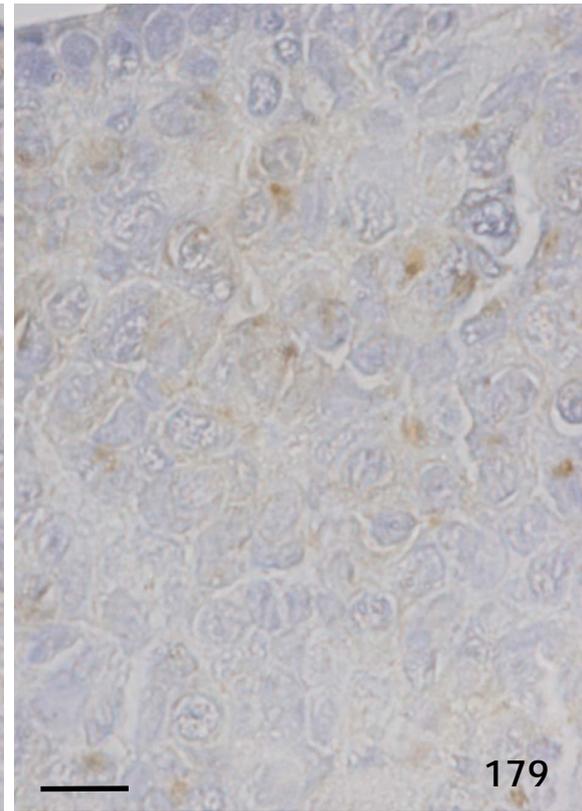
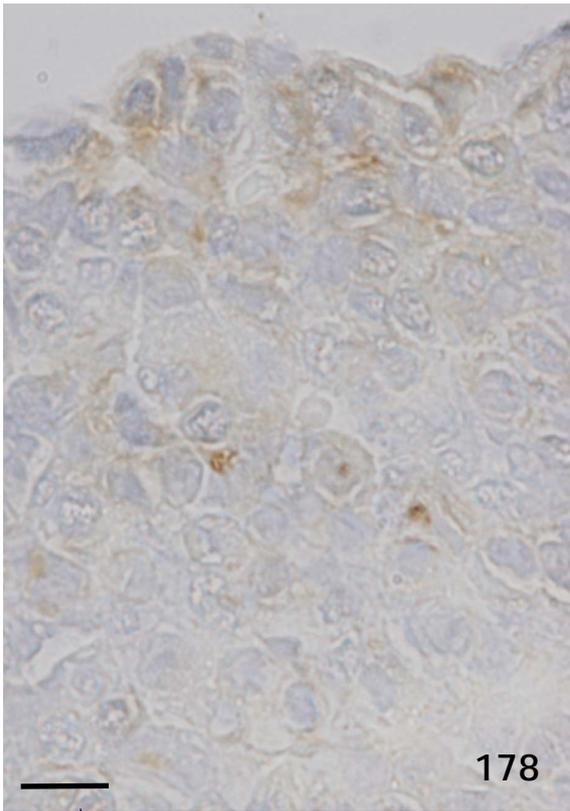


Figura 177. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.05$



Figuras 178 a 181. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región medial próxima a la pars intermedia de la hipófisis de machos wild type (**figuras 178 y 179**) y knock out (**figuras 180 y 181**).
barra: 10 μ m

Células de prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de hembras wild type.

Las células de prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de los machos ArKO no presentaron diferencias significativas en lo relativo al porcentaje de células positivas (figura 182) o de su densidad numérica (figura 183).

Morfológicamente se constató que en los animales wild type las células de prolactina aparecían principalmente por debajo del epitelio de la caverna hipofisaria (figura 184).

En los animales ArKO la positividad en células que contactaban con la caverna fue mucho más evidente (figura 185), si bien también se apreciaban células en profundidad parecidas a las de los wild type.

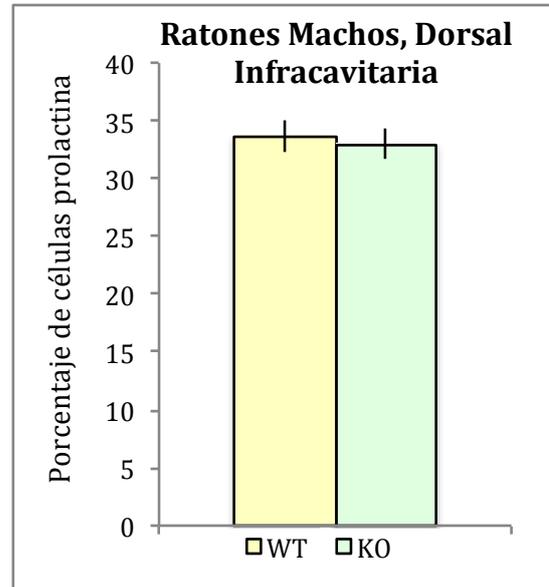


Figura 182. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out.

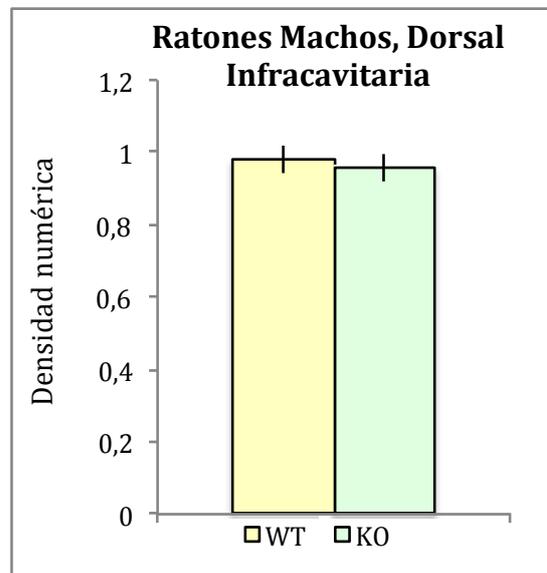
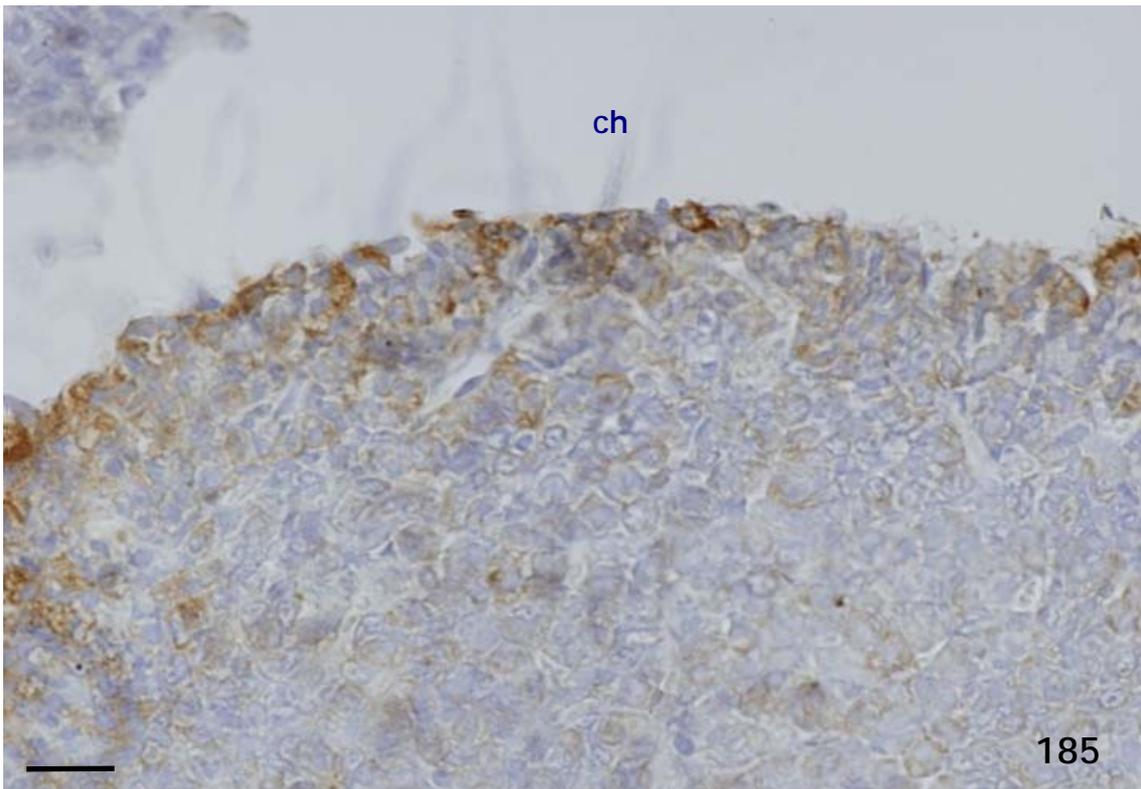
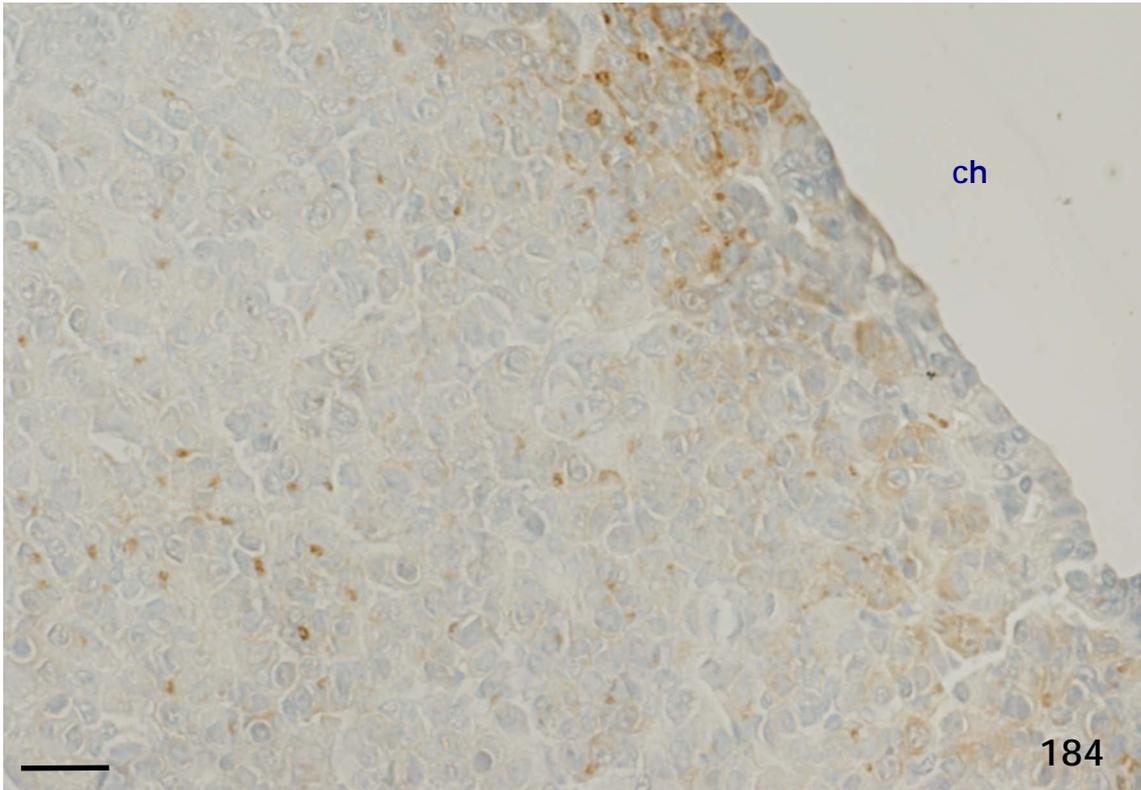


Figura 183. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 184 a 185. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de machos wild type (**figura 184**) y knock out (**figura 185**).

ch: caverna hipofisaria

barra: 25 μ m

A mayores aumentos se apreció que las células positivas en los animales wild type (figuras 187 y 188) eran más irregulares y poligonales que las de los ArKO (figuras 189 y 190) que por lo general fueron más redondeadas.

En ambos grupos la reacción inmunocitoquímica fue muy irregular, por lo general débil.

Destacando la ausencia de nucleolos y la presencia abundante de un área negativa perinuclear.

El tamaño de las células fue ligeramente menor en los ArKO que en los wild type, aunque estas diferencias no alcanzaron valores significativos (Figura 186).

El área celular media en los animales wild type fue de $47.81 \pm 0.76 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 27.88 y $64.91 \mu\text{m}^2$.

Los animales ArKO presentaron un área celular media de $45.96 \pm 0.96 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 28.34 y $67.48 \mu\text{m}^2$.

Al analizar el área nuclear, se apreció un descenso en los animales ArKO, $13.15 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$, con respecto a los wild type, $14.76 \pm 0.29 \mu\text{m}^2$ que, en este caso, sí alcanzó diferencias significativas ($p < 0.05$).

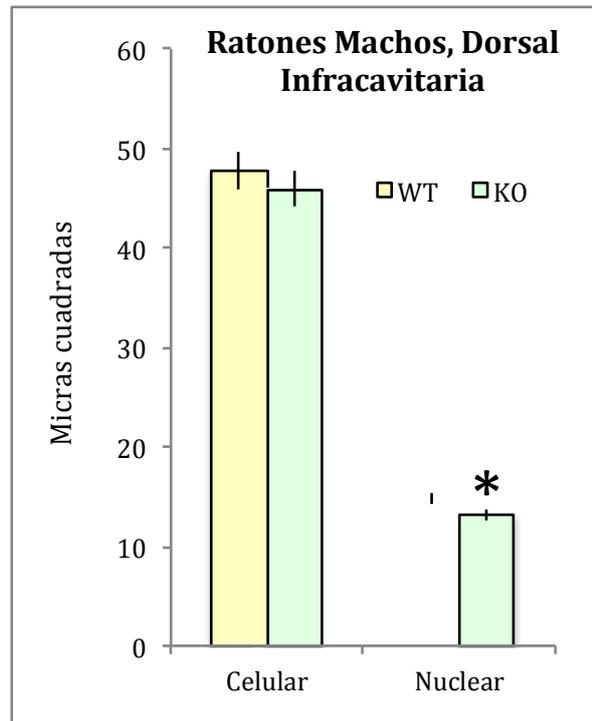
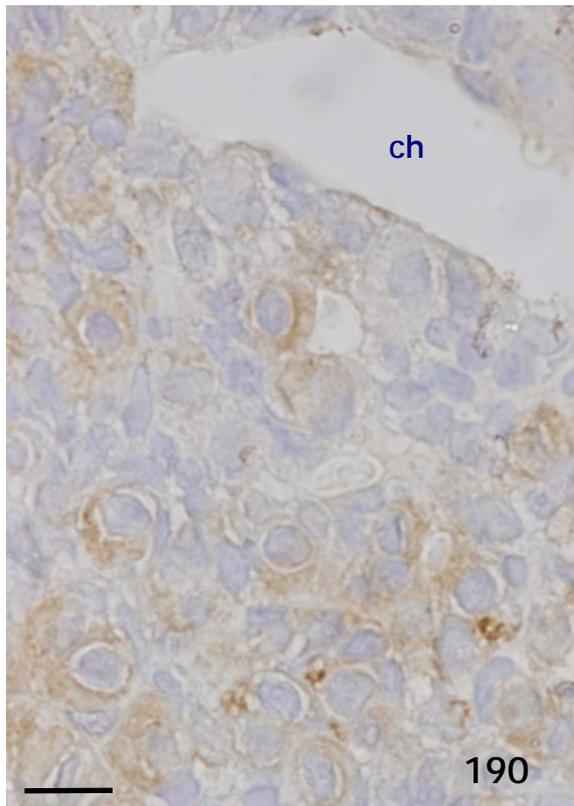
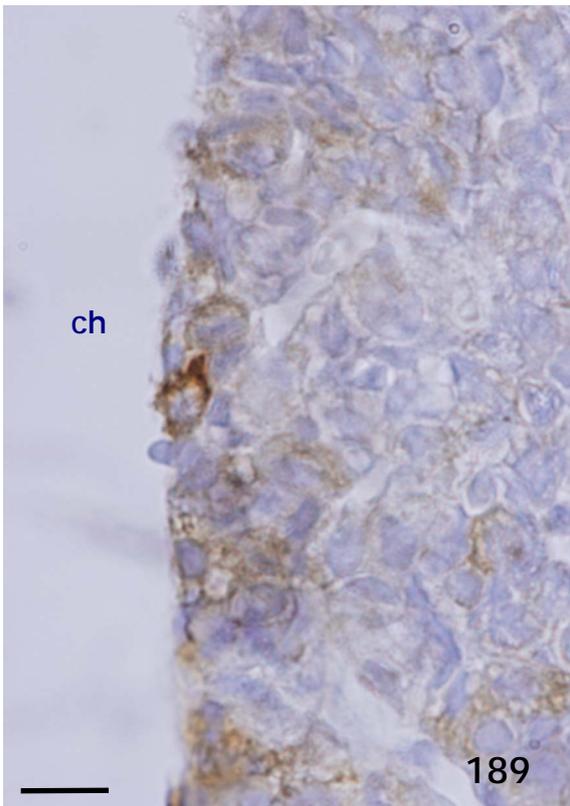
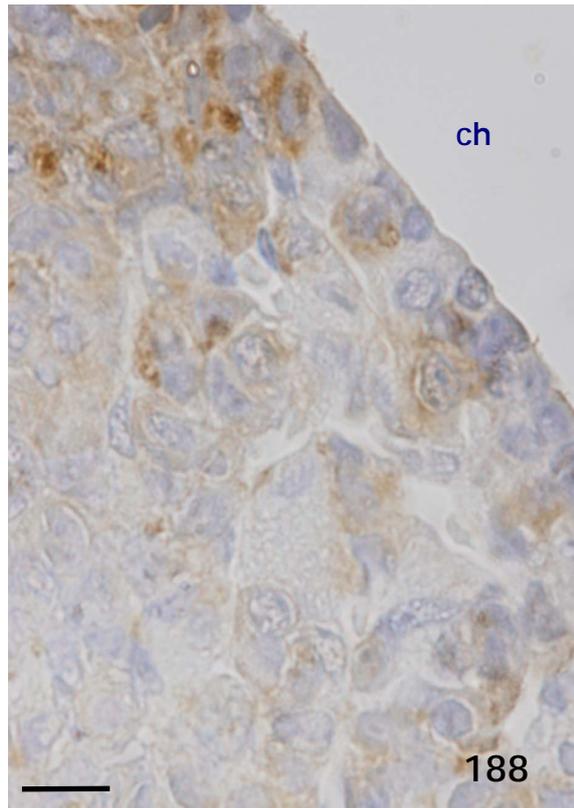
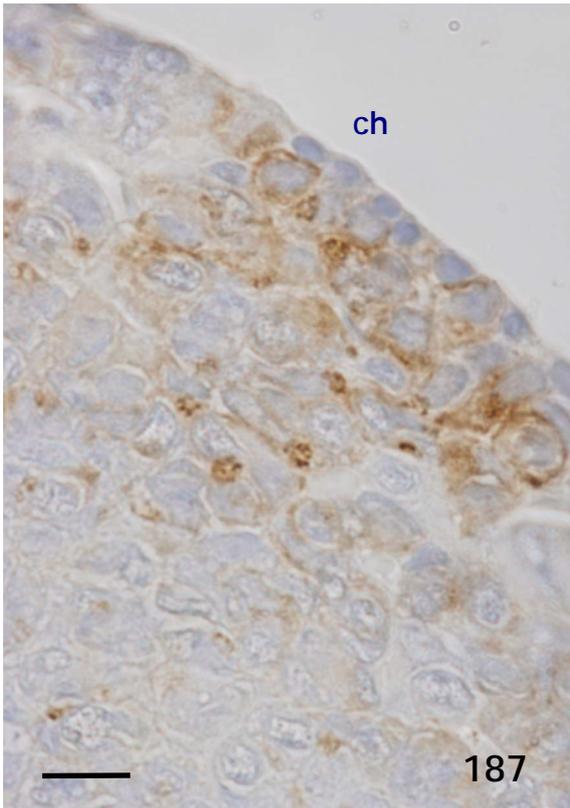


Figura 186. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.05$



Figuras 187 a 190. Micrografías que muestran las características morfológicas de las células positivas a prolactina en la región dorsal infracavitaria de la hipófisis de machos wild type (**figuras 187 y 188**) y knock out (**figuras 189 y 190**).

barra: 10 μ m

ch: caverna hipofisaria

Células de prolactina en la región central medial de la hipófisis de machos.

Al estudiar la región central medial de la hipófisis de los machos no se observaron diferencias en el número de células positivas a prolactina entre los machos knock out y los wild type. Como muestran las figuras 191, relativa al porcentaje celular, y la figura 192, relativa a la densidad numérica.

Las células en esta región presentaron una inmunorreactividad muy débil y sin grandes diferencias entre los animales wild type (figura 193) y los ArKO (figura 194).

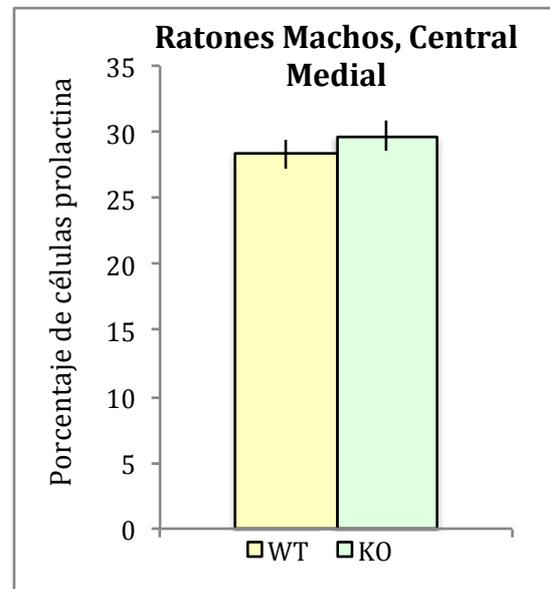


Figura 191. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

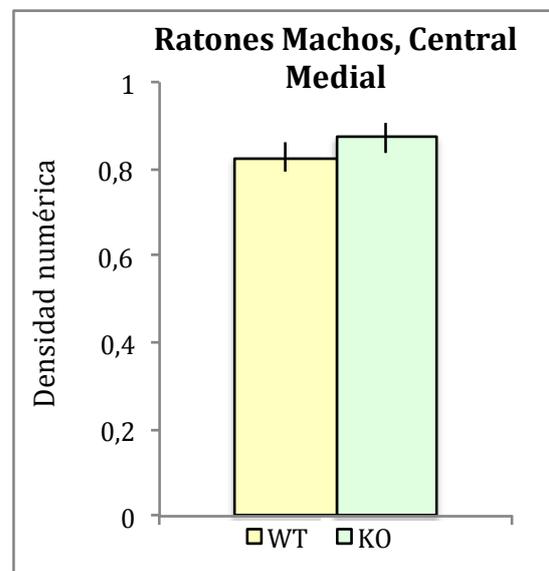
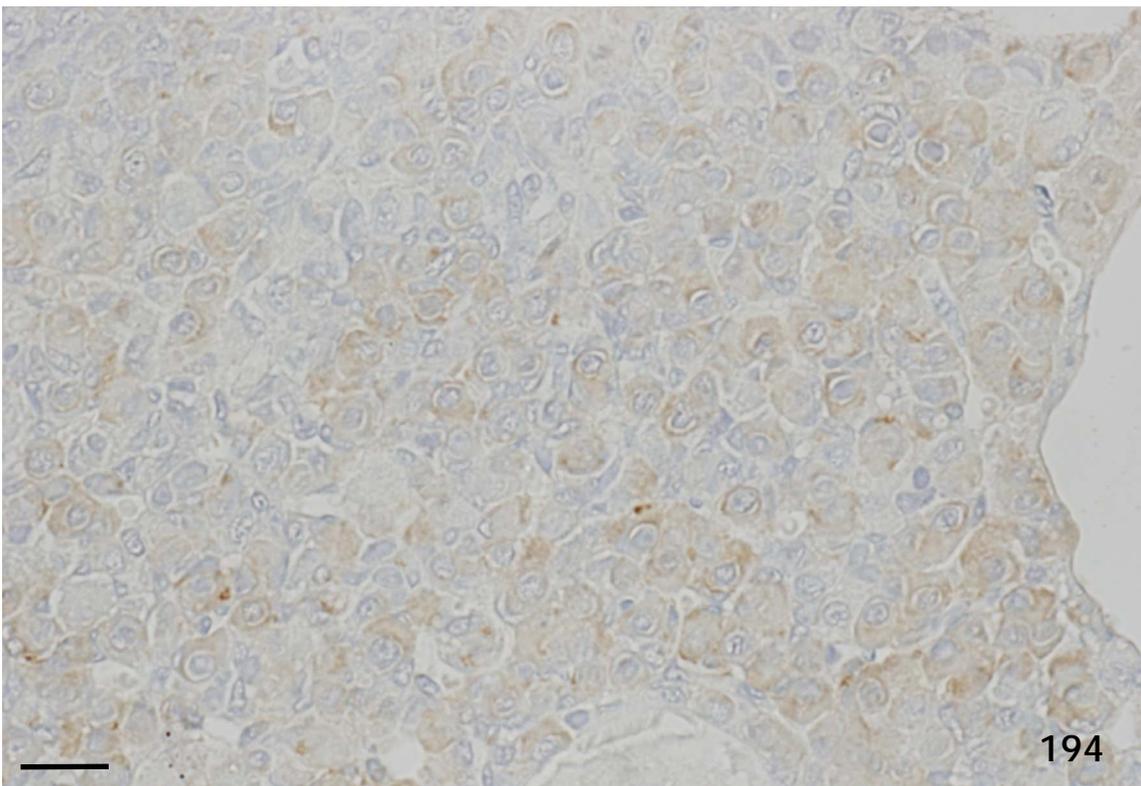
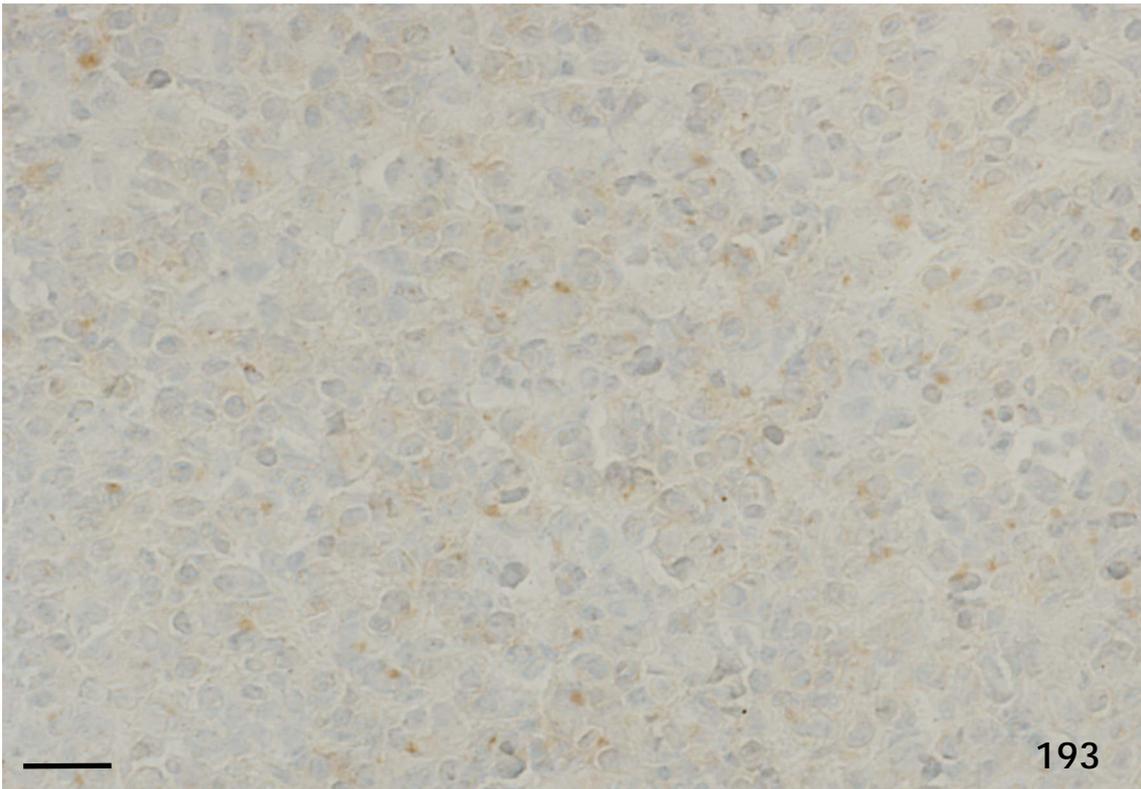


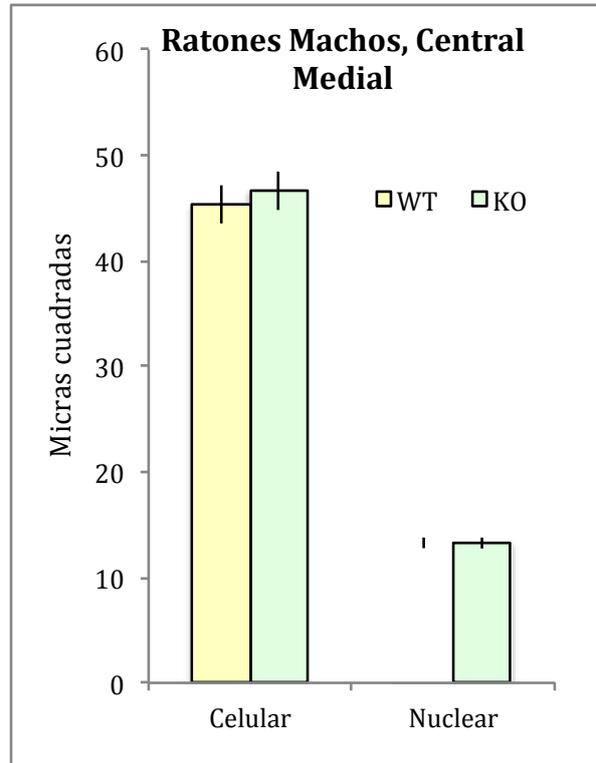
Figura 192. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.



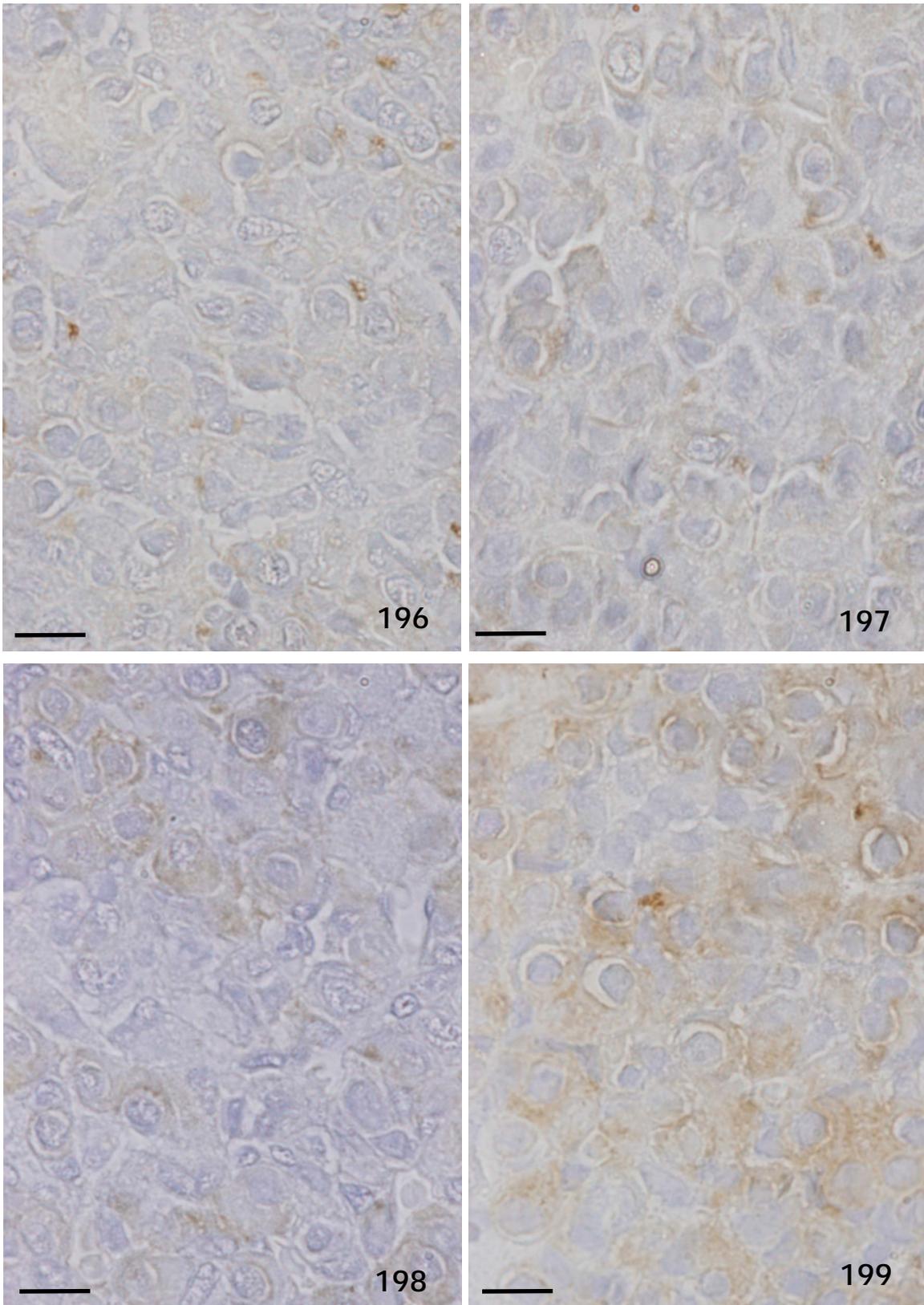
Figuras 193 y 194. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis de machos wild type (**figura 193**) y knock out (**figura 194**).
barra: 25 μ m

La figura 195, en la que se muestran los valores de las áreas celular y nuclear medias de las células positivas a prolactina en la región centro medial, es claramente indicativa de que no se encontraron diferencias en el tamaño de estas células entre los animales wild type y los ArKO.



Lo mismo ocurrió al analizar a grandes aumentos los rasgos morfológicos de las células positivas a prolactina en los ratones machos wild type (figuras 196 y 197) y los ArKO (figuras 198 y 199).

Figura 195. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis. WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 196 a 199. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región central medial de la hipófisis de machos wild type (**figuras 196 y 197**) y knock out (**figuras 198 y 199**).

ch: caverna hipofisaria

barra: 10 µm

Células de prolactina en la región central lateral de la hipófisis de machos.

La cuantificación de las células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis de los ratones machos puso en evidencia que no existían diferencias significativas en el porcentaje celular (figura 200) o en la densidad numérica (figura 201), entre los animales wild type y los ArKO.

Tanto en los animales wild type (figura 202) como en los ArKO (figura 203) las células eran débilmente positivas y aparecían desperdigadas y generalmente aisladas en esta región de la glándula.

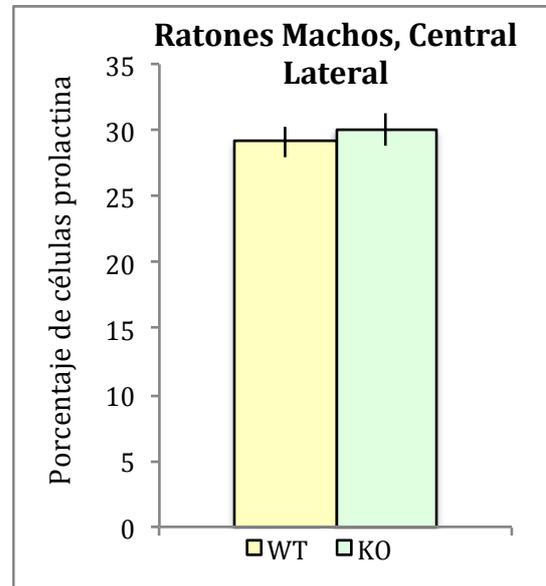


Figura 200. Gráfica que muestra el porcentaje de células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.

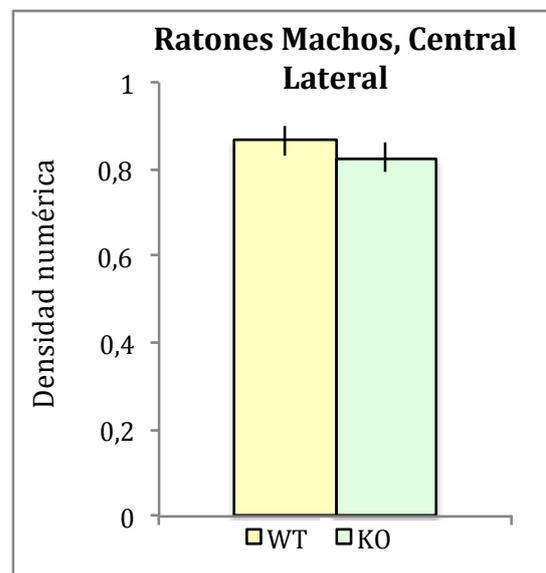
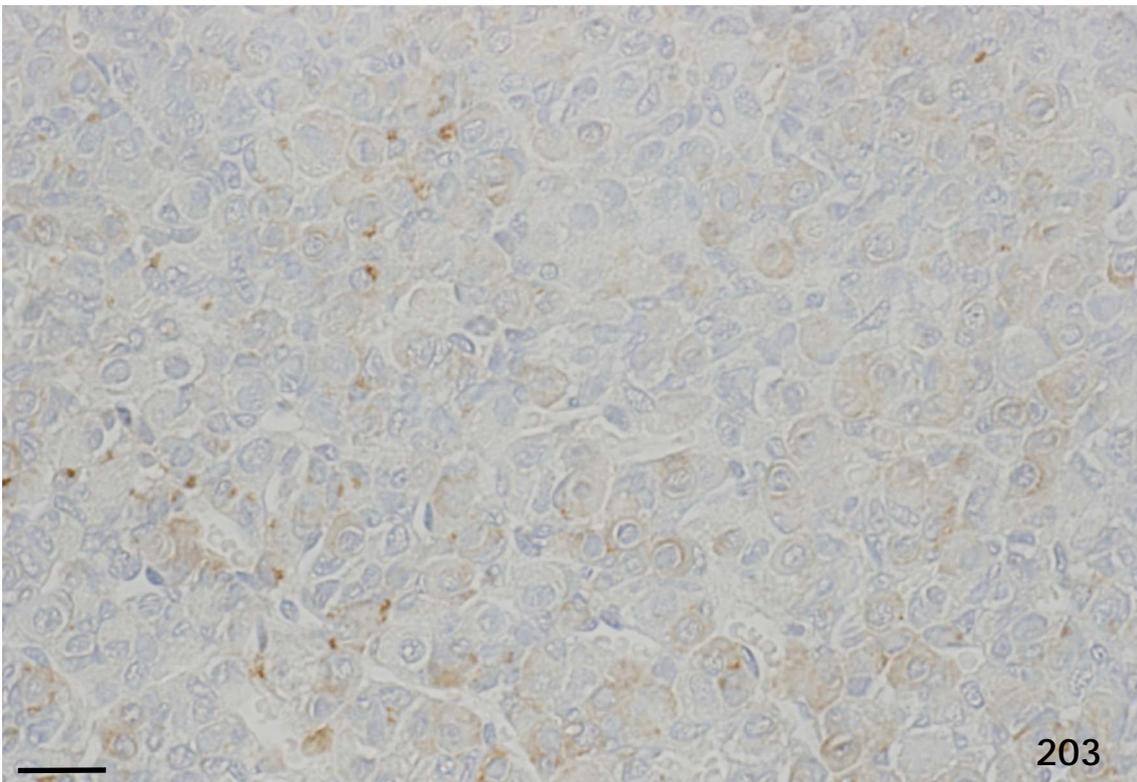
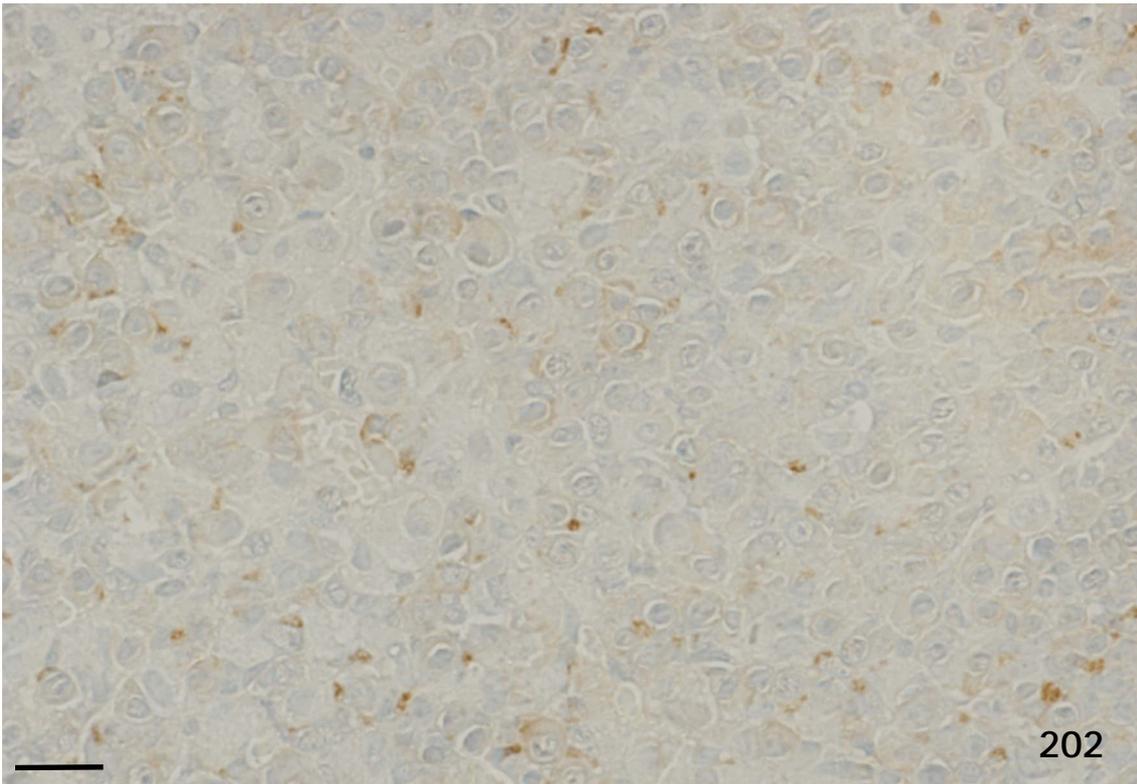


Figura 201. Gráfica que muestra la densidad numérica de células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis.

WT: Wild Type, KO: Knock Out.



Figuras 202 y 203. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis de machos wild type (**figura 202**) y knock out (**figura 203**).

ch: caverna hipofisaria

barra: 25 μ m

Aunque no se apreciaron diferencias significativas en el número de células positivas a prolactina, al analizar su tamaño sí que aparecieron diferencias significativas entre los machos wild type y los ArKO (figura 204).

El área celular media en los machos wild type fue de 52.50 ± 1.08 , oscilando entre 36.62 y 78.80. En los machos ArKO el área celular fue significativamente inferior ($p < 0.001$) alcanzando un valor medio de $41.38 \pm 1.07 \mu\text{m}^2$, oscilando entre 20.83 y $64.18 \mu\text{m}^2$.

Significaciones estadísticas semejantes ($p < 0.001$) se hallaron al analizar el tamaño nuclear, con un área nuclear media de $13.41 \pm 0.25 \mu\text{m}^2$ para los animales wild type, y de $9.79 \pm 0.30 \mu\text{m}^2$ para los ArKO.

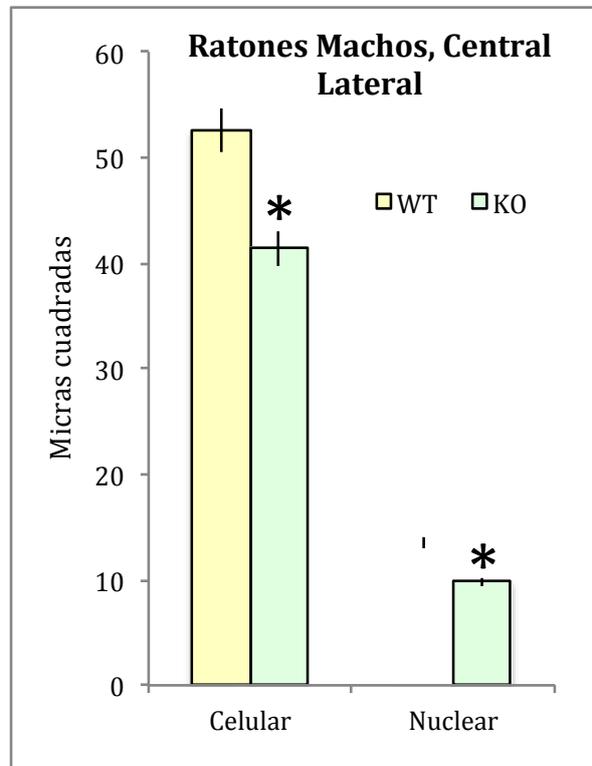
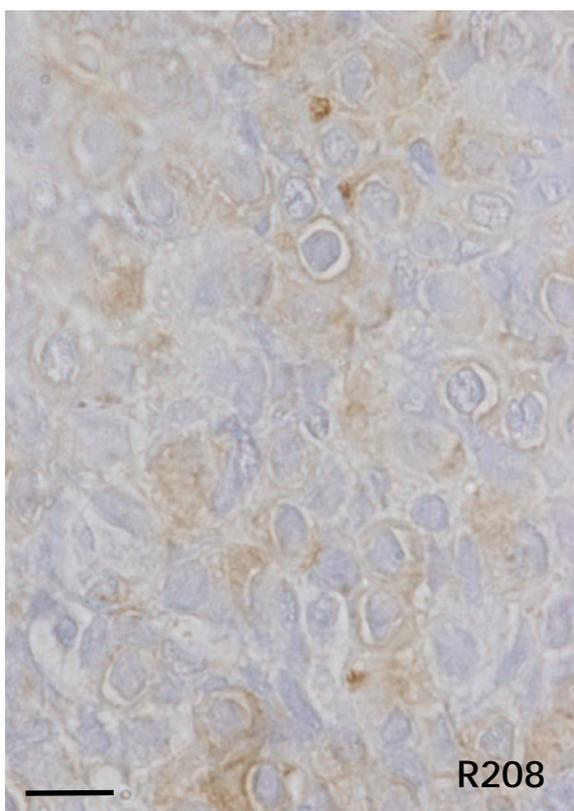
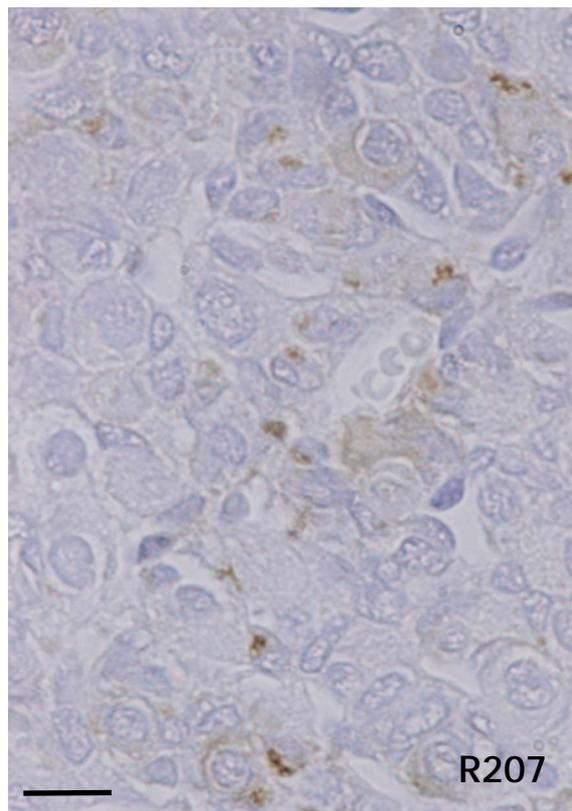
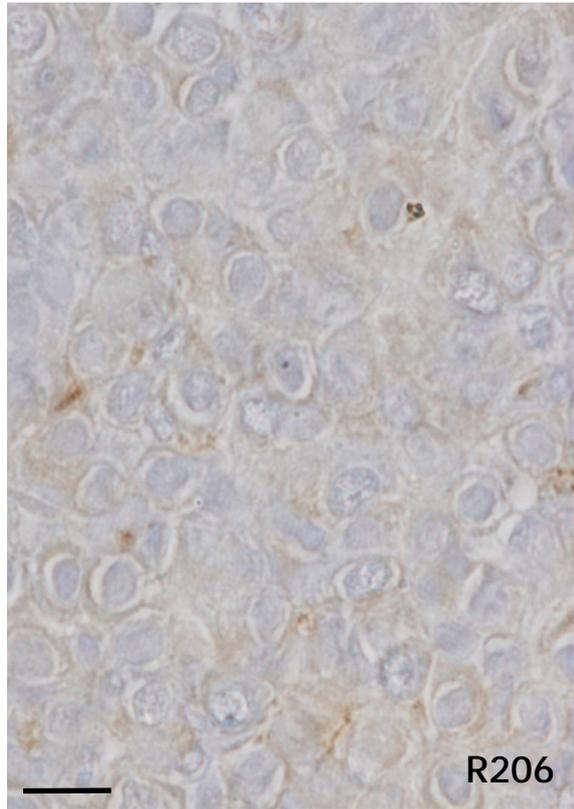
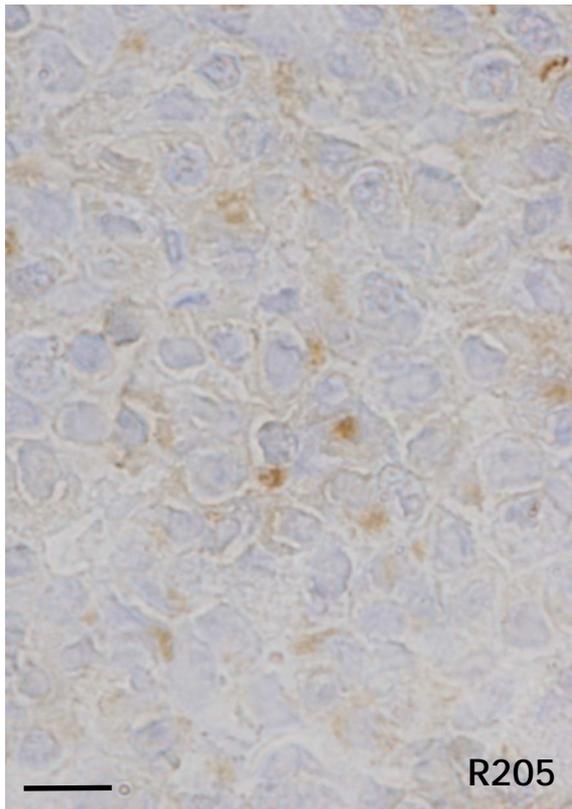


Figura 204. Gráfica que muestra las áreas celular y nuclear de las células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis.
WT: Wild Type, KO: Knock Out. *: $p < 0.001$

A grandes aumentos, llama la atención que la reacción inmunocitoquímica se depositaba formando acúmulos irregulares que no afectaban a la totalidad del citoplasma (figuras 205 a 208).



Figuras 205 a 208. Micrografías panorámicas que muestran el patrón de positividad y distribución de las células positivas a prolactina en la región central lateral de la hipófisis de machos wild type (**figuras 205 y 206**) y knock out (**figuras 207 y 208**).
barra: 10 μ m

Discusión

Comentarios sobre la Metodología empleada.

Gran parte de los objetivos de esta Tesis Doctoral estaban dirigidos a comprobar si el la actuación de la aromatasas P450 influía de manera importante sobre las células hipofisarias productoras de prolactina.

En el estudio hemos utilizado dos tipos de técnicas: inmunocitoquímicas para valorar la especificidad de las células a estudiar, y morfométricas, para comprobar de manera objetiva los cambios habidos en el número de células de prolactina, en su área celular y en su área nuclear.

Por ello en esta discusión, comentaremos estas técnicas, para pasar a comentar después los resultados obtenidos.

Inmunocitoquímica.

Mediante los métodos de la inmunocitoquímica in vivo o in vitro, se pueden caracterizar las células de la hipófisis anterior que contienen hormonas o péptidos.

Para nuestro estudio hemos utilizado el método de la Estrepto-Avidina-Biotina-Peroxidasa (Stav-Pox), considerada una técnica sándwich porque necesita de tres complejos de reacción para su realización.

La Stav-Pox es una variante del método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), más moderna y específica. Emplea un primer antisuero (procedente de ratón o conejo) contra el antígeno que se desea estudiar, semejante a la PAP pero normalmente de 5 a 10 veces más diluido; un segundo antisuero (obtenido generalmente de cabra o cerdo) anti-inmunoglobulina (fracción Fc) del primario y que lleva incorporado a su brazo largo varias moléculas de Biotina (proteína de alta afinidad por las inmunoglobulinas) y, finalmente, un complejo de Estrepto-Avidina conjugado con varias moléculas de peroxidasa, que se une a la Biotina (por la alta afinidad de la Estrepto-Avidina por la Biotina).

Para la conservación de la morfología y de la antigenicidad es fundamental el proceso de fijación. Las características de las reacciones inmunocitoquímicas después del empleo de fijadores diferentes han sido analizadas por muchos autores, como Nakane y col. (1989), Hall y col. (1990), Landerbg y Groos (1991), Golick y Rice (1992).

En nuestro estudio hemos utilizado una solución fijadora ampliamente experimentada en nuestro laboratorio, el paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, como demuestran gran número de publicaciones sobre el estudio inmunohistoquímico de la hipófisis, algunas de las cuales se recogen en este trabajo. Así comprobamos que, aún cuando la cantidad de hormona o péptido era pequeña, dicha solución se revelaba como un excelente fijador para el estudio inmunocitoquímico de las hormonas hipofisarias en el ratón.

Los controles que hemos realizado están enmarcados dentro de los clásicamente descritos: test de dilución (Sternberger, 1979; Petrusz y col., 1976), test de sustitución de

reactivos (Hutson y col., 1979; Forssmann y col., 1981) y, el más común de todos, el test de preabsorción (Hutson y col., 1979; Buffa y col., 1979; Forssmann y col., 1981).

Al sustituir el suero anti-prolactina por tampón de ensayo y por suero normal de conejo, obtuvimos como resultado la abolición total del producto de reacción.

Realizamos controles de dilución tanto para obtener la concentración más adecuada del primer antisuero como para eliminar tinciones de fondo y otras reacciones; después de un meticuloso test de dilución comprobamos que la dilución óptima del suero específico fue de 1:300 para el anti-prolactina.

También hemos realizado preabsorción del suero primario con prolactina (Sigma®) a razón de 10nM/100 µl de suero diluido, y en todos los casos obtuvimos la abolición de la reacción.

De esta manera, en nuestro laboratorio se han caracterizado, mediante su expresión inmunocitoquímica, las células productoras de varias hormonas hipofisarias (Carretero y col., 1989b; 1990b; 1992c; Montero y col., 1990; Rubio y col., 1992; 1994; Sánchez y col., 1993) o productores de péptidos como GRF (Carretero y col., 1991c), somatostatina (Gil, 1992) o VIP (Carretero y col., 1995b; 1997b).

También se pueden detectar enzimas intracelulares mediante inmunohistoquímica, como hemos hecho en nuestro laboratorio con la aromatasas P450 (Carretero y col., 1999a, b; 2003b).

Morfometría y Planimetría.

La segunda técnica empleada en este apartado, la aplicación de métodos cuantitativos morfométricos y estereológicos, intenta resolver el problema de la valoración morfológica subjetiva de la actividad celular. Estos métodos han evolucionado a lo largo de los años; en sus inicios, hace más de treinta años, se empleaban métodos manuales, pero en la actualidad, el empleo de los ordenadores y la digitalización de imágenes permite hacer análisis automáticos o semiautomáticos en los que el operador no interfiere en la medida.

Alrededor de 1850, el geólogo francés Delesse y el microscopista inglés Sorby enunciaron, independientemente, el principio de que el promedio de un área fraccional de un tipo particular de componente, en una sección tomada de un cuerpo sólido, es directamente proporcional a la fracción de volumen de ese componente dentro del cuerpo sólido original (Delesse, 1847; Sorby, 1856).

Estos autores llegaron a esta conclusión por un proceso intuitivo, pero los esfuerzos de expertos en geometría integral y probabilidad han demostrado en varias ocasiones la validez del principio de Delesse (Crofton, 1877; Delthiel, 1926; Bonnesen y Fenchel, 1934; Santalo, 1936; Blaschke, 1949).

Mayhew y Cruz (1973) transformaron el principio de Delesse mediante la consideración de un modelo de esfera concéntrica (toscamente similar a una célula) y consiguieron formulaciones bastante claras de esta relación.

Otros autores también han dejado claro que las ecuaciones usadas en estereología son mera manifestación de un área mucho más amplia de las matemáticas, que se ha denominado geometría multidimensional (Miles, 1972) o simplemente probabilidad geométrica (Little, 1974).

La estereología, término acuñado por la Sociedad Internacional de Estereología (ISA) en 1961, está basada en la probabilidad geométrica y permite la evaluación de estructuras tridimensionales por extrapolación de mediciones realizadas en secciones bidimensionales, tras la aplicación de medidas llevadas a cabo en secciones bidimensionales y axiomas estereológicos, consiguiendo la medida de volumen, superficie y número de tejidos y componentes celulares con microscopía óptica o electrónica (Rohr y col., 1978).

Los métodos estereológicos son aquellos que se usan para derivar información tridimensional a partir de la consideración de imágenes bidimensionales. En sentido amplio, esto incluirá métodos de reconstrucción tridimensional usando secciones seriadas así como métodos cuantitativos extrapolables tratados con determinaciones numéricas. Este último concepto ha sido denominado estereología cuantitativa (Underwood, 1970).

Existen bastantes revisiones y artículos que han tratado más a fondo estos temas y, entre ellos, destacamos los de Loud y col. (1965), Weibel y col. (1966), Weibel (1969), Elias y col., (1971), Weibel y Bolender (1973) y Elias y Hide (1980).

Los parámetros abiertos a estudio por los métodos estereológicos incluyen: volúmenes y áreas de superficie de componentes fraccionarios, volúmenes medios, áreas de superficie medias y densidad numérica de diferentes partículas o células dentro de un tejido, así como el tamaño y número de las mismas. Estos volúmenes, áreas, números y tamaños pueden ser estimados a partir de células o tejidos, o bien a partir de porciones de los mismos.

En estereología estricta, los valores para un componente dado son expresados como densidades que relacionan su volumen, superficie o número, con la unidad de volumen de una superficie de referencia dada. En morfometría simple, los valores se expresan como la media aritmética de una población de valores que resulta de tratar estadísticamente las áreas o números referidos a áreas o a poblaciones totales de un parámetro concreto.

Los efectos de tratamientos experimentales sobre la estructura celular y el curso a lo largo del tiempo de distintos eventos morfológicos, pueden ser constatados de forma precisa por medio del volumen, superficie o número de células o de sus organelas. Con ello se evitan en gran medida los aspectos subjetivos y se pueden obtener datos cuantitativos fiables y comparables. Por ello, los métodos estereológicos y morfométricos representan un avance importante en la microanatomía y en la investigación básica morfológica en neuroendocrinología.

En nuestro laboratorio, han sido empleados en numerosas ocasiones técnicas y métodos estereológicos o morfométricos para el estudio de la hipófisis con gran eficacia y precisión, determinando el área celular y el área nuclear de forma semejante a como se ha realizado en este trabajo.

Es obvio que, para determinar la fracción celular en un tejido (porcentaje de células inmunopositivas y densidad numérica, en nuestro caso) es muy importante considerar el método empleado para su cuantificación. Los métodos histológicos suelen manejar muchas menos células que la citometría de flujo.

La cuantificación normal a través de microscopio es un método seguro si analiza un número suficiente de células, aunque tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo, tanto más cuanto mayor sea la población celular considerada (Barnard y col., 1987; Sheperd y col., 1988; Karamitopoulou y col., 1993).

El mayor problema radica en dilucidar cuántas células es necesario contar. Distintos estudios tratan de valorar esta aproximación (Aherne y col., 1977, 1982; García y col., 1987); habiendo empleado métodos semicuantitativos (Gatter y col., 1986; García y col., 1989), así como el análisis de imagen (Schwartz y col., 1989).

En nuestro caso, hemos optado por la cuantificación manual en campos de grandes aumentos para determinar la fracción positiva a prolactina, estimando que 4000 células por región de la hipófisis, elegidas aleatoriamente, fue un número suficiente para obtener resultados fiables estadísticamente.

Como comprobaremos al comentar los efectos de los distintos grupos de estudio, el marcaje inmunocitoquímico ha permitido comprobar claramente los efectos sobre las células hipofisarias que tienen las situaciones experimentales en nuestro estudio.

Los ratones knock out para la aromatasa (ArKO).

Un detalle importante, dentro del diseño experimental, es el modelo animal que hemos empleado y su aceptación y validación internacional como animal de experimentación.

Para entender la validación del modelo y su elección para la realización de este estudio, en este capítulo de discusión, incluimos los hallazgos bibliográficos que relacionan en la literatura a la aromatasa con la regulación de la prolactina y, por tanto, de las células hipofisarias que la producen.

En el cerebro existen grandes concentraciones de estrógenos que se sintetizan localmente gracias a la presencia de aromatasa (Cornil y col., 2006). La actividad de este enzima puede ser modulada rápidamente (en minutos o incluso segundos) por medio de neurotransmisores (Hojo y col., 2004; Balthazart y col., 2006a; Balthazart y col., 2006b). Este mecanismo origina cambios rápidos y transitorios en la concentración local de estrógenos a nivel del cerebro.

Se ha descrito la presencia de aromatasa en el hipotálamo, concretamente en el núcleo preóptico medial (Balthazart y col., 1993).

En los ratones ArKO hembras el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal está alterado debido a la deprivación de estrógenos. Estos animales presentan concentraciones de gonadotropinas más elevadas que los ratones wild type (wt), probablemente como

resultado de esta ausencia de retroregulación negativa, ya que cuando se les administra una dosis baja de estradiol la concentración de LH plasmática disminuye hasta niveles fisiológicos (Britt y col., 2000, Liew y col., 2010).

Los ratones ArKO hembra son infértiles debido a la alteración de la folículoogénesis y a la incapacidad para ovular, como muestra la ausencia de cuerpos lúteos. La anovulación puede deberse también a los niveles persistentemente elevados de LH y a la ausencia del pico preovulatorio de esta. Fruto de esta exposición crónica a la LH, sus ovarios presentan hiperplasia del estroma y quistes hemorrágicos (Britt y col., 2000).

Puede concluirse, por tanto, que el fenotipo ovarico de los ratones ArKO puede atribuirse a un ambiente hormonal alterado fruto de la ausencia de aromatasa que impide la conversión de andrógenos a estrógenos. Sin embargo, esta morfología no concuerda exactamente con la del síndrome de ovario poliquístico (SOP) de los humanos, porque no presentan engrosamiento de la teca interna.

Esta infertilidad, junto a las alteraciones testiculares de los machos ArKO que también les hace infértiles nos ha obligado a utilizar progenitores heterocigóticos para obtener ratones machos y hembra ArKO para nuestro estudio.

En los ratones ArKO machos los niveles séricos de testosterona son más altos que en los wild type, y esta diferencia se mantiene en todas las edades (Fisher y col., 1998). En primates y perros, la supresión de la aromatización origina un aumento de la concentración de LH (Trunet y col., 1993).

En las ratas macho la situación parece ser diferente, ya que la administración de un inhibidor de la aromatasa no esteroideo durante un corto periodo de tiempo produce un aumento de la FSH pero no altera las concentraciones plasmáticas de LH. Además, el aumento de la FSH ocurre en ausencia de cambios detectables en la concentración de estradiol, por lo que cabría pensar que este *feed back* negativo se lleva a cabo por medio de la aromatización local de la testosterona dentro del hipotálamo y la hipófisis.

In vitro, los inhibidores de la aromatasa, como el fadrozol, inducen un descenso del tamaño de las células de prolactina que también presentan un descenso de su proliferación (Carretero et al., 2013).

Los hallazgos que acabamos de detallar ponen de manifiesto que el modelo experimental empleado en nuestro estudio es un modelo aceptado y validado para el estudio de la hipófisis reproductora y, en particular, para el estudio de las células hipofisarias productoras LH.

Siendo este el primer estudio realizado sobre los cambios que acontecen en este tipo celular hipofisario ante la ausencia total de estrógenos por no producirse la aromatasa P450. Lo que le da una gran importancia en la investigación traslacional y otorga el carácter de originalidad que debe aportar todo trabajo de Tesis Doctoral.

Comentarios sobre los resultados obtenidos.

Ausencia de la aromatasa P450 y génesis de adenomas hipofisarios.

En general, los adenomas pituitarios constituyen el 15% de los tumores intracraneales. Aunque se consideran benignos, son causa de una morbilidad importante debido, al incremento de secreción hormonal y a una posible compresión de estructuras vecinas a la silla turca (Asa y Ezzat, 1998; Kaltsas y Grossman, 1998; Levy y Lightman, 2003; Ragel y Couldwell, 2004; Horvath y Kovacs, 2008).

Según Asa y Ezzat (1998) y Kovacs y col. (2001) y teniendo en cuenta las características morfológicas y secretoras de la adenohipófisis, se diferencian los siguientes tipos de adenomas, por orden de frecuencia: Prolactinomas (si hay exceso de secreción de hormona prolactina), GHomas o somatotrofinomas (exceso de secreción de hormona GH, unido normalmente a la enfermedad de acromegalia o gigantismo), ACTHomas (unido a la secreción de hormona ACTH en enfermedad de Cushing), adenomas no funcionantes (o adenomas que no presentan exceso de secreción de ninguna hormona, ni signos endocrinológicos) y los menos frecuentes, los adenomas que secretan TSH, gonadotropinas o bien aquellos que secretan más de una hormona. Sin embargo, los adenomas pituitarios pueden ser muy heterogéneos y con dificultad de tipaje en muchos casos (Kovacs y col., 2001).

En la clasificación de los adenomas antes expuesta, también se ha de tener en cuenta, la llamada secreción paradójica (Cantalamesa y col., 1976; De Marinis y col., 1990). La secreción paradójica es aquella que se produce cuando una célula adenohipofisaria determinada responde a una hormona hipotalámica que no es la específica de dicha célula; ello es debido a que la adenohipófisis contiene, además, algunas células multifuncionales de secreción no ortodoxa, que elaboran dos hormonas adenohipofisarias (células polihormonales) y que responden a varias hormonas hipotalámicas liberadoras (células de múltiple respuesta); este tipo celular puede estar involucrado en la secreción paradójica y además, en la llamada “transdiferenciación” o cambio en el fenotipo celular de estas células, sin que exista división celular (Losa y col., 1985; Cordido y col., 1994; Ámsterdam y col., 1982; Fischer y col., 1992; Villalobos y col., 2004).

Los tumores hipofisarios, fundamentalmente los adenomas, constituyen entre el 10 y el 15% de todos los tumores intracraneales (Ishibashi y Yamaji, 1985; Sarkar, 2006). Los prolactinomas son los adenomas más frecuentes y son considerados como tumores monoclonales, que afectan a una sola estirpe celular de la hipófisis, las células de prolactina (Prezant y Melmed, 2002; Clayton y Farrel, 2004) lo que sugiere que pueden existir factores moleculares intrínsecos en las células de prolactina que darían origen al tumor.

Los adenomas pituitarios productores de gran cantidad de Prolactina se denominan prolactinomas y son de los más numerosos. Son los más frecuentes de la hipófisis

(Ishibashi y Yamaji, 1985). Uno de cada 2800 hombres y una de cada 1050 mujeres se considera que poseen prolactinomas. Entre ellos tenemos los adenomas y los carcinomas secretores de Prolactina. Se admite también que algunos pacientes con acromegalía, son portadores de adenomas mixtos, al segregar hormona del crecimiento y prolactina (Sarkar, 2006).

Como hemos dicho antes, los adenomas son tumores benignos y los carcinomas presentan malignidad. La iniciación, desarrollo y progresión de los adenomas y su posible paso a carcinomas hipofisarios, no es del todo conocida (Donangelo y Melmed, 2008); Una alteración del ciclo celular, la angiogénesis (Melmed, 2003; Levy y Lightman, 2003; Scheithauer y col., 2006), así como de determinados cambios moleculares en diversas proteínas están siendo analizados.

Los adenomas pueden ser considerados, como funcionantes, si secretan gran cantidad de hormona o como endocrinológicamente inactivos al no secretar hormonas u hormonas inactivas. Además, según el tamaño, como microadenomas y como macroadenoma; si su diámetro es mayor de 1 cm hablamos de macroadenoma y, en caso contrario, como microadenoma, no importando los datos endocrinos que presenten, según Bevan (2008). La macroadenomas se diagnostican bien mediante técnicas de imagen, mientras que los microadenomas es más complicado, necesitando medios adecuados para obtener imágenes de gran resolución; sin embargo, mediante técnicas bioquímicas el diagnóstico es fácil y sencillo.

El patrón de crecimiento de estos tumores puede ser, expansivo, dando lugar a un crecimiento de la masa tumoral que, a su vez, provoca un aumento de presión sobre el tejido normal de la hipófisis y sobre la silla turca; también puede ser un crecimiento invasivo, rápido, alcanzando no solo el tejido normal de la glándula sino también la dura madre y estructuras parasellares, como el seno esfenoidal y seno cavernoso e incluso alcanzar el quiasma óptico y provocar alteraciones en el campo visual del paciente. Es muy raro que alcance la fosa posterior o la nasofaringe (Kovacs y col., 1991; Vance, 2003; Kovacs y Horvath, 2005).

El problema de la vascularización es un hecho constatado en diversos tumores. Se admite que la vascularización es menor en los tumores hipofisarios en relación con las hipófisis normales, cosa que no ocurre en otros tipos de tumores, como el de próstata, mama, estómago, donde hay un incremento de la angiogénesis; sin embargo, concretamente en los prolactinomas, la vascularización es más manifiesta que en otros tumores hipofisarios, como los adenomas que producen las hormona GH o FSH (Turner y col., 2003).

Tanto los macroprolactinomas, los prolactinomas invasivos o los carcinomas tienen una densidad de vasos superior a los que poseen los microadenomas, adenomas no invasivos u otros adenomas hipofisarios. Ello puede darnos una pista sobre un origen diferente de los microadenomas y macroadenomas (Turner y col., 2003).

La iniciación, desarrollo y progresión de los adenomas y su posible paso a carcinomas hipofisarios, no es muy conocida (Donangelo y Melmed, 2008).

Los factores que pueden dar lugar a la génesis de los adenomas en general y de los prolactinomas en particular son múltiples. Se sabe que, en general, el envejecimiento es causa de la aparición de adenomas; se ha comprobado en ratas viejas, aunque dependiendo de la cepa estudiada, la existencia de adenomas hipofisarios espontáneos en ratas maduras, la mayoría prolactinomas, entre un 10 y un 86% (Sarkar y col., 1983). En nuestro laboratorio hemos encontrado un porcentaje alto de adenomas espontáneos en ratas viejas, siendo la mayoría prolactinomas (Carretero, 2002).

Los estrógenos han sido muy estudiados como causa de inducción de tumores hipofisarios productores de prolactina (Sadoul y col., 1992). En ratas de ambos sexos, elevados niveles de estrógenos en suero y durante largos periodos de tiempo, causan hiperplasia y/o adenomas (DeNicola y col., 1978; Wicklund y col., 1981).

En humanos transexuales, que recibieron fuertes dosis de estrógenos, aparecieron prolactinomas (Gooren y col., 1988) Y existen evidencias claras de un crecimiento, tanto de micro como de de macroprolactinomas, durante la terapia con estrógenos (García y Kapcala, 1995).

Mujeres que tomaron contraceptivos orales mostraron niveles altos de PRL (Carol y col., 1988) y aquellas que tomaron estrógenos para el tratamiento de irregularidades en la menstruación, la incidencia de prolactinomas fue de 7 a 8 veces más alta (Shy y col., 1983). Estos datos sugieren que algunas mujeres son más sensibles a los efectos lactogénicos de los estrógenos exógenos y pueden tener más riesgo del desarrollo de prolactinomas (Luciano y col., 1985) lo que sugiere una base génica predeterminante.

Las células de secreción paradójica debido a la transdiferenciación, como antes apuntábamos, pudieran ser un factor de iniciación de los adenomas hipofisarios (Senovilla y col., 2004).

Otro factor a tener en cuenta, es una más de las causas que se señalan en la génesis de los adenomas es la angiogénesis (Melmed, 2003; Levy y Lightman, 2003; Scheithauer y col., 2006). Es cierto que la vascularización es menor en los tumores hipofisarios en relación con las hipófisis normales, cosa que no ocurre en otros tipos de tumores, como el de próstata, mama, estómago, donde hay un incremento de la angiogénesis; sin embargo, la vascularización en los adenomas que segregan PRL es más manifiesta que en otros tumores hipofisarios, como los adenomas que producen la hormona GH o FSH (Turner y col., 2003).

Un posible paso de adenomas a carcinomas no es descartado en su globalidad. Si hablamos de la génesis de los carcinomas pituitarios se consideró que los medios terapéuticos empleados para extirpar los adenomas hipofisarios, tales como la hipofisectomía transfrontal o transesfenoidal o la radioterapia, eran la causa de dichos tumores; sin embargo, no hay ninguna evidencia que demuestre este punto de vista (Kaltsas y Grossman, 1998; Ragel y Couldwell, 2004; Taylor y col., 1994; Brada y col., 1992).

Una presentación de los carcinomas sin ningún antecedente previo no puede excluirse (Nose-Alberti y col., 1998; Roncaroli y col. 2003); la transformación de los macroadenomas en carcinomas necesita un largo tiempo de evolución (Wilson, 1982;

Mountcastle y col. 1989; Pernicone y col., 1997; Kaltsas y Grossman, 1998; LLOYD y col. 2004) con la consecuente aparición de modificaciones genéticas (Mountcastle y col., 1989; Kaltsas y Grossman, 1998; Ragel y Couldwell, 2004), sabiéndose que en el primitivo estado proliferativo aparezcan mutaciones monoclonales o policlonales y alteraciones de oncogenes, así como de genes supresores de tumores (Kaltsas y Grossman, 1998; Zahedi y col., 2001; Asa y Ezzat, 2002).

Las alteraciones genéticas están involucradas en la génesis y progresión de los prolactinomas, incluyendo la pérdida de genes supresores de tumores, la sobreexpresión de oncogenes y la expresión anormal de proteínas y moléculas intrínsecas, que mantienen la estabilidad de los cromosomas.

En el trabajo que presentamos hemos realizado, con el objeto de poder añadir algún dato nuevo en el conocimiento de la génesis de los adenomas hipofisarios, la relevancia que puede tener la aromatasa en la génesis de los adenomas hipofisarios productores de prolactina —prolactinomas—, que se desarrollan espontáneamente en el envejecimiento de los roedores.

En este aspecto, el estudio que presentamos es una parte de otro más amplio desarrollado dentro de nuestro Departamento, por supuesto con el mismo objetivo, el estudio de la génesis de los adenomas humanos.

En adenomas espontáneos de rata, Carretero y colaboradores (2002) demostraron que la aromatasa P450 se sobreexpresaba en la totalidad de los prolactinomas. Más recientemente (Carretero y col., 2013) estudiando adenomas hipofisarios humanos no inducidos se comprobó que dentro de una serie de 87 adenomas humanos no inducidos el 55% de ellos (48 tumores) fueron PRL positivos y que todos los prolactinomas estudiados fueron aromatasa positivos. Además, el grado de proliferación y apoptosis en estos tumores dependía de la localización del coactivador estrogénico AIB1, ligado a receptor estrogénico α .

El nuevo dato que aportamos a este respecto es que los animales knock out para la aromatasa, ya sean machos o hembras, no desarrollan adenomas hipofisarios espontáneos, al menos a las edades de aparición en los animales wild type, lo que vuelve a poner de manifiesto la relevancia del papel que la aromatasa puede desempeñar en la génesis de estos tumores.

Prolactinomas y Aromatasa.

La biosíntesis de estrógenos está catalizada por un enzima conocido como aromatasa P450 (Thomson y Siiteri, 1974a; Mendelson y col., 1985; Nakajin y col., 1986; Kellis y Vickery, 1987). La aromatasa P450 es el producto de la expresión del gen CYP19 (Nelson y col., 1993).

EL CYP19 es un miembro de la superfamilia de genes P450, formada a su vez por más de 300 miembros repartidos en unas 36 familias de genes (Nelson y col., 1993). Todos ellos dan lugar a enzimas, caracterizados por catalizar la inserción de átomos de oxí-

geno, derivados del oxígeno molecular, dentro de moléculas orgánicas para dar lugar a la formación de grupos hidroxilos; por ello, la familia de proteínas citocromo P450 son monooxigenasas que catalizan muchas reacciones implicadas en el metabolismo de drogas y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos.

En el caso de la aromatasa P450, el oxígeno molecular da lugar a la pérdida del grupo metilo angular C19 del substrato esteroideo para transformarlo en ácido fórmico a la vez que se produce la aromatización del anillo A para transformarlo en el anillo fenólico A, típico de los estrógenos (Thompson y Siiteri, 1974b).

Los diferentes transcritos de la aromatasa derivados del gen CYP19, derivan de la expresión de los 9 exones del gen, comenzando a partir del exón II; mientras que la región 5' de los transcritos es diferente dependiendo del tejido en el que se sintetiza la aromatasa, dependiendo del promotor que actúe; los promotores son diferentes de unos tejidos a otros y son regiones no trasladadas del exón I (Means y col., 1991; Kilgore y col., 1992; Toda y Shizuta, 1993).

La síntesis de aromatasa en la placenta está dirigida por un promotor distal muy potente el promotor I.1 (Means y col., 1991; Jenkins y col., 1993); en el ovario está dirigida por el promotor II; mientras que en el tejido adiposo lo está por el promotor I.4 (Meandro y col., 1991, 1993; Harada y col., 1993). En el cerebro, actúa el promotor 1f, de forma específica, al menos, en el hipotálamo y la amígdala (Honda y col., 1994).

Aunque los transcritos en los diferentes tejidos presentan un terminal 5' diferentes, al no ser trasladados, la proteína final resultante es siempre la misma, independientemente del lugar de producción.

La transcripción del gen puede originar dos variantes, en la variante 1 no se produce la transcripción del exón 2a y, como resultado, el transcrito tiene un UTR 5' más corto que el transcrito de la variante 2. No obstante, como ya hemos comentado antes, la proteína resultante de ambos transcritos es idéntica.

El exón I presenta un elemento de respuesta a glucocorticoides (también puede ser para los andrógenos), un lugar Sp1 de unión, un lugar de activación para interferón- γ , el elemento GAS y un receptor soluble para interleucina-6.

La estimulación de las células por factores como IL-6, IL-11 y oncostatina-M, en presencia de glucocorticoides, da lugar a la fosforilación de residuos de tirosina en Jak1 y a la fosforilación de STAT3 que se une al elemento GAS del promotor (Zhao y col., 1995).

La transcripción normal del gen da lugar a un transcrito de casi 3 Kb cuya secuencia en la especie humana es:

```
1      GCGGTGTCAGAAACCCTGTGGTGAATTCAGCCTGTGGATTCCAGAAATTTGGAGTGTC
61     TTGGGGGGGAAAAATCCGCACACACAAAAGCAACATTTGGAAATCCCTGTGGACTCTAAATT
121    GCCCCTCTGAGGTCAAGGAACACAAGATGGTTTTGGAAATGCTGAACCCGATACATTAT
181    AACATCACCAGCATCGTGCCTGAAGCCATGCCTGCTGCCACCATGCCAGTCCCTGCTCCTC
241    ACTGGCCTTTTCTCTTGGTGTGGAATTATGAGGGCACATCCTCAATACCAGGTCTGGC
301    TACTGCATGGGAATTGACCCCTCATCTCCACGGCAGATTCCTGTGGATGGGGATCGGC
361    AGTGCCTGCAACTACTACAACCGGATATATGGAGAATTCATGCGAGTCTGGATCTCTGGA
421    GAGGAAACTCATTATCAGCAAGTCTCAAGTATGTCCACATAATGAAGCACAATCAT
481    TACAGCTCTCGATTCCGCAGCAAACCTGGGCTGCAGTGCATCGGTATGCATGAGAAAGGC
```

541 ATCATATTTAAACAACAATCCAGAGCTCTGGAAAACAACTCGACCCTTCTTTATGAAAAGCT
601 CTGTCAGGCCCGCCCTTGTTTCGTATGGTCACAGTCTGTGCTGAATCCCTCAAAAACACAT
661 CTGGACAGGTTGGAGGAGGTGACCAATGAATCGGGCTATGTGACGTTGACCCCTTCTG
721 CGTCGTGTATGCTGGACACCTTAACACGCTCTTCTTGAGGATCCCTTTGGACGAAAAGT
781 GCTATCGTGGTTAAAATCCAAGGTTATTTGATGTCATGGCAAGCTCTCCTCATCAAAACA
841 GACATCTCTTTAAGATTCTTGGCTATACAAAAGTATGAGAAGTCTGTCAAGGATTTG
901 AAAGATGCCATAGAAAGTTCTGATAGCAGAAAAAGACCGAGGATTTCCACAGAAGAGAAA
961 CTGGAAGAATGTATGGACTTTGCCACTGAGTTGATTTAGCAGAGAAAACGTGGTGACCTG
1021 ACAAGAGAGAATGTGAACCAGTGCATATTGGAATGCTGATCGCAGCTCCTGACACCATG
1081 TCTGTCTCTTTGTTCTTCATGCTATTCTCATTGCAAAGCACCCCTAATGTTGAAAGAGGCA
1141 ATAATAAAGGAAATCCAGACTGTTATTGGTGAGAGAGACATAAAGATTGATGATATACAA
1201 AAATTTAAAGTGATGGAAAACCTCATTATGAGAGCATGCGGTACCAGCCTGTCGTGGAC
1261 TTGGTCAATGCGCAAAGCCTTAGAAGATGATGTAATCGATGGCTACCCAGTGAAAAAGGGG
1321 ACAAACTATTCTGAAATTTGGAAGGATGCACAGACTCGAGTTTTCCCAAACCCAAT
1381 GAATTTACTCTTGAAAATTTTGCAAAGAATGTTCCCTATAGGTAATTTTCAGCCATTTGGC
1441 TTTGGGCCCGTGGCTGTGCAGGAAAGTACATCGCCATGGTGTATGATGAAAGCCATCCT
1501 GTTACACTTCTGAGACGATTCACGTGAAGACATTGCAAGGACAGTGTGTTGAGAGCATA
1561 CAGAAGATACACGACTTGTCCCTTGCAACCCAGATGAGACTAAAAACATGCTGGAAATGATC
1621 TTTACCCCAAGAACTCAGACAGGTGTCTGGAACACTAGAGAAGGCTGGTCACTACCCAC
1681 TCTGGAGCATTTCTCATCAGTAGTTCACATACAAATCATCCATCCTTGCCAATAGTGTC
1741 TCCTCACAGTGAACACTCAGTGGCCATGGCATTTTATAGGCATACCTCCTATGGGTTGT
1801 CACCAAGCTAGGTGCTATTTGTCATCTGCTCCTGTTACACCAGAGAACAGGCTACAAG
1861 AGAAAAAGCAGAGGCCAAGAGTTTGGAGGAGAAATAGTCGGTGAAGAAACCGTATCCATA
1921 AAGACCCGATTCACCAAAATGTGCTTTGAGAAGGATAGGCCTTATTAACAAAATGTATG
1981 TCTGGTTCCCAAGTAGAGCTCTACTGCCTCAACCCAAGGGGATTTTATGCTGGGGCAG
2041 AAACACTCAAGTTGATAGAAAGACCAGGCCAATGTGAGGGTACCTGGGGCCAAACCCAC
2101 CTGCTAGTGTGAATTAAGTACTTTAATTTTGTCTGTGAGGTTGAAAAGCAACATT
2161 CATAGTCTTTGGAGAATGCTTAGAAATTCAGCATTGACCCTTGTGTGAATTAAGCCC
2221 AATTAATTCCTGTTTGTCTACATATGATCTGTCTGTGGCAAAAAGTTAATCAGAGGAAAT
2281 TCTTTCCAGTCTGTCGATTTATGCCTCAGCCACTGCTGTGCTACAATTCATTGTTGTT
2341 ACCTGTAGATTACAGTAATACAACTATATATAATCATCAAGTAATACAACTAATTTAG
2401 TAATAGCTGGGTTAAGTATTATTAGGGCCCTGTGTCTGCTGTAGAAAAAAAATTCACA
2461 TGATGCACCTCAAATCAAATAAAAATCCTTTGGCATGTTCCCATTTTGTCTAGCTCA
2521 ATTAGTGTGGCTAACCAAGAGATAACTGTAATGTGACATTGATTGCTCTTACTACAGC
2581 TTCAGTGATTGGGGGAGGAAAAAGTCCCAACCCAATGGGCTCAAACCTCTAAGGGGTACTC
2641 CTCTCATCCCCTATCCTTCTCCCTCGACATTTCTCCCTCTTCTTCCATGACCCCAA
2701 AGCCAAAGGGCAACAGATCAGTAAAGAACGTTGGTCAAGATGAGAACCCCTGAAAGTATTTTT
2761 AATCCTACCTCAAATTAACAGTTACCTGAGAGATTTAACATTATCTAGTTCATTGAAT
2821 CATTGTATGTGGTCATGGATAAATTGCACACCTTGAATTCGCTTTCTAAAGGAAATCAA
2881 ATGAATGGAGGAACTTTCCAAACACCACTTTACTTGTGTTATATAGCCAAATATACTATC
2941 TCTACTGAATGTCATTGAAAACTAAAAATTAACCTATTTACAATAGGT

La traslación del mRNA da lugar a una proteína con un peso molecular de 57.752 Kb, formada por 503 residuos aa., cuya secuencia es:

1 mvlemlnph ynitsivpea mpaatmpvll ltglflvwn yegtssippg gycmgigpli
61 shgrflwmgi gsacnynrv ygefmrwv geetliisks ssmfhimkhn hyssrfgskl
121 glqicgmhek giifnnpel wktrpffmk alsppglvrn vtvcaeslkt hldrleevtn
181 esgyvdvltl lrrvmldtsn tflriplde saivkiqgy fdawqallik pdiffkislw
241 ykkyeksvkd lkdaievlia ekrrristee kleecmdfat elilaekrgd ltrenvnqci
301 lemliapdt msvslffmlf liakhpvnee aiikeiqvti gerdikiddi qklkvmenfi
361 yesmryqpvv dlvmrkaled dvidgypvkk gtniilnigr mhrleffpkp neftlenfak
421 nvpyryfqpfg fgprgcagk yiamvmmkai lvtllrrfhv ktlqgqcvcs iqkhdslsh
481 pdetknmlem iftprnsdrc leh

(PubMed-Protein, n° de acceso: NP000094)

Los residuos 48-485 son los que la definen como una proteína perteneciente a la familia del citocromo P450, y el residuo 437 es el “heme binding site”.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio habíamos demostrado la existencia de la Aromatasa en la hipófisis de rata mediante técnicas inmunocitoquímicas (Carretero y col. 1999a y b, 2002, 2003b) y la habíamos relacionado con la génesis de los prolactinomas en roedores (Carretero y col., 2002) y en humanos (Carretero y col., 2013).

Se ha demostrado, en roedores, que los adenomas hipofisarios espontáneos son frecuentes al avanzar la edad del animal (Berkvens y col., 1980; McComb y col., 1984; Herzog y Schlote, 1992) y, dentro de ellos, los prolactinomas tienen la mayor incidencia, llegando en algunas series a alcanzar hasta un 80% de las ratas de edad avanzada (Meites, 1982; Sarkar y col., 1982).

Se sabe que la manipulación experimental de la regulación dopaminérgica y estrogénica de la célula de prolactina da lugar a que la dopamina anule el efecto proliferativo del estradiol (McComb y col., 1986; Phelps e Hymer, 1988; Kovacs y col., 1991) y a que los estrógenos y los antagonistas dopaminérgicos se sumen sinérgicamente para inducir dicha proliferación y, quizás tras una hiperplasia previa, inducir la aparición de prolactinomas (Pérez y col., 1986; Pasolli y col., 1992; Oliveira y col., 1996; Southgate y col., 2000).

En nuestro laboratorio, como resultado de diversos proyectos de investigación, se ha demostrado que la hipófisis de ratas adultas presenta aromatasa en algunas de sus células y que la presencia del enzima es mucho más alta en machos que en hembras (Carretero y col., 1999a y b), siendo el primer hallazgo en este sentido publicado a nivel mundial.

Este estudio se continuó con un análisis realizado con inmunohistoquímica, hibridación in situ y western blotting, sobre la expresión hipofisaria de la aromatasa. Con un anticuerpo altamente específico para la aromatasa de rata se demostró que además del dimorfismo sexual observado en la rata adulta, existe una expresión diferencial dependiendo de la edad del animal: Prenatalmente, su expresión comienza en el día 17 del desarrollo, se mantiene en etapas postnatales tempranas, expresándose igual en machos que en hembras. Prepuberalmente, la expresión disminuye en hembras y se mantiene en machos y, en la rata adulta, apenas se expresa en la hembra, pero sí en el macho (Carretero y col., 1999b, 2003b).

Además, se comprobó que las hipófisis no tumorales de ratas viejas no expresan el enzima, mientras que un porcentaje muy alto de los adenomas espontáneos que aparecen en estos animales sí lo expresan, lo que sugiere que dicha expresión podría guardar estrecha relación con el tumor. Así, de una serie de 105 adenomas espontáneos de hipófisis de rata, el 66%, fueron inmunorreactivos a la aromatasa, sin que ello guardara relación con el tipo anatomopatológico del adenoma.

Considerando solo los prolactinomas (adenomas productores de prolactina), el 86.67% presentaron reacción a la aromatasa, llamando la atención que el 100% de los prolactinomas puros (adenomas que solo producen prolactina) fueron aromatasa positivos, mientras que solo el 60% de los múltiples (adenomas que producen prolactina y otras hormonas) expresaron el enzima (Carretero y col., 2002).

Estos últimos hallazgos sugerían que la producción local de estradiol a partir de testosterona, por actuación de la Aromatasa, podría estar implicada en la génesis de dichos tumores.

Nuestro trabajo corrobora los resultados anteriores demostrando que la ausencia de aromatasa P450 en los ratones ArKO se acompaña de la ausencia de desarrollo de los prolactinomas espontáneos observados en los ratones wild type. Lo que sugiere que la aromatasa P450, metabolizando la Testosterona a Estradiol, estaría implicada en la génesis y desarrollo de los prolactinomas.

Prolactina y Aromatasa.

También en nuestro laboratorio, se ha comprobado que la aromatasa hipofisaria juega un importante papel regulador fisiológico de la función y estructura de las células de prolactina (Carretero et al., 2014).

La relevancia fisiológica de la presencia de la aromatasa en la hipófisis y, por tanto, de la posible aromatización de la testosterona a estradiol podría explicar por qué el estradiol a dosis mayores a las tasas séricas en machos, causa claros efectos sobre la regulación hormonal, la morfología y la proliferación celular en la hipófisis (Carretero y col., 1990a, 1991b, 1992a, 1995b; Rubio y col., 1992; Sánchez y col., 1993). Todos esos efectos podrían ser explicados por la presencia del enzima en la hipófisis de la rata macho.

Además, el estradiol es un importante regulador de la prolactina hipofisaria; está bien documentado en la literatura que el estradiol induce aumentos de la secreción de la hormona (MacLeod y col., 1969; Maurer y col., 1977; Lieberman y col., 1979; Pierce y Shin, 1980; Burdman y col., 1984; Pérez y col., 1986).

Estos efectos se acompañan de cambios morfológicos como aumento del número de células productoras de prolactina (Pérez y col., 1986) e hipertrofia de las organelas celulares (Hymer y col., 1961; Smith and Farquhar, 1966; Pantic y Genbacev, 1969, 1972; Saunders y col., 1983; Torres and Aoki, 1987; Carretero y col., 1991b).

Además, el estradiol induce la proliferación de las células de prolactina (Takahashi y col., 1984; Sakuma y col., 1984; Pérez y col., 1986).

El estradiol, al margen de su actuación directa sobre las células de prolactina, podría actuar indirectamente sobre ellas, ya que induce aumentos de reguladores auto-paracrinós de la hormona como el VIP (Lam y col., 1990; Carrillo and Phelps, 1992; Hammond y col., 1997; Vázquez, 1994; Carretero y col., 1995a; Carretero y col., 1998) o la galanina (Hyde y col., 1991).

En el presente estudio, hemos encontrado cambios muy significativos en las células hipofisarias positivas a prolactina. Entre ellos destacan: variaciones e la localización citoplásmica y descensos en la intensidad de la reacción citoplásmica inmunocitoquímica, el descenso en el porcentaje de las células positivas a prolactina y descensos en el tamaño de las áreas celular y nuclear de estas células.

Todos estos hallazgos sugieren un descenso en la actividad de las células de prolactina en los animales ArKO, frente a los animales wild type.

Las diferencias en la intensidad de reacción citoplásmica podrían ser explicadas como consecuencia a una disminución en la cantidad de hormona almacenada intracelularmente, como previamente se demostró en nuestro laboratorio para este mismo tipo de células (Carretero y col., 1988).

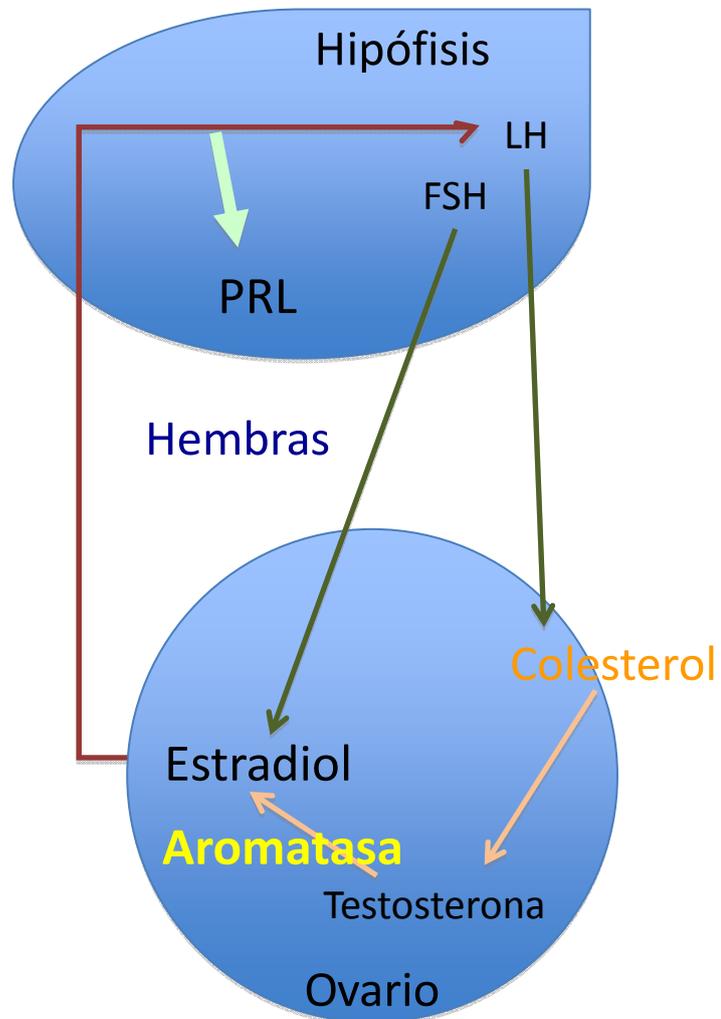
Los descensos en las áreas celular y nuclear, conjuntamente, soportan la idea de que la actividad y la proliferación de las células de prolactina están disminuidas como también se ha demostrado en estudios previos (Carretero y col., 1991b; Carretero y col., 1995b).

Puesto que el tratamiento con estradiol induce efectos contrarios a los encontrados en nuestro estudio y dado que en los animales ArKO no ocurre la aromatización local de aromatasa a estradiol, los hallazgos obtenidos en nuestro estudio sugieren que la aromatasa está implicada fisiológicamente en la regulación de las células hipofisarias productoras de prolactina, transformando la testosterona en estradiol.

En las hembras, el papel de la aromatasa en la producción ovárica de estrógenos es fundamental. Como muestra el esquema adjunto la testosterona producida por las células de la teca a partir del colesterol sanguíneo regulada por la LH, se transforma en estradiol en las células de la granulosa gracias a la actuación del enzima, bajo la regulación de la FSH.

El estradiol liberado a sangre desde el ovario alcanza la hipófisis a través del sistema porta hipofisario ejerciendo un feed back inhibitor sobre LH y FSH y estimulando a la prolactina.

La ausencia de aromatasa en las hembras ArKO justificaría la ausencia de estrógenos en sangre y por lo tanto su actuación como estimulador de la prolactina hipofisaria, dando lugar a los cambios morfológicos que hemos observado en nuestro estudio, de forma muy particular a la disminución del tamaño de las células positivas a prolactina y de sus núcleos.



En principio, en los machos el proceso no ocurre igual que en las hembras. La aromatasa testicular transforma localmente la testosterona a estradiol para inducir la maduración de los espermatozoides y las cantidades de estrógenos que son liberadas a sangre son mínimas.

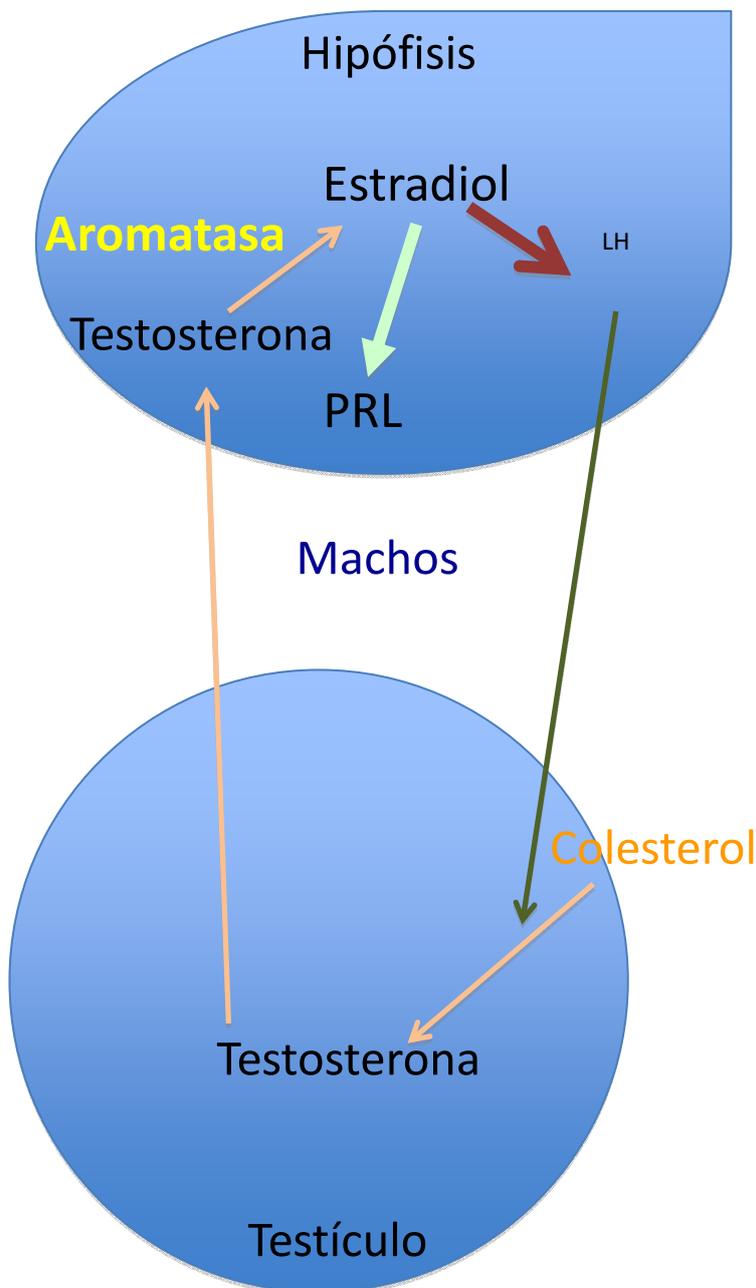
Por ello, no cabría esperar un mecanismo estimulador de las células hipofisarias productoras de prolactina desde los estrógenos hemáticos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio ponen de manifiesto que, contra lo que en principio cabría esperar, la ausencia de aromatasa en los animales ArKO en los machos produce los mismos cambios respecto a los machos wild type que aquellos

que fueron encontrados en las hembras. Este resultado sugiere que, en la propia hipófisis, de forma auto-paracrina, se produce estradiol a partir de la testosterona por actuación de la aromatasa.

Apoyando esta teoría, la hipófisis de la rata macho posee más aromatasa que la de la hembra, como se ha evidenciado por inmunocitoquímica, western blotting e hibridación *in situ* (Carretero y col., 1999a, 2003b, 2011). Este hecho se revierte tras la castración y vuelve a recuperarse si animales castrados son tratados con estradiol o testosterona, dependiendo del sexo (Carretero y col., 2011).

En este sentido, nuestros resultados sobre las células de prolactina hipofisarias justifican la razón por la que la glándula en los machos expresa el enzima más que en las hembras.



Por otro lado, resultados previos obtenidos desde nuestro laboratorio que han sido justificación de nuestro estudio hacían previsible que las células de prolactina de los machos ArKO tuvieran una disminución de su actividad al compararlas con las de los machos wild type.

El tratamiento *in vivo* e *in vitro* con el antagonista de aromatasa fadrozol® indujo un efecto sobre las células de prolactina parecido al observado en nuestro estudio en los machos ArKO, con disminución en el tamaño celular y en el porcentaje de células positivas (Carretero y col., 2014). Nuestro estudio en ratones ArKO confirma que el efecto observado después del tratamiento con el antagonista de la aromatasa se debe a la actuación del enzima.

El análisis de las células gonadotropas positivas a LH en ratones ArKO de-

mostró que la regulación estrogénica de la LH se desarrollaba en machos y hembras a través del estradiol, el hemático en la hembra y el hipofisario en los machos (López, 2014; Carretero y col., 2015).

Nuestros resultados nos llevan a plantear un nuevo esquema regulador de las células de prolactina en la hipófisis de los machos, en el que jugaría un importante papel el estradiol que se produce localmente en la hipófisis a partir de la testosterona por actuación de la aromatasas, como el que se muestra en la figura adyacente.

El descenso en la actividad de las células positivas a prolactina en las hipófisis de los animales ArKO, hembras y machos, con respecto a los wild type se justifica por la desaparición del efecto estimulador de los estrógenos sobre dichas células, junto al predominio de la inhibición dopaminérgica.

La dopamina es el neurotransmisor hipotalámico de mayor relevancia en la inhibición de la secreción de prolactina desde las células hipofisarias. Este efecto inhibitorio lo realiza a través de su unión a receptores dopaminérgicos tipo D2 (Picetti y col., 1997; Missale y col., 1998). El estudio de ratones knock out para este tipo de receptores permitió comprobar la presencia de un aumento en la expresión de prolactina y un desarrollo anormal de la hipófisis (Baik y col., 1995; Kelly y col., 1997).

Habiéndose comprobado que los efectos antiproliferativos y apoptóticos de los agonistas dopaminérgicos sobre líneas celulares tumorales hipofisarias son desarrollados a través de los receptores D2 (An y col., 2003).

Existen dos isoformas del receptor dopaminérgico D2 (Bunzow y col., 1988; Giros y col., 1989; Dal Toso y col., 1989), codificadas por el mismo gen, que se generan por la transcripción alternativa del exón 6 de dicho gen. Una isoforma larga D2L, de 444 aminoácidos, y otra corta D2S, de 415 aminoácidos; de las dos, la más abundante es la D2L (Montmayeur y col., 1991).

En las células de prolactina, la activación del receptor D2 da lugar a la inhibición de los aumentos del cAMP inducidos por VIP a través de proteínas Gi (Senogles, 1994; Liu y col., 1994, 1999). Abre los canales de potasio, a través de la proteína Gi3, a la vez que cierra los canales de calcio, a través de la proteína Go (Lledo y col., 1992; Bartschi y col., 1992; Liu y col., 1994, 1999). La activación de la isoforma D2S abre los canales de potasio, bloquea los canales de calcio, inhibe la producción de cAMP e inhibe la activación de las MAPK (Albert y col., 1990; Vallar y col., 1990; Elsholtz y col., 1991; Liu y col., 1994, 1999; Senogles, 1994; Ohmichi y col., 1994; Chuprun y col., 1997). La inhibición mediada a través de la isoforma D2L requiere a la proteína Go, pero no a la proteína Gi2. Los efectos inhibitorios sobre la síntesis de DNA se desarrollan a través de las proteínas Gi/Go para la isoforma D2S y, a través de la proteína Gi2 para la isoforma D2L (Albert, 2002).

En las células de prolactina, se producen ambas isoformas en cantidades semejantes (Oomizu y col., 2003). Bajo el efecto activador estrogénico, la isoforma D2L aumenta considerablemente desapareciendo prácticamente la forma D2S (Oomizu y col., 2003). Además, en adenomas hipofisarios no funcionantes, en la especie humana, se ha demostrado que la presencia de la isoforma D2S es más eficaz en la respuesta a

cabergolina que la presencia de la isoforma D2L (Pivonello y col., 2004), lo que sugiere que este podría ser otro mecanismo a través del cual los estrógenos podrían bloquear la inhibición dopaminérgica del desarrollo de los prolactinomas.

Basado en lo anterior, se podría hipotetizar que la desaparición en los animales Ar-KO del efecto estimulador estrogénico implicaría que no existiría una dominancia de la isoforma D2L sobre la D2S y las células de prolactina de estos animales serían más sensibles a los efectos inhibidores dopaminérgicos.

Apoptosis de las células positivas a Prolactina.

La apoptosis es frecuente observarla en células hormona dependientes, sobre todo después de una deprivación hormonal (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Vaux y Strasser, 1996; Thompson, 1994). La apoptosis ha podido ser estudiada gracias a la existencia de modelos de animales experimentales (4, 5 y 6), que han permitido apreciar en la hipófisis los efectos de la manipulación hormonal. En la hipófisis humana y concretamente en los adenomas, la muerte programada ha sido menos estudiada (7, 8).

La familia de proteínas Bcl-2, regulan, tanto estimulando como frenando diversos pasos en la apoptosis (10, 11). La propia Bcl-2, componente de esta amplia familia, bloquea la muerte celular (10, 11).

Una sobreexpresión de Bcl-2 ha sido demostrada en un 30% de los adenomas estudiados por Wang y col (1996); sin embargo, otras proteínas, tanto proapoptóticas como antiapoptóticas de esta familia, no han sido estudiadas. Se admite que la sobreexpresión de Bcl-2 provoca protección contra varios estímulos proapoptóticos, como los provocados por la proteína p53, las radiaciones y la quimioterapia (Schwartzman y Cidlowski, 1993; Vaux y Strasser, 1996; Thompson, 1994).

Kulig y col (1999) estudiando hipófisis humanas no tumorales y neoplásicas encontraron niveles bajos de apoptosis en estudios in vivo de adenomas hipofisarios realizados mediante la técnica de Tunel; solo en algunos casos hallaron signos de apoptosis, concretamente condensación de la cromatina nuclear y cuerpos apoptóticos; sin embargo, los niveles de apoptosis en los carcinomas fueron más elevados

En relación con la proteína Bcl-2, los autores antes citados mostraron, mediante técnicas de inmunotinción en cortes de parafina de los adenomas hipofisarios, concentraciones altas de Bcl-2, pero no en los carcinomas.

La familia Bcl2 activan la apoptosis vía retículo endoplásmico (Zoung y col., 2003). Aunque también se muestran activas en intervenir en la supervivencia celular (Yin y Schimke, 1996; Kostic y col 1997) y al parecer pueden actuar regulando el movimiento de los iones de calcio a través de las membranas del retículo endoplásmico, aboliendo la señal del calcio para la apoptosis (Lam y col.1994).

En hipófisis humanas de mujeres embarazadas y después del parto presentaron índices apoptóticos cuatro y cinco veces más altos que los controles La hipófisis aumenta en peso entre el 80% y el 100% en mujeres embarazadas, secundaria a la hiperplasia de células de prolactina (Stefaneanu y col., 1992).

En animales, durante el posparto, se ha demostrado que existen índices elevados de apoptosis (Haggi y col., 1986; Ahlbom y col., 1998) siendo estos hallazgos similares a los encontrados después de un tratamiento con estrógenos (Drewet y col., 1993) en ratas, donde se apreciaron tanto células apoptóticas como otras células presentando cuerpos apoptóticos fagocitados, incrementadas después de un periodos de 44 horas de dejar el tratamiento estrogénico.

Los índices de apoptosis encontrados por Kulig y col. (1999), Geen y col. (1997) y Saitoh y col. (1997) fueron significativamente bajos en relación con los encontrados por Kontogeorgos y col. (1997) estudiando 85 adenomas hipofisarios humanos, los índices de apoptosis fueron más altos. Estas discrepancias pueden ser debidas a la técnica empleada para detectar las células en apoptosis en cada trabajo.

Nosotros planteamos realizar un estudio de la apoptosis celular en la hipófisis de los animales ArKO frente a los wild type, para ello empleamos como marcador de apoptosis la caspasa 3 activa y analizar mediante electroforesis de DNA la fragmentación de las hebras de dicho ácido nucleico.

En ambos sexos, independientemente de que fueran wild type o knock out, no pudimos encontrar apoptosis con ninguno de los dos métodos, probablemente debido a que la apoptosis es un fenómeno rápido, que quizás aconteció durante el desarrollo de la glándula, pero que no es evidenciable en el animal adulto en las situaciones experimentales en las que se ha desarrollado nuestro trabajo.

Proliferación de las células positivas a Prolactina.

La diferenciación de las células hipofisarias se realiza a lo largo del desarrollo embrionario de forma secuencial (Watanabe y Daikoku, 1979; Shiino y col., 1977; Childs y col., 1981, 1982; Wilson y Christensen, 1982; Childs, 1983; Watanabe, 1985), se sabe que el primer tipo celular en diferenciarse lo constituyen las células corticotropas, que no parecen depender de factores externos a la propia hipófisis para su diferenciación.

No ocurre así con otros tipos celulares como las células somatotropas, gonadotropas o lactotropas. Para su diferenciación precisan de la presencia de otras hormonas y diversos factores que parecen estar involucrados en estos procesos (Voss y Rosenfeld, 1992). La GnRH es precisa para la diferenciación de las gonadotropas (Kudo y col., 1994) y la subunidad alfa de las hormonas glicoproteicas para la de las lactotropas (Bégeot y col., 1984).

La diferenciación de las células hipofisarias se produce después de las síntesis de DNA y, presumiblemente, después de un fenómeno de proliferación (Mazurkiewicz y Nakane, 1986); proliferación que regula diferentes aspectos de la capacidad fisiológica hipofisaria (Ikeda y Yoshimoto, 1991).

En la rata adulta, el porcentaje de cada tipo celular hipofisario es diferente (Herlant, 1964; Nakane, 1970, 1973; Baker y col., 1972; Costoff, 1973; Surks y Defesy, 1977; Hymer y col., 1980; Childs y col., 1981, 1982; Takahasy y Kawashima, 1982; Frawley y Nelly, 1983; Dada y col., 1983, 1984), pero un matiz importante es que dichos porcentajes varían dependiendo del estado endocrino general y cada tipo celular prolifera en respuesta a hormonas y factores hipotalámicos (Jacobi y col., 1977; Sakuma y col., 1984; Romano y col., 1984; Inoue y col., 1985, 1986; Pérez y col., 1986; McNicol y col., 1990; Zhou-Li y col., 1992; Arola y col., 1993; Oishi y col., 1993) y la edad juega un importante papel, en muchos casos no bien aclarado, en la regulación de la proliferación celular hipofisaria (Shirasawa y Yashimura, 1982; Takahashi y col., 1984; Kawashima y Takahashi, 1986) y en la diferenciación celular, ya que ocurre una alta incidencia de adenomas espontáneos en las ratas viejas (Berkvens y col., 1980).

Clásicamente se ha descrito que la fracción celular proliferativa en la hipófisis anterior de animales adultos es baja (Pomerat, 1941; Hunt, 1943; Städtler y col., 1970; Stepién y col., 1978) mientras que es alta durante el desarrollo (Shirasawa y Yashimura, 1982; Takahashi y col., 1984; Carbajo y col., 1989; Carbajo y Watanabe, 1990).

Los estudios realizados in vivo por Oishi y col. (1993) demuestran grandes fluctuaciones en la actividad proliferativa celular de la hipófisis de ratas hembras adultas a lo largo del ciclo estrual, siendo máxima en el estro y mínima en el diestro; mientras que la rata macho mantiene una actividad homogéneamente baja, semejante a la de la hembra en proestro o estro temprano.

Estos autores observaron que la mayor actividad proliferativa se daba en las células lactotropas, seguida por somatotropas, corticotropas, gonadotropas (más LH que FSH) y siendo las tirotropas las de menor actividad.

La actividad proliferativa se mantiene constante excepto en las época de crecimiento, en la que se aprecia una disminución progresiva (Nouët y Kujas, 1975; Shirisawa y Yoshimura, 1982; Sakuma y col., 1984; Carbajo-Pérez y Watanabe, 1990).

Sin embargo, al parecer de Oishi y col. (1993) la actividad proliferativa guarda relación con los ritmos circadianos, el ciclo estrual y el sexo, así en la rata, es mayor la actividad proliferativa en la hembra que en el macho.

El mismo autor antes citado comprobó que la actividad proliferativa dependía de la fase del ciclo estrual; iba en aumento desde el proestro hasta el estro, disminuyendo progresivamente desde el final del estro, metaestro y diestro. Desde el metaestro hasta el proestro no hay cambios significativos (Hunt y Hunt, 1966).

Estos cambios son debidos a los niveles de estradiol que tiene lugar en el ciclo estrual, ya que el estradiol actúa como agente favorecedor de la proliferación (Oishi y col., 1993).

Los estrógenos aumentan la actividad mitótica de la adenohipófisis (Lloyd y col., 1975; Jacobi y col., 1977; Kalbermann y col., 1979) y es factible que la proliferación de las células de prolactina durante el estro sea estimulada por la elevada secreción de estrógenos ováricos durante el proestro (Oishi y col., 1993).

Al parecer es mayor la actividad proliferativa en la rata a primeras horas de la mañana y a media noche, sobre el resto del día, lo que implica, según Nouët y Kujas (1975), la participación de los ritmos circadianos en este proceso.

La proliferación hipofisaria en el ratón ha sido menos estudiada.

En el año 2007 apareció un estudio de Miyamoto y colaboradores que ha sido cuestionado en su fiabilidad por la propia revista que lo publicó, por lo que no lo tenemos en consideración.

López (2014) describió un aumento de la proliferación de las células gonadotropas positivas a LH en los animales ArKO frente a los wild type, pero no analizó las células positivas a prolactina.

El empleo de antiestrógenos capaces de actuar sobre los dos tipos de receptor estrogénico ha puesto de manifiesto que el bloqueo de la actuación de los estrógenos inhibe la proliferación de células lactotropas o de líneas celulares tumorales productoras de prolactina (Kansra y col., 2005).

En ratones también se ha demostrado que la proliferación de las células productoras de prolactina durante la preñez está mediada, al menos en parte, por estradiol (Toldano y col., 2012).

La actuación estrogénica sobre la proliferación de las células de prolactina se ve potenciada por IGF-1 (Saitoh y col., 2010), aunque la actuación de IGF-1 y de los estrógenos se da por rutas diferentes, dependiendo de la edad del animal (Hikake y col., 2010).

Los resultados observados en el presente estudio ponen de manifiesto que la aromataza hipofisaria, transformando la testosterona a estradiol, es un importante factor en el mantenimiento de la población de células lactotropas en la hipófisis y que su ausencia provoca un descenso claro en la proliferación de este tipo celular. Un dato importante es que los resultados obtenidos al compararlos con los ratones wild type fueron muy semejantes en machos y hembras, lo que sugiere que el regulador definitivo a nivel hipofisario en ambos sexos es el estradiol.

Conclusiones

Tras estudiar el desarrollo de prolactinomas hipofisarios espontáneos y fijar la atención en las células productoras de prolactina de la hipófisis de ratones knock out para la aromatasa P450 y compararlas con las de ratones wild type de la misma edad, analizar estadísticamente los resultados obtenidos y contrastarlos con la literatura existente al respecto, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1.- El trabajo que se presenta es el primer estudio que constata que la ausencia de aromatasa en roedores de edad avanzada impide la aparición de los prolactinomas hipofisarios espontáneos, cuya prevalencia es grande cuando persiste la expresión del enzima. Lo que sugiere que la sobre-expresión de la aromatasa P450 en edades avanzadas puede ser una causa principal en la génesis de dichos adenomas.

2.- La imposibilidad de generar estrógenos por ausencia de aromatasa P450 que acontece en los animales knock out provoca un descenso en el porcentaje de células positivas a prolactina en la hipófisis que es prácticamente idéntico en hembras y machos. Lo que sugiere que los estrógenos juegan un importante papel en el mantenimiento de la población lactotropa hipofisaria no solo en las hembras sino también en los machos. Este hallazgo es importante ya que demuestra, por primera vez, que fisiológicamente los estrógenos ejercen una regulación estimuladora de la producción de prolactina en los machos, lo que sugiere que los andrógenos desarrollan una regulación de la población de las células hipofisarias productoras de prolactina a través de su aromatización a estradiol.

3.- La ausencia de aromatasa P450 induce un descenso del área celular y del área nuclear de las células positivas a prolactina, en ambos sexos, de una forma parecida.

4.- Los cambios observados no afectan por igual a toda la glándula, lo que sugiere que la respuesta a la regulación estrogénica de las células hipofisarias productoras de prolactina no es homogénea.

5.- Este estudio demuestra que la aromatización local hipofisaria de los andrógenos a estrógenos, al menos en los machos, es un mecanismo fisiológico de regulación de la proliferación de las células productoras de prolactina.

Referencias Bibliográficas

- Adams CVM, Svettenhan KV (1958). Studies on a neurohipophysial mechanism influencing gonadotropic activity. *Cold Spring Quart Biol*, 5: 280-288.
- Aguado LI, Rodriguez S, Bilbao A, Rodriguez EM (1979). Cytological changes in the pars distalis of the female rat hypophysis grafted under the kidney capsule. *Cell Tiss Res*, 199: 539-544.
- Aherne W A, Dunnill MS, Edward Arnold (1982). Adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res* 271: 169-176.
- Aherne WA, Camplejohn RS, Wright NA (1977). An introduction to cell population kinetics. London: Edward Arnold.
- Ahlbom, E., Grandison, L., Zhivotovsky, B., Ceccatelli, S (1998).- Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the Bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*. 139: 2465-2471.
- Akingbemi BT (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive biology and endocrinology*, 3: 51.
- Albert P. g protein preferences for dopamine D2 inhibition of prolactin secretion and DNA synthesis in GH4 pituitary cells. 2002 *Mol. Endocrinol.* 16(8):1903-1911.
- Amara JF, Van Itallie C, Dannies PS (1987). Regulation of prolactin production and cell growth by estradiol: difference in sensitivity to estradiol occurs at level of messenger ribonucleic acid accumulation. *Endocrinology* 120: 264-271.
- Amat P, Muñoz Barragan L (1974). Mitosis en la adenohipófisis. *An.Anat*, 23: 15-27.
- Amsterdam JD, Winokur A, Lucki I, Snyder P, Harris RI, Caroff S, Rickels K (1982). Growth hormone, prolactin and thyrotropin responses to gonadotropin-releasing hormone in depressed patients and healthy volunteers. *Psychoneuroendocrinology*, 7: 177-184.
- An JJ, Cho SR, Jeong DW, Park KW, Ahn YS, Baik JH (2003). Anti-proliferative effects and cell Death mediated by two isoforms of dopamine D2 receptor in pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol*, 206: 49-62.
- Antakly T, Pelletier G, Zeytinoglu F, Labrie F (1979). Effects of colchicine on the morphology and prolactin secretion of rat anterior pituitary cells in monolayer culture. *Am J Anat*, 166: 353-372.
- Arola J, Heikkila P, Kahri AI.- Biphasic effect of ACTH on growth of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res*, 271: 169-176, 1993.
- Asa SL, Ezzat S (2002). The pathogenesis of pituitary tumours. *Nature reviews Cancer*, 2: 836-849.
- Asa SL, Ezzat V (1998). The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr. Rev.* 19: 798-827
- Aumüller G, Wagneer R, Gräf KJ (1978). Fine structure of rat prolactin cells after treatment with a long acting depot contraceptive. *Acta Endocr*, 89: 252-262.
- Bach ML, Roelants F, De Montigny J, Huang M, Potier S, Souciet JL (1995). Recovery of gene function by gene duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11: 169-177.
- Baertschi AJ, Audigier Y, Lledo PM, Israel JM, Bockaert J, Vincent JD (1992). Dialysis of lactotropes with antisense oligonucleotides assigns guanine nucleotide binding protein subtypes to their channel effectors. *Mol Endocrinol*, 6: 2257-65.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, LeMeur M, Borrelli E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptor. *Nature* 1995 337, 424-428.
- Bailey P, Davidoff LM (1925). Concerning the Microscopic Structure of the Hypophysis Cerebri in Acromegaly: (Based on a Study of Tissues Removed at Operation from 35 Patients). *Am J Pathol*, 1: 185-208.
- Baker BL, Clark RH, Hunter RL (1963). Starch Gel Electrophoresis of Rat Hypophysis in Relation to Prolactin Activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 114: 251-255.
- Baker BL, Eskin TA, Clapp HW.- The effect of medroxyprogesterone on cells of the pituitary pars distalis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 140: 357-361, 1972.
- Balthazart J, Baillien M, Ball GF (2006a). Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology*, 147: 359-366.

- Balthazart J, Ball, GF (2006b). Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci*, 29: 241–249.
- Balthazart J, Foidart A (1993). Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 44: 521–540.
- Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar NJ (1987). Proliferative index breast carcinoma determined in situ by KI 67 immunostaining and its relationship to pathological and clinical variables. *J Pathol*, 152: 287-295.
- Beauvillain JC, Mazzuca M, Dubois MP (1977). The prolactin and growth hormone producing cells of the guinea pig pituitary. *Cell Tiss Res*, 184: 343-358.
- Bégeot M, Hemming FJ, Dubois MP.- Introduction of pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone alfa-subunit. *Science*, 226: 566-568, 1984.
- Benjamin M, Baker BI (1978). Ultrastructural studies on prolactin and growth hormone cells in anguila pituitaries in long term cultures. *Cell Tiss Res*, 191: 161-170.
- Berkvens, JM. Van Nesselrooy, JHJ. Kroes, R. Spontaneous tumors in the pituitary gland of old Wistar rats. A morphological and immunocytochemical study. *J. Pathol.* 1980. 130: 179-191.
- Bevan JS (2008). Functional assesment of the pituitary. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID y Wass JAH, eds. Blackwell publishing. Oxford. pp: 194-199.
- Blaschke W (1949). *Vorlesungen über Integralgeometrie*. Chelsea Publishing Company.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews*, 19: 225-268.
- Bonnesen T, Fenchel W (1934). *Theorie der konvexwen Körper*. *Ergebnisse der Mathematik und ihrer Grenzgebiete* 3, S. 1.
- Brada M, Ford D, Ashley S, Bliss JM, Crowley S, Mason M, Rajan B, Traish D (1992). Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *Br Med J*, 302: 1343-1346.
- Britt K L., Drummond, AE, Cox VA, Dyson M, Wreford N.G, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK (2000). An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology*, 14: 2614–2623.
- Brooks CL, Kim BG, Aphale P, Kleeman BE, Johnson GC (1990). Phosphorylated variant of bovine prolactin. *Opl Cell Endocrinol*, 71: 117-123.
- Buffa R, Solcia E, Fiocca R, Crivelli O, Pera A (1979). Complement-mediated binding of immunoglobulins to some endocrine cells of the pancreas and gut. *J Histochem Cytochem*, 27: 1279-1280.
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Simpson ER (1999). Aromatase as a therapeutic target in endometriosis. *Trends in Endocrinol Metab*, 11: 22–27.
- Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor. *Nature*. 1988. 336, 783-787.
- Burdman JA, Calabrese MT, Romano MI, Carricarte VC, MacLeod RM (1984). Effect of ovariectomy and clomiphene on the in-vitro incorporation of (3H)thymidine into pituitary DNA and on prolactin synthesis and release in rats. *J Endocrinol*, 101: 197-201
- Burrows HL, Birkmeier TS, Seasholtz AF, Camper SA (1996). Targeted ablation of cells in the pituitary primordia of transgenic mice. *Mole Endocrinol*, 10: 1467-1477.
- Camper SA, Yao YA, Rottman FM (1985). Hormonal regulation of the bovine prolactin promoter in rat pituitary tumor cells. *J Biol Chem*, 260: 12246-12251.
- Cantalamesa L, Reschini E, Catania A, Giustina G (1976). Pituitary hormone responses to hypothalamic releasing hormones in acromegaly. *Acta Endocrinol*, 83: 673-683.
- Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER (1997). Effect of Testosterone and Estradiol in a Man with Aromatase Deficiency. *N Engl J Med*, 337: 91-95.

- Carbajo E, Montegi M, Watanabe YG.- Cell proliferation in the anterior pituitary on mice during growth. *Biomed Res*, 10: 275-281, 1989.
- Carbajo-Pérez E, Watanabe YG.- Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period. *Cell Tissue Res*, 261: 333-338, 1990.
- Carol W, Lauterbach H, Klinger G, Unger A, Michels W (1988). [Prolactin stimulation using the metoclopramide test in females taking oral contraceptives]. *Zentralblatt fur Gynakologie*, 110: 1515-1521.
- Carretero J, Sánchez F, Blanco E, Riesco JM, Vázquez R (1988). Analysis of immunoreactive PRL cells following treatment with met-enkephalin. *Z Mikrosk -anat Fors*, 102: 711-720.
- Carretero J, Sánchez F, Blanco E, Riesco JM, Sánchez-Franco F, Vázquez R (1989). Morphofunctional study of mammatropic cells following intraventricular administration of met-enkephalin. *Anat Embryol*, 179: 243-250.
- Carretero J, Sánchez F, Torres JL, Blanco E, Riesco JM, Vázquez R (1989b). Study of h-TSH immunoreactive adenohypophyseal cells following treatment with methymlazole. *Histol Histopathol*, 4: 71-76.
- Carretero J, Sánchez F, Montero M, Blanco E, Riesco JM, Carbajo E, González R, Vázquez R (1990b). Morphological and functional study of the GH-immunoreactive adenohypophyseal cells in ovariectomized rats. *Histochem J*, 22: 683-687.
- Carretero J, Sánchez F, Montero M, González R, Blanco E, Riesco JM, Vázquez R (1991a). Morphometric study of the LH-immunoreactive gonadotrophic cells of rats following treatment with methoclopramide. *Histol Histopathol*, 6: 101-105.
- Carretero J, Sánchez F, Blanco E, Montero M, Riesco JM, González R, Vázquez R (1991b). Estrogenic modulation of met-enkephalin-induced prolactin secretion in rats. *Anat Embryol*, 183: 455-459.
- Carretero J, Sánchez F, Vázquez R, Cacicedo L, Sanchez-Franco F, Fernández G, Montero M (1991c). In vivo and in vitro evidence of growth hormone-releasing factor-like produced locally in the adenohypophyseal cells of the rat. *Neuropeptides*, 19: 223-229.
- Carretero J, Sánchez F, González R, Montero M, Juanes JA, Riesco JM, Vázquez R (1992a). Morphometric analysis of GH-immunoreactive cells after GH release induced by treatment with estrogen in adult male rats. *Acta Histochem*, 93:271-276.
- Carretero J, Blanco E, Sanchez F, Riesco JM, Rubio M, Juanes JA, Vazquez, R. (1992b). Morphometrical variations of prolactin cells in response to prolonged and systemic administration of met-enkephalin in female rats. *Anat. Embryol*, 186: 99-105.
- Carretero J, Sánchez F, Rubio M, Juanes JA, Blanco E, González R, Riesco JM, Vázquez R (1992c). Morphometric changes in GH-immunoreactive adenohypophyseal cells induced by intraventricular administration of colchicine to adult rats. *Histol Histopathol*, 7: 673-677.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Santos M, Blanco J, Vázquez R (1995a). In vitro morphometric and proliferative variations in VIP-immunoreactive pituitary cells induced by estradiol. *Neuroendocrinology* 62:277-282.
- Carretero J, Rubio M, Navarro N, Prieto P, Vázquez RJ, Sánchez F, Vázquez R (1995b). In vitro modifications in the proliferation rate of prolactin cells are accompanied by nuclear morphometric variations. *Histol Histopathol*, 10: 135-139.
- Carretero J, Vázquez RJ, Santos M, Cacicedo L, Rubio M, Sánchez-Franco F, Vázquez R (1996). Dopamine inhibits in vitro release of VIP and proliferation of VIP-immunoreactive pituitary cells. *Neuropeptides*, 30: 81-86.
- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Estévez MJ, Santos M, Vázquez G, Blanco E, Vázquez R (1997a). Hyperactivity and proliferation of prolactin cells induced in vitro by met-enkephalin. *Eur J Anat*, 1: 89-95
- Carretero J, Rubio M, Vázquez-Perfecto RJ, Sánchez F, Torres JL, Pérez RM, Vázquez R (1997b). Decreases in the size proliferation rate of VIP-immunoreactive cells induced in vitro by Testosterone are associated with decreases in VIP release. *Neuroendocrinology*, 65: 173-178.

- Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Cabo JJ, Vázquez G, Santos M, Pérez RM, Vázquez R (1997c). Corticosterone induces hypoactivity of prolactin-immunoreactive cells. *Acta Anat*, 160: 15-22.
- Carretero J, Vázquez RJ, Rubio M, Santos M, Vázquez G, Sánchez F, Blanco E, Martín-Clavijo A, Vázquez R (1998). Inverse effects of estradiol and testosterone on the in vitro proliferation rate of rat VIP-immunoreactive cells. *Eur J Anat*, 2 : 101-108.
- Carretero J, Vázquez G, Blanco E, Rubio M, Santos M, Martín-Clavijo A, Torres JL, Vázquez R (1999a). Immunohistochemical evidence of the presence of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res*, 295: 419-423.
- Carretero J, Vázquez G, Martín-Clavijo A, Rubio M, Hernández E, Moro JA, Gato A, Barbosa E, Vázquez R (1999b). In vivo studies on cytodifferentiation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur J Anat*, 3: 79-85.
- Carretero J, Martín-Clavijo A, Vázquez G, Somalo J, Rubio M, Sánchez F, Hernández E, Montero MC, Torres JL, Vázquez R (1999c). Effects of in vitro immunosuppression of interleukin-6 on the proliferation of rat hypophyseal cells. *Eur J Anat*, 3: 137-143.
- Carretero J, Rubio M, Blanco E, Riesco JA, Juanes JA, Vázquez G, Hernández E, Vázquez R (2000). Immunohistochemical and in situ hybridization detection for Aromatase P450. Paradigm for application on morphological study of the pituitary gland. *Eur J Anat*, 4-S1: 50.
- Carretero J, Burks DJ, Vázquez G, Rubio M, Hernández E, Bodego P, Vázquez R (2002). Expression of aromatase P450 is increased in spontaneous prolactinomas of aged rats. *Pituitary*, 5 : 5-10.
- Carretero J, Rubio M, Blanco E, Burks DJ, Torres JL, Hernández E, Bodego P, Riesco JM, Juanes JA, Vázquez R (2003a). Variations in the cellular proliferation of prolactin cells from late pregnancy to lactation in rats. *Ann Anat*, 185: 97-101.
- Carretero J, Vázquez G, Rubio M, Blanco E, Juanes JA, Pérez E, Burks DJ, Vázquez R (2003b). Postnatal differentiation of the immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol Histopathol*, 18 : 419-423.
- Carretero J, Bodego P, Rodríguez RE, Rubio M, Blanco E, Burks DJ (2004). Expression of the μ -opioid receptor in the anterior pituitary gland is influenced by age and sex. *Neuropeptides*, 38: 63-68.
- Carretero J, Blanco E, Rubio M, Riesco JM, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Herrero J, Burks DJ (2011). Gonadal steroids regulate aromatase P450 expression in the rat pituitary. *Eur J Anat*, 15: 98-106.
- Carretero J, Blanco E, Carretero M, Carretero-Hernández M, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Burks DJ, Font de Mora J (2013). The expression of AIB1 correlates with cellular proliferation in human prolactinomas. *Ann Anat*, 195: 253-259.
- Carretero J, Blanco EJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Carretero M, Vázquez T, Álvarez P, García-Barrado MJ (2015). Morphological evidence of the possible relevance of aromatase P450 in auto-paracrine regulation and pathology of the hypophysis. *Eur J Anat*, 19: 229-247.
- Carrillo AJ, Phelps CJ (1992). Quantification of vasoactive intestinal peptide immunoreactivity in the anterior pituitary glands of intact male and female, ovariectomized, and estradiol benzoate-treated rats. *Endocrinology*, 131: 964-969.
- Carrillo AJ, Sharp ZD, DePaolo LV (1987) Correlation of rat pituitary prolactin messenger ribonucleic acid and hormone content with serum levels during the estrogen-induced surge. *Endocrinology* 121: 1993-1999.
- Chang NG, Nikitovich-Winer MN (1978). Correlation between suckling-induced changes in the ultrastructure of mammothrophs and prolactin release. *Cell Tiss Res*, 166: 399-406.
- Chang NG, Nikitovitch-Winer MN (1976). Correlation between suckling-induced changes in the ultrastructure of mammothrophs and prolactin release. *Cell Tissue Res*, 166: 399-406.
- Childs G, Ellinson D, Foster L, Ramaley JA (1981). Postnatal maturation of gonadotropes in the male rat pituitary. *Endocrinology*, 109:1683-1692.

- Childs GV, Ellison DG, Ramaley JA.- Storage of anterior lobe adrenocorticotropin in corticotropes and subpopulation of gonadotropes during the stress-nonresponsive period in the neonatal male rat. *Endocrinology*, 110: 1676-1692, 1982.
- Childs GV.- Neonatal development of the thyrotrope in the male rat pituitary. *Endocrinology*, 112: 1647-1652, 1983.
- Chuprun JK, Raymond JR, Blackshear PJ (1997). The heterotrimeric G protein G alpha i2 mediates lysophosphatidic acid-stimulated induction of the c-fos gene in mouse fibroblasts. *J Biol Chem*, 272: 773-781.
- Clayton RN, Farrell WE (2004). Pituitary tumour clonality revisited. *Front Horm Res*, 32: 186-204.
- Cogan JD, Wu W, Phillips JA 3rd, Arnhold IJ, Agapito A, Fofanova OV, Osorio MG, Bircan I, Moreno A, Mendonca BB (1998). The PROP1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 3346-3349.
- Cooke NE, Baxter JD (1982). Structural analysis of the prolactin gene suggests a separate origin for its 5' end. *Nature*, 297: 603-606.
- Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA (1981). Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem*, 256: 4007-4016.
- Cooke NE, Coit D, Weiner RI, Baxter JD, Martial JA (1980). Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *J Biol Chem*, 255: 6502-6510.
- Cooke NE, Szpirer C, Levan G (1986). The related genes encoding growth hormone and prolactin have been dispersed to chromosomes 10 and 17 in the rat. *Endocrinology*, 119: 2451-2454.
- Cordido F, Casanueva F, Vidal O, Diéguez C (1994). Physiopathology of hypophyseal tumors secreting growth hormone, prolactin and glycoproteins. *An Med Interna*, 11: 89-94.
- Cornil CA, Ball GF, Balthazart J (2006). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res*, 1126: 2-26.
- Costoff A (1973). Ultrastructure of rat adenohipophysis. Correlation with function. Edited by Academy Press. New York. 1973. 13-146.
- Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS (2003). Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol*, 17: 1039-1053.
- Crofton, MW, (1877). Geometrical theorems related to mean values. *Proc Lond Math Soc*, 8: 304.
- Dacheux F (1980). Ultrastructural immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the porcine pituitary. *Cell Tissue Res*, 207: 277-286.
- Dada DA, Blake MJ, Stein EA (1984). Pars distalis cell quantification in normal adult male and female rats. *J Endocrinol*, 101: 87-94
- Dada MO, Campbell GT, Blake CA (1983). A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohipophysis of adult male rats and adult female rats throughout the estrous cycle. *Endocrinology*, 113: 970-984.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.* 1989. 8,4025-4034.
- Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsch PC, Krauss S, Beddington RS, Robinson IC (1998). Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nature genetics*, 19: 125-133.
- Dawson AB (1946). Some evidence of specific secretory activity of the anterior pituitary gland of the cat. *Amer J Anat*, 78: 347-409.
- Dawson AB, Friedgood HB (1938). The differentiation of two classes of acidophils in the anterior pituitary of the rabbit and cat. *Stain Technol*, 13: 17-21.

- Day RN, Maurer RA (1989a). The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones. *Mol Endocrinol*, 3: 3-9.
- Day RN, Maurer RA (1989b). Thyroid hormone-responsive elements of the prolactin gene: evidence for both positive and negative regulation. *Mol Endocrinol*, 3: 931-938.
- De Marinis L, Mancini A, D'Amico C, Calabró F, Zuppi P, Fiumara C, Barini A (1990). Periovulatory plasma prolactin response to gonadotropin-releasing hormone: role of endogenous opiates. *Neuroendocrinology*, 51: 717-720.
- De Marinis L, Mancini A, Maira G, Anile C, Menini E, Barbarino A (1984). Postoperative evaluation of dopaminergic tone in prolactinoma patients. II. plasma thyrotropin response to metoclopramide. *J Clin Endocrinol Metab*, 58: 405-409.
- De Nicola AF, von Lawzewitsch I, Kaplan SE, Libertun C (1978). Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *J Natl Cancer Inst*, 61: 753-763.
- Dekker A (1968). Electron microscopic study of somatotropic and lactotropic pituitary cells of the syrian hamster. *Anat Rec*, 162: 123-136.
- Delesse A (1847). Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches (extrait). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 25: 544.
- Delthiel R (1926). Probabilités géométriques. Gauthier-Villars et Ge. Eds Ecole Polytechnique Paris.
- Desclin L (1945). Contribution à l'étude de la structure et du fonctionnement de l'hypophyse pendant le post-partum. *Arch Biol (Liege)*, 56: 261-323.
- Dexlex P, Ross GL, Probst D (1976). Ultrastructural study of the adenohypophysis of the chinese hamster. *Acta Anat*, 96: 35-54.
- Donangelo L, Melmed S (2008). Molecular pathogenesis of pituitary adenomas. En. *Clinical endocrine oncology*. Hay ID y Wass JAH, eds. Blackwell publishing. Oxford. pp: 187-193.
- Drewett, N., Jacobi, J.M., Willgoss, D.A., Lloyd, H.M (1993).- Apoptosis in the anterior pituitary gland of the rat: studies with estrogen and bromocryptine. *Neuroendocrinology*. 57: 89-95.
- Drummond AE, Baillie AJ, Findlay JK (1999). Ovarian estrogen receptor α and β mRNA expression: impact of development and estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, 149: 153-161.
- Dukes M, Edwards PN, Large M, Smith IK, Boyle T (1996). The preclinical pharmacology of "Arimidex" (Anastrozole; ZD1033) — a potent, selective aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58: 439-445.
- El Etreby MF, Fath El Bab MR (1978). Effect of cyproterone acetate, d-norgestrel and progesterone on cells of the pars distalis of the adenohypophysis in the beagle bitch. *Cell Tissue Res*, 191: 205-218.
- Elias H, Hyde DM (1980). An elementary introduction to stereology quantitative microscopy. *Am J Anat*, 159: 412-446.
- Elias PM, Ornstein L, Lutzner MA, Robbins JH (1971). A method for studying the ultrastructure of intercellular contacts in leukocyte cultures. *Experientia*, 27: 116-118.
- Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC (1991). Inhibitory control of prolactin and pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem*, 266: 22919-22925.
- Elsholtz HP, Mangalam HJ, Potter E, Albert VR, Supowit S, Evans RM, Rosenfeld MG (1986). Two different cis-active elements transfer the transcriptional effects of both EGF and phorbol esters. *Science*, 234: 1552-1557.
- Erdheim J, Stumme E (1909). Ueberr die schwangerschaftsveränderung der hypophyse. *Beitr path Anat*, 46: 1-132.
- Farquhar MG (1961). Origin and fate of secretory granules in cells of the anterior pituitary gland. *Trans N Y Acad Sci*, 23: 346-351.

- Farquhar MG (1969). Lysosome function in regulating secretion. Disposal of secretory granules in cells of the anterior pituitary gland. En: *Lysosomes in biology and pathology* (Dingle JT, Fell HB, eds). North-Holland Amsterdam, 2: 462-482.
- Farquhar MG, Reid JJ, Daniell LW (1978). Intracellular transport and packaging of prolactin: a quantitative electron microscope autoradiographic study of mammothrophs dissociated from rat pituitaries. *Endocrinology*, 102: 296-311.
- Farquhar MG, Rinehart JF (1954a). Cytologic alteration in the anterior pituitary gland following thyroidectomy: An electron microscopic study. *Endocrinology*, 55: 857-876.
- Farquhar MG, Rinehart JF (1954b). Electron microscope studies of the anterior pituitary of castrated rats. *Endocrinology*, 54: 516-541.
- Farquhar MG, Wellings SR (1957). Electron microscopic evidence suggesting secretory granule formation within the Golgi apparatus. *J Biophys Biochem Cytol*, 3: 319.
- Ferguson KA, Wallace AL (1961). Starch-gel electrophoresis of anterior pituitary hormones. *Nature*, 190: 629-630.
- Fischer UG, Wood SH, Bruhn J, Roseff SJ, Mortola J, Rivier JE, Yen SS (1992). Effect of human corticotropin-releasing hormone on gonadotropin secretion in cycling and postmenopausal women. *Fertil Steril*, 58: 1108-1112.
- Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *PNAS*, 95: 6965-6970.
- Forssmann WG, Pickel V, Reinecke M, Hock D, Metz J, Heym C, Forssmann WG (1981). Immunohistochemistry and immunocytochemistry of nervous tissue. En *Techniques in neuroanatomical research.*, eds. Springer-Verlag, Berlín. pp.: 171-205.
- Fossum S, Gautvik KM (1977). Stereological and biochemical analysis of prolactin and growth hormone secreting rat pituitary cells in culture. *Stereology combined with non-parametrical statistics*. *Cell Tissue Res*, 184: 169-178.
- Foster CL (1971). Relationship between ultratructure and function in the adenohipophysis of the rabbit. En: *Subcellular organization and function in endocrine tissues*. (Heller H, Lederis K, eds). Cambridge University Press, P: 125-146.
- Frantz AG, Kleinberg DL (1970). Prolactin: evidence that it is separate from growth hormone in human blood. *Science*, 170: 745-747.
- Frawley LS, Neill JD.- Identification of a pituitary cell type that segregates both growth hormone and prolactin: detection by reverse haemolytic plaque assays. Program of the Endocrine Society, 65th Annual Meeting; Abstract n° 918, 1983.
- Gaiddon C, de Tapia M, Loeffler JP (1999). The tissue-specific transcription factor Pit-1/GHF-1 binds to the c-fos serum response element and activates c-fos transcription. *Mol Endocrinol*, 13: 742-751.
- García CF, Weiss LM, Lowder J (1987). Quantitation and stimation of lymphocyte subsets in tissue sections. Comparison with flow cytometry. *Am J Pathol*, 87: 470-477.
- Garcia MM, Kapcala LP (1995). Growth of a microprolactinoma to a macroprolactinoma during estrogen therapy. *J Endocrinol Invest*, 18: 450-455.
- García RL, Coltrera MD, Gown AM (1989). Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol*, 134: 733-739.
- García-Barrado MJ, Blanco EJ, Carretero-Hernández M, Iglesias Osma MC, Carretero M, Herrero JJ, Burks DJ, Carretero J (2014). Local transformations of androgens into estradiol by aromatase P450 is involved in the regulation of prolactin and the proliferation of pituitary prolactin-positive cells. *PLOS One*, 9: e101403. doi: 10.371/journal.pone.0101403.
- Garnier PE, Aubert ML, Kaplan SL, Grumbach MM (1978). Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: decreased affinity of "Big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 47: 1273-1281.

- Gatter KC, Dunnill MA, Gerdes J, Stein H, Mason DY (1986). New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol*, 39: 590-593.
- Giannattasio G, Zanini A, Meldolesi J (1975). Molecular organization of rat prolactin granules. In vitro stability of intact and membraneless granules. *J Cell Biol*, 64: 246-251.
- Gil J (1992). Estudio inmunocitoquímico de las estirpes celulares productoras de neuropéptidos: péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de GH (GRF) y somatostatina (SRIF), en la hipófisis de la rata. Tesis Doctoral. Univ. de Salamanca.
- Girod C, Cure M, Dubois P (1964). Les types cellulaires chromophiles de la pars distalis de l'hypophyse chez le hámster dore (*Mesocricetus auratus* Waterh). *CR Acad Sci*, 258: 6244-6247.
- Giros B, Sokoloff P, Martrs MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative slicing directs the expression of two D2 dopamine recap isoforms. *Nature*. 1989 Dec 21-28;342(6252):923-6.
- Glass CK, Holloway JM, Devary OV, Rosenfeld MG (1988). The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*, 54: 313-323.
- Golick ML, Rice M (1992). Optimum staining of PCNA in paraffin sections is dependent of fixation, drying and intensification. *J Histotechnol*, 15: 39-41.
- Goluboff LG, Ezrin C (1969) Effect of pregnancy on the somatotroph and the prolactin cell of the human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 29: 1533-1538.
- Gooren LJ, Assies J, Asscheman H, de Slegte R, van Kessel H (1988). Estrogen-induced prolactinoma in a man. *J Clin Endocrinol Metab*, 66 : 444-446.
- Gracia-Navarro F (1980). Estudio estructural y ultraestructural de la pars distalis de la adenohipófisis de rana ridibunda. *Morf Norm Pat*, 4:49-65.
- Gracia-Navarro F, Doerr-Schott (1982). Immunohistochemical detection of adenohypophyseal cells containing hormones in rana ridibunda. *Cell Tissue Res*, 222: 687-690.
- Guyda JH (1975). Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: Immunoassay and radioreceptor assay correlations. *J Clin Endocrinol Metab*, 41: 953-967.
- Haggi ES, Torres AI, Maldonado CA, Aoki A. – Regresión of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation. *J Endocrinol*. 11: 367-370, 1986.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillet CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: a index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162: 285-294.
- Halmi NS (1952). Two type of basophils in the rat pituitary: tritotrophs and gonadotrophs vs beta and delta cells. *Endocrinology*, 50: 140-142.
- Halmi NS, Parsons JA, Erlandsen SL, Duello T (1975). Prolactin and growth hormone cells in the human hypophysis: A study with immunoenzyme histochemistry and differential staining. *Cell Tissue Res*, 158: 497-507.
- Hammond PJ, Khandan-Nia N, Withers DJ, Jones PM, Ghatei MA, Bloom SR (1997). Regulation of anterior pituitary galanin and vasoactive intestinal peptide by oestrogen and prolactin status. *J Endocrinol*, 152: 211-9.
- Harrison F (1979). The effect of L-DOPA on the ultrastructure of the adenohypophysis of the chinese quail, *excalfactoria chinensis*. *Cell Tissue Res*, 198: 521-526.
- Hayes FJ, Seminara SB, DeCruz S, Boepple PA, Crowley WF (2000). Aromatase Inhibition in the Human Male Reveals a Hypothalamic Site of Estrogen Feedback. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3027-3035.
- Hedinger CE, Farquhar MG (1957). Elektronen mikroskopische Untersuchungen von zwei typen acidophiler Hypophysenvorderlappen zellen bei der Ratte. *Schweiz Z allg Pathol Bakteriolog*, 20: 766-768.

- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*, 87: 905-931.
- Herbert DC (1980). Morphology of the mamotrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition. *Amer J Anat*, 158: 521-531.
- Herbert DC, Cisneros PL, Rennels EG (1977). Morphological changes in Prolactin cells of male rats after testosterone administration. *Endocrinology*, 100: 487-495.
- Herbert DC, Schupples J, Poggel A, Gunzel P, El Etreby MF (1977a). Effect of cytoproterone acetate on prolactin secretion in the female Rhesus Monkey. *Cell Tissue Res*, 183: 51-60.
- Herlant M (1964). The cells of the adenohypophysis and their functional significance. *Int Rev Cytol*, 17: 299-382.
- Herzog T., Schlote W., 1992, Pituitary adenomas: tumor cell growth by cluster formation pattern analysis based on immunohistochemistry. *Acta Neuropathol (Berl)* , 1992;84(5):509-15.
- Hikake T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T (2010). Differential involvement of insulin-like growth factor-I and estrogen on prolactin cells in the mouse anterior pituitary. *Exp Biol Med*, 235: 974-980.
- Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P450, 17 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 865-870.
- Honda S, Harada N, Takagi Y (1994). Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 198:1153-1160.
- Horvath E, Kovacs K (1988). Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J Electron Microscop Tech*, 8: 401-432.
- Horvath E, Kovacs K. 2008. Pathology of tumors of the pituitary. En: *Clinical endocrine oncology*. Hay ID, Wass JAH, Eds. Blackwell Publishing.
- Hunt TE (1943).- Mitotic activity in the anterior hypophysis of female rats of different age groups and at different periods of the day. *Endocrinology*, 32: 334-339.
- Hunt TE, Hunt EA (1966).- A radioautographic study of the proliferative activity of adrenocortical and hypophyseal cells of the rat at different periods of the estrous cycle. *Anat. Rec.*, 156: 361-368.
- Hutson JC, Childs GV, Gardner PJ (1979). Considerations for establishing the validity of immunocytological studies. *J Histochem Cytochem*, 27: 1201-1202.
- Hyde JF, Engle MG, Maley BE (1991). Colocalization of galanin and prolactin within secretory granules of anterior pituitary cells in estrogen-treated Fischer 344 rats. *Endocrinology*, 129: 270-276.
- Hymer WC, McShan SW, Christiansen RG (1961). Electron microscopic studies of anterior pituitary glands from lactating and estrogen-treated rats. *Endocrinology*, 69: 81-90.
- Hymer WC, Page R, Kelsey RC, Augustine EC, Wilfinger W, Ciolkosz M.- Separated somatotrophs: their use in vitro and in vivo. En: *Synthesis and release of adenohypophyseal hormones* (Justisz M, McKerns KW, eds.), New York and London: Plenum Press, pp.: 125-166, 1980.
- Ikeda H, Yoshimoto T.- Developmental changes in proliferative activity of cells of the murine Rathke's pouch. *Cell Tiss Res*, 263: 41-47, 1991.
- Ingraham HA, Albert VR, Chen RP, Crenshaw 3d EB, Elsholtz HP, He X, Kapiloff MS, Mangalam HJ, Swanson LW, Treacy MN, Rosenfeld MG (1990). A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Annu Rev Physiol*, 52: 773-791.
- Inoue K, Ishikawa K, Tanaka S (1986).- Proliferation of gonadotrophs in castrated male rat anterior pituitary. En: *Pars distalis of the pituitary gland* (Yoshimura F, Gorbman A, eds.). Elsevier Science Publishers (Biomedical Division), pp.: 125-131.
- Inoue K, Tanaka S, Kurosumi K (1985).- Mitotic activity of gonadotropes in the anterior pituitary of castrated male rat. *Cell Tiss. Res.*, 240: 505-510.

- Ishibashi M, Yamaji T (1985). Mechanism of the inhibitory action of dopamine and somatostatin on prolactin secretion from human lactotrophs in culture. *J Clin Endocrinol Metab*, 60: 599-606.
- Iverson RA, Day KH, d'Emden M, Day RN, Maurer RA (1990). Clustered point mutation analysis of the rat prolactin promoter. *Mol Endocrinol*, 4: 1564-1571.
- Jackson AE, Bancroft C (1988). Proximal upstream flanking sequences direct calcium regulation of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol*, 2: 1139-1144.
- Jacobi J, Lloyd HM, Meares JD (1977).- Onset of oestrogen-induced prolactin secretion and DNA synthesis by the rat pituitary gland. *J. Endocrinol.*, 72: 35-39.
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bnick D (1998). Rat Testicular Germ Cells and Epididymal Sperm Contain Active P450 Aromatase. *J Androl*, 19: 65-71.
- Jenkins C, Michael D, Mahendroo M, Simpson E (1993). Exon-specific northern analysis and rapid amplification of cDNA ends (RACE) reveal that the proximal promoter II (PII) is responsible for aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression in human ovary. *Mol Cell Endocrinol*, 97: 1-6.
- Juntti SA, Tollkuhn J, Wu MV, Fraser EJ, Soderborg T, Tan S, Honda S, Harada N, Shah NM (2010). The Androgen Receptor Governs the Execution, but Not Programming, of Male Sexual and Territorial Behaviors. *Neuron*, 66: 260-272.
- Kalbermann LE, Szijan I, Burdman JA (1979). Cell proliferation in the rat pituitary gland. A mechanism of control in prolactin cells. *Experientia*, 35: 689-690.
- Kaltsas GA, Grossman AB (1998). Malignant pituitary tumours. *Pituitary*, 1: 69-81.
- Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N (2005). Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol*, 239: 27-36.
- Karamitopoulou E, Perentes E, Melachrinou M, Maraziotis T (1993). Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in human central nervous system neoplasms. *Acta Neurophatol*, 85: 316-322.
- Kawashima S, Takahashi S (1986).- Morphological and functional changes of prolactin cells during aging in the rat. En Pars distalis of the pituitary gland. Structure, function and regulation (Yoshimura F, Gorbman A, eds.). Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division), pp.: 51-56.
- Keech CA, Gutierrez-Hartmann A (1989). Analysis of rat prolactin promoter sequences that mediate pituitary-specific and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated gene expression in vivo. *Mol Endocrinol*, 3: 832-839.
- Kellis JT, Vickery LE (1987). Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem*, 262: 4413-4420.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*, 19: 103-113.
- Kilgore MW, Means GD, Mendelson CR, Simpson ER (1992). Alternative promotion of aromatase P-450 expression in the human placenta. *Mol Cell Endocrinol*, 83: R9-16.
- Kontogeorgos, G., Sambaziotis, D., Piaditis, G., Karameris, A (1997).- Apoptosis in human pituitary adenomas: a morphologic and in-situ end-labeling study. *Mod. Pathol.* 10: 921-926.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S (1997). Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 277: 559-562.
- Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Lloyd RV, Lancranjan I, Buchfelder M, Fahlbusch R (1991). Effect of dopamine agonist medication on prolactin producing pituitary adenomas. A morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 418: 439-46.
- Kovacs K, Horvath E (2005). Effects of medical therapy on pituitary tumors. *Ultrastruct Pathol*, 29: 163-167.
- Kovacs K, Horvath E, Vidal S (2001). Classification of pituitary adenomas. *J Neuro-Oncol*, 54: 121-127.

- Kovacs K, Ilse G, Ryan N, McComb DJ, Horvath E, Chen HJ, Walfish PG (1980). Pituitary prolactin cell hiperplasia. *Hormone Res*, 12: 87-95.
- Kudo A, Park MK, Kawashima S.- Effects of gonadotropinreleasing hormone (GnRH) on the cytodifferentiation of gonadotropes in rat adenohipophyseal primordia in organ culture. *Cell Tiss Res*, 276: 35-43, 1994.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS*, 93: 5925-5930.
- Kulig E, Jin L, Qian X, Horvath E, Kovacs K, Stefaneanu L, Scheithauer BW, Lloyd RV (1999). Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitaries: expression of the bcl-2 family of proteins.
- Kwakowsky A, Koszegi Z, Cheong RY, Abraham IM (2013). Neuroprotective effects of non-classical estrogen-like signaling activators: from mechanism to potential implications. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12: 1219-1225.
- Lam KSL, Srivastava G, Lechan RM, Lee T, Reichlin S (1990). Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Neuroendocrinology*, 52: 417-421.
- Lam M, DUBYAK G, Chen L, Nuñez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 6569-6573.
- Landberg G, Gross G (1991). Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res*, 51: 4570-4574.
- Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, Chimento A, Pezzi V, Maggiolini M (2013). Cross talk between GPER and growth factor signaling. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 137: 50-56.
- Leadem ChA, Blask DE (1982). Immunocytochemical and ultrastructural correlates of the pineal inhibition of prolactin cell activity in blind anosmic female rats. *Cell Tissue Res*, 227: 343-350.
- Leatherland JF, Renfree MB (1983 a). Structure of the pars distalis in the adult tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Cell Tissue Res*, 229: 155-174.
- Leatherland JF, Renfree MB (1983 b). Structure of the pars distalis in pouch-young tammar wallabies (*Macropus eugenii*). *Cell Tissue Res*, 230: 587-603.
- Leatherland JF, Ronald K (1978). Structure of the adenohipophysis in parturient female and neonate harp seals, *Pagophilus groensandicus*. *Cell Tissue Res*, 192: 341-357.
- Levy A, Lightman S (2003). Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours. *Front Neuroendocrinol*, 24: 94-127.
- Lew AM, Elsholtz HP (1991). Cloning of the human cDNA for transcription factor Pit-1. *Nucleic Acids Res*, 19: 6329.
- Lewis UJ, Singh RN, Sinha YN, Vanderlaan WP (1985). Glycosylated human prolactin. *Endocrinology*, 116: 359-363.
- Li S, Crenshaw EB, 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature*, 347: 528-533.
- Lieberman LE, Szjan I, Brudman JA (1979). Cell proliferation in the rat pituitary gland: A mechanism of control in prolactin cells. *Experientia*, 35: 689-691.
- Little DV (1974). A third note on recent research in geometrical probability. *Advanc Appl Prob*, 6: 103.
- Liu LX, Burgess LH, González AM, Sibley DR, Chiodo LA (1999). D2S, D2L, D3 and D4 dopamine receptors couple to a voltage-dependent potassium current in N18TG2 x mesencephalon hybrid cell (MES-23.5) via distinct G proteins. *Synapse*, 31: 108-118.
- Liu YF, Jakobs KH, Rasenick MM, Albert PR (1994). G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G₀ and G_{i2} in GH4C1 pituitary cells. *J Biol Chem*, 269: 13880-13886.

- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent JD. Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron*. 1999; 8:455-463.
- Lloyd HM, Meares JD, Jacobi J (1975). Effects of oestrogen and bromocryptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. *Nature*, 255: 497-498.
- Lloyd RV Kovacs K, Young jr WF, Farrel WE, Asa SL, Truillas J, Kontogeorgos G, Sano T, SCheithauer BW, Horvath E, DeLellis RA, Heitz PU (2004). Pituitary tumors. En : DeLellis R, Lloyd RV, Heitz PV, Eng C, eds. Introduction. WHO classification of tumors of the endocrine organs : pathology and genetics of endocrine organs. Lyon, ARC Press, pp. : 10-13.
- Lloyd RV, Cano M, Landefeld TD (1988). The effects of estrogens on tumor growth and on prolactin and growth hormone mRNA expression in rat pituitary tissues. *Am J Pathol*, 133: 397-406.
- López F (2014). Posible interacción de la aromatasa P450 y la hipófisis reproductora. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca.
- Losa M, Schopohl J, Muller OA, von Werder K (1985). Growth hormone releasing factor induces prolactin secretion in acromegalic patients but not in normal subjects. *Acta Endocrinol*, 109: 467-473.
- Loud AV, Barany WC, Pack BA (1965). Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab Invest*, 14: 996-1008.
- Loud AV, Barany WC, Pack BA. (1965): Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab Invest*, 14: 996-1008.
- Luciano AA, Sherman BM, Chapler FK, Hauser KS, Wallace RB (1985). Hyperprolactinemia and contraception: a prospective study. *Obst Gynecol*, 65: 506-510.
- MacLeod RM, Abad A, Eidson LH (1969). In vivo effect of sex hormones on the in vitro synthesis of prolactin and growth hormone in normal and pituitary tumor-bearing rats. *Endocrinology*, 84: 1475-1483.
- Mahendroo MS, Means GD, Mendelson CR, Simpson ER (1991). Tissue-specific expression of human P-450AROM. The promoter responsible for expression in adipose tissue is different from that utilized in placenta. *J Biol Chem*, 266: 11276-11281.
- Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER (1993). Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem*, 268: 19463-19470.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Lumberg B, Kastner P, Mark M, Chambin P, Evans RM (1985). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.
- Maurer RA (1982). Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem*, 257: 2133-2136.
- Maurer RA, Gorski J (1977). Effects of estradiol-17beta and pimozide on prolactin synthesis in male and female rats. *Endocrinology*, 101: 76-84.
- Maurer RA, Gorski J, McKean DJ (1977). Partial amino acid sequence of rat pre-prolactin. *Biochem J*, 161: 189-192.
- Mayhew TM, Cruz LM (1973). Stereological correction procedures for estimating true volume proportions from biased samples. *J Microscopy*, 99: 287-99.
- Mazurkiewicz JE, Nakane PK. – Cytodifferentiation of neoplastic pituitary cells in culture. En: Pars distalis of the pituitary gland (Yoshimura F, Gorbman A, eds.), Elsevier Science Publishers (Biomedical Division), pp.: 37-45, 1986.
- McComb D.J., Hellmann P., Thorner M.O., Scott D., Evans W.S., Kovacs ., Morphologic Effects of Bromocriptine on Spontaneously Occurring Pituitary Prolactin-Cell Hyperplasia in Old Long-Evans Rats. *Amer.J.Pathol*, 1986; 122:7-16.
- McComb DJ, Kovacs K., Beri J., ak F., Pituitary adenomas in old Sprague-Dawley rats: a histologic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *J Natl Cancer Inst.*, 1984 Nov; 73(5) 1143-66.
- McNicol AM, Murray JE, McMeekin W (1990).- Vasopressin stimulation of cell proliferation in the rat pituitary gland in vitro. *J. Endocrinol.*, 126: 255-259.

- McShan WH (1965). Ultrastructure and function of the anterior pituitary gland. En: Proc. 2th. Int. Cong. Endocrinol. London, 1964. (Selwyn, D.M., ed). Excerpta Medica Foundation, Amsterdam: 382-391.
- Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER (1991). Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol*, 5: 2005-2013.
- Meites J. Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging. *Neuroendocrinology* 1982;34:151-156.
- Melmed S (2003;). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*, 112: 1603-1618.
- Mendelson CR, Wright EE, Evans CT, Porter JC, Simpson ER (1985). Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification. *Arch Biochem Biophys*, 243: 480-491.
- Miles RE (1972). Multi-dimensional perspectives on stereology. *J Microscopy*, 95: 181.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW; Jaber M, Caaron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 1998. 78, 189-225.
- Molitch ME (2002). Prolactin. en: *The Pituitary 2ª edición*, S. Melmed ed.; Blackwell Publishing, Malden, Massachusetts, USA. pp:119-171
- Montero M, Sánchez F, Juanes JA, Blanco E, González R, Vázquez R, Carretero J (1990). Morphometric study of the ACTH-immunoreactive adenohypophysary cells. *An Anat*, 36: 47-54.
- Montmayeur JP, Bausero P, Amlaiky N, Maroteaux L, Hen R, Borrelli E. Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Letter*. 1991 January 28;278(2):239-43.
- Moriarty GC (1973). Adenohypophysis: Ultrastructural cytochemistry a review. *J Histochem Cytochem*, 21: 855-894.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996). ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*, 392: 49-53.
- Mountcastle RB, Roof BS, Mayfield RK, Mordes DB, Sagel J, Biggs PJ, Rawe SE (1989). Pituitary adenocarcinoma in an acromegalic patient: response to bromocriptine and pituitary testing: a review of the literature on 36 cases of pituitary carcinoma. *Am J Med Sci*, 298 : 109-118.
- Nakajin S, Shinoda M, Hall PF (1986). Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*,134: 704-10.
- Nakane PK (1970). Clasifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem*, 18: 9-20.
- Nakane PK (1973).- Distribution of gonadotropic cells in the anterior pituitary gland of the rat. En: *Regulation of mammalian reproduction* (Segal S, Crozier R, Corfman PA, Condliffe P eds.). Springfield, Illinois: Charles C Thomas, pp.: 79-88.
- Nakane PK (1975). Identification of anterior pituitary cells by immunoelectron microscopy. En: Tixier-Vidal A, Farquhar MG (ed): *The anterior pituitary*. Academic Press Inc. New York-San Francisco, pp.: 45-61.
- Nakane PK, Moriuchi T, Koji T, Taniguchi Y, Izumi S, Hui L (1989). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin): review and some new findings. *Acta Histochem Cytochem*, 22: 105-116.
- Neill JD, Freeman ME, Tillson SA (1971). Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology*, 89: 1448-1453.
- Nelson C, Albert VR, Elsholtz HP, Lu LI, Rosenfeld MG (1988). Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science*, 239 : 1400-1405.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O (1993). The P450 superfamily: up-date on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Bio*, 12: 1-51.

- Nicoll CS (1967). Bio-assay of prolactin. Analysis of the pigeon crop-sac response to local prolactin injection by an objective and quantitative method. *Endocrinology*, 80: 641-655.
- Nogami H, Yoshimura F (1982). Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec*, 202: 261-274.
- Nose-Alberti V, Mesquita MI, Martin LC, Kayath MJ (1998). Adrenocorticotropin-Producing Pituitary Carcinoma with Expression of c-erbB-2 and High PCNA Index: A Comparative Study with Pituitary Adenomas and Normal Pituitary Tissues. *Endocr Pathol*, 9: 53-62.
- Nouët JC, Kujas M (1975).- Variations of mitotic activity in the adenohipophysis of male rats during a 24-hour cycle. *Cell Tiss. Res.*, 164: 193-200.
- Oetting WS, Walker AM (1986). Differential isoform distribution between stored and secreted prolactin. *Endocrinology*, 119: 1377-1381.
- Ohmichi M, Koike K, Nohara A, Kanda Y, Sakamoto T, Zhang ZX, Hirota K, Miyake A (1994). Dopamine inhibits TRH-induced MAP kinase activation in dispersed rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 200: 742-748.
- Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T, Morii S. – Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Anat Rec*, 235: 111-120, 1993.
- Oliveira, MC. Moraes, JT. Barros, HM. Barbosa-Coutinho, LM. Effect of estrogen and neuroleptics on prolactin secretion and immunoreactive prolactin cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996. 29: 521-525.
- Olivereau M, Olivereau JM, Aimar Ch (1980). Responses of MSH and prolactin cells to 5-hydroxytryptophan (5-HTP) in amphibians and teleosts. *Cell Tissue Res*, 207: 377-385.
- Oomizu S, Boyadjieva N, Sarkar DK. Ethanol and estradiol modulate alternative splicing of dopamine D2 receptor messenger RNA and abolish the inhibitory action of bromocriptine on prolactin release from the pituitary gland. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003 Jun;27(6):975-80.
- Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB (1981). The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science*, 212: 815-816.
- Pantic V, Genbacev O (1969). Ultrastructure of pituitary lactotropic cells of oestrogen treated male rats. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Fors*,95: 280-289.
- Pantic V, Genbacev O (1972). Pituitaries of rats neonatally treated with oestrogen. I. Luteotropic and somatotrophic cells and hormones content. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Fors*,126: 41-52.
- Pantic VR (1975). The specificity of pituitary cells and regulation of their activities. En: Borune, G.H, y J.F. Danielli, eds., *International review of cytology*. Academic Press, New York, 40: 153-195.
- Pasolli, HA. Torres, AI. Aoki, A. Influence of lactotroph cell density on prolactin secretion in rats. *J. Endocrinol.* 1992. 134: 241-246.
- Pasteels JL (1963). Recherches morphologiques et expérimentales sur la sécrétion de prolactine. *Arch. Biol. (Liège)*, 74: 439-553.
- Pearse AG, Van Noorden S (1963). The functional cytology of the human adenohipophysis. *Can Med Assoc J*, 88: 462-471.
- Pelletier G, Desy L, Kerkerian L, Cote J (1984). Immunocytochemical localization of neuropeptide Y (NPY) in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res*, 238: 203-205.
- Pelletier G, Lemay A, Beraud G, Labrie F (1972). Ultrastructural changes accompanying the stimulatory effect of N-Monobutyl adenosine 3', 5'- Monophosphate on the release of growth hormone (GH), prolactin (PRL) and adrenocorticotropid hormone (ACTH) in rat anterior pituitary gland in vitro. *Endocrinology*, 91: 1355-1371.
- Pérez RL, Machiavelli GA, Romano MI, Burdman JA (1986). Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin-secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats. *J Endocrinol*, 108: 399-403.
- Pernicone PJ, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Young WF jr, Lloyd RV, Davis DH, Guthrie BL, Schoene WC (1997). Pituitary carcinoma : a clinicopathologic study of 15 cases. *Cancer*, 79: 804-812.

- Petrusz P, Sar M, Ordroneau P, Dimeo P (1976). Specificity in immunocytochemical staining. *J Histochem Cytochem*, 24: 1110-1115.
- Pfaffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown MR, Wit JM, Jansen M, Van der Nat H, Van den Brande JL, Rosenfeld MG, Ingraham HA (1992). Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science*, 257: 1118-1121.
- Phelps C.J., Hymer W.C. Effects of bromocriptine on prolactin cellular hypertrophy, proliferation and secretory activity in diethylstilbestrol-induced pituitary tumors. *Molecular and cellular Endocrinology*, 1988;58:137-148.
- Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. dopamine D2 receptors in signal transduction and behaviour. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1997. 11, 121-142.
- Pierce M, Shin SH (1980). Comparative studies of prolactin secretion in estradiol-primed and normal male rats induced by ether stress, pimozone and TSH. *Neuroendocrinology*, 31: 270-275.
- Pivonello R, Matrone C, Filipella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, Annunziato L, Lombardi G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunction pituitary tumor: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr;89(4):1674-83.
- Plourde PV, Dyroff M, Dukes M (1994). Arimidex®: A potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treat*, 30: 103-111.
- Pomerat GR (1941).- Mitotic activity in the pituitary of the white rat following castration. *Am. J. Anat.*, 69: 89-121.
- Ponchon M, Lause P, Maiter D (2000). In vitro effects of oestradiol on galanin gene expression in rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol*, 12:559-564.
- Prezant TR, Levine J, Melmed S (1998). Molecular characterization of the Men I tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1388-1391.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Ann Rev Physiol*, 70: 165-190.
- Prossnitz ER, Maggiolini M (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*, 308: 32-38.
- Purves HD, Griesbach WE (1951). The significance of the Gomori staining of the basophils of the rat pituitary. *Endocrinology*, 49: 652-662.
- Purves HD, Griesbach WE (1956). Changes in the basophil cells of the rat pituitary after thyroidectomy. *J Endocrinol*, 13: 365-375.
- Racadot J (1963). Modifications cytologiques du lobe antérieur de l'hypophyse de la brevis au cours du post partum. *C R Soc Biol*, 157: 729-732.
- Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Weintraub BD, Wondisford FE (1992). A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science*, 257: 1115-1118.
- Ragel BT, Couldwell WT (2004). Pituitary carcinoma: a review of the literature. *Neurosurg Focus*, 16: E7
- Reifel CW, Shin SH, Leather RA (1983). Extensive ultrastructural changes in rat mamotrophs following administration of the dopamine agonist ergocristine-reflecting inhibition of prolactin release. *Cell Tissue Res*, 232: 249-256.
- Riddle O, Bates RW, Dykshorn WS (1933). The preparation, identification and assay of prolactin hormone of the anterior pituitary. *Amer J Physiol*, 105: 191-216.
- Riddle O, Bates WR, Dykshorn WS (1932). A new hormone of the anterior pituitary. *Proc Soc Exptl Biol Med*, 29 : 1211-1212.
- Riddle O, Braucher FP (1931). Studies on the physiology of reproduction in birds. *Am J Physiol*, 97 : 614-625.

- Robker RL, Richards JS (1998). Hormone-Induced Proliferation and Differentiation of Granulosa Cells: A Coordinated Balance of the Cell Cycle Regulators Cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol*, 12: 924-40.
- Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW (1988). Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem*, 263: 9063-9066.
- Rohr HP, Bartsch G, Oberholzer M, Reith A, Hollinger O (1978). Stereology. En: *Electron microscopy in human medicine. 1. Instrumentation and techniques*. Johannessen JV; Ed. McGraw-Hill International Book Company. London pp: 285-309.
- Romano MI, Machiavelli GA, Pérez RL, Carricarte V, Burdman JA (1984).- Correlation between LH secretion in castrated rats with cellular proliferation and synthesis of DNA in the anterior pituitary gland. *J. Endocrinol.*, 102: 13-18.
- Romeis B (1940). Die Hypophyse. En: *Hand buch der mikroskopischen anatomic des menschen* (von Möllendorff W, Ed.). Springer. Berlin 6: 389-472.
- Roncaroli F, Nose V, Scheithauer BW, Kovacs K, Horvath E, Young WF Jr., Lloyd RV, Bishop MC, Hsi B, Fletcher JA (2003). Gonadotropic pituitary carcinoma: HER-2/neu expression and gene amplification. Report of two cases. *J Neurosurg*, 99: 402-408.
- Rosenbloom AL, Almonte AS, Brown MR, Fisher DA, Baumbach L, Parks JS (1999). Clinical and biochemical phenotype of familial anterior hypopituitarism from mutation of the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 50-57.
- Roubos EW, van der Wal-Divendal RM (1980). Ultrastructural analysis of peptide-hormone release by exocytosis. *Cell Tissue Res*, 207: 267-275.
- Rubio M, Carretero J, Sánchez F, Riesco JM, Vázquez RJ, Vázquez R (1992). Estradiol influences the LH response to met-enkephalin. *Acta Anat*, 145: 382-386.
- Rubio M, Sánchez F, Carretero J, Riesco JM, Cabo L, Vázquez R (1994). Immunohistochemical-morphometric study of the LH-adenohypophyseal cells following chronic treatment with met-enkephalin. *Histol Histopathol*, 9: 221-226.
- Sadoul JL, Thyss A, Freychet P (1992). Invasive mixed growth hormone/prolactin secreting pituitary tumour: complete shrinking by octreotide and bromocriptine, and lack of tumour growth relapse 20 months after octreotide withdrawal. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 126: 179-183.
- Saitoh Y, Hikake T, Hayashi S, Iguchi T, Sato T (2010). Involvement of insulin-like growth factor-I for the regulation of prolactin synthesis by estrogen and postnatal proliferation of lactotrophs in the mouse anterior pituitary. *Cell Tissue Res*, 340: 147-158.
- Saitoh, Y., Arita, N., Ohnishi, T., Ek-ramullah, S., Takemura, K., Hayakawa, T (1997).- Absence of apoptosis in somatotropinomas treated with actreotide. *Acta Neurochir. Wien*. 139: 851-856.
- Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, Yamamoto KR (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev*, 2: 1144-1154.
- Sakuma S, Shirasawa N, Yoshimura F (1984). A histometrical study of immunohistochemically identified mitotic adenohypophysial cells in immature and mature castrated rats. *J Endocrinol*, 100: 323-328.
- Salpenter MM, Farquhar MG (1981). High resolution analysis of the secretory pathway in mammatrophs of the rat anterior pituitary. *J Cell Biol*, 91: 240-246.
- Sánchez F, Carretero J, Rubio M, Riesco JM, Vázquez R (1993). Morphometric analysis of the hypoactivity of FSH-immunoreactive cells in estrogen-primed male rats. *Acta Histochem*, 94: 125-130.
- Santalo LA (1936). *Geometría integral* 15. *Abhandlungen* 12.
- Santolaya RC, Cioccia D, Maseschi E (1979). Effects of pimozide on the ultrastructure of the pars distalis in the rat. *Cell Tissue Res*, 199: 483-492.
- Sarkar DK (2006). Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Front Horm Res*, 35: 32-49.

- Sarkar DK, Gottschall PE, Meites J. Damage to hypothalamic dopaminergic neuron is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* 1982;218:684-686.
- Sarkar DK, Miki N, Meites J (1983). Failure of prolactin short loop feedback mechanism to operate in old as compared to young female rats. *Endocrinology*, 113: 1452-1458.
- Sasaki F, Sano M (1980). Role of the ovary in the sexual differentiation of prolactin and growth hormone cells in the mouse adenohypophysis during postnatal development: a stereological morphometric study by electron microscopy. *J Endocrinol*, 85: 283-289.
- Sato, S. (1980). Postnatal development, sexual difference and variation during the sexual cycle of prolactin cells in rats: The especial reference to the topographic affinity to a gonadotroph. *Endocrinol Jap*, 27: 573-583.
- Saunders PTK, Millar MR, Williams K, Macpherson S, Harkiss D, Anderson RA, Orr B, Nigel P, Groome GS, Fraser HM (2000). Differential Expression of Estrogen Receptor- α and - β and Androgen Receptor in the Ovaries of Marmosets and Humans. *Biol Reprod*, 63: 1098-1105.
- Saunders SL, Reifel CW, Shin SH (1983). Ultrastructural changes rapidly induced by somatostatin may inhibit prolactin release in estrogen-primed rat adenohypophysis. *Cell Tissue Res*, 232: 21-34.
- Schaufele F (1999). Regulation of estrogen receptor activation of the prolactin enhancer/promoter by antagonistic activation function-2-interacting proteins. *Mol Endocrinol*, 13: 935-945.
- Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo T J, Kovacs KT, Horvath E, Yapicier O, Young WF Jr, Meyer FB, Kuroki T, Riehle DL, Laws ER Jr (2006). Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery*, 59: 341-353.
- Scheithauer BW, Sano T, Kovacs KT, Young WF Jr., Ryan N, Randall RV (1990). The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. *Mayo Clin Proc*, 65: 461-474.
- Schoneman A (1892). Hypophysis und thyroids. *Virchow Arch*, 216: 443-452.
- Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, Toder M, Weinberg DS (1989). Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphoms. Digital image analysis of KI 67 antibody staining. *Am J Pathol*, 134: 327-336.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, 14: 133-151.
- Senogles SE (1994a). The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins. *J Biol Chem*, 269: 23120-23127.
- Senogles SE (1994b). The D2 dopamine receptor mediates inhibition of growth in GH4ZR7 cells: involvement of protein kinase-C epsilon. *Endocrinology*, 134: 783-789.
- Senovilla L, Nunez L, de Campos JM, de Luis DA, Romero E, Sanchez A, GarcíaSancho J, Villalobos C (2004). Multifunctional cells in human pituitary adenomas: implications for paradoxical secretion and tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 4545-4552.
- Sheng HZ, Zhadanov AB, Mosinger B Jr, Fujii T, Bertuzzi S, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Mahon KA, Westphal H (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science*, 272: 1004-1007.
- Sheperd NA, Richman PI, England J (1988). KI 67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol*, 155: 1213-1219.
- Shiino M, Ishikawa H, Rennels EG (1977). In vitro and in vivo studies on cytodifferentiation of pituitary clonal cells derived from the epithelium of Rathke's pouch. *Cell Tissue Res*, 181: 473-485.
- Shiino M, Williams G, Rennels EG (1972). Ultrastructural observation of pituitary release of prolactin in the rat by suckling stimulus. *Endocrinology*, 90: 176-187.
- Shirisawa N, Yoshimura F (1982). Immunohistochemical and electron microscopical studies of mitotic adenohypophysial cells in different ages of rats. *Anat. Embryol. (Berl.)*, 165: 51-61.
- Shome B, Parlow AF (1977). Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab*, 45: 1112-1115.

- Shull JD, Gorski J (1984). Estrogen stimulates prolactin gene transcription by a mechanism independent of pituitary protein synthesis. *Endocrinology*, 114: 1550-1557.
- Shull JD, Gorski J (1985). Estrogen regulates the transcription of the rat prolactin gene in vivo through at least two independent mechanisms. *Endocrinology*, 116: 2456-2462.
- Shull JD, Gorski J (1986). The hormonal regulation of prolactin gene expression: an examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of estrogen to these mechanisms. *Vitam Horm*, 43: 197-249.
- Shull JD, Gorski J (1989). Estrogen regulation of prolactin gene transcription in vivo: paradoxical effects of 17 beta-estradiol dose. *Endocrinology*, 124:279-285.
- Shupnik MA, Baxter LA, French LR, Gorski J (1979). In vivo effects of estrogen on ovine pituitaries: prolactin and growth hormone biosynthesis and messenger ribonucleic acid translation. *Endocrinology*, 104: 729-735.
- Shy KK, McTiernan AM, Daling JR, Weiss NS (1983). Oral contraceptive use and the occurrence of pituitary prolactinoma. *JAMA*, 249: 2204-2207.
- Sinha YN, Selby FW, Lewis UJ, VanderLaan WP (1973). A homologous radioimmunoassay for human prolactin. *J Clin Endocrinol Metab*, 36: 509-516.
- Smith RE Farquhar MG (1970). Modulation in nucleoside diphosphatase activity of mammotrophic cells of the rat denohypophysis during secretion. *J Histochem Cytochem*, 18: 237-250.
- Smith RE, Farquhar MG (1966). Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J Cell Biol*, 31: 319-347.
- Somasekhar MB, Gorski J (1988). Two elements of the rat prolactin 5' flanking region are required for its regulation by estrogen and glucocorticoids. *Gene*, 69: 13-21.
- Sorby H (1856). On slaty cleavage as exhibited in the Devonian limestones of Devonshire. *Phil Mag*, 11: 20.
- Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet-of-Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature*, 384: 327-333.
- Southgate, TD. Windeatt, S. Smith-Arica, J. Gerdes, CA. Perone, MJ. Morris, I. Davis, JR. Klatzrnann, D. Löwens-tein, PR. Castro, MG. Transcriptional targeting to anterior pituitary lactotrophic cells using recombi-nant adenovirus vectors in vitro and in vivo in normal and estrogen/sulpiride-induced hyperplastic an-terior pituitaries. *Endocrinology*. 2000. 141: 3493-3505.
- Städler F, Stocker E, Dhom G, Tietze HU (1970).- Autoradiographic studies on nuclear DNA and RNA synthesis in the adenohipophysis of castrated rats. *Acta Endocrinol*. 64: 324-338.
- Stanley F (1989). Transcriptional regulation of prolactin gene expression by thyroid hormone--alternate sup-pression and stimulation in different GH cell lines. *Mol Endocrinol*, 3: 1627-1633.
- Stefan Y, Benakis A (1976). [Ultrastructural study of stimulation induced by sulpiride on prolactin and gonad-otrope cells of hypophysis in male and female rats (author's transl)]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 37:375-388.
- Stefaneanu L, Kovacs K, Lloyd RV, Scheithauer BW, Young WF Jr, Sano T, Jin L (1992).- Pituitary lacotrophs and somatotrophs in pregnancy: a correlative in situ hybridization and immunocytochemical study. *Vir-chows Archiv B Cell Pathol*, 62: 291-296.
- Stepián H, Wolaniuk A, Pawlikowski M (1978).- Effects of pimozide and bromocriptine on anterior pituitary cell population. *J. Neural Transm.*, 42: 239-244.
- Sternberger L (1979). *Immunocytochemistry*. Wiley J, Sons, eds. New York 2nd ed.
- Suh HK, Frantz AG (1974). Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endo-crinol Metab*, 39: 928-935.
- Surks MI, DeFesi CR. – Determination of the cell number of each cell type in the anterior pituitary of euthroid and hypothyroid rats. *Endocrinology* 101: 946-958, 1977.

- Takahashi S, Kawashima S. – Age-related changes in prolactin cell percentage and serum prolactin levels in intact and neonatally gonadectomized male and female rats. *Act Anat* 113: 211-217, 1982.
- Takahashi S, Okazaki K, Kawashima S (1984). Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell Tissue Res*, 235: 497-502.
- Taylor WA, Uttley D, Wilkins PR (1994). Multiple dural metastases from a pituitary adenoma. Case report. *J Neurosurg*, 81 : 624-626.
- Thompson EA Jr, Siiteri PK (1976). Partial resolution of the placental microsomal aromatase complex. *J Steroid Biochem*, 7:636-639.
- Thompson EA, Siiteri PK (1974a). The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem*, 249: 5373-5378.
- Thompson EA, Siiteri PK (1974b). Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem*, 249: 5364-5372.
- Thomson JA, Davies DL, McLaren EH, Teasdale GM. Ten year follow up of microprolactinoma treated by transsphenoidal surgery. *Brit Med J* 1994;309: 1409-1410.
- Tixier-Vidal A, Gourdj D (1980). Endocytosis in cultured prolactin cells. En: *Central and peripheral regulation of prolactin function*. (R.M. MacLeod y U, Scapagnini, ed). Raven Press, New York. pp.: 125-140.
- Tixier-Vidal A, Tougard C, Dufy B, Vincent JD (1982). Morphological functional and electrical correlates in anterior pituitary cells. En: *Neuroendocrine perspectives, vol. I* (Müller, E.E.; MacLeod, R.M. eds) Elsevier Biomedical Press. pp.: 211-251.
- Toda K, Shizuta Y (1993). Molecular cloning of a cDNA showing alternative splicing of the 5'-untranslated sequence of mRNA for human aromatase P-450. *Eur J Biochem*, 213: 383-389.
- Toledano Y, Zonis S, Ren SG, Wawrowsky K, Chesnokova V, Melmed S (2012). Estradiol partially recapitulates murine pituitary cell cycle response to pregnancy. *Endocrinology*, 153: 5011-5022.
- Torres AI, Aoki A (1987). Release of big and small molecular forms of prolactin: dependence upon dynamic state of the lactotroph. *J Endocrinol*, 114: 213-220.
- Tougaard C, Picart R, Tixier-Vidal A (1980).- Electron microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture. *Am J Anat*, 158: 471-490.
- Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*, 12: 1691-1704.
- Treier M, Rosenfeld MG (1996). The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr Opin Cell Biol*, 8: 833-843.
- Treier M1, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev*, 12: 1691-1704.
- Trunet PF, Mueller P, Bhatnagar AS, Dickes I, Monnet G, White G (1993). Open dose-finding study of a new potent and selective nonsteroidal aromatase inhibitor, CGS 20 267, in healthy male subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 319-323.
- Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA (1984). Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J*, 3: 429-437.
- Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA (2003). Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev*, 24: 600-632.
- Underwood EE, (1970). *Quantitative sterology*. Addison Wesley, Massachusetts.
- Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O (1990). Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK-fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem*, 265: 10320-10326.

- Van Noorden S, Polak JM, Bloom SR, Bryant MG (1979). Vasoactive intestinal polypeptide in the pituitary pars nervosa. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 5: 149-153.
- Van Oordt PGYJ (1965). Nomenclature of the hormone producing cells in the adenohipophysis. *Gen Com Endocr*, 5: 131-134.
- Vance ML (2003). Medical treatment of functional pituitary tumors. *Ultrastruct Pathol*, 14: 81-87.
- Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Deneef C (1989). Production of interleukin-6 by folliculostellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology*, 49: 102-106.
- Vaux DL, Strasser A (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 2239-2244.
- Vázquez R, Carretero J, Pérez MN, Juanes JA, Vázquez RJ, Angoso M (1990a). La met-enkefalina induce cambios en las células PRL de ratas machos tratadas previamente con estrógenos. *An Anat*, 36: 330-332.
- Vázquez-Perfecto RJ. – Estradiol, testosterona, corticosterona y dopamina como reguladores de la proliferación de las células VIPérgicas hipofisarias de la rata. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, 1994.
- Vician L, Shupnik MA, Gorski J (1979). Effects of estrogen on primary ovine pituitary cell cultures: stimulation of prolactin secretion, synthesis, and preprolactin messenger ribonucleic acid activity. *Endocrinology*, 104: 736-743.
- Villalobos C, Nunez L, Garcia-Sancho J (2004). Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammatropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch*, 449: 257-264.
- Von Lawzewitsch I, Debeljuk L, Puig R (1972a). The acute and prolonged effects of curde hypothalamic extract on the anterior pituitary glands cells. An electron microscopic study. I. Somatotrophs and mammatrophs. *Acta Anat (Basel)*, 83: 575-592.
- Von Lawzewitsch I, Dickmann GH, Amezúa L, Pardal C (1972b). Cytological and ultrastructural characterization of the human pituitary. *Acta Anat (Basel)*, 81: 286-316.
- Voss JW, Rosenfeld MG (1992). Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. *Cell*, 70: 527-530.
- Wallis M (2000). Episodic evolution of protein hormones: molecular evolution of pituitary prolactin. *J Mol Evol*, 50: 465-473.
- Wallis M, Daniels M, Ellis SA (1980). Size heterogeneity of rat pituitary prolactin. *Biochem J*, 189: 605-614.
- Watanabe YG (1985). Effects of brain and mesenchyme upon the cytogenesis of rat adenohipophysis in vitro. II. Differentiation of LH cells. *Cell Tissue Res*, 242: 49-55.
- Watanabe YG, Daikoku S (1979). An immunohistochemical study on the cytogenesis of adenohipophysial cells in fetal rats. *Dev Biol*, 68: 557-567.
- Waterman MR, Simpson ER (1985). Regulation of the biosynthesis of cytochromes P-450 involved in steroid hormone synthesis. *Mol Cell Endocrinol*, 39: 81-89.
- Weibel ER (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 26: 235-302.
- Weibel ER, Bolender RP (1973). Stereological techniques for electron microscopy. En: *Principle and techniques of electron microscopy*. Hyatt MA; Ed. Van Nostrand-Reinhold, New York. pp: 239-296.
- Weibel ER, Kistler GS, Tondury G (1966). A stereologic electron microscope study of "tubular myelin figures" in alveolar fluids of rat lungs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 69: 418-427.
- Whitaker MD, Klee GG, Kao PC, Randall RV, Heser DW (1984). Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J Clin Endocrinol Metab*, 58: 826-830.
- Wicklund J, Wertz N, Gorski J (1981). A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. *Endocrinology*, 109: 1700-1707.
- Wilson DB, Christensen E. – Prenatal cytodifferentiation on the pars distalis of the dwarf mutant mouse. *Acta Anat*, 114: 259-267, 1982.

- Wilson DE (1982). Pituitary carcinoma occurring as middle ear tumor. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 90: 665-666.
- Wolf JB, David VA, Deutch AH (1990). Identification of a distal regulatory element in the 5' flanking region of the bovine prolactin gene. *Nucleic Acids Res*, 18: 4905-4912.
- Wu X, Zhang R, Xu R, Zhou Y, Di A (1998). [E2-induced prolactin-secreting tumor of heteroplasmy pituitary in renal capsule of the rats]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 20: 257-263.
- Yamamoto N, Seo H, Suganuma N, Matsui N, Nakane T, Kuwayama A, Kageyama N (1986). Effect of estrogen on prolactin mRNA in the rat pituitary. Analysis by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroendocrinology*, 42: 494-497.
- Yin DX, Schimke RT (1996). Inhibition of apoptosis by overexpressing Bcl-2 enhances gene amplification by a mechanism independent of aphidicolin pretreatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 3394-3398.
- Yoshimura F, Soji T, Yachi H, Ishikawa H (1974). Life stage and secretory cycle of anterior pituitary basophils. *Endocrinol Jap*, 21: 217-249.
- Zahedi A, Booth GL, Smyth HS, Farrell WE, Clayton RN, Asa SL, Ezzat S (2001). Distinct clonal composition of primary and metastatic adrenocorticotrophic hormone-producing pituitary carcinoma. *Clin Endocrinol*, 55: 549-556.
- Zanini A, Giannattasio G, Meldolesi J (1974). Studies on in vitro synthesis and secretion of growth hormone and prolactin. II. Evidence against the existence of precursor molecules. *Endocrinology*, 94: 104-111.
- Zhao Y, Mendelson CR, Simpson ER (1995). Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Mol Endocrinol*, 9: 340-349.
- Zhou-Li F, Albadalejo V, Joly-Pharaboz MO, Nicolas B, Andre J. – Antiestrogens prevent the stimulatory effects of L-triiodothyronine on cell proliferation. *Endocrinology*, 130: 1145-1152, 1992.
- Zimmerman EA, Defendini R, Frantz AG (1974). Prolactin and growth hormone in patients with pituitary adenomas: A correlative study of hormone in tumor and plasma by immunoperoxidase technique and radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab*, 38: 577-585.
- Zumpe D, Clancy AN, Bonsall RW, Michael RP (1996). Behavioral responses to Depo-Provera, Fadrozole, and estradiol in castrated, testosterone-treated cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): the involvement of progesterin receptors. *Physiol Behav*, 60:531-540.