CLAUDIA VEIGA CHANG

Análise de marcadores de células-tronco/progenitoras em hipófises de modelos animais com hipopituitarismo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de Carvalho

SÃO PAULO
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Chang, Claudia Veiga
Análise de marcadores de células-tronco/progenitoras em hipófises de modelos animais com hipopituitarismo / Claudia Veiga Chang. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.
Orientador: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Hipófise/crescimento & desenvolvimento 3.Hipopituitarismo/congênito 4.Modelos animais 5.Camundongos mutantes/crescimento & desenvolvimento 6.Camundongos transgênicos/crescimento & desenvolvimento 7.Células-tronco pluripotentes 8.Imunoistoquímica 9.Reação em cadeia da polimerase em tempo real 10.Fatores de transcrição SOX 11.Fatores de transcrição SOXB1 12.Nicho de células-tronco

USP/FM/DBD-347/13

Aos meus queridos avós:

"Raízes fortes"

Volto no tempo,
Sinto o cheiro do mar e a música das ondas quebrando na areia...
Sinto o vento acariciando o meu rosto...
Olho da janela,
Vejo meus avós brincando comigo na praia,
Falam-me sobre a vida, sobre o mundo,
Minha gratidão permanecerá por todos os dias da minha existência.
Levarei comigo todos os ensinamentos e princípios.
O olhar de orgulho misturado ao sorriso do amor.
Vocês estarão sempre comigo.
"Raízes fortes...
Raízes muito fortes..."

Ao meu querido marido:

*"**Que solidão errante..."***

Meu amor,
Não sei quantas vidas já tive,
Nem quantas vidas terei,
A única certeza que tenho,
Depois de 15 anos ao seu lado,
é que você é
Minha paz e minha fortaleza,
Minha alegria e meu refúgio...
"Que solidão errante...
até a sua companhia".

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos avós, que me criaram e me proporcionaram todas as oportunidades que tive na vida, vocês me deram muito mais do que educação, princípios ou valores, vocês me deram amor... Serei eternamente grata por tudo o que sempre fizeram por mim. Nunca conseguirei agradecer o suficiente...

Ao meu avô Genésio (Caramelo), com quem aprendi a ter coragem, determinação e, acima de tudo, motivação no auge dos seus 98 anos.

A minha doce e eterna avó Norma, com quem aprendi que o amor e um sorriso podem ser os maiores dons...

A minha mãe...

Ao meu pai e à tia Gleides, admiro muito toda a história de vida e de conquistas de vocês.

Aos meus irmãos, que me fazem ter a certeza de que nunca estarei sozinha.

Aos meus sobrinhos, que me fazem ter a certeza de querer ser mãe.

A minha tia Lucinha, por todo carinho desde a minha infância.

À família Chang, admiro a garra e a coragem de se chegar a um país distante e conseguir construir tudo o que vocês construíram...

A "pequena" grande família do meu esposo, vocês se tornaram também a minha família, amo cada um de vocês...

Aos meus tios, Tuca e tia Chang, pelo suporte no primeiro ano da faculdade.

Aos locais pelos quais passei e que sem eles não teria chegado onde estou: Colégio Rui Barbosa em Guarapari, Colégio Leonardo da Vinci em Vitória, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e UNESP (Botucatu).

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF, em particular, às professoras Martha Guerra e Vera Peters, que fizeram com que eu me apaixonasse pela pesquisa desde os primeiros anos da faculdade.

À Unesp e a todos os professores da Clínica Médica e Endocrinologia! A todos os meus colegas e amigos da residência! Considero esta a fase da minha vida em que tive a maior curva de aprendizado...

A todos os amigos do colégio, da Faculdade, da Residência e da USP.

A todos aqueles que estiveram comigo ao longo de toda minha jornada...

As minhas amigas, Renata, Sabrina e Vaninha. Dizem que quem tem um verdadeiro amigo na vida pode se considerar uma pessoa de sorte. Eu tenho três! Ter a amizade de vocês é uma dádiva!

Aos meus amigos:

Luciana Pepino e Rodrigo Léllis, pelas inúmeras lições de gestão de carreira!

Felipe Gaia, por todo apoio e pelos conselhos desde a época da residência.

Erica Barcellos e Renata Marques, por todos estes anos trabalhando juntas e compartilhando projetos, metas e sonhos...

Ao Instituto Superior de Medicina (ISMD), em particular, à Raquel Vilar e Roberta Motta, que compartilham comigo a paixão pelo ensino!

Aos alunos do ISMD, que me fazem ter a certeza de que o melhor conhecimento é aquele que não é retido, é disseminado...

Por fim, gostaria de agradecer aos que me deram suporte diretamente com a concretização desta tese e do projeto:

- Ao CNPq e à Fapesp, fundamentais na pesquisa em nosso país e sem os quais teria sido impossível desenvolver este projeto;

- À Profa. Sally Camper, nossa colaboradora da Universidade de Michigan, poder ter feito este nível de pesquisa foi um grande privilégio;

- A todos do Biotério da Faculdade de Medicina da USP, que nos deram todo o suporte com relação as nossas linhagens... Um agradecimento em especial à Luci, que cuidou dos nossos animais com o máximo de cuidado e zelo;

- A Patologia, pela parceria e paciência, em particular, ao Dr. Iberê, à Alda e à Cinthya;

- A todos os amigos e professores do LIM 42, em particular, à Profa. Berenice, por todo suporte e apoio desde o início...

- Aos amigos Ricardo Araujo, Cinthya Cerqueira, Mariana Guzzo e Agata, vocês foram mais que colaboradores, vocês se tornaram grandes amigos... repartimos angústias, compartilhamos expectativas, vibramos com resultados... Vocês me mostraram que o doutorado é muito mais que lâminas, pipetas ou reagentes... Que a ciência é muito mais que "dar respostas"... Que verdadeiros amigos podemos encontrar a qualquer hora!

- A minha doce e querida orientadora, Dra. Luciani Carvalho, você foi "mais" um presente de Deus na minha vida... Com um projeto apaixonante e desafiador! Com você, aprendi muito mais que pesquisa... Você soube me ensinar ciência, me motivar a fazer perguntas e, principalmente, me mostrou quando a parte pessoal era mais importante... Ter tido você como orientadora foi uma enorme honra e privilégio para mim!

- À Faculdade de Medicina da USP, por ter permitido a realização e a concretização deste enorme sonho;

- Aos meus pacientes, que me dão a convicção de que escolhi a profissão mais linda, motivante e apaixonante que se poderia ter...

Ao meu esposo, por todo o seu suporte e incentivo... por todas as vezes em que eu iria cair e você me levantou, por todas as vezes em que eu iria desanimar e você me motivou, por todos os dias que tivemos e que teremos juntos, ***meu eterno amor****...*

“Viver é como andar de bicicleta: é preciso estar em constante movimento para manter-se o equilíbrio”.

(Albert Einstein)

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO..... 2
1.1. Mecanismos responsáveis pela renovação glandular hipofisária.. 2
1.2. Conceito de células-tronco..... 3
1.3. Principais marcadores e histórico de estudos envolvendo células-tronco/progenitoras na hipófise..... 5
1.4. Embriogênese e organogênese hipofisária..... 8
1.5. Fatores de transcrição e vias de sinalização..... 11
1.6. Deficiência hipofisária hormonal múltipla e histórico dos modelos de animais com hipopituitarismo..... 15
1.7. Outros marcadores relevantes para o entendimento do estudo..... 19
1.8. Justificativa do estudo..... 20

2 OBJETIVOS.....23
2.1. Objetivo Geral.....23
2.2. Objetivos Específicos..... 23

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 25
3.1 Estudo colaborativo.....25
3.2 Modelos animais.....25
3.2.1 Considerações éticas..... 25
3.2.2 Descrição das linhagens.....25
3.2.2.1 Camundongo α-GSU: transgênico do gene *Cga*..... 25
3.2.2.2 Camundongo Snell: mutante espontâneo gene *Pou1f1*... 27
3.2.2.3 Camundongo Ames: mutante espontâneo gene *Prop1*... 27
3.3 Tempo de estudo.....28
3.4 Casuística.....28
3.5 Genotipagem..... 29
3.6 Imuno-histoquímica..... 31
3.6.1 Imuno-histoquímica convencional.....31
3.6.2 Programa de contagem– *Image Pro Plus*..... 31
3.7 RT-qPCR..... 32
3.7.1 Extração de RNA.....32
3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)..... 33
3.7.3 RT-qPCR.....33
3.8 Análise estatística.....34

4 RESULTADOS.....37
4.1 Relações anatômicas e morfologia hipofisária..... 37
4.2 Desenvolvimento hipofisário pós-natal: análise histológica por hematoxicilina-eosina (HE).....38
4.3 Imuno-histoquímica..... 42
4.4 RT-qPCR..... 46
4.4.1 Expressão relativa dos genes analisados nos mutantes, utilizando-se os selvagens como calibradores..... 46
4.4.1.1 Linhagem αGSU (*Cga*).....46
4.4.1.2 Linhagem Snell (*Pou1f1*)..... 50
4.4.1.3 Linhagem Ames (*Prop1*).....54
4.4.2 Análise evolutiva da expressão relativa do gene *Sox2* na linhagem Ames (*Prop1)*.....59

5 DISCUSSÃO.....62
5.1. Morfologia hipofisária: hiperplasia na linhagem αGSU (*Cga)*, hipoplasia na linhagem Snell (*Pou1f1*) e hipoplasia com dismorfologia na linhagem Ames (*Prop1*)..... 62
5.2. A imunolocalização do SOX2 ocorre na região da zona marginal e em nichos difusos no lobo anterior da hipófise.....64
5.3. Os marcadores de células-tronco/progenitoras estão reduzidos na linhagem αGSU (*Cga*) e aumentados nas linhagens Ames (*Prop1*) e Snell (*Pou1f1*).....66
5.4. Análise conjunta do RT-qPCR e IHQ: maior transcrição na vida adulta dos marcadores de células-tronco/progenitoras nos mutantes das linhagens Ames (*Prop1*) e Snell (*Pou1f1*) utilizando-se os selvagens como calibradores, mas baixo índice de imunolocalização de SOX2 na IHQ..... 70
5.5. Divergências encontradas nos marcadores de células-tronco/progenitoras das linhagens em estudo já descritos na hipófise..... 72
5.6. *Nr2e1* (*Tlx*): um novo marcador de célula tronco/progenitora na hipófise..... 78
5.7. Considerações finais..... 80

6 CONCLUSÕES.....83

7 ANEXOS.....85

8 REFERÊNCIAS..... 104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
Actb	*Actin Beta*
αGSU	Subunidade Alfa Glicoproteica
Bmi1	*B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1*
Casp 3	*Caspase 3*
Casp 7	*Caspase 7*
Cd44	*Cd44 Antigen*
cDNA	DNA Complementar
Cga	Gene Codificador Unidade Alfa Glicoproteica
CO_2	Dióxido de Carbono
DAB	Diaminobenzidina
DP	Desvio-padrão
FSH	Hormônio Foliculoestimulante
GAPDH	*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GFP	*Protein Fluorescein Green*
Gfra2	*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Receptor Alpha 2*
GH	Hormônio de Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HE	Hematoxilina-Eosina
HPRT	*Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*
Hes1	*Hairy and Enhancer of Split 1*
Hesx1	*Homeobox Gene Expressed in Embrionic Stem Cell 1*
HRP	*Horseradish Peroxidase*
IHQ	Imuno-histoquímica
Isl1	*ISL1 Transcription Factor, LIM/Homeodomain*
Ki67	*Antigen Identified by Monoclonal Antibody Ki 67*
LH	Hormônio Luteinizante
Lhx3	*LIM Homeobox Protein 3*
MGDC	*Mouse Genomic DNA Contamination*
Nanog	*Nanog Homeobox*

Nestin	*Nestina*
Notch2	*Notch Homolog 2 (Drosophila)*
Nr2e1	*Nuclear Receptor Subfamily 2, Group E, Member 1*
Oct4	*Octamer-Binding Protein 4*
Otx2	*Orthodenticle Homeobox 2*
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
Pit1	*Pituitary-Specific Transcription Factor 1 (Pou1f1)*
PPC	*Positive PCR Control*
Pou1f1	*POU Class 1 Homeobox 1*
Prop1	*Prophet of Pit1, Paired-Like Homeodomain Transcription Factor*
Pou5f1	*POU Domain, Class 5, Transcription Factor 1*
PRL	Hormônio Prolactina
RT-qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcrição Reversa Quantitativa
RTC	*Reverse Transcription Control*
S100β	*S100 Protein Beta Polypeptide Neural*
Sca1	*Stem Cell Antigen 1*
SNC	Sistema Nervoso Central
Sox1	*SRY-Box Containing Gene 1*
Sox2	*SRY-Box Containing Gene 2*
Sox3	*SRY-Box Containing Gene 3*
Sox9	*SRY-Box Containing Gene 9*
SSEA4	*Stage Specific Embryonic Antigen-4*
TSH	Hormônio Tireoestimulante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Embriogênese e organogênese da hipófise de camundongo..... 10

Figura 2 Genes e fatores de transcrição envolvidos na formação hipofisária..... 11

Figura 3 Linhagens Snell e Ames..... 17

Figura 4 Modelos do desenvolvimento hipofisário em camundongos selvagens e mutantes Ames (Prop1) e Snell (Pou1f1)..... 18

Figura 5 Linhagem αGSU..... 19

Figura 6 Geração do modelo transgênico nocaute para o gene *Cga*..... 26

Figura 7 Corte histológico coronal mostrando a correlação da hipófise com outras estruturas anatômicas em animal αGSU P0 ($Cga^{+/+}$)..... 37

Figura 8 Corte histológico coronal da hipófise mostrando as subdivisões anatômicas em animal Snell P0 ($Pou1f1^{+/+}$)..... 38

Figura 9 Desenvolvimento hipofisário nos camundongos da linhagem αGSU (*Cga*)..... 40

Figura 10 Desenvolvimento hipofisário nos camundongos da linhagem Snell (*Pou1f1*)..... 40

Figura 11 Desenvolvimento hipofisário nos camundongos da linhagem Ames (*Prop1*)..... 41

Figura 12 Hipófise do animal mutado αGSU ($Cga^{-/-}$) com 8 semanas..... 42

Figura 13 Imunolocalização de SOX2 na linhagem αGSU (*Cga*) ao nascimento (P0)..... 43

Figura 14 Imunolocalização de SOX2 na linhagem Snell (*Pou1f1*) ao nascimento (P0)..... 43

Figura 15 Imunolocalização de SOX2 na linhagem Ames (*Prop1*) ao nascimento..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Total de animais coletados e emblocados em parafina para realização de IHQ nos diferentes tempos..... 30

Tabela 2 Total de hipófises coletadas e estocadas a -80ºC para a realização do RT-qPCR nos diferentes tempos..... 30

Tabela 3 Relação dos genes da placa customizada para a realização de RT-qPCR..... 33

Tabela 4 Expressão relativa dos genes marcadores de apoptose nas linhagens αGSU (Cga), Snell (Pou1f1) e Ames (Prop1) por RT-qPCR..... 58

Tabela 5 Principais estudos envolvendo células-tronco/progenitoras e hipófise..... 76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Imunolocalização de SOX2 na linhagem αGSU (*Cga*) nos diferentes tempos.....45

Gráfico 2 Expressão relativa de cada gene marcador de células-tronco/progenitoras na linhagem αGSU (*Cga*) por RT-qPCR....48

Gráfico 3 Expressão relativa dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras na linhagem αGSU (*Cga*) por RT-qPCR: visão geral..... 49

Gráfico 4 Expressão relativa dos fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1* e *Otx2*) na linhagem αGSU (*Cga*) por RT-qPCR..... 49

Gráfico 5 Expressão relativa dos fatores de diferenciação e proliferação celular na linhagem αGSU (*Cga*) por RT-qPCR.....50

Gráfico 6 Expressão relativa de cada gene marcador de células-tronco/progenitoras na linhagem Snell (*Pou1f1*) por RT-qPCR.....52

Gráfico 7 Expressão relativa dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras na linhagem Snell (*Pou1f1*) por RT-qPCR: visão geral..... 53

Gráfico 8 Expressão relativa dos fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1* e *Otx2*) na linhagem Snell (*Pou1f1*) por RT-qPCR..... 53

Gráfico 9 Expressão relativa dos fatores de diferenciação e proliferação celular na linhagem Snell (*Pou1f1*) por RT-qPCR.....54

Gráfico 10 Expressão relativa de cada gene marcador de células-tronco/progenitoras na linhagem Ames (*Prop1*) por RT-qPCR.....56

Gráfico 11 Expressão relativa dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras na linhagem Ames (*Prop1*) por RT-qPCR: visão geral..... 57

Gráfico 12 Expressão relativa dos fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1* e *Otx2*) na linhagem Ames (*Prop1*) por RT-qPCR.....57

Gráfico 13 Expressão relativa dos fatores de diferenciação e proliferação celular na linhagem Ames (*Prop1*) por RT-qPCR..... 58

Gráfico 14 Expressão relativa evolutiva dos níveis transcricionais do *Sox2* na linhagem Ames (*Prop1*) por RT-qPCR, utilizando-se o P0 do selvagem como calibrador.....60

RESUMO

Chang CV. *Análise de marcadores de células-tronco/progenitoras em hipófises de modelos animais com hipopituitarismo* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013. p. 116.

Introdução: As células-tronco apresentam capacidade de proliferação, autorrenovação, potencial de diferenciação e já foram descritas na hipófise estando envolvidas na renovação celular e regulação homeostática, porém pouco se sabe sobre o seu perfil de expressão nos quadros de hipopituitarismo. Dentre os marcadores de células-tronco descritos previamente na hipófise, destacam-se os genes *Sox2*, *Nanog*, *Nestina*, *Cd44* e *Oct4*. Outro marcador, o gene *Nr2e1* (*Tlx*), encontrado em células-tronco neuronais, apresenta-se elevado durante a embriogênese e na vida adulta no cérebro de camundongos, mas, até o momento, não foi caracterizado na hipófise. **Objetivo:** Analisar a imunolocalização do SOX2 e o padrão de expressão de marcadores de células-tronco/progenitoras, fatores de transcrição precoce, marcadores de apoptose e proliferação celular na hipófise de três linhagens de camundongos com hipopituitarismo de causa genética por alteração em fatores precoces de diferenciação glandular, as linhagens Ames (*Prop1*) e Snell (*Pou1f1*), e por fator tardio de conjugação dos hormônios glicoproteicos, a linhagem αGSU, nocaute do gene *Cga*. **Material e Métodos:** Foram coletadas hipófises nos tempos P0 (ao nascimento), P7 (final da primeira onda de crescimento glandular), 4 semanas (4S-período da puberdade) e 8 semanas (8S-vida adulta). Nas três linhagens de animais, realizou-se imuno-histoquímica com SOX2 e RT-qPCR com os marcadores de células-tronco/progenitoras *Sox2*, *Nanog*, *Nestina, Cd44, Oct4 e Nr2e1*, fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1* e *Otx2)*, fator de proliferação celular (*Ki67),* fatores de diferenciação celular (*S100β* e *Sox9*) e marcadores de apoptose (*Caspases 3* e 7). A quantificação relativa dos genes-alvo nos animais mutantes teve como calibrador os seus respectivos selvagens. **Resultados**: A imunolocalização do SOX2 foi observada na zona que circunda a fenda de Rathke (camada marginal) e em nichos difusos pela glândula nas três linhagens estudadas. Na linhagem αGSU, evidenciou-se uma redução de *Nanog, Nr2e1, Oct4,* e *Hesx1* em 4S e de *Nestina* em 8S. Na linhagem Snell, observou-se aumento na expressão de *Sox2*, *Nanog*, *Cd44*, *Nr2e1*, *Hesx1*, *Hes1, Otx2, S100β* e *Sox9* em 4S e aumento *de Sox2, Cd44*, *Hesx1, Otx2* e *Sox9* em 8S, associado à redução de *Ki67* em ambos os períodos. Na linhagem Ames, evidenciou-se aumento de *Sox2*, *Nanog, Cd44*, *Hesx1*, *Hes1*, *Otx2, S100β* e *Sox9* em 4S e 8S. O gene *Nr2e1* esteve hiperexpresso em todos os tempos. Houve redução do *Ki67* em 4S. As *caspases 3* e *7* não se apresentaram alteradas em nenhuma linhagem e/ou tempo. **Discussão e conclusão:** O padrão de imunolocalização de SOX2 encontrado nas três linhagens estudadas foi semelhante ao descrito em animais sem hipopituitarismo. A evidência da presença do *Nr2e1* o coloca como um novo marcador de células-tronco/progenitoras na hipófise. A expressão elevada dos

marcadores de células-tronco/progenitoras nas linhagens Ames e Snell sugere que a ausência dos fatores de transcrição precoces não permitiria que a célula tronco/progenitora iniciasse o processo de diferenciação celular, enquanto o oposto ocorreria na linhagem αGSU. Adicionalmente, estes achados justificam a hipoplasia hipofisária observada em animais com defeitos em fatores de transcrição expressos no início da diferenciação hipofisária, nos quais o acúmulo de células-tronco pode ser um indicador da indiferenciação hipofisária.

Descritores: Células-tronco; Hipófise/crescimento & desenvolvimento; Hipopituitarismo/congênito; Modelos animais; Camundongos mutantes/crescimento & desenvolvimento; Camundongos transgênicos/crescimento & desenvolvimento; Células-tronco pluripotentes; Imunoistoquímica; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Fatores de transcrição SOX; Fatores de transcrição SOXB1; Nicho de células-tronco.

SUMMARY

Chang CV. *Analysis of stem / progenitor cells markers in pituitary glands of animal models with hypopituitarism* [Thesis]. Sao Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, in 2013. p. 116.

Introduction: The role of stem cells, with their capacity for proliferation, self-renewal, and differentiation, has already been described in the cell turnover and homeostatic regulation of the pituitary gland. However, little is known about the expression profiles of these markers in hypopituitarism. Among the stem cell markers previously described in the pituitary include the genes for *Sox2, Nanog, nestin, CD44* and *Oct4*. Another gene marker, *Nr2e1* (*Tlx*), found in neural stem cells, is highly expressed during embryogenesis and adulthood, but so far has not been characterized in the pituitary. **Objective**: To analyze the immunohistochemical profile of SOX2, as well as the pattern of expression of various markers of stem/progenitor cells, early transcription factors, apoptosis factors and cell proliferation in three pituitary strains of mice with a genetic cause of hypopituitarism. Strains studied with hypopituitarism due to changes in factors of precocious glandular differentiation, include the Ames (*Prop1*) and Snell (Pou1f1) lineages; hypopituitarism due to the delayed conjugation of glycoprotein hormones include the αGSU strain, which is caused by the knockout of the *Cga* gene. **Material and Methods**: We collected pituitaries at four time points including P0 (birth), P7 (considered the end of the first wave of growth glandular), 4 weeks (4S - puberty period) and 8 weeks (8S - adulthood). All three strains were subjected to immunohistochemical analysis of SOX2 and RT-qPCR of markers of stem/progenitor cells *Sox2, Nanog*, *Nestin*, *Cd44*, Oct4 and *Nr2e1*, early transcription factors (*Hesx1*, *Otx2* and *Hes1*), cell proliferation (*Ki67*), cell differentiation factors (*S100β* and *Sox9*) and apoptosis (*caspases* 3 and 7) markers. Relative quantification of target genes in mutant animals was normalized to their respective wild type littermate. **Results**: The immunolocalization of SOX2 was observed in the area surrounding the Rathke cleft (marginal layer), as well as in diffuse niches throughout the gland in all three strains studied. The αGSU strain showed a reduction of *Nanog*, *Nr2e1*, *Oct4* and *Hesx1* at 4S, and *Nestin* at 8S. The Snell mice exhibited an increase of expression in *Sox2*, *Nanog*, *Cd44*, *Nr2e1*, *Hesx1*, *Hes1*, *Otx2*, *S100β* and *Sox9* in at 4S and increased *Sox2*, *Cd44*, *Hesx1, Otx2* and *Sox9* at 8S, associated with the reduction of *Ki67* in both periods. The Ames strain showed an increase of *Sox2*, *Nanog*, *Cd44*, *Hesx1*, *Hes1*, *Otx2, S100β* and *Sox9* at 4S and 8S; the gene *Nr2e1* was over expressed at all times; and there was reduction in *Ki67* at 4S. Caspases 3 and 7 had not changed in any strain, at any time. **Discussion and Conclusion**: The pattern of immunolocalization of SOX2 found in the three strains studied was similar to that described in animals without hypopituitarism. The presence of *Nr2e1* in our study suggests it as a new marker of stem/progenitor cells in the pituitary. The high expression of markers of stem/progenitor cells in the Ames and Snell strains suggests that the absence of early transcription

factors *Prop1* and *Pou1f1* do not allow the stem/ progenitors cells to start the process of cell differentiation, while the opposite occurs in the αGSU lineage. Additionally, these findings explain the pituitary hypoplasia observed in animals with defects in early transcription factors, as indicated by the accumulation of stem cells in the Snell and Ames lineages, preventing the initiation of pituitary differentiation.

Descriptors: Stem cells; Pituitary gland/growth & development; Hypopituitarism/congenital; Models, animal; Mice, mutant strains/growth & development; Mice, transgenic/growth & development; Pluripotent stem cells; Immunohistochemistry; Real-time polymerase chain reaction; Sox transcription factors; SOXB1 transcription factors; Stem cell niche

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mecanismos responsáveis pela renovação glandular hipofisária

A hipófise anterior tem um importante papel no controle endocrinológico e possui vários tipos de células produtoras de hormônios, que estão sob o controle direto hipotalâmico, além da regulação indireta por sinais de *feedback* endócrino periférico (Nolan *et al*., 1998). Apesar de ter baixa taxa de renovação celular (Nolan *et al*., 1998), a hipófise apresenta a capacidade de adaptar o número absoluto e relativo de cada subtipo celular em resposta a diferentes demandas metabólicas, como crescimento, puberdade, gestação e lactação (Levy, 2002). Têm-se evidências de que o número de somatotrofos durante a puberdade pode vir a dobrar, assim como a expansão e redução dos lactotrofos podem ocorrer várias vezes durante a lactação ou gestação (Levy, 2002).

A resposta metabólica glandular ocorre não só pelos mecanismos adaptativos, mas também pelo próprio processo de renovação celular. A taxa de renovação celular ocorre em torno de 60-70 dias (Nolan *et al*., 1998) e, por isto, a hipófise é considerada um órgão de baixa taxa de renovação quando comparada a outros órgãos com elevada renovação (como pele ou intestino) (Levy, 2002). Em contrapartida, existem órgãos, como coração ou pulmão, que necessitam de ainda mais tempo para se autorrenovar (100-200 dias) e, assim, são considerados órgãos cuja taxa de renovação é muito lenta (Beltrami *et al*., 2003; Rando, 2006).

Os mecanismos responsáveis por esta mudança são pobremente entendidos. Dentre eles, encontram-se mitose de células pré-existentes já diferenciadas, transdiferenciação (conversão entre fenótipos) e diferenciação de células-tronco, porém nenhum destes processos foi extensivamente comprovado (Borrelli *et al*., 1989; Childs, 2000; Fu e Vankelecom, 2012; Horvath *et al*., 1990; Porter *et al*., 1991; Vankelecom,

2007a; Vankelecom e Gremeaux, 2010; Vidal *et al*., 2001; Yoshimura *et al*., 1969).

Embora flutuações nos mecanismos de diferenciação e morte celular de células endócrinas diferenciadas poderiam explicar tais oscilações à resposta adaptativa dinâmica, estudos diretos da atividade mitótica, após estímulos que aumentariam o número de células expressando ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e LH (hormônio luteinizante), mostraram que estas mudanças não seriam provenientes de células maduras diferenciadas, mas sim de células progenitoras que ainda não tinham iniciado o mecanismo de diferenciação celular (Nolan; Levy, 2006). Além disto, a habilidade da hipófise adulta em se regenerar após perda expressiva, como lesões imunes (De Jersey *et al*., 2004) ou genéticas (Borrelli *et al*., 1989), torna a possibilidade da participação de células-tronco multipotentes ou uma subpopulação de células progenitoras (Chen *et al*., 2009; Fauquier *et al*., 2008; Rizzoti, 2010; Vankelecom, 2007b) envolvidas no processo de renovação glandular ainda mais provável.

1.2 Conceito de células-tronco

As células-tronco tecido-específicas têm sido identificadas em muitos órgãos com capacidade de proliferação, autorrenovação, potencial de diferenciação e habilidade de regeneração tecidual após perda celular (Beltrami *et al*., 2003; Rando, 2006).

Células-tronco, por definição, possuem capacidade multipotente de autorrenovação envolvidas no *turnover*, plasticidade ou reparo (Beltrami *et al*., 2003; Rando, 2006). Por divisão assimétrica, uma célula tronco deve ser capaz de originar uma outra célula tronco, além de uma outra célula que entrará na via de diferenciação (progenitora) (Rando, 2006). Tal célula progenitora tem uma capacidade limitada ou ausente de se autorrenovar, mas prolifera-se a fim de formar um *pool* de células que entrarão no programa de diferenciação tecidual (Rando, 2006; Reynolds, Rietze, 2005). Quando o processo de autorrenovação ainda não é totalmente conhecido,

prefere-se o uso do termo tronco/progenitora, uma vez que, para caracterização específica de célula “tronco”, o processo de autorrenovação deva ter ocorrido, no mínimo, por cinco ciclos (Reynolds; Rietze, 2005).

Embora múltiplos tipos celulares da hipófise anterior tenham sido aventados como possíveis candidatos a células-tronco, nenhum deles apresentou inequívoca comprovação de tal fato (Vankelecom, 2007a), dentre elas, destacam-se:

- Células cromófobas: sem grânulos de secreção. Embora tenha sido aventada a possibilidade de tais células corresponderem às células-tronco (Otsuka *et al*., 1971; Yoshimura *et al*., 1969), acredita-se que, na verdade, as células cromófobas somente “sustentariam” ou “regularizariam” o processo de restauração, em vez de serem uma “fonte” de células-tronco (Vankelecom, 2007a);

- Células marginais: o argumento “topográfico” para se correlacionar as células marginais ao possível nicho de células-tronco reside no fato de que as células-tronco neuronais se encontram ao redor dos ventrículos cerebrais (Capela e Temple, 2002; Doetsch *et al*., 1999). Além disto, já foram relatados diversos marcadores de células-tronco nesta região (Fauquier *et al*., 2008; Garcia-Lavandeira *et al*., 2009; Gleiberman *et al*., 2008; Krylyshkina *et al*., 2005; Yoshida *et al*., 2009);

- Células foliculoesteladas: definidas como células pequenas de formato irregular/estrelado que constituiriam pequenas “ilhas ou nichos”, distribuídas por todo lobo anterior (Inoue *et al*., 1999). Estas células teriam algumas características “em comum” com as células da camada marginal (Lepore *et al*., 2005). Além disto, manteriam sua imaturidade estrutural e capacidade de mitose (Horvath, Kovacs, 2002; Inoue *et al*., 2002). Teriam como marcador mais específico o S100 (Nakajima *et al*., 1980).

1.3 Principais marcadores e histórico de estudos envolvendo células-tronco/progenitoras na hipófise

Apesar de as células-tronco poderem ser facilmente detectadas por meio da expressão de alguns genes em órgãos com alta renovação e/ou capacidade regenerativa (Gage FH, 2000; Moore *et al*., 2006), os diversos estudos são conflitantes com relação a quais seriam os melhores marcadores. Dentre eles, destacam-se:

Sox2 (*SRY-box containing gene 2*): gene necessário para manutenção de várias subpopulações de células-tronco (Boiani e Scholer, 2005; Fauquier *et al*., 2008; Vankelecom e Gremeaux, 2010). A hipófise anterior de camundongos adultos conteria uma pequena subpopulação de células SOX2 positivas que, quando em cultura *in vitro*, são capazes de formar esferas e se diferenciar em todos os subtipos celulares hipofisários (Fauquier *et al*., 2008). Mutações em heterozigose tanto em camundongos como humanos está associada ao hipopituitarismo com anormalidades variáveis na morfologia hipofisária (Kelberman *et al*., 2006).

O Sox2, juntamente com *Sox1* e *Sox3,* estão agrupados na subfamília B1 do gene *Sox* e estão envolvidos em diversas fases do desenvolvimento embrionário e diferenciação celular, apresentando papel central na embriogênese (Pevny; Placzek, 2005). Durante o desenvolvimento hipofisário, o *Sox2* é expresso no início da formação da bolsa de Rathke e se mantém até que o processo de diferenciação celular terminal ocorra (Kelberman *et al*., 2006). Embora o *Sox2* seja imprescindível para o desenvolvimento normal e função hipotálamo-hipofisária e diversas mutações tenham sido descritas tanto em humanos como em animais (Kelberman *et al*., 2006), é a sua expressão mantida na zona da camada marginal no período embrionário e na glândula adulta que o tem colocado como marcador central de células não diferenciadas (células-tronco e/ou progenitoras), capazes de suprir a demanda metabólica glandular (Fauquier *et al*., 2008; Yoshida *et al*., 2011);

Oct4 (*Pou5f1*) (o*ctamer-binding protein 4)* este gene codifica um fator de transcrição contendo homeodomínio POU. Este fator de transcrição tem

um papel no desenvolvimento embrionário especialmente durante a embriogênese precoce e é necessário para a pluripotencialidade da célula tronco (Rodda *et al*., 2005);

Nestina: proteína de filamento intermediário classe VI, está expressa, primariamente, em células nervosas, mas também apresenta expressão em células endoteliais vasculares (Klein *et al*., 2003);

Nanog: fator de transcrição relacionado à proliferação e autorrenovação de células-tronco (Cavaleri, Scholer, 2003; Chambers *et al*., 2003; Rodda *et al*., 2005);

Cd44: participa de uma série de funções celulares, sendo uma glicoproteína de adesão celular (Williams *et al*., 2013);

Nr2e1 (*Tlx*): marcador de células-tronco neuronais. Foi demonstrado que o *Nr2e1* seria um regulador essencial na manutenção das células-tronco neuronais e na autorrenovação de neurônios no cérebro adulto (Shi *et al*., 2004). Estudos experimentais demonstraram que sua expressão em camundongos começa no E8 (E = dia embrionário), pico E13.5, redução por volta E16, com níveis muito reduzidos ao nascimento. Ocorre um aumento novamente após o nascimento com níveis elevados no cérebro adulto (Monaghan *et al*., 1997). Não há, contudo, até o presente momento, relatos de estudos deste marcador na hipófise.

Dentre outros possíveis marcadores de células-tronco já relatados na hipófise, citam-se, ainda: *Sca1*, *Sox9*, *Bmi1*, *Gfra2*, *SSEA4*, *Isl1*, *S100β*, entre outros (Chen *et al*., 2005; 2009; Fauquier *et al*., 2008; Garcia-Lavandeira *et al*., 2009; Vankelecom, 2007a; b).

Além da importância dos marcadores de células-tronco como ferramenta para análise da presença dessas, sabe-se, também, que existem correlações entre eles, por exemplo, *Sox2*, *Nanog* e *Oct4* formam um circuito regulatório que manteria a célula no estado indiferenciado (Rodda *et al*., 2005); *Sox2* tem um papel estimulatório sobre *Nestina* e *Tlx* (Shimozaki *et al*., 2012).

A primeira vez que se aventou a possibilidade de existirem células-tronco na hipófise foi quando Yoshimura *et al*. (1969) realizou um transplante de células hipofisárias a ratos hipofisectomizados levando à ação secretora (Yoshimura *et al*., 1969).

Posteriormente, relatou-se a presença de nestina em células dispersas em hipófises de ratos (Krylyshkina *et al*., 2005) e foi descrita a presença de uma possível população de células-tronco na hipófise, por meio de citometria de fluxo (Chen *et al*., 2005). Essas células foram denominadas de *side population* (SP) e, uma vez em cultura, deram origem a um aglomerado de células dispostas em esferas (Chen *et al*., 2005; 2006; Krylyshkina *et al*., 2005). Concomitante a estes achados, foi descrita a existência de "células hipofisárias formadoras de colônias", originalmente descritas em células hematopoiéticas, que não só apresentavam características de autorrenovação, mas também potencial de diferenciação celular (Lepore *et al*., 2005, 2007).

Em estudos posteriores, Chen *et al*. (2009) caracterizaram melhor a SP e as dividiram conforme níveis de expressão de *Sca1 ("Stem cell antigen 1")*, mas, ao contrário do que foi observado no primeiro estudo (Chen *et al*., 2005), a população com baixos níveis de expressão de *Sca1*, denominada (*non Sca-high)*, foi capaz de gerar *clusters* de células-tronco/progenitoras com expressão de altos níveis de *Sox2* e *Nestina* (Chen *et al*., 2009). Esta subpopulação seria multipotente com capacidade de gerar todos os subtipos celulares da hipófise anterior e redução subsequente de *Sox2* após serem colocadas em meio de diferenciação (Matrigel) (Chen *et al*., 2009).

Com o isolamento de determinadas células hipofisárias que, uma vez em cultura, deram origem a um aglomerado de células dispostas em esferas com capacidade de se autorrenovar e, principalmente, diferenciar-se em todos os subtipos glandulares, a possibilidade de realmente existirem células-tronco/progenitoras na hipófise tornou-se cada vez mais crescente (Chen *et al*., 2005; Fauquier *et al*., 2008). O fato de ambos os grupos terem conseguido formação de esferas hipofisárias a partir de células marcadas com SOX2 tornou esse marcador como um dos principais relacionados ao

estudo de células-tronco/progenitoras. Como, no entanto, não foi comprovada a autorrenovação celular específica de cinco ciclos, o uso do termo célula-tronco/“progenitora” é mais adequado, em detrimento do termo “tronco” isolado.

Embora a maioria dos estudos sejam homogênios quanto à expressão de *Sox2*, isso não se aplicaria aos outros marcadores de células-tronco (Boiani, Scholer, 2005; Fauquier *et al*., 2008; Vankelecom, Gremeaux, 2010).

1.4 Embriogênese e organogênese hipofisária

A embriogênese e organogênese hipofisária é semelhante em todos os vertebrados e o processo de desenvolvimento em roedores é muito parecido com o que ocorre em humanos (Kawamura *et al*., 2002; Osumi-Yamashita *et al*., 1994; Pogoda e Hammerschmidt, 2007). Os lobos anterior e intermediário derivam do ectoderma oral enquanto o lobo posterior é proveniente do neuroectoderma (Burrows *et al*., 1999; Dattani e Robinson, 2000; Kelberman *et al*., 2009) (Figura 1).

O desenvolvimento hipofisário nos camundongos começa por volta do dia embrionário 7.5 (E7.5) com espessamento do ectoderma oral e formação da placa neural (Zhu *et al*., 2007). Por volta do E9, inicia-se o processo de invaginação do ectoderma oral dando origem à bolsa de Rathke, o primórdio da adenohipófise, composta pelos lobos anterior e intermediário (Kelberman *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2007). Em contrapartida, o ectoderma neural proveniente do diencéfalo ventral, ao evaginar-se (E10.5), forma o infundíbulo que dará origem ao lobo posterior e haste hipofisária (Burrows *et al*., 1999). A justaposição entre a bolsa de Rathke e o diencéfalo ventral/infundíbulo é mantida nos estágios iniciais de organogênese hipofisária e é imprescindível para interação entre uma série de moléculas sinalizadoras provenientes tanto do diencéfalo ventral/infundíbulo, como da própria bolsa de Rathke (Suga *et al*., 2011). Por volta do E12.5, a bolsa de

Rathke se separa do ectoderma oral e começa a se expandir para formar o lobo anterior da hipófise (Burrows *et al*., 1999).

O lúmen da bolsa de Rathke persiste como uma fenda, separando os lobos intermediário e anterior (evento que não é observado em humanos) (Dattani e Robinson, 2000; Kelberman *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2007). Nesta fase, as células proliferativas estão localizadas na área perilumeal, com alto nível de proliferação e à medida que ocorre o processo de diferenciação celular, ocorre a migração para a porção ventral, desenvolvendo, assim, o lobo anterior (Himes, Raetzman, 2009; Kelberman *et al*., 2009; Ward *et al*., 2005) (Figura 1).

Evidências recentes têm demonstrado que a área que circunda a fenda (a área perilumeal), denominada zona da camada marginal, poderia ser o nicho de células com capacidade proliferativa (células-tronco/progenitoras) (Fauquier *et al*., 2008; Garcia-Lavandeira *et al*., 2009; Gleiberman *et al*., 2008; Krylyshkina *et al*., 2005; Yoshida *et al*., 2009).

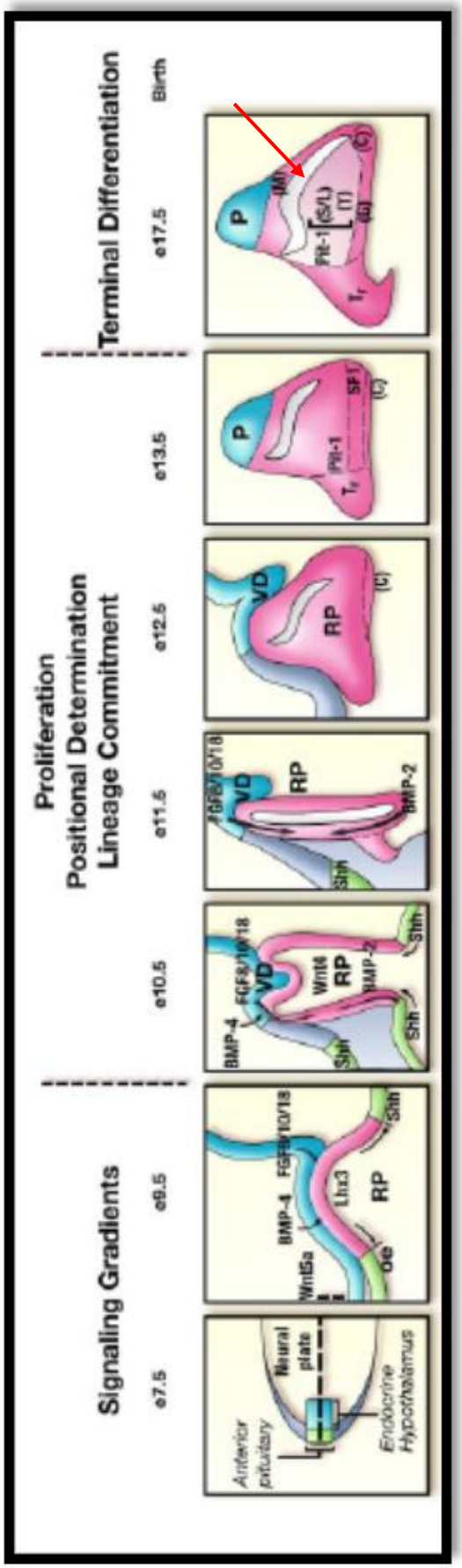


Figura 1 - Embriogênese e organogênese da hipófise de camundongo. Adaptado de Zhu *et al.* (2007). Ressaltam-se três períodos de desenvolvimento glandular: gradientes de sinalização em uma fase precoce, proliferação celular, migração e "comprometimento" de cada uma das linhagens e, por fim, diferenciação terminal. Seta vermelha: área que circunda a fenda, "camada da zona marginal".

1.5 Fatores de transcrição e vias de sinalização

São diversos os fatores e vias de sinalização envolvidos no processo de embriogênese e organogênese hipofisária (Kelberman *et al*., 2009; Savage *et al*., 2003; Zhu *et al*., 2007) (Figura 2).

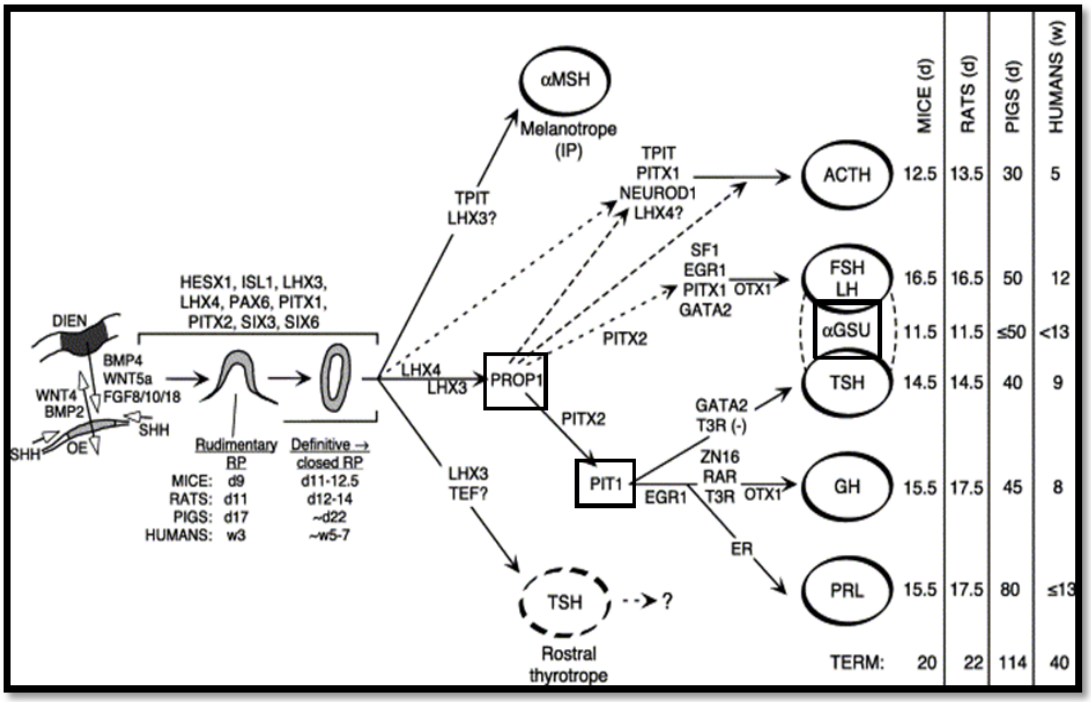


Figura 2 - Genes e fatores de transcrição envolvidos na formação hipofisária. Adaptado Savage *et al*., 2003. Destacado pelo quadrado: fatores alterados nas linhagens do presente estudo.

A seguir, serão abordados os principais fatores de transcrição e vias de sinalização envolvidos na formação e diferenciação da hipófise, e que foram escolhidos para análise no presente estudo.

O gene *Hesx1 (Homeobox Gene Expressed in Embrionic Stem Cell 1*) é um fator de transcrição que apresenta início de expressão por volta do E9.5 e persiste até E12 (Zhu *et al*., 2007). Sua expressão é regulada pelo *Lhx3* e *Prop1* (Savage *et al*., 2003). Enquanto o *Lhx3* é necessário para manter a sua expressão, *Prop1/β-catenina* são necessários para sua repressão (Sheng, Westphal, 1999; Sornson *et al*., 1996).

O gene *Lhx3* (*LIM Homeobox Protein 3*) é um fator de expressão precoce encontrado na retina, motoneurônios, na glândula pineal e na hipófise (Sloop *et al*., 2001). Camundongos transgênicos com alteração do *Lhx3* possuem alterações no desenvolvimento hipofisário em fases muito precoces da formação glandular (Kelberman *et al*., 2009). No entanto, sua ação nas fases terminais na formação hipofisária e/ou produção hormonal é pouco conhecida. Estudos *in vitro* evidenciaram que o *Lhx3* pode agir sinergicamente com outros fatores de transcrição, como, por exemplo, o *Pou1f1* (*Pit1*) (Savage *et al*., 2007; Sloop *et al*., 2001).

O gene *Hes1* (*Hairy and Enhancer of Split 1*) é um efetor essencial da via *Notch*, e, por sua vez, regula a manutenção das células indiferenciadas (Hitoshi *et al*., 2002; Kita *et al*., 2007). O *Hes1* teria uma ação não só na manutenção das células-tronco, controlando o ciclo celular e diferenciação (Kabos *et al*., 2002), mas também teria um papel no tamanho, volume e integridade estrutural do sistema nervoso central (SNC) pelo mecanismo de ciclo celular (Hatakeyama *et al*., 2004).

O gene *Otx2* (*Orthodenticle Homeobox 2*) codifica um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento normal do cérebro, cerebelo, glândula pineal e olho, com papel desde a embriogênese até a vida adulta (Beby; Lamonerie, 2013). Sua expressão ou repressão teria correlação direta com via de sinalização *Notch/Hes* (Muranishi *et al*., 2011) e parece desempenhar função direta no desenvolvimento do hipotálamo, da haste hipofisária e nos derivados da bolsa de Rathke (Matsuo *et al*., 1995). Mutações em heterozigose em humanos têm sido correlacionadas a graves malformações oculares, com anormalidades cerebrais e hipopituitarismo (Cohen, 2012).

O gene *Prop1* (*Prophet Of Pit1, Paired-Like Homeodomain Transcription Factor*) é um fator de transcrição específico da hipófise, com início de expressão por volta do E10-E10.5, pico no E12.5 e diminuição da expressão por volta do E15.5 (Figura 2) (Raetzman *et al*., 2002) . Além de ser necessário para iniciar a expressão do *Pou1f1*, também tem ação primordial na regulação inibitória da expressão do *Hesx1*, funcionando,

portanto, como fator transcricional ativador e repressor, dependendo dos cofatores associados (Zhu *et al*., 2007). Estudos genéticos têm demonstrado que a regulação temporal da expressão do *Prop1* é crítica para o desenvolvimento glandular hipofisário normal (Kelberman *et al*., 2009; Raetzman *et al*., 2004; Ward *et al*., 2005). Sua expressão prematura na bolsa de Rathke leva à agenesia da glândula provavelmente por inibir a expressão do *Hesx1* (Dasen *et al*., 2001).

Em humanos, mutações no *PROP1* são as causas mais comuns de hipopituitarismo congênito que se manifesta com déficit de GH (hormônio de crescimento), TSH (hormônio tireoestimulante), PRL (prolactina), gonadotrofinas (FSH e LH), e déficit variável e progressivo de ACTH (Bottner *et al*., 2004; Dattani e Robinson, 2000). Há uma grande variabilidade no fenótipo e na velocidade de instalação das deficiências, além de, eventualmente, observar-se hiperplasia seguida de hipoplasia hipofisária *("waxing and waning")*, processo até hoje não totalmente esclarecido (Mendonca *et al*., 1999; Riepe *et al*., 2001).

Muitas linhas de evidências têm indicado que o *Prop1* participaria continuamente não apenas do processo de especificação das linhagens celulares, mas também da proliferação celular após o nascimento (Raetzman *et al*., 2002; Raetzman *et al*., 2006). Yoshida *et al.* (2009) demonstraram a coexpressão de PROP1 e SOX2 nas células-tronco hipofisárias no período embrionário e pós-natal em hipófises de ratos sugerindo a sua participação na expansão do lobo anterior e o seu desaparecimento no primeiro estágio de transição de células progenitoras em células diferenciadas no período embrionário (Yoshida *et al*., 2009). O fato de os autores terem constatado coexistência transitória de PROP1 com PIT1 (POU1F1), mas não com hormônios, aventa a possibilidade de haver uma condição intermediária entre a fase de células progenitoras e a fase inicial de diferenciação ("*commited cells*"), dando suporte ao fato de que o *Prop1* funcionaria como ativador precoce do gene *Pou1f1* (Gleiberman *et al*., 2008). Os dados sugerem que *Prop1* existiria nas células progenitoras que expressam SOX2, agindo na expansão do lobo anterior, e desapareceria na

fase de transição para a diferenciação celular (Fauquier *et al*., 2008; Kim *et al*., 2011; Yoshida *et al*., 2009). Posteriormente, foi demonstrado que PROP1 estaria ausente nas células endócrinas, mas coexistiria com SOX2 em células não endócrinas, sendo a maioria *S100* positiva, por análise de imuno-histoquímica no período pós-natal de ratos (Yoshida *et al*., 2011). Outro dado que reforça a possibilidade de expressão do fator *Prop1* na vida adulta é o envolvimento no processo de tumorigênese hipofisária, com maior expressão de *PROP1* em tumores hipofisários produtores de ACTH (corticotropinomas) (Araujo *et al*., 2013).

O gene *Pou1f1* (*POU Class 1 Homeobox 1*), também denominado *Pit1,* é um fator de transcrição hipofisário específico pertencente à família de homeodomínio POU. É expresso tardiamente no desenvolvimento hipofisário (E13.5), apresenta pico de expressão por volta do E16.5, persistindo até a vida adulta (Kelberman *et al*., 2009; Simmons *et al*., 1990). É necessário para o desenvolvimento dos somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos na hipófise anterior, mas acredita-se que seja o fator mais importante para expansão hipofisária pós-natal comparado ao período embrionário propriamente dito (Dattani; Robinson, 2000).

Em humanos, mutações no *POU1F1* apresentam-se com deficiência de GH, PRL e graus variados de TSH, com hipoplasia do lobo anterior sendo identificada na maioria dos casos (Kelberman *et al*., 2009).

Os hormônios glicoproteicos, dentre eles o TSH e FSH/LH, são dímeros que consistem de duas subunidades, alfa e beta. A subunidade alfa é comum a todos, e é codificada pelo gene *Cga* (*αGSU)*, enquanto a subunidade beta confere a especificidade biológica (Roberson *et al*., 1994). Embora esteja envolvido nas fases mais tardias de produção hormonal pelo tireotrofos e gonadotrofos, a expressão do *αGSU* se inicia em um período precoce, por volta do E11.5 (Wray *et al*., 1989). Devido a este fato, criou-se um modelo de animal transgênico nocaute para o gene *Cga* (Kendall *et al*., 1995) para que fosse avaliada sua possível participação no processo de sinalização para migração dos neurônios produtores de GnRH (hormônio estimulador de gonadotrofinas) que são produzidas na placa olfatória e

migram, posteriormente, para região hipotalâmica (Wray *et al*., 1989), porém tal hipótese não foi confirmada (Kendall *et al*., 1995).

1.6 Deficiência hipofisária hormonal múltipla e histórico dos modelos animais com hipopituitarismo

Dentre as causas de deficiência hormonal hipofisária múltipla em humanos, destaca-se a presença de mutações nos fatores de transcrição envolvidos na formação da hipófise e diferenciação terminal das células hipofisárias produtoras de hormônios, dentre eles, os genes *PROP1* e *POU1F1* (Mehta; Dattani, 2008).

O primeiro relato de observação de uma prole de camundongos com déficit de crescimento ("*dwarf mice*") foi no início do século XX quando Snell observou o crescimento inadequado de alguns camundongos de sua colônia. Além da redução do tamanho (Figura 3-A), os animais apresentavam lentificação motora e infertilidade (tanto machos como fêmeas) (Snell, 1929). Sessenta anos depois, foi sugerido que a mutação espontânea observada por Snell deveria estar no gene *Pou1f1*(*Pit-1*) (Camper *et al*., 1990), com deficiência de GH, PRL e TSH (Camper *et al*., 1990; Gage, P. J. *et al*., 1996a; Li, S. *et al*., 1990; Lin *et al*., 1992; Nasonkin *et al*., 2004; Sornson *et al*., 1996; Ward *et al*., 2005).

A morfologia e tamanho da hipófise do camundongo mutante para o gene *Pou1f1* (*Pit1*) é semelhante ao do selvagem no período fetal, indicando que o *Pou1f1* seria "dispensável" para iniciar a expansão do lobo anterior. Entretanto, uma semana após o nascimento, a hipófise do camundongo mutante de *Pou1f1* é nitidamente menor que a dos selvagens (Figura 4). Isso ocorre devido à redução da proliferação celular primária e a ocorrência de apoptose (Ward *et al*., 2006).

Embora a linhagem Ames (Figura 3-B) tenha sido descrita previamente (Bartke, 1965; Cheng *et al*., 1983), foi somente em 1991 que Buckwalter *et al*. descrevem a localização gênica responsável pela mutação no cromossomo 11 (Buckwalter *et al*., 1991), e, em 1996, Sornson e cols.

fizeram a correlação com gene *Prop1* (Sornson *et al*., 1996). A falha na migração ventral das células progenitoras no mutante e a consequente falta de diferenciação resultam em dismorfologia hipofisária com diminuição da adenohipófise, porém com o volume hipofisário dentro do normal notado logo ao nascimento (Figura 4). Na 8ª semana de vida, no entanto, o volume hipofisário do camundongo mutante é cerca de oito vezes menor que o do selvagem (Ward *et al*., 2005; 2006).

As mutações no gene *PROP1* em humanos estão associadas a quadro clínico de deficiência de GH, PRL, TSH e gonadotrofinas, que podem ser evolutivas, além da possibilidade de progressão com deficiência de cortisol (Bottner *et al*., 2004). Já no modelo animal mutante espontâneo do *Prop1* (Ames), nota-se a deficiência de GH, PRL e TSH, com eixo gonadotrófico parcialmente comprometido, mas sem alteração de corticotrofo (Nasonkin *et al*., 2011).

O desenvolvimento da hipófise em camundongos normais começa com a invaginação do ectoderma oral para formar a bolsa de Rathke, conforme exposto anteriormente (Zhu *et al*., 2007). A crista neural mais anterior dá origem ao primórdio dos lobos anterior e intermediário (Kelberman *et al*., 2009; Zhu *et al*., 2007). A placa neural adjacente se desenvolve em hipotálamo e o lobo posterior da glândula hipofisária (Burrows *et al*., 1999).

No E12.5, quando ocorre o pico de expressão do *Prop1*, as células progenitoras migram ventralmente para o lobo anterior em que irão se desenvolver e iniciar o processo de diferenciação (Raetzman *et al*., 2002; Ward *et al*., 2005). No dia E14.5, a ativação de *Pou1f1* (*Pit1)* leva à especificação da linhagem dependente (Kelberman *et al*., 2009; Ward *et al*., 2006). Depois do nascimento, de P1 a P11, a linhagem *Pou1f1 (Pit1)* sofre a proliferação ativa e o lobo anterior expande-se lateralmente (Ward *et al*., 2006). No animal *Prop1*$^{-/-}$, a migração ventral é bloqueada, resultando em dismorfismo da bolsa de Rathke e hipoplasia do lobo anterior no E14.5 (Nasonkin *et al*., 2004; Raetzman *et al*., 2004; Ward *et al*., 2005). Ao nascimento, este dismorfismo permanece evidente, mas o tamanho do órgão total é normal. O *Pou1f1 (Pit1)* não é ativado, e a linhagem *Pit1* não

consegue se diferenciar. Isto leva a não expansão do órgão durante o desenvolvimento pós-natal. A hipoplasia é também parcialmente atribuída à intensa apoptose das células luminais estratificadas, possivelmente por causa de vascularização deficiente (Ward *et al*., 2006).

O modelo mutante *Pou1f1*$^{-/-}$ não exibe qualquer dismorfismo nem alteração na vascularização (Ward *et al*., 2006). As células migram da bolsa no lobo anterior normalmente, mas a linhagem *Pou1f1 (Pit1)* mutante não consegue se diferenciar. Isto leva a uma proliferação diminuída durante desenvolvimento pós-natal e hipoplasia hipofisária, que é acompanhado por um aumento da apoptose e hipoplasia subsequente da hipófise (Ward *et al*., 2006) (Figura 4).

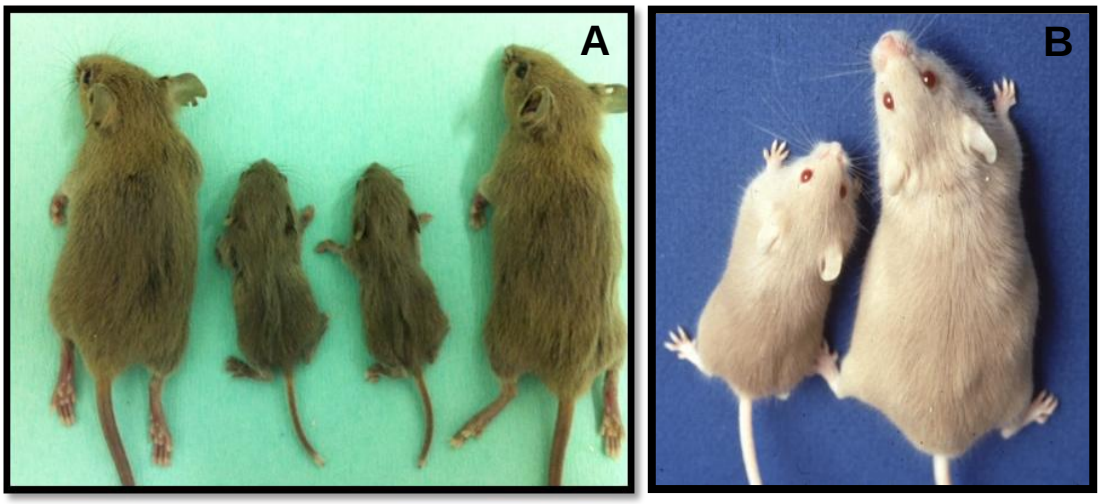


Figura 3 – Linhagens Snell e Ames **A)** Camundongos da linhagem Snell (*Pou1f1*) com 8 semanas de vida. Animais selvagens nas extremidades e mutantes ao centro; **B)** Camundongos da linhagem Ames (*Prop1*) com 8 semanas de vida Mutante a E e selvagem a D da foto.

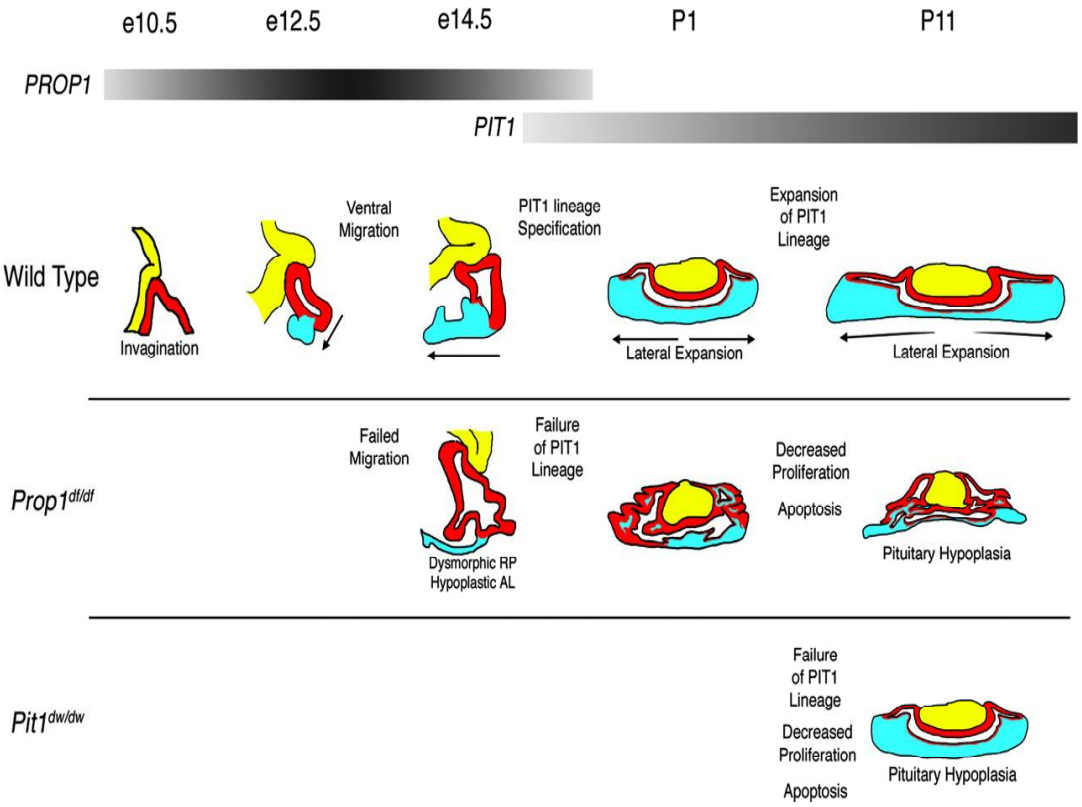


Figura 4 – Modelo do desenvolvimento hipofisário em camundongos selvagens e mutantes Ames (*Prop1*) e Snell (*Pou1f1*). Retirado de Ward *et al*. (2006) O perfil de expressão de *Prop1* e *Pou1f1* (*Pit1*) é mostrado como barras pretas acima. Em amarelo, desenvolvimento do lobo posterior, em vermelho, células estratificadas do lúmen, em azul, células do lobo anterior.

Pela necessidade de se estudar em modelos animais alterações funcionais na formação de TSH, LH e FSH e pelo fato de não se ter descrito nenhuma mutação na subunidade beta ou alfa destes hormônios, Kendall *et al.* (1995) criaram um modelo transgênico de camundongo nocaute para a subunidade alfa por recombinação homóloga (Kendall *et al*., 1995) (Figura 5).

O camundongo nocaute para o gene *Cga* (αGSU*)* apresenta deficiência dos hormônios TSH, LH e FSH, que, para serem bioativos, precisam conjugar a subunidade beta (específica de cada hormônio), à subunidade alfa, comum a todos os hormônios glicoproteicos. Esses camundongos com hipopituitarismo apresentam hiperplasia da hipófise na fase adulta (Kendall *et al*., 1995).

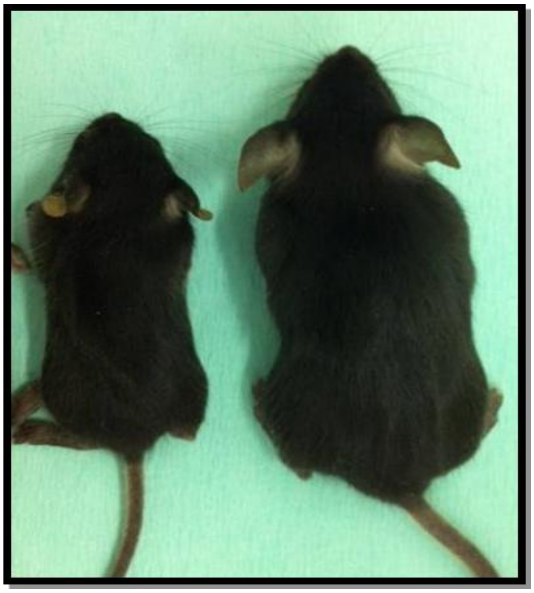


Figura 5 – Linhagem αGSU. Camundongos transgênicos da linhagem αGSU com 8 semanas de vida. Mutante à E e selvagem à D da foto.

Apesar das diferenças genômicas entre humanos e camundongos (Kelberman *et al*., 2009), esses modelos animais são úteis para o entendimento dos quadros de hipopituitarismo em humanos.

1.7 Outros marcadores relevantes para o entendimento do estudo

A proliferação celular é um processo biológico de fundamental importância controlada por mecanismos extremamente coordenados. Análises detalhadas do ciclo celular revelam que o antígeno Ki67 é ativamente expresso em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas ausente em células quiescentes (Gerdes *et al*., 1984) e durante o processo de reparo do DNA (Hall *et al*., 1993), fazendo com que seja considerado, portanto, um fator de proliferação celular. Assim, a presença do *Ki67* está relacionada ao ciclo celular, sugerindo um importante papel desta estrutura na manutenção e regulação do crescimento celular (Schluter *et al*., 1993).

Com relação à morte celular, destaca-se a via de apoptose, necrose e inflamação envolvendo as caspases (Jin; El-Deiry, 2005). Estas enzimas

podem ser divididas em dois grandes grupos: iniciadoras e efetoras. Dentre as efetoras, destacam-se as capases 3, -6 e -7, que são responsáveis pela clivagem do substrato, sendo a caspase 3 comum a ambas as vias (Thompson, 1995).

1.8 Justificativa do estudo

Conforme exposto, evidências recentes, portanto, sugerem que realmente haja uma reserva de células-tronco/progenitoras na hipófise e que essas participem do processo não só daresposta adaptativa dinâmica em períodos de maior demanda metabólica, mas também como manutenção do *turn over* glandular (Rizzoti, 2010; Vankelecom, 2007b; Vankelecom, Gremeaux, 2010).

Em estudo prévio envolvendo modelo transgênico com sistema condicional de destruição de somatotrofos na vida adulta usando a toxina da difteria, Fu *et al.* (2012) evidenciaram que ocorre um aumento imediato do número de células imunomarcadas com SOX2, com restauração global da secreção hormonal e do número de somatotrofos após 4-5 meses (Fu *et al*., 2012). Posteriormente, os mesmos autores, ao repetirem o modelo transgênico para análise lactotrófica, observaram resultados semelhantes (Fu; Vankelecom, 2012).

Diante de tal achado, questionamos como estaria o *pool* de células-tronco em modelos animais que apresentem hipopituitarismo por alterações em diferentes fatores de transcrição para a formação glandular. Estariam os marcadores de células-tronco aumentadas naqueles modelos que apresentassem comprometimento do fator de transcrição mais precoce (mutantes dos fatores *Prop1* e *Pou1f1*), uma vez que tais células não entrariam na “via de diferenciação”? E, no modelo em que não houvesse comprometimento de fator de transcrição precoce, mas sim hipopituitarismo por ausência da subunidade alfa (transgênico αGSU), os marcadores de células-tronco estariam reduzidos justamente por estas células conseguirem iniciar o processo de diferenciação?

Assim, nosso estudo consistiu na análise de vários marcadores de células-tronco/progenitoras (uma vez que, como vimos anteriormente, ainda não há consenso de quais seriam os melhores) (Vankelecom, 2012), além da pesquisa de um novo marcador já descrito em células-tronco neuronais, o *Nr2e1* (Monaghan *et al*., 1997; Shi *et al*., 2004), em diferentes pontos do período pós-natal. Para isto, foram utilizadas três linhagens de modelos animais com hipopituitarismo, mas, ao contrário do que já havia sido feito na literatura, não em modelos com hipopituitarismo adquirido (Fu *et al*., 2012; Fu, Vankelecom, 2012), mas sim genético, com alterações distintas no processo de formação glandular. A análise conjunta com outros fatores de transcrição precoce, fator de proliferação, diferenciação celular e apoptose nos permitiu fazer a correlação dos nossos achados para cada um dos fatores alterados das linhagens estudadas. Adicionalmente, a imunolocalização em nível tecidual permitiu analisar *in situ* se os locais da reserva de células-tronco/progenitoras seriam os mesmos já descritos para animais sem hipopituitarismo.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de marcadores células-tronco/progenitoras em modelos animais com hipopituitarismo em diferentes fases do período pós-natal.

2.2 Objetivos Específicos

1. Imunolocalizar as regiões que contenham marcador de célula tronco/progenitora SOX2;

2. Correlacionar os achados com fatores de transcrição, marcadores de proliferação e apoptose;

3. Avaliar expressão do marcador de célula tronco *Nr2e1* previamente descrito em células-tronco neuronais e ainda não avaliado na hipófise.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo colaborativo

O projeto em questão foi desenvolvido em colaboração com o Laboratório da Profa. Dra. Sally A. Camper da Universidade de Michigan. As três linhagens de animais foram doadas para a realização do estudo.

3.2 Modelos animais

3.2.1 Considerações Éticas

Foi obtida a aprovação do Comitê de Ética do Uso e Cuidado com Animais em Experimentação de Michigan (*The University of Michigan Committee on Use and Care of Animals - UCUCA*) e pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (118/10) (Anexo A), assim como aprovação para o nível de segurança NB-1 pela Comissão Interna de Biossegurança para organismos geneticamente modificados (0217/06) (Anexo B).

3.2.2 Descrição das linhagens

3.2.2.1 Camundongo Alfa-GSU: transgênico do gene *Cga*

Background: C57BL6 B6;129S2 – Cga^{tm1Sac}.

Transgênico: introdução de gene resistente à neomicina no exon 3. Nocaute do gene *Cga* (Figura 6).

Fenótipo dos animais homozigotos ($Cga^{-/-}$): são hipogonádicos e exibem hipotiroidismo grave com alteração de crescimento (Kendall *et al*., 1995). O fenótipo do animal heterozigoto é semelhante ao do selvagem.

Geração do modelo transgênico: o gene formador da subunidade alfa dos hormônios glicoproteicos dos camundongos consiste de 4 exons. A região codificadora de 96 aminoácidos contem exons 2, 3 e 4 (Gordon *et al*., 1988). O nocaute do gene *Cga* foi feito por recombinação homóloga com a inserção do gene resistente a neomicina (*neo)* em substituição aos exons 2 e 3 e manutenção do exon 4. Foi inserido o gene herpes simples vírus timidina quinase, na extremidade 3', responsável pela eliminação das células que sofreram recombinação não homóloga. As células-tronco foram eletroporizadas com vetor-alvo e os casos de recombinação homóloga foram analisados por PCR (reação em cadeia de polimerase). A integridade do DNA e a classificação dos clones injetados nos blastocistos dos animais foram confirmadas por *Southern blot*. Chimeras foram cruzadas com camundongos C57BL/6 e, assim, obtido animal transgênico (Figura 6) (Kendall *et al*., 1995).

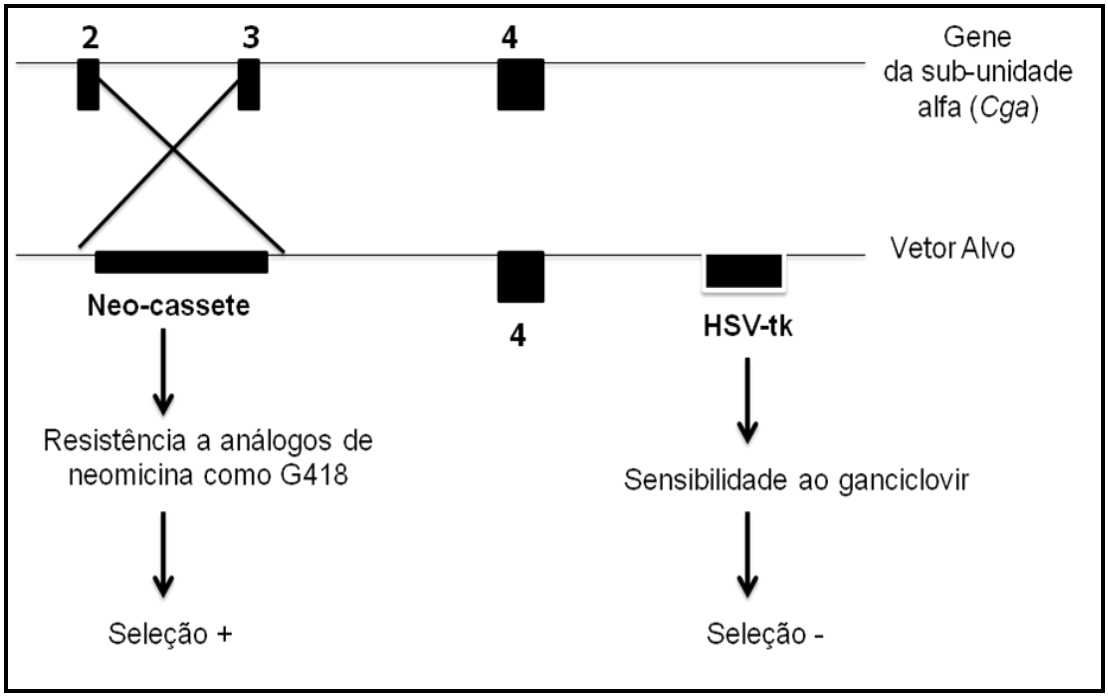


Figura 6 - Geração do modelo transgênico nocaute para o gene *Cga.* Adaptado de (Kendall *et al*., 1995).

3.2.2.2 Camundongo Snell: mutante espontâneo do gene *Pou1f1*

Background da linhagem: DW/J – *Mlph*$^{ln/ln}$, *Pou1f1*^{dw}.

Mutação: a troca de Guanina (G) por Timina (T) na posição 900 do cDNA (ENSMUST00000176330) leva a uma substituição de um Triptofano por Cisteina no códon 261.

Fenótipo dos Animais homozigotos (*Pou1f1*$^{dw/dw}$) diminuição significativa do crescimento após a primeira semana pós-natal. Também apresentam hipotireoidismo e infertilidade com níveis indetectáveis de GH, PRL e TSH. O animal mutante adulto apresenta cerca de 1/3 a 1/4 do tamanho do animal selvagem/heterozigoto (Camper *et al*., 1990). O fenótipo do animal heterozigoto é idêntico ao do animal selvagem.

3.2.2.3 Camundongo Ames: mutante espontâneo do gene *Prop1*

Background da linhagem: DF/B – *p/+, Prop1*^{df}.

Mutação: a troca de Timina (T) por Citosina (C) na posição 475 do cDNA (ENSMUST00000051159) leva à substituição de uma serina por prolina no códon 83.

Camundongos mutantes espontâneos no gene *Prop1*$^{df/df}$ são muito semelhantes aos camundongos Snell, com mutação no gene *Pou1f1* (*Pit1*$^{dw/dw}$). Fenótipo dos animais homozigotos (*Prop1*$^{df/df}$): apresentam um retardo de crescimento após a primeira semana pós-natal. O fenótipo do animal heterozigoto é semelhante ao selvagem. Fêmeas e machos são inférteis com GH e PRL indetectáveis, e déficit de TSH (Sornson *et al*., 1996; Ward *et al*., 2005; 2006). Mutantes homozigotos apresentam redução no crescimento após a primeira semana de vida pós-natal e, após dois meses, apresentam metade do tamanho dos camundongos selvagens (Ward *et al*., 2005). Descreve-se aumento de longevidade associado à restrição calórica nos animais mutantes (Ikeno *et al*., 2013).

3.3 Tempo de estudo

Com o intuito de avaliar a expressão dos marcadores células-tronco/progenitoras no período pós-natal, optou-se por analisar os seguintes tempos, com os respectivos objetivos:

- primeiro dia de nascimento (P0): parâmetro de como estaria a expressão de células-tronco logo após o nascimento;
- sete dias após nascimento (P7): final da primeira fase de crescimento hipofisário pós-natal;
- quatro semanas de vida (4S): fase correspondente ao período puberal;
- oito semanas de vida (8S): vida adulta.

3.4 Casuística

Foram obtidos do cruzamento de fêmea e macho em estado de heterozigose os camundongos das três diferentes linhagens com mutações nos genes *Prop1*, *Pou1f1* (*Pit1*) e nocaute do gene *Cga*. Os animais foram colocados para acasalamento e mantidos de acordo com o protocolo de manutenção de animais experimentais, tanto no laboratório de Animais Transgênicos da Universidade de Michigan, como no Biotério da Faculdade de Medicina da USP (ciclo claro/escuro 12 horas, água e ração padrão de purina *ad libitum*). Os sacrifícios foram realizados por decapitação após a colocação em câmara de CO_2. Para realização da imuno-histoquímica, foram coletadas as hipófises dos animais com 4S e 8S, a decapitação foi seguida de craniectomia por acesso inferior e hipofisectomia. O material obtido foi colocado por 30 minutos no paraformaldeído (4%). Para a coleta das amostras no P0 e P7, foi feita a decapitação com retirada do escalpo e fixação de todo o crânio, deixando-se de 8h-12h no paraformaldeído (4%). Os blocos de parafina de 3 animais normais (+/+ ou +/-) e 3 animais mutantes (-/-) foram submetidos a cortes de 3 micras em um micrótomo

rotativo automático Leica RM2255 (*Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha*) (em alguns grupos, obtivemos uma amostragem menor, Anexos C e D).

Com relação às amostras para a realização do RT-qPCR, a coleta das hipófises dos animais no P0 e P7 foi feita com o auxílio da lupa de grande aumento *(Estereomicroscópio Binocular, Modelo Luxeo4Z, Labomed, USA)* para melhor visualização do material. Nos tempos 4S e 8S, entretanto, não houve necessidade de ampliação por lupa. Os animais foram colocados em câmara de CO_2. Após a decapitação, a via de acesso em todos os tempos foi feita por craniectomia látero-superior, separação da calota craniana e afastamento do encéfalo. Tal técnica permitiu a preservação de toda relação anatômica em comparação com a via de acesso inferior. Após a coleta, as amostras foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, estocadas em freezer a -80 ^{0}C. Para a realização do RT-qPCR, foram selecionadas quatro amostras de hipófises de animais com 4S e 8S, e seis amostras de hipófises de animais coletados no P0 e P7, com a mesma proporção quanto ao sexo (machos e fêmeas) e agrupados em selvagem ou mutante.

3.5 Genotipagem

Foi realizada a genotipagem conforme protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Michigan (Vide Anexos E-G) (Gage, P. J. *et al*., 1996a; Kendall *et al*., 1995; Ward *et al*., 2006). Pela dificuldade técnica da genotipagem da linhagem *Pou1f1*, optou-se por amplificarmos o produto de PCR com os primers A (5'GCTGCTAAGGATGCTCTGG3') e B (5'GCCTGTTCTCTATTTCCAAGG3') da primeira PCR do protocolo original da genotipagem, seguido de purificação. As reaçõesde purificação foram feitas utilizando-se a enzima *ExoSAP-IT (Affymetrix USB, Santa Clara, CA, USA), de acordo com as* instruções do fabricante. Foram usado 2 microlitros da ExoSAP-IT para 5 microlitros do produto de PCR colocados a 37 ^{o}C por 15 minutos, seguidos por 15 minutos a 80 ^{o}C. Os produtos de PCR foram

submetidos a reações de sequenciamento utilizando- se o kit syberdye (*Life Tecnologies, Foster City,* USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados no sequenciador automático de DNA – ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer (Life Tecnologies, Foster City,* USA). Os eletroferogramas foram analisados pelo software *Sequencher 4.8 (Ann Arbor*, MI, USA). No animal selvagem, a posição 261 é ocupada por um aminoácido triptofano representado por TGG e a troca do último G (guanina) por T (timina) leva à substituição de triptofano por cisteina (TGT).

Tabela 1 - Total de animais coletados e emblocados em parafina para realização de IHQ nos diferentes tempos.

LINHAGENS	TEMPOS							
	P0 +/+ +/-	**P0 -/-**	**P7 +/+ +/-**	**P7 -/-**	**4S +/+ +/-**	**4S -/-**	**8S +/+ +/-**	**8S -/-**
Ames	22	5	21	4	3	6	8	7
Snell	21	6	10	9	11	7	9	9
αGSU	15	7	31	3	6	9	10	5
TOTAL	234							

NOTA: +/+ Selvagem; +/- Heterozigoto; -/- Mutante; P0: 1º dia vida; P7: sete dias de vida, final da primeira onda crescimento hipofisário; 4S: quatro semanas de vida, período puberal; 8S: vida adulta.

Tabela 2 - Total de hipófises coletadas e estocadas a -80 ºC para a realização do RT-qPCR nos diferentes tempos.

LINHAGENS	TEMPOS							
	P0 +/+ +/-	**P0 -/-**	**P7 +/+ +/-**	**P7 -/-**	**4S +/+ +/-**	**4S -/-**	**8S +/+ +/-**	**8S -/-**
Ames	62	15	60	12	52	12	25	14
Snell	83	8	94	7	84	10	30	11
αGSU	86	16	77	22	33	20	59	17
TOTAL	909							

NOTA: +/+ Selvagem; +/- Heterozigoto; -/- Mutante. P0:1º dia vida; P7: sete dias de vida, final da primeira onda crescimento hipofisário; 4S: quatro semanas de vida, período puberal; 8S e 12S: vida adulta.

3.6 Imuno-histoquímica

3.6.1 Imuno-histoquímica convencional

Foram realizados 20 cortes de 3um de espessura do bloco de parafina de cada amostra em micrótomo rotativo automático Leica RM2255 (*Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha*). Estes foram distendidos em banho-maria à temperatura de 50 ºC e a secagem completa dos cortes para aderência às lâminas foi realizada em estufa FANEM, modelo Orion 515 (FANEM, São Paulo, Brasil) a 60 ºC. Em um corte de cada amostra, realizou-se a coloração histológica de Hematoxilina-Eosina (HE) para evidenciar as estruturas citoplasmáticas e nucleares do tecido de acordo com a afinidade ácida e básica de cada elemento.

Após os cortes, as lâminas foram "classificadas" em ordem decrescente quanto à qualidade da morfologia no eixo coronal (melhor corte para visualização concomitante lobos anterior, intermediário e posterior). As lâminas escolhidas foram desparafinadas com xilol, hidratados os cortes em etanol e lavados com PBS (solução salina tamponada com fosfatos 0,01M/pH 7,4). Posteriormente, foi realizado o bloqueio tecidual com metanol e peróxido de hidrogênio. A exposição dos epítopos foi feita com a fervura das lâminas em ácido cítrico, seguido de um bloqueio de proteínas inespecíficas. A etapa seguinte consistiu da cobertura com anticorpo primário contra SOX2 (titulação: 1/1600) crescido em coelho (ab97959, *Abcam, San Francisco, CA, USA*), sendo deixado em temperatura ambiente por 12 horas. No dia seguinte, foi acrescentado polímero com anticorpo anticoelho marcado com HRP (*Horseradish Peroxidase*), sendo a revelação final com DAB (Diaminobenzidina, tetracloridrato) (Sigma D5637) (Anexo H).

3.6.2 Programa de contagem – *Image Pro Plus*

Para comparação objetiva das lâminas dos animais selvagens e mutados, submetidas à imuno-histoquímica com SOX2, utilizamos um

programa específico de contagem de núcleos a partir de um *software*, *Image-ProPlus*, versão 7.0 (*Media Cybernetics, Bethesda, USA*) permitindo, assim, um maior subsídio para conclusão dos dados quando comparado ao método tradicional subjetivo.

Metodologia de utilização do programa:

1) Captura das imagens e ativação do recurso para fundi-las;
2) Demarcação da área de análise (lobo anterior e intermediário, excluindo-se o lobo posterior);
3) Início da criação do perfil: núcleos positivos;
4) Marcação dos núcleos negativos pela imuno-histoquímica;
5) Contagem absoluta e relativa.

3.7 RT-qPCR

3.7.1 Extração de RNA

Com o intuito de obter RNA mensageiro para análise de expressão dos genes para a realização da placa de RT-qPCR, foram realizadas extrações de RNA total das hipófises de camundongos. A extração de RNA foi feita utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (*QIAGEN,Valencia, CA, USA*), conforme instruções do fabricante em que os tecidos são lisados e homegeneizados na presença de tampão contendo tiocianato de guanidina (inativa as RNases) e, após adição de etanol na solução, as moléculas de RNA adquirem as condições químicas adequadas para se ligarem à coluna (Anexo I). Em seguida, o material foi submetido ao tratamento com a enzima *RNase-Free DNase Set* (*QIAGEN,Valencia, CA, USA*), que evita a contaminação com DNA genômico. Posteriormente, o material foi lavado, eluído em água Milli-Q e estocado a -80 ºC. A quantificação do RNA total extraído foi realizada em aparelho espectrofotômetro (*BioPhotometer, Eppendorf,* Hamburgo, Alemanha), utilizando-se comprimento de onda de 260 nanômetros.

3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

As análises de expressão dos genes escolhidos no presente estudo foram realizadas utilizando-se três microgramas de RNA total para síntese de cDNA por meio do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems,Foster City, CA, USA*), conforme protocolo do fabricante (Anexo J).

3.7.3 RT-qPCR

Os cDNAs foram utilizados nas reações de RT-qPCR utilizando o kit *RT² Profiler™ PCR Array (SYBR® Green PCR Mastermix)* – CAPM11273 (SABioscences- *QIAGEN, Valencia, CA, USA*), conforme protocolo do fabricante (Anexo K).

Os genes analisados (Tabela 3) encontram-se divididos em quatro amostras por placa e estão descritos pormenorizados no Anexo L.

Tabela 3 – Relação dos genes da placa customizada para a realização de RT-qPCR.

Marcadores células-tronco/ progenitoras	Fatores de transcrição	Marcadores de apoptose	Marcador proliferação e diferenciação celular	Genes endógenos; controles
Sox2	*Hesx1*	*Casp 3*	*Ki67*	*Hprt*
Nanog	*Otx2*	*Casp 7*	*S100β*	*Gapdh*
Nestin	*Hes1*		*Sox9*	*Actb*
Cd44				*PPC*
Oct4				*MGDC*
Nr2e1				

NOTA: *Sox2: SRY-box containing gene 2; Nestin (Nestina); Nanog* homeobox*; Cd44 antigen; Oct4: Octamer-binding protein 4; Nr2e1: nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1; Hesx1:, homeobox gene expressed in ES cells*; *Otx2: Orthodenticle Homeobox 2; Hes1 (Hairy and enhancer of split 1); Casp 3:*caspase 3;*Casp 7:* caspase 7; *Ki67: antigen identified by monoclonal antibody Ki67*; *S100β: S100 beta protein polypeptide neural; Hprt: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*; *Gapdh: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; *Actb*: *actin beta; PPC: Positive PCR Control; MGDC: Mouse Genomic DNA Contamination.*

As amplificações foram efetuadas no termociclador ABI Prism 7000 (*Applied Biosystems*, *Foster City, CA, USA*) e o protocolo consistiu dos seguintes parâmetros: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A expressão dos genes foi normalizada utilizando-se os CT_s das amostras utilizadas como calibradores que consistiram ou do *pool* da amostra de hipófises dos selvagens de cada tempo correspondente ao mutante ou do P0 do selvagem para todos os tempos do selvagem e/ou mutante (nesta última análise, foi usado o gene endógeno que apresentou menor variabilidade e não a média dos três analisados).

A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001), em que o ΔC_T representa a diferença de expressão entre o gene-alvo e o endógeno de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta C_T$ correspondem à diferença entre o ΔC_T de uma amostra (mutante em determinado tempo) e ΔC_T do calibrador (selvagem no mesmo tempo ou P0 do selvagem). Os valores da expressão gênica representam o número de vezes em que o gene-alvo está expresso em relação ao calibrador utilizado.

Foi considerada variação acima do valor de erro do método, valores relativos >2,5 ou <0,4. Para melhor representação gráfica, foi feita a conversão dos dados de $2^{-\Delta\Delta CT}$ para $\log_2$. Cada *pool* de amostra foi feito em triplicata.

3.8. Análise estatística

A abordagem da análise estatística foi não paramétrica porque não exige o reconhecimento da distribuição de probabilidade das variáveis.

Variáveis qualitativas foram listadas como frequências e porcentagens, enquanto variáveis quantitativas foram expressas como mediana (mínimo-máximo).

Para análise dos dados, foi utilizado teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos (mutado X selvagem). Para comparação dos

tempos de um mesmo grupo (mutado ou selvagem), foi feito teste de Friedman seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas.

A análise dos dados do RT-qPCR foi feita utilizando-se os CTs do animal mutante, normalizado para os três genes endógenos analisados e calibrado com os valores dos CTs do selvagem, normalizando-o também com os três genes endógenos do mesmo animal. Os dados foram analisados por meio da fórmula de Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para melhor representação gráfica, os dados brutos foram convertidos a $\log_2$.

Para análise evolutiva do gene *Sox2* nos experimentos da linhagem Ames (*Prop1*), avaliamos a variabilidade dos genes endógenos (teste de Wilcoxon) e foi escolhido aquele que não apresentou variabilidade ($p>0,05$), o gene *HPRT* (Anexo M: Tabela - Variabilidade dos genes endógenos na linhagem αGSU). Nesta situação, avaliamos os CTs de cada um dos mutantes e selvagens, normalizando-os com os CTs do gene endógeno *HPRT* de cada um dos animais, e calibrado com os CTs do P0 do selvagem, normalizado-os com os valores dos CTs do *HPRT* endógeno.

Utilizaram-se os programas SPSS versão 15.0 e GraphPad versão 5.0. Foi considerado estatisticamente significante $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Relações anatômicas e morfologia hipofisária

Nos cortes coronais dos blocos de parafina corados por HE, observou-se a correlação da hipófise e estruturas adjacentes nas três linhagens estudadas (Figura 7).

As subdivisões da glândula em lobos anterior, intermediário e posterior foram evidentes (Figura 8).

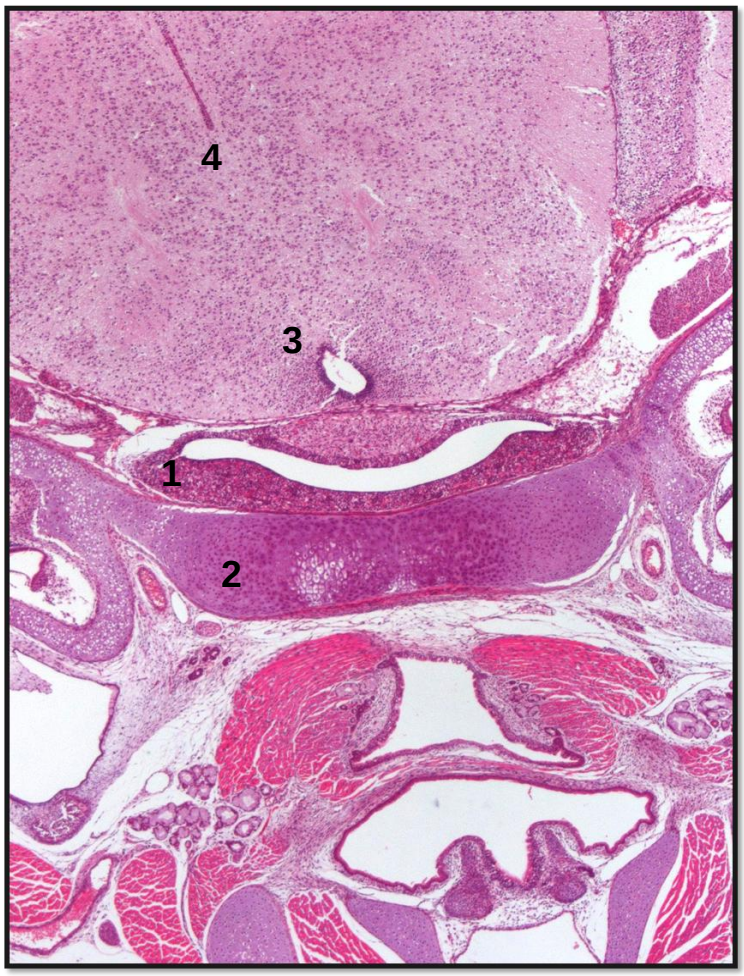


Figura 7 – Corte histológico coronal mostrando a correlação da hipófise com outras estruturas anatômicas em animal AGSU P0 (*Cga*$^{+/+}$). Coloração por HE 4x. 1: hipófise; 2: osso esfenoide; 3: III ventrículo; 4: encéfalo.

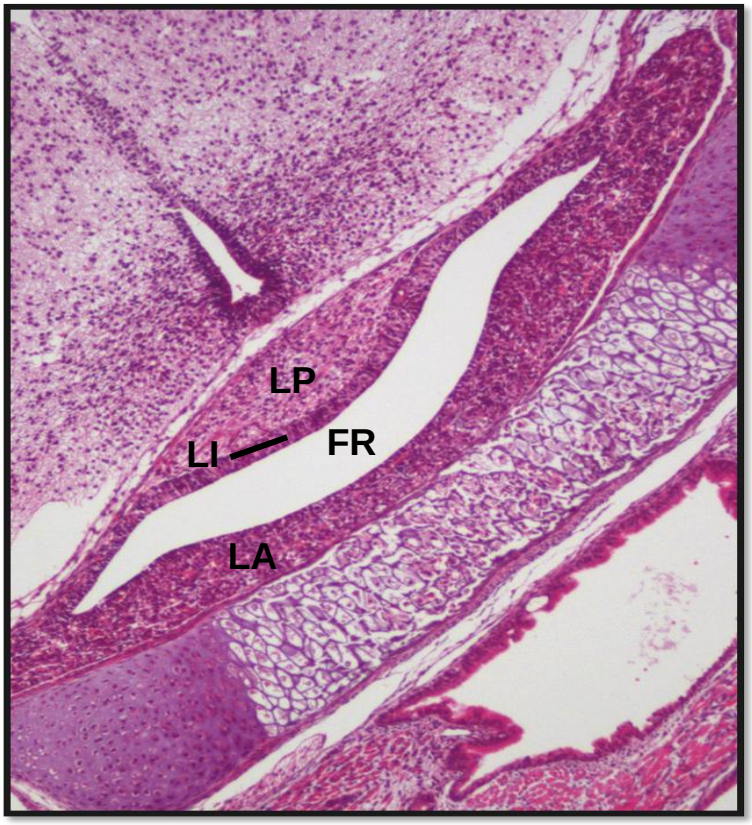


Figura 8 - Corte histológico coronal da hipófise mostrando as subdivisões anatômicas em animal Snell P0 (*Pou1f1*$^{+/+}$). Coloração por HE 10x. LA: lobo anterior; LI: lobo intermediário; LP: lobo posterior; FR: fenda de Rathke.

4.2 Desenvolvimento hipofisário pós-natal: análise histológica por hematoxicilina-eosina (HE)

Os resultados da análise histológica da hipófise das três linhagens nos diferentes tempos confirmaram os dados já descritos na literatura.

Enquanto na linhagem αGSU observou-se um quadro de hiperplasia hipofisária significativa, mais evidente na vida adulta dos animais transgênicos, quando comparados aos selvagens (Figura 9D1-D2), nas linhagens Snell (*Pou1f1)* e Ames (*Prop1*), observou-se um grau evidente de hipoplasia hipofisária nos animais mutantes (Figuras 10D1-D2 e 11D1-D2, respectivamente).

O fator de transcrição *Pou1f1* parece ser mais importante para o processo de desenvolvimento do lobo anterior no período pós-natal, uma vez que não há diferença no tamanho ou na morfologia da hipófise no

nascimento (P0) dos mutantes (*Pou1f1*$^{-/-}$) (Figura 10A2), quando comparados aos selvagens (*Pou1f1*$^{+/+}$) (Figura 10 A1). Durante as fases subsequentes, no entanto, nota-se processo progressivo de hipoplasia (Figura 10B2-C2), tornando-se mais evidente na vida adulta (Figura 10D2).

Na linhagem Ames (*Prop1*$^{-/-}$), no entanto, observou-se um quadro de dismorfologia hipofisária logo no nascimento (P0) (Figura 11A2). Posteriormente, intensifica-se o processo de hipoplasia glandular, tornando-se mais significativa nos períodos puberal (4S) (Figura 11C2) e vida adulta (Figura 11D2) quando comparados aos camundongos selvagens (*Prop1*$^{+/+}$).

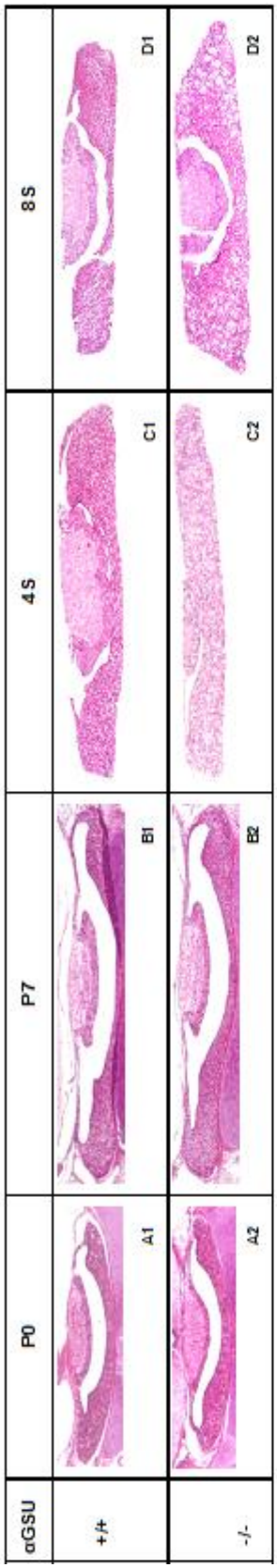


Figura 9 - Desenvolvimento hipofisário nos camundongos da linhagem αGSU. Animal αGSU selvagem ($Cga^{+/+}$) nos períodos P0 (A1), P7 (B1), 4S (C1) e 8S (D1) e mutante ($Cga^{-/-}$) nos períodos P0 (A2), P7 (B2), 4S (C2) e 8S (D2). Coloração por HE, 10x aumento (P0) e 4x aumento (P7, 4S e 8S). Imagens proporcionais.

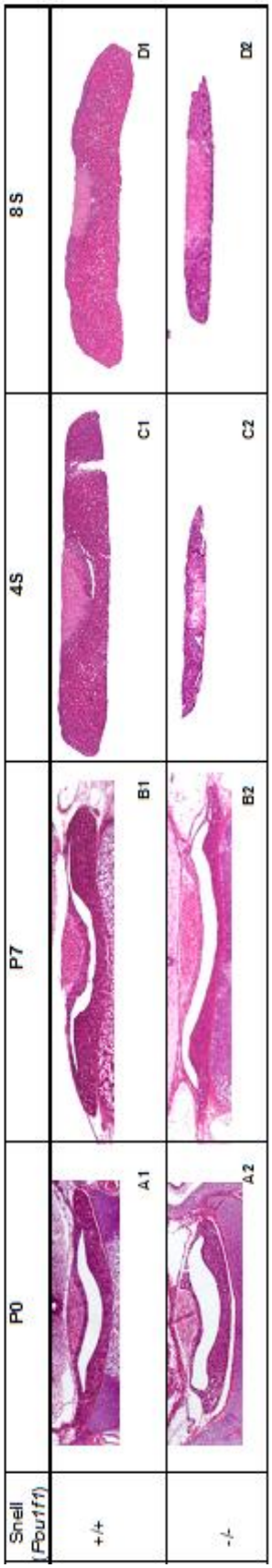


Figura 10 - Desenvolvimento hipofisário nos camundongos da linhagem Snell (*Pou1f1*). Animal Snell selvagem ($Pou1f1^{+/+}$) nos períodos P0 (A1), P7 (B1), 4S (C1) e 8S (D1) e mutante ($Pou1f1^{-/-}$) nos períodos P0 (A2), P7 (B2), 4S (C2) e 8S (D2). Coloração por HE, 10x aumento (P0) e 4x aumento (P7, 4S e 8S). Imagens proporcionais.

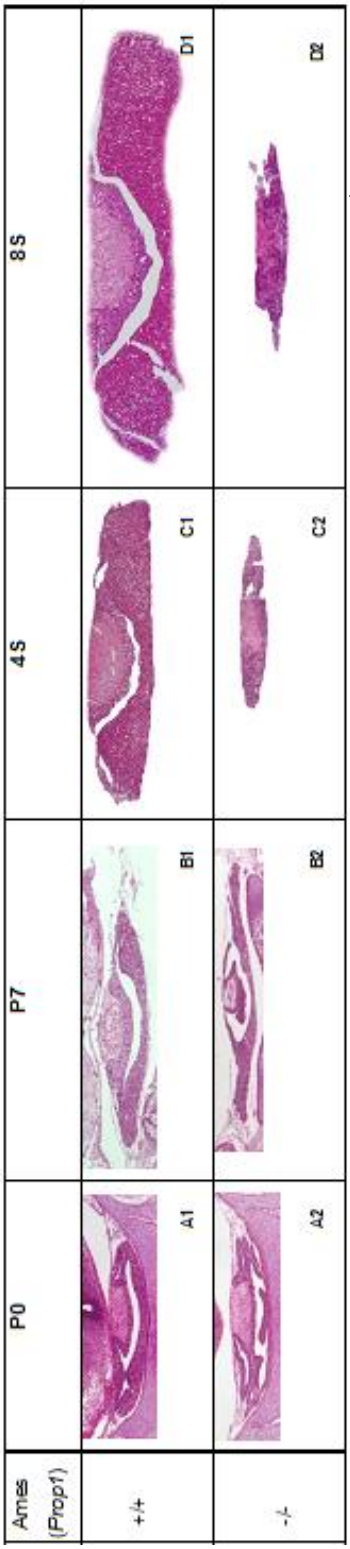


Figura 11 - Desenvolvimento hipofisário nos camundongos da linhagem Ames. Animal Ames selvagem (*Prop1*$^{+/+}$) nos períodos P0 (A1), P7 (B1), 4S (C1) e 8S (D1), e mutante (*Prop1*$^{-/-}$) nos períodos P0 (A2), P7 (B2), 4S (C2) e 8S (D2). Coloração por HE, 10x aumento (P0) e 4x aumento (P7, 4S e 8S). Imagens proporcionais.

Ao fazermos a análise comparativa da morfologia na vida adulta dos animais mutantes/transgênicos das três linhagens (Figuras 9-11D2), observa-se que, enquanto ocorre quadro de hipoplasia hipofisária (Figura 10

D2) na linhagem Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$) com preservação da morfologia hipofisária, na linhagem Ames (*Prop1*$^{-/-}$), o quadro de hipoplasia, ocorre concomitante à dismorfologia hipofisária (Figura 11D2). O oposto, com quadro de hiperplasia, observa-se nos camundongos transgênicos nocautes para o gene *Cga* da linhagem αGSU (Figura 9D2), associado a um processo intenso de vacuolização glandular (Figura 12B).

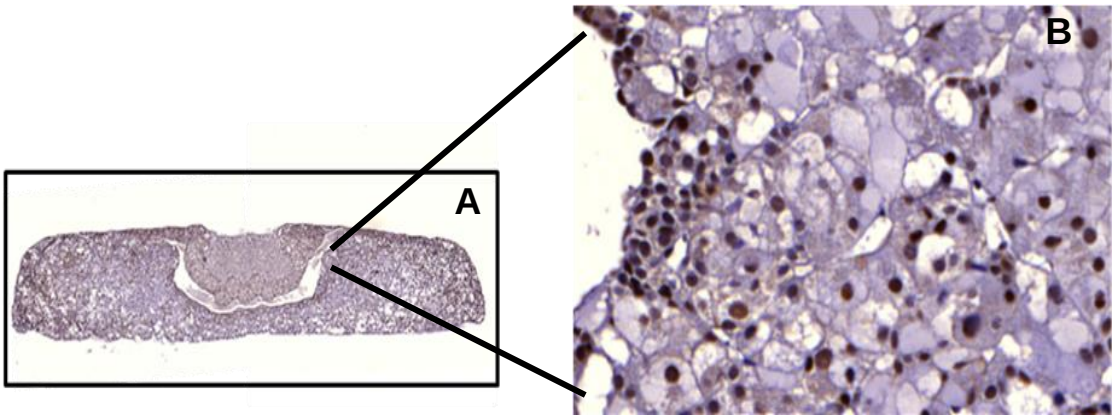


Figura 12 - Hipófise do animal mutado αGSU (Cga$^{-/-}$) com 8 semanas. Pequeno aumento (A) (4x) e grande aumento (40x), demonstrando processo de vacuolização com hipertrofia e hiperplasia glandular. IHQ SOX2 1:1600.

4.3 Imuno-histoquímica

Com a imuno-histoquímica do SOX2 (titulação de 1:1600), evidenciou-se imunomarcação nas três linhagens (Figuras 13-15).

Observou-se que, tanto nos camundongos selvagens como nos mutantes de cada uma das linhagens, a imunomarcação predominou na região que circunda a fenda, que seria correspondente à camada marginal, e em nichos difusos pela glândula (Figuras 13-15). Ambas as regiões já foram aventadas de serem possíveis “reservas” de células-tronco/progenitoras, conforme exposto previamente.

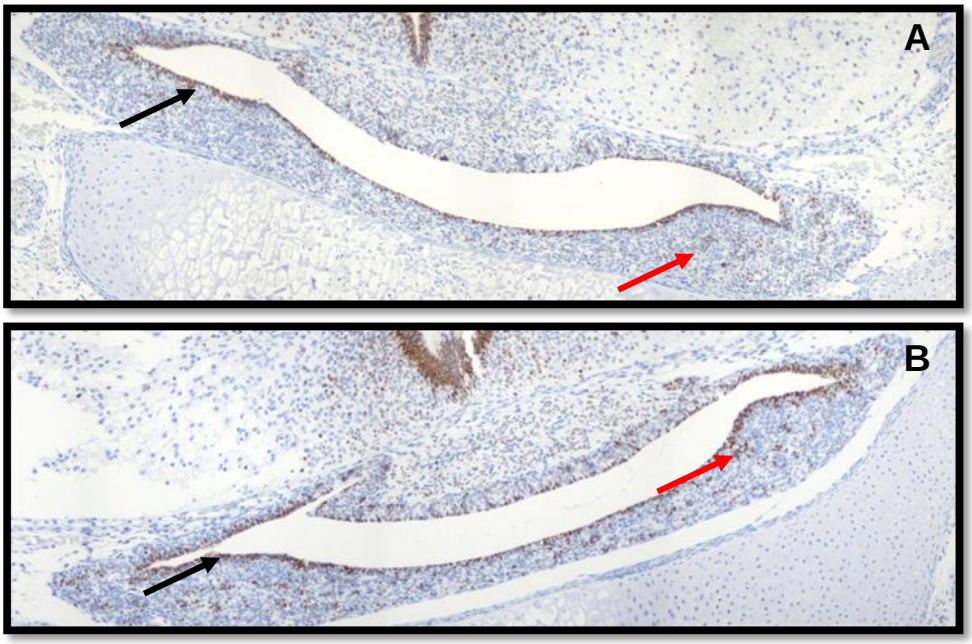


Figura 13 - Imunolocalização de SOX2 na linhagem αGSU ao nascimento (P0). **A:** animal mutado; **B:** selvagem. Observa-se uma expressão do SOX2 na região marginal (setas pretas) e em nichos difusos pela glândula (setas vermelhas). IHQ SOX2 (1:1600), coloração marrom. Aumento 20x.

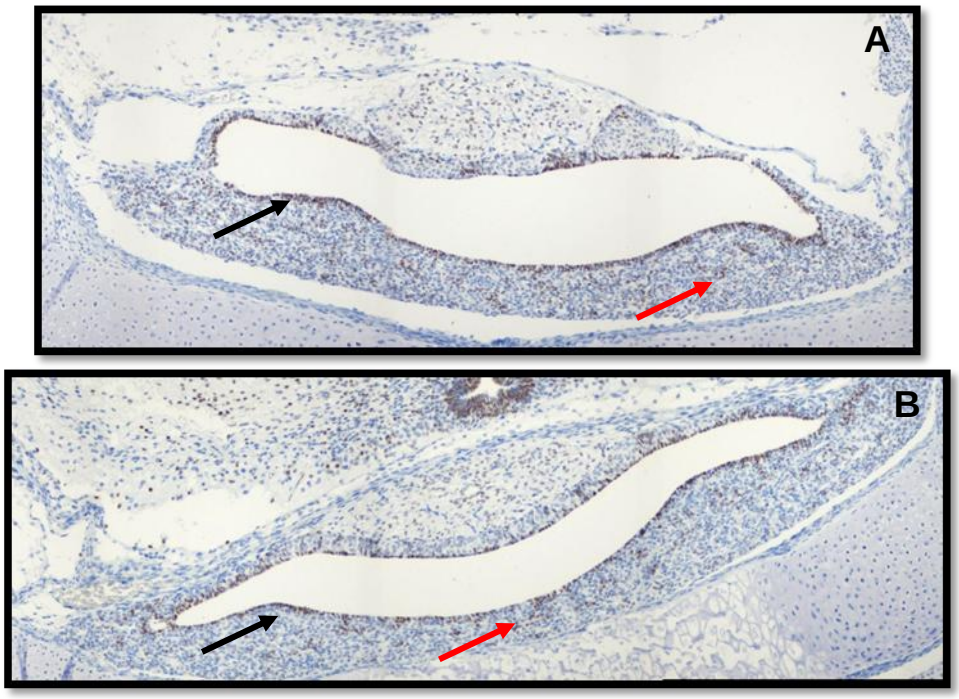


Figura 14 - Imunolocalização de SOX2 na linhagem Snell (*Pou1f1*) ao nascimento (P0). **A:** animal mutado; **B:** selvagem. Observa-se uma expressão do SOX2 na região marginal (setas pretas) e em nichos difusos pela glândula (setas vermelhas). IHQ SOX2 (1:1600), coloração marrom. Aumento 20x.

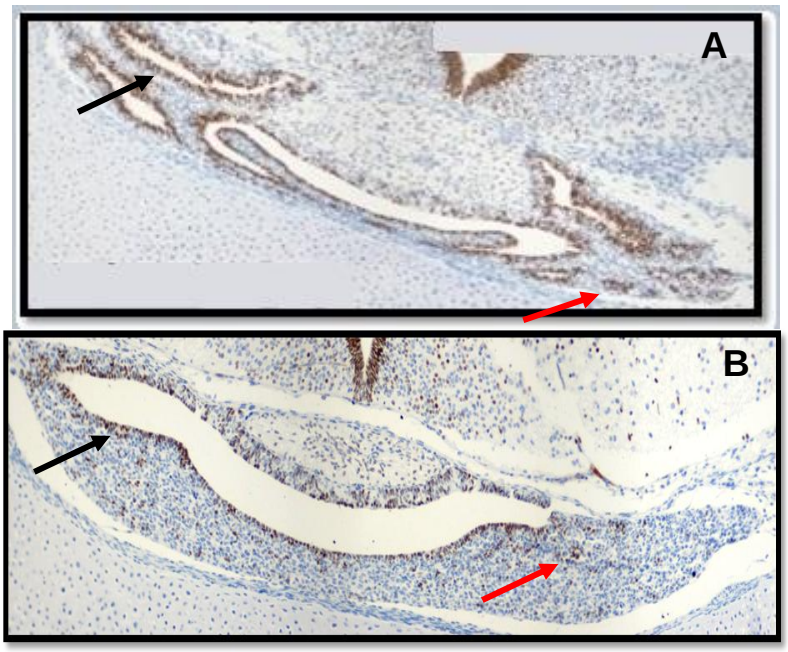


Figura 15 - Imunolocalização de SOX2 na linhagem Ames (*Prop1*) ao nascimento (P0). A: animal mutado; B: selvagem. Observa-se uma expressão do SOX2 na região marginal (setas pretas) e em nichos difusos pela glândula (setas vermelhas). IHQ SOX 2 (1:1600), coloração marrom. Aumento 20x.

Com relação à contagem do percentual dos núcleos positivos para SOX2 na IHQ, evidenciou-se que, embora a imunolocalização tenha ocorrido desde o nascimento (P0) até a vida adulta (8S), o percentual diminuiu progressivamente nas três linhagens estudadas (dados observacionais).

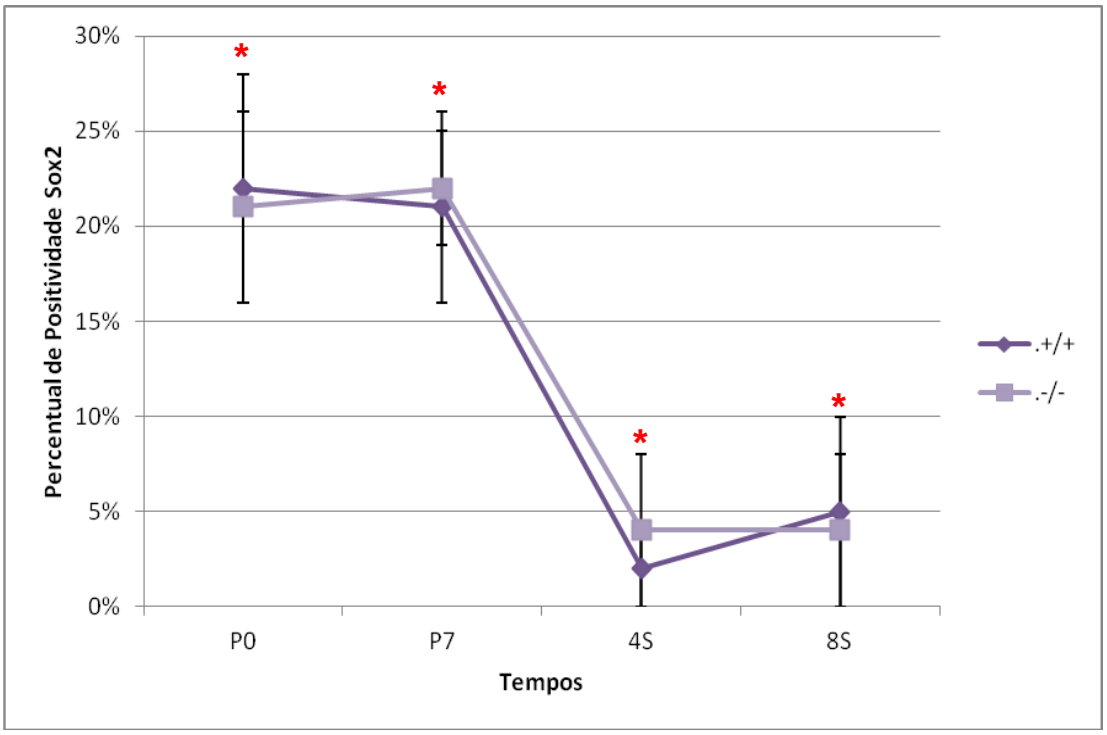
Na linhagem αGSU (*Cga*), constatou-se uma diferença significativa pelo teste de Friedman para análise de variabilidade entre os grupos (*p=0,033*), embora no teste *post hoc* de Dunn não tenham sido evidenciados especificamente os tempos (Anexo N: Tabela - Análise comparativa dos percentuais dos núcleos imunopositivos para SOX2 à IHQ na linhagem αGSU). Adicionalmente, observou-se que o percentual de imunopositividade foi muito semelhante comparando-se os animais mutantes com selvagens, sem diferença significativa entre os grupos (mutante X selvagens) (Gráfico 1).

Nas demais linhagens, Snell (*Pou1f1*) e Ames (*Prop1*), também se observou redução percentual dos núcleos imunorreativos para SOX2 tanto no grupo selvagem como no grupo mutante evolutivamente do dia do

nascimento P0, à vida adulta (8S), Anexos C (Tabela - Análise comparativa dos percentuais dos núcleos imunopositivos para SOX2 à IHQ na linhagem Snell) e Anexo D (Tabela - Análise comparativa dos percentuais dos núcleos imunopositivos para SOX2 à IHQ na linhagem Ames), respectivamente.

Adicionalmente, na linhagem Ames, no dia do nascimento (P0), evidenciou-se uma maior imunorreatividade para SOX2 nos camundongos mutantes quando comparados aos selvagens (Figura 13a). O percentual de núcleos positivos nos camundongos selvagens representou cerca de 51% (n=1) em comparação ao 21% evidenciado nos animais selvagens (n=3) (Anexo D).

Gráfico 1 – Imunolocalização de SOX2 na linhagem αGSU (*Cga*) nos diferentes tempos.



NOTA: percentual de células imunorreativas para SOX2 nos diferentes tempos nos camundongos mutantes (-/-) e selvagens (+/+). Comparação entre os grupos por Mann-Whitney e variabilidade de cada grupo por teste de Friedman, *$p=0,33$ para mutantes e selvagens, *post hoc* de Dunn não significativo. Observa-se redução progressiva dos núcleos SOX2+ tanto nos mutantes (n=3) como nos selvagens (n=3).

4.4 RT-qPCR

4.4.1 Expressão relativa dos genes analisados nos mutantes, utilizando-se os selvagens como calibradores

4.4.1.1 Linhagem αGSU (*Cga*)

Dentre os marcadores de células-tronco, observamos, na linhagem αGSU (*Cga)*, os seguintes padrões de expressão dos mutantes utilizando-se os respectivos selvagens de cada tempo como calibrador:

- *Sox2*: não houve alteração da expressão nos tempos analisados (Gráfico 2A);

- *Nanog*: hipoexpressão no período de puberdade (4S) (Gráfico 2B);

- *Cd44*: não houve alteração expressão relativa em nenhum dos tempos analisados (Gráfico 2C);

- *Nestina*: hipoexpressão na vida adulta (8S) (Gráfico 2D);

- *Oct4*: hipoexpressão no período puberal (4S) (Gráfico 2E);

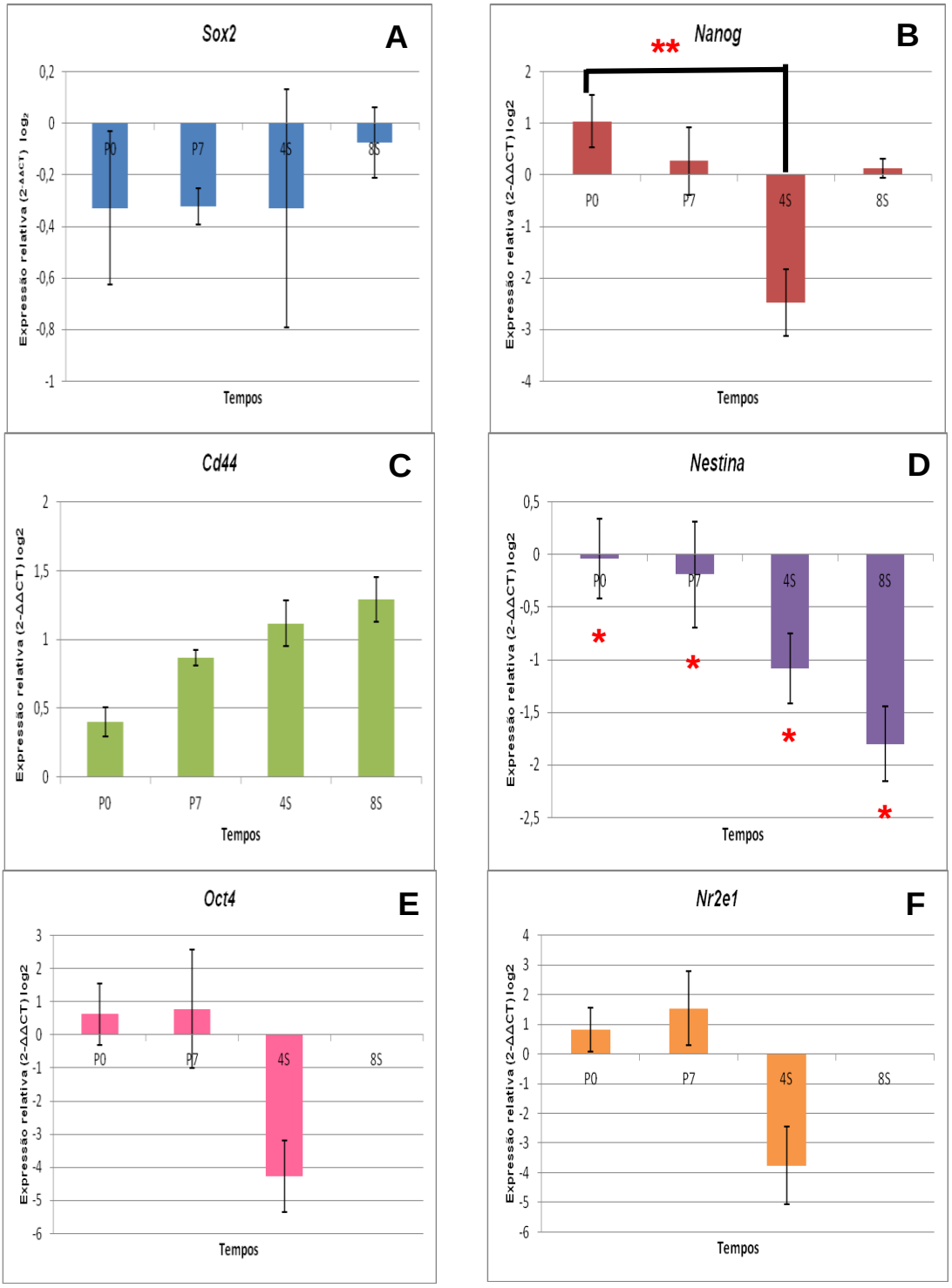
- *Nr2e1*: hiperexpressão em P7 e hipoexpressão em 4S (Gráfico 2F).

Na análise conjunta dos resultados, observou-se, portanto, uma redução da expressão dos marcadores *Nanog*, *Oct4* e *Nr2e1* (nos animais mutantes em relação aos selvagens com 4S) e de *Nestina* (nos animais mutantes em relação aos selvagens com 8S) (Gráfico 3, todos os valores em uma mesma escala para melhor visualização). Pelo teste de Friedman para comparação entre os grupos nos diferentes tempos, evidenciou-se que a *Nestina* apresentou alteração ($p=0,017$), embora a análise *post hoc* pelo teste de Dunn não tenha evidenciado os tempos específicos (Anexo O: Tabela - Análise estatística da expressão relativa dos genes na linhagem αGSU por RT-qPCR). Por outro lado, a redução do *Nanog* foi significativa no período de 4S em relação ao P0 (teste de Friedman, seguido de teste de Dunn, com $p<0,05$). No período de maior queda dos marcadores com 4S, os animais mutantes apresentaram uma redução concomitante do fator de transcrição *Hesx1* (Gráfico 4) utilizando-se o selvagem do mesmo período como calibrador. A análise estatística demonstrou que esta queda foi significativa em relação ao P7 ($p<0,05$, teste de Friedman *post hoc* Dunn).

Por outro lado, o aumento da transcrição do *S100β* observado ao nascimento, foi estatisticamente maior quando comparado aos níveis transcricionais na vida adulta ($p<0,05$) (Gráfico 5).

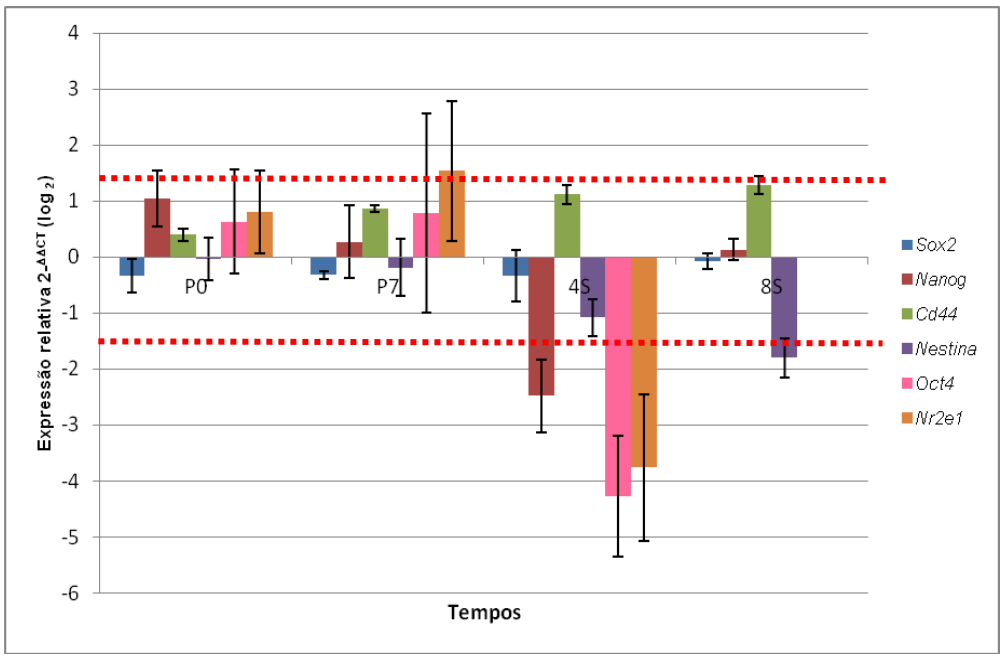
Apesar de termos observado um aumento na expressão do marcador *Nr2e1* no P7 (Gráfico 2F), acreditamos que possa ter havido um eventual erro amostral (devido ao elevado desvio-padrão observado).

Gráfico 2 - Expressão relativa de cada gene marcador de células-tronco/progenitoras na linhagem αGSU (*Cga)* por RT-qPCR.



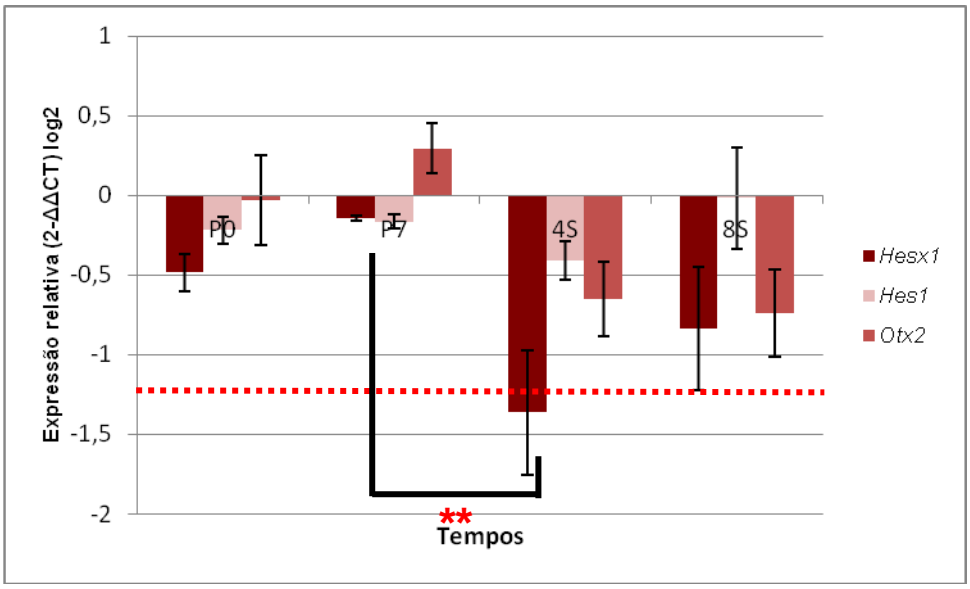
NOTA: Valores de expressão relativa de cada marcador de células-tronco/progenitoras separadamente ($2^{-\Delta\Delta CT}$) **(A-F)** dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se os respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32. Escalas distintas. **B)** Teste de Friedman e *post hoc* de Dunn (**$p<0,05$) P0>4S. **D)** Teste de Friedman (*$p=0,017$) com teste *post hoc* Dunn não significativo.

Gráfico 3 - Expressão relativa dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras na linhagem αGSU (Cga) por RT-qPCR: visão geral.



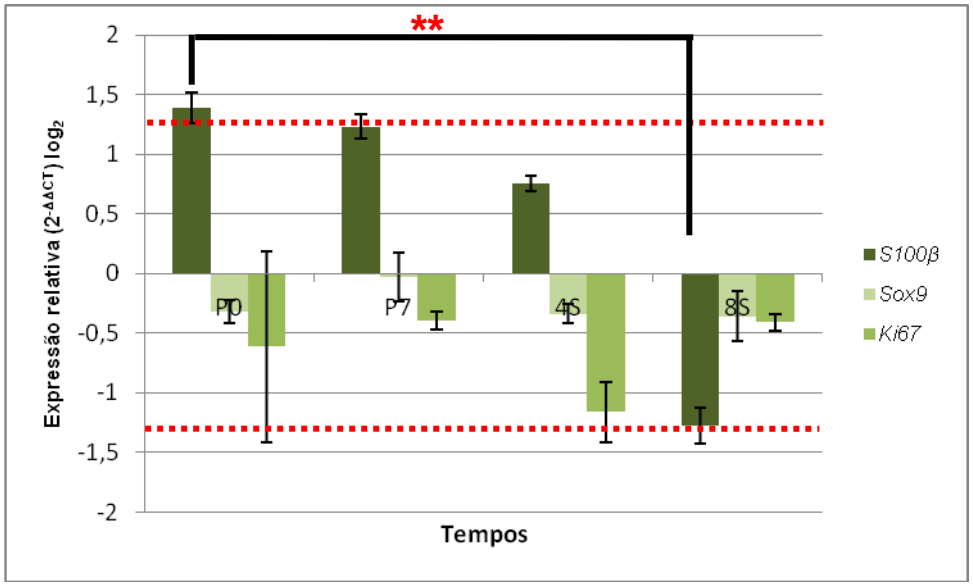
NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de todos os marcadores de células-tronco/progenitoras em uma mesma escala. Dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se redução da expressão relativa dos marcadores *Nanog*, *Oct4* e *Nr2e1* em 4S e *Nestina* em 8S.

Gráfico 4 - Expressão relativa dos fatores de transcrição precoces (*Hesx1, Hes1 e Otx2*) na linhagem αGSU (*Cga)* por RT-qPCR.



NOTA: Valores de expressão relativa dos genes de transcrição precoces ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se redução da expressão de *Hesx1* em 4S, diferença estatisticamente significativa com relação ao P7, teste de Friedman, *post hoc* teste Dunn (**$p<0,05$).

Gráfico 5 - Expressão relativa dos fatores de diferenciação e proliferação celular na linhagem αGSU (*Cga) p*or RT-qPCR.



NOTA: Valores de expressão relativa dos marcadores de diferenciação celular e proliferação celular ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em log_2 dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se elevação do *S100β* no período de P0 em relação à 8S (teste de Friedman, *post hoc* de Dunn **$p<0,05$).

4.4.1.2 Linhagem Snell (*Pou1f1*)

Dentre os marcadores de células-tronco, observamos na linhagem Snell (*Pou1f1*) os seguintes padrões de expressão dos mutantes utilizando-se os respectivos selvagens de cada tempo como calibrador:

- *Sox2*: hiperexpressão na puberdade (4S) e vida adulta (8S) (Gráfico 6A);

- *Nanog*: hiperexpressão no período da puberdade (4S) (Gráfico 6B);

- *Cd44*: hiperexpressão nos períodos da puberdade (4S) e vida adulta (8S) (Gráfico 6C);

- *Nestina*: ausência de alteração expressão nos tempos analisados (Gráfico 6D);

- *Oct4*: a transcrição do gene só foi detectada no P7, mas sem alteração de expressão (Gráfico 6E);

- *Nr2e1*: alteração de expressão nos tempos P0 (hipoexpressão), P7 e 4S (hiperexpressão) (Gráfico 6F).

Na análise conjunta dos resultados (para uma melhor visualização), observou-se, portanto, que houve uma elevação da expressão do *Nr2e1*, *Nanog*, *Sox2* e *Cd44* no período puberal (4S), sendo que estes dois últimos marcadores (*Sox2* e *Cd44*) permaneceram elevados na vida adulta (8S) (Gráfico 7). Em contrapartida, *Nr2e1* apresentou redução ao nascimento (P0) e aumento também ao final da primeira onda de crescimento hipofisário (P7), além do período referido de 4S (Gráficos 6F e 7).

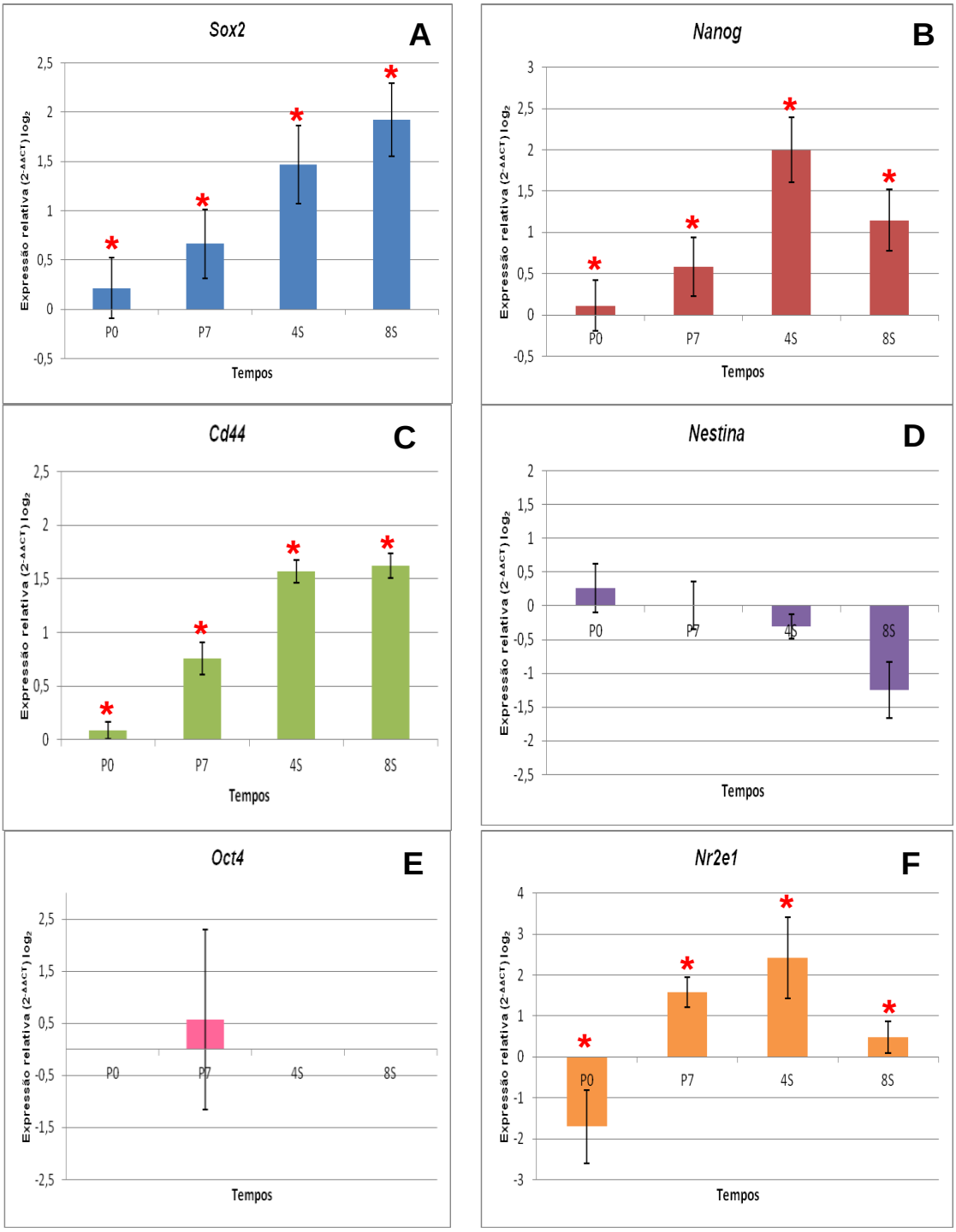
Na análise da variabilidade entre os grupos, pelo teste de Friedman houve diferença significativa de expressão dos marcadores de células-tronco entre todos os tempos para os genes *Cd44*, *Nr2e1* e *Nanog* ($p=0,017$) e *Sox2* ($p=0,033$), porém com *post hoc* de Dunn sem significância (Anexo P: Tabela - Análise estatística da expressão relativa dos genes na linhagem Snell por RT-qPCR).

No período de 4S, concomitante ao aumento de expressão dos marcadores de células-tronco, houve o aumento dos fatores de transcrição precoces *Hesx1*, *Hes1* e *Otx2* (Gráfico 8) e dos fatores relacionados à diferenciação celular *S100β* e *Sox9* (Gráfico 9). Ambos estiveram associados a uma redução do índice de proliferação *Ki67* (Gráfico 9). Tal redução do fator de proliferação permaneceu na vida adulta (8S) (Gráfico 9) com concomitância do aumento da expressão dos marcadores *Hesx1*, *Otx2* (Gráfico 8) e *Sox9* (Gráfico 9).

Pelo teste de Friedman, constatou-se que, embora não tenha havido diferença significativa entre os tempos para o gene *S100β* (p=0,058), houve diferença significativa para o *Sox9*, com *post hoc* de Dunn demonstrando aumento na vida adulta (8S) comparado ao nascimento (P0) ($p<0,05$).

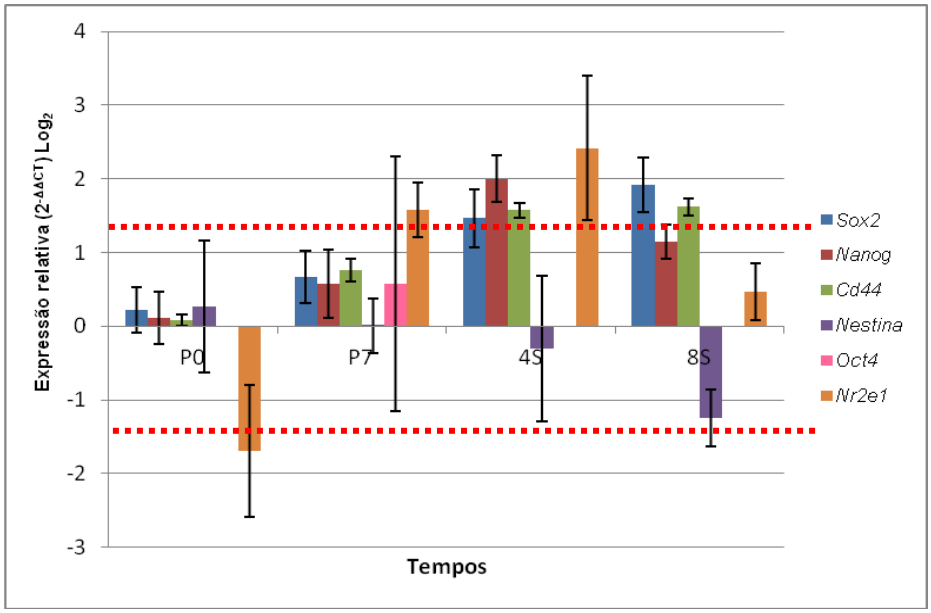
Todos os fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1* e *Otx2*) apresentaram significância pelo teste de Friedman, com $p=0,033$, $p=0,017$ e $p=0,017$, respectivamente.

Gráfico 6 - Expressão relativa de cada gene marcador de células-tronco/progenitoras na linhagem Snell (*Pou1f1*) por RT-qPCR.



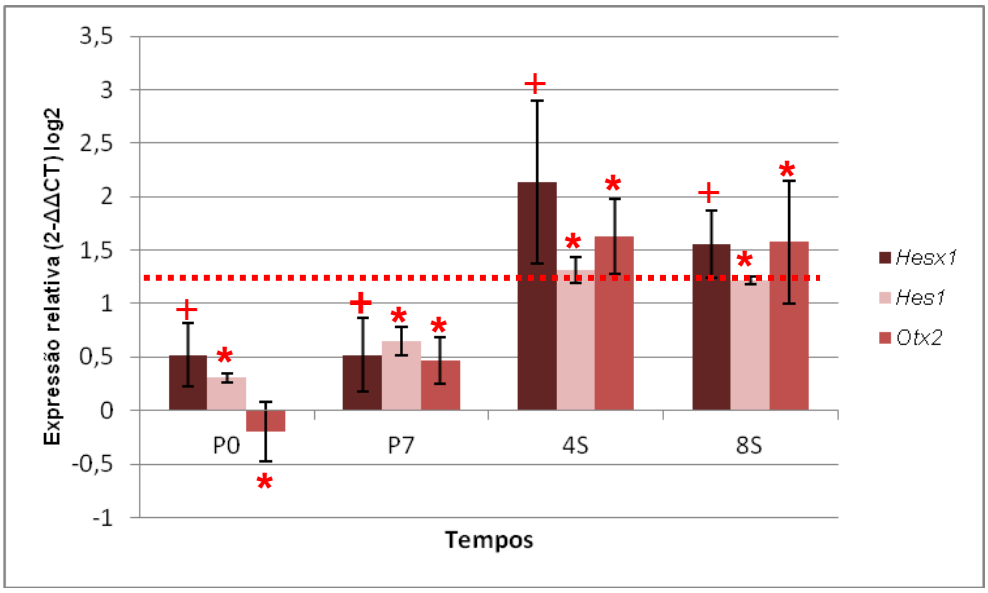
NOTA: Valores de expressão relativa de cada marcador de célula-tronco separadamente ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32. Escalas distintas. **A**) Teste de Friedman +*p=0,033*, *post hoc* Dunn não significativo**. B, C e F**) Teste de Friedman **p=0,017*, *post hoc* Dunn não significativo.

Gráfico 7 - Expressão relativa dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras na linhagem Snell (*Pou1f1)* por RT-qPCR: visão geral.



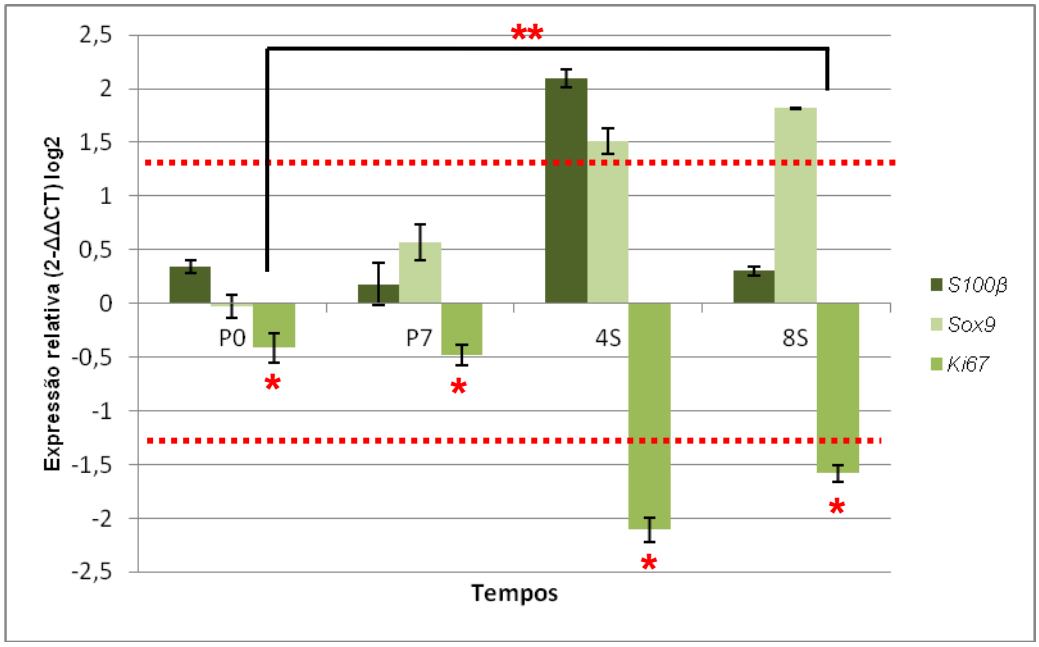
NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de todos os genes marcadores de células-tronco/progenitoras em uma mesma escala. Dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se aumento de vários marcadores nos períodos 4S e 8S.

Gráfico 8 - Expressão relativa dos fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1* e *Otx2*) na linhagem Snell (*Pou1f1)* por RT-qPCR.



NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Aumento da expressão relativa dos marcadores em 4S e 8S. Análise comparativa entre os tempos por teste de Friedman, **p=0,017*, *+p=0,033*, *post hoc* Dunn não significativo.

Gráfico 9 - Expressão relativa dos fatores de diferenciação e proliferação celular na linhagem Snell (*Pou1f1)* por RT-qPCR.



NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em log_2 dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha para melhor visualização). Aumento da expressão dos fatores diferenciação celular com 4S e 8S, redução fator proliferação nos mesmos períodos. Análise comparativa entre os tempos por teste de Friedman, *$p=0,017$, *post hoc* Dunn não significativo; chave demonstrando diferença significativa entre os tempos 8S>P0, com **$p<0,05$.

4.4.1.3 Linhagem Ames (*Prop1*)

Dentre os marcadores de células-tronco, observamos, na linhagem Ames (*Prop1*), os seguintes padrões de expressão dos mutantes utilizando-se os respectivos selvagens de cada tempo como calibrador:

- *Sox2*: hiperexpressão nos períodos de P7, 4S e 8S (Gráfico 10A);
- *Nanog*: hiperexpressão nos períodos de P7, 4S e 8S (Gráfico 10B);
- *Cd44*: hiperexpressão nos períodos da puberdade (4S) e vida adulta (8S) (Gráfico 10C);
- *Nestina*: ausência de alteração expressão nos tempos analisados (Gráfico 10D);
- *Oct4*: hipoexpressão em P0 (Gráfico 10E);
- *Nr2e1*: hiperexpressão em todos os tempos analisados (Gráfico 10F).

Na análise conjunta dos resultados (para uma melhor visualização), observou-se, portanto, que, na linhagem Ames (*Prop*$^{-/-}$*),* assim com na linhagem Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$), houve o aumento da expressão de células-tronco tanto no período da puberdade (4S) como no período da vida adulta (8S) (*Cd44*, *Nanog*, *Sox2* e *Nr2e1*) (Gráfico 11). Quanto aos marcadores de células-tronco/progenitoras nos outros tempos analisados, observou-se um aumento do *Nanog* e *Sox2* também no final da primeira onda de crescimento hipofisário (P7), sendo que o marcador *Nr2e1* apresentou uma maior expressão nos mutantes em relação aos selvagens (calibradores) em todos os tempos analisados (Gráfico 11).

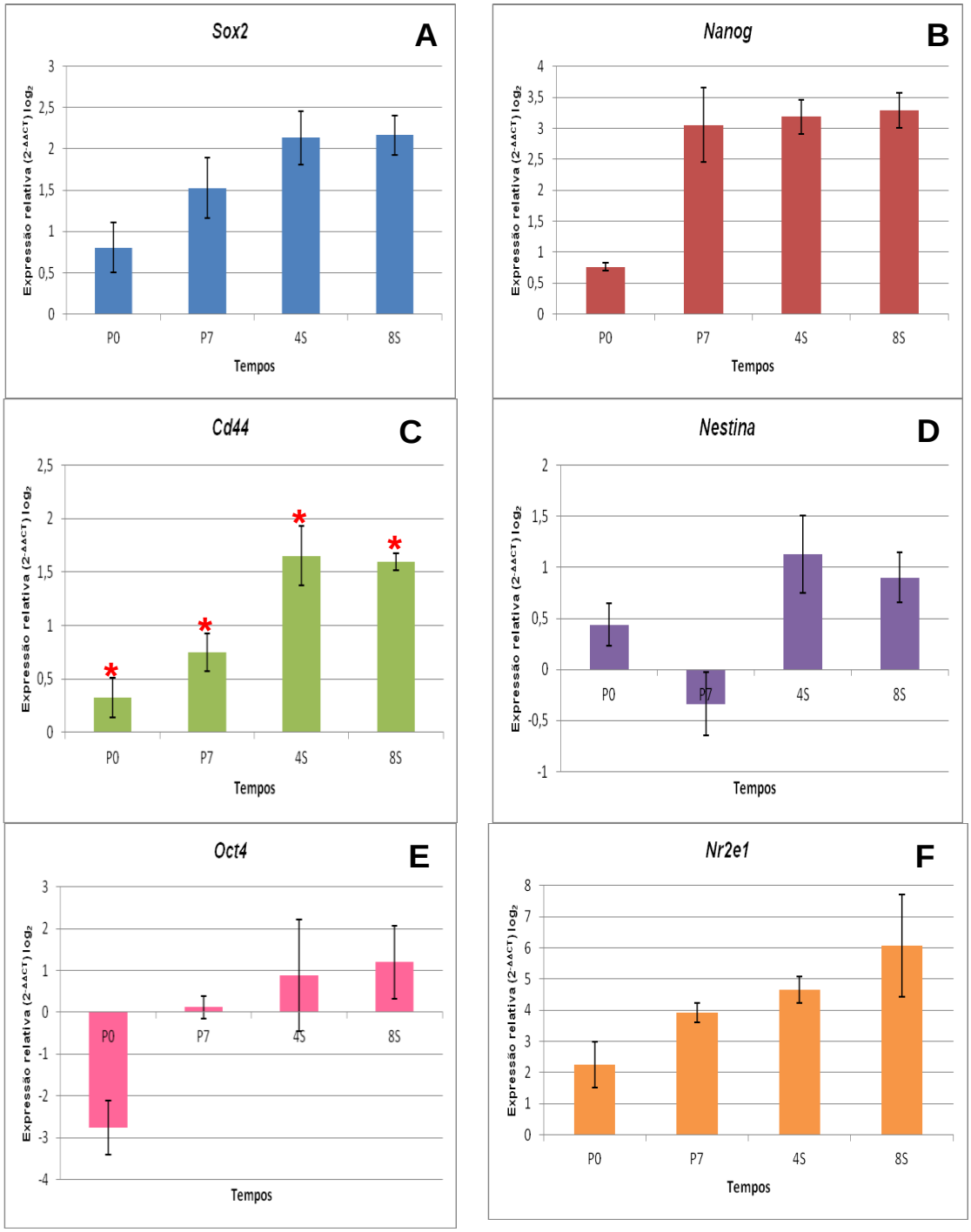
Ao se fazer a análise estatística entre os tempos, contatou-se que o *Cd44* apresentou variabilidade entre todos os tempos avaliados pelo teste de Friedman (*p=0,017*), embora no *post hoc* Dunn não tenha sido significativo para análise comparativa por pares (Anexo Q: Tabela - Análise estatística da expressão relativa dos genes na linhagem Ames por RT-qPCR).

Conforme esperado, observou-se um aumento do fator de transcrição *Hesx1* em todos os períodos de vida pós-natal (Gráfico 12). Os marcadores *Hes1*, *Otx2* (Gráfico 12), *Sox9* e *S100β* (Gráfico 13) também tiveram elevação nos períodos de 4S e 8S, além do período puberal, P7 (somente o *Otx2*) (Gráfico 12). Outro dado observado de forma semelhante à linhagem Snell (*Pou1f1*) foi a queda do fator de proliferação *Ki67* no período da puberdade (4S) (Gráfico 13).

No teste de Friedman, houve variação significativa entre os tempos dos genes *Hesx1, Hes1* (ambos com *p=0,017*) com *post hoc* não significativo.

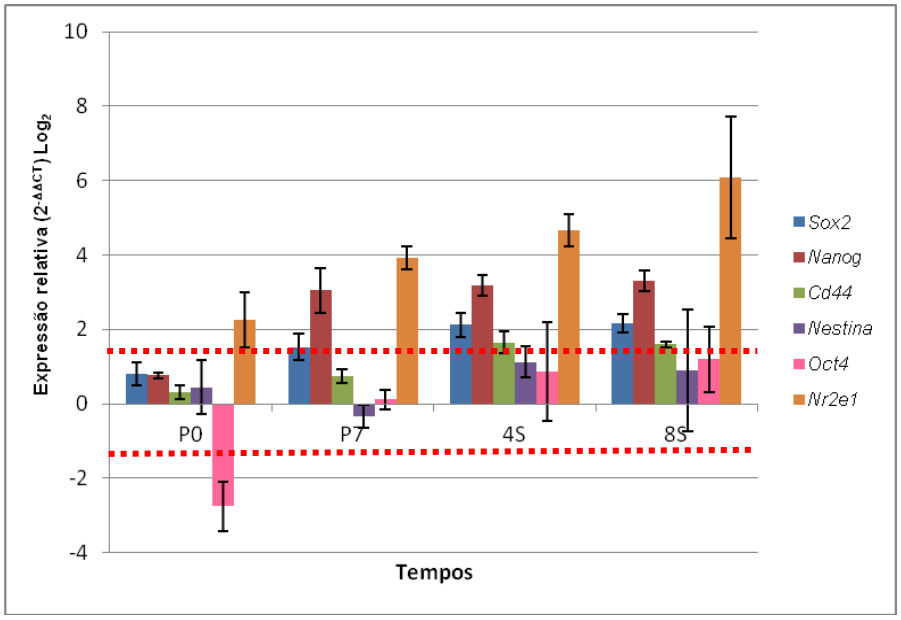
Quanto aos fatores de diferenciação e proliferação celular, observou-se significância com *p=0,017* para o *Sox9* e de *p<0,05* no *post hoc* de Dunn para o gene *S100β,* com maior expressão na puberdade quando comparado ao P7.

Gráfico 10 - Expressão relativa de cada gene marcador de células-tronco/progenitoras na linhagem Ames (*Prop1*) por RT-qPCR.



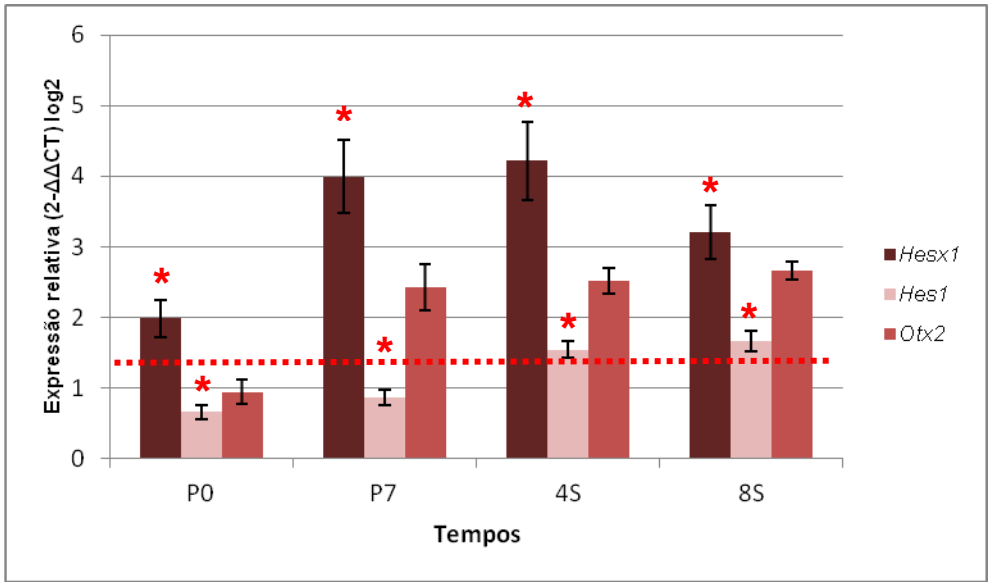
NOTA: Valores de expressão relativa de cada marcador de célula-tronco/progenitora separadamente ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ± 1,32. Escalas distintas. C) Teste de Friedman, *$p=0,017$, *post hoc* Dunn não significativo.

Gráfico 11 - Expressão relativa dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras na linhagem Ames (*Prop1) p*or RT-qPCR: visão geral.



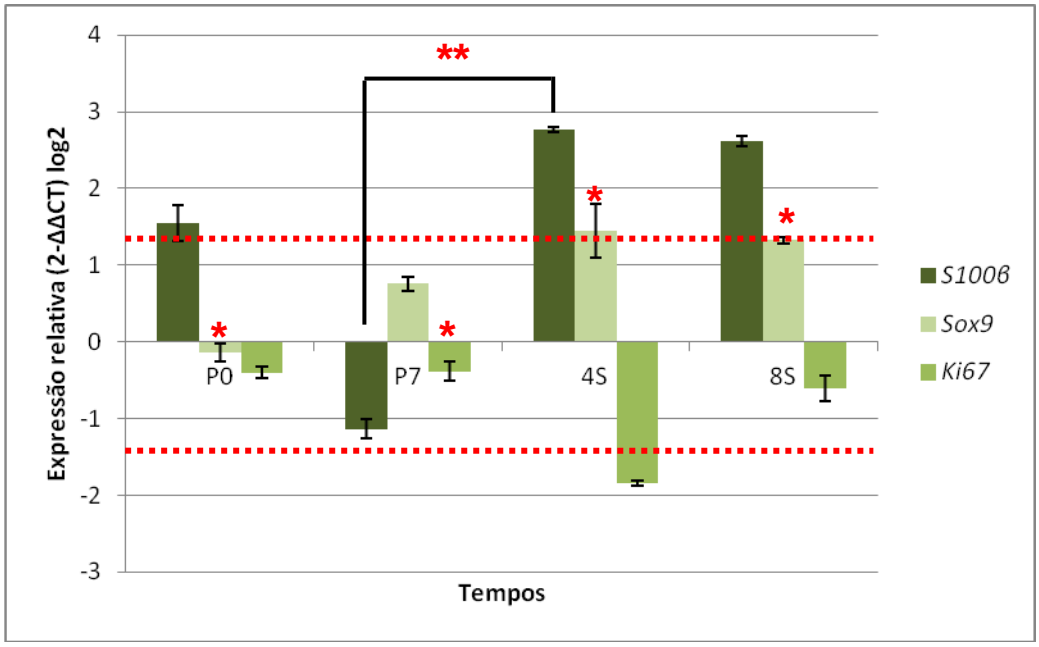
NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de todos os marcadores de células-tronco/progenitoras em uma mesma escala. Dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se aumento de vários marcadores nos períodos P7, 4S e 8S.

Gráfico 12 - Expressão relativa dos fatores de transcrição precoces (*Hesx1*, *Hes1*, *Otx2*) na linhagem Ames (*Prop1) p*or RT-qPCR.



NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em $\log_2$ dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ± 1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se aumento dos fatores de transcrição precoce em vários dos tempos avaliados. Análise comparativa entre os tempos por teste de Friedman, *$p=0,017$, *post hoc* Dunn não significativo.

Gráfico 13 - Expressão relativa dos fatores de diferenciação e proliferação celular na linhagem Ames (*Prop1)* por RT-qPCR.



NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dados brutos convertidos em log_2 dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > ±1,32 (linha tracejada vermelha, para melhor visualização). Observa-se aumento do fator diferenciação celular *S100β* em 4S e 8S, e redução do fator de proliferação em 4S. Análise comparativa entre os tempos por teste de Friedman, *$p=0,017$, com *post hoc* Dunn não significativo; chave demonstra diferença significativa entre os tempos 4S>P7, *post hoc* Dunn **$p<0,05$.

Com relação aos marcadores de apoptose analisados, *Caspase* 3 e -7, não houve alteração de expressão em nenhum dos tempos das três linhagens estudadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Expressão relativa dos genes marcadores de apoptose nas linhagens αGSU (*Cga*), Snell (*Pou1f1*) e Ames (*Prop1*) por RTq-PCR.

LINHAGEM	GENE	Tempos			
		P0	P7	4S	8S
AGSU	*Casp 3*	0,95 ± 0,05	0,87 ± 0,04	0,96 ± 0,08	1,11 ± 0,09
	Casp 7	0,89 ± 0,06	0,92 ± 0,03	0,79 ± 0,03	1,05 ± 0,16
Snell	*Casp 3*	1,07 ± 0,05	1,17 ± 0,06	1,74 ± 0,47	1,36 ± 0,08
	Casp 7	0,81 ± 0,05	0,91 ± 0,08	1,21 ± 0,07	1,69 ± 0,13
Ames	*Casp 3*	0,99 ± 0,07	1,54 ± 0,36	1,47 ±0,24	1,57 ±0,07
	Casp 7	0,80 ± 0,10	1,14 ± 0,14	1,23 ± 0,12	1,49 ± 0,20

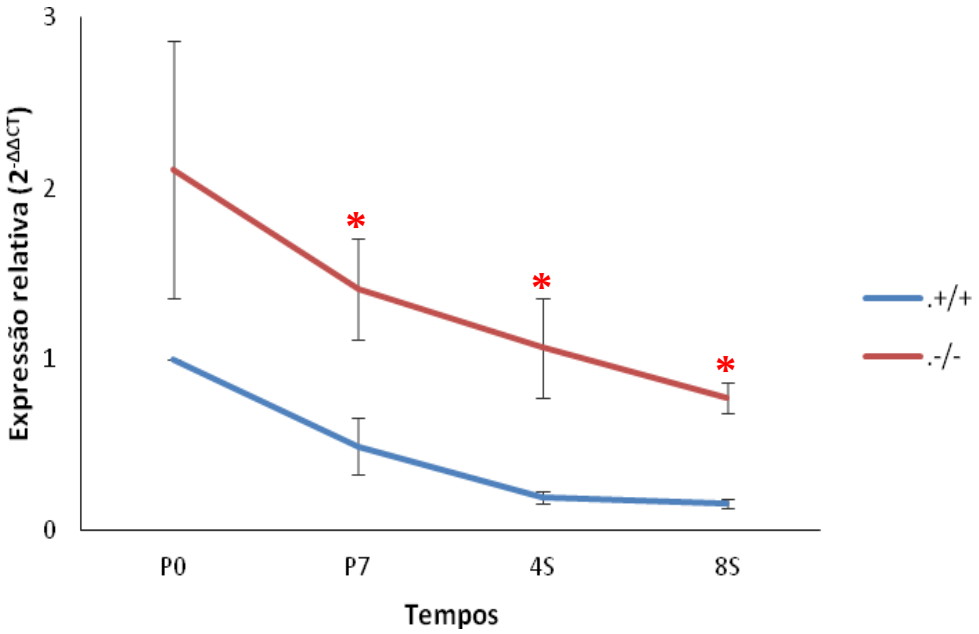
NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$), dados brutos convertidos dos mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata), utilizando-se respectivos selvagens como calibradores. Foram considerados diferencialmente expressos valores > 2,5 e <0,4.

4.4.2 Análise evolutiva da expressão relativa do gene *Sox2* na linhagem Ames (*Prop1*)

Como houve a hiperexpressão do *Sox2* em três dos quatro tempos analisados na linhagem Ames (*Prop1*), optou-se por fazer a análise evolutiva do gene. Para isto, avaliou-se a variabilidade dos genes endógenos usados do P0 do selvagem em relação aos demais tempos do selvagem e entre todos os tempos dos mutantes (Anexo M).

Como não houve variabilidade do gene endógeno *HPRT* ($p>0,05$), optou-se por usá-lo para proceder a análise evolutiva do gene *Sox2*. Constatou-se que, apesar da expressão relativa do mutante (utilizando-se como calibrador os CTs do P0 do selvagem) apresentar níveis maiores de expressão (teste Mann-Whitney $p=0,049$), ocorre uma redução na expressão de *Sox2* tempo-dependente, semelhante ao que se constatou com os dados observacionais na imuno-histoquímica tanto para os animais selvagens (queda significativa de 4S para 8S, $p=0,027$) como para os mutantes (queda significativa do P7 para 4S, $p=0,027$), ambos pelo teste de Friedman com *post hoc* de Dunn não significativo (Anexo R - Tabela Análise evolutiva da expressão do gene *Sox2* em animais mutantes e selvagens da linhagem Ames (*Prop1*) usando o P0 do selvagem como calibrador).

Gráfico 14 - Expressão relativa evolutiva dos níveis transcricionais do *Sox2* na linhagem Ames (*Prop1) p*or RT-qPCR, utilizando-se o P0 do selvagem como calibrador.



NOTA: Valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) do gene *Sox2* de mutantes (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata) e selvagens (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata) utilizando-se o P0 do selvagem como calibrador. Foram considerados diferencialmente expressos valores > 2,5 ou < 0,4 (dados brutos). Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos (P7, 4S e 8S) do mutante em relação ao selvagem (Mann-Whitney, **p=0,049*).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Com os avanços recentes nos estudos demonstrando evidências da existência de células-tronco/progenitoras na hipófise sendo responsáveis tanto pela renovação glandular como por suprir momentos de maior demanda metabólica, este estudo se baseou na avaliação da presença de marcadores de células-tronco/progenitoras em modelos animais com hipopituitarismo congênito.

O uso das três linhagens com acometimento em diferentes pontos do processo de desenvolvimento glandular permitiu não só avaliar a expressão dos marcadores, mas também correlacionar os seus níveis de expressão à fase na cascata de diferenciação hipofisária e ao tipo de deficiência hormonal envolvida.

O achado do aumento dos marcadores de células-tronco/progenitoras naqueles modelos com alteração nos fatores de diferenciação precoce (*Prop1* e *Pou1f1)* e a redução no modelo com acometimento apenas terminal na formação hormonal (*Cga*) deram indícios de que, mesmo nos animais com hipopituitarismo, as células-tronco/progenitoras podem ter correlação com o processo de renovação glandular.

5.1 Morfologia hipofisária: hiperplasia na linhagem α-GSU (*Cga)* hipoplasia na linhagem Snell (*Pou1f1*) e hipoplasia com dismorfologia na linhagem Ames (*Prop1*)

Embora já tenham sido descritas as alterações morfológicas observadas nas hipófises das três linhagens em questão, no presente estudo, houve preocupação em se reproduzir os achados anteriores, e em fazer uma caracterização evolutiva e comparativa intra e interespécies nas diferentes fases do desenvolvimento pós-natal.

O modelo α-GSU (nocaute do gene *Cga*), que cursa com deficiência na

conjugação dos hormônios glicoproteicos pela ausência da subunidade alfa, foi desenvolvido para o estudo da influência desta alteração no processo de desenvolvimento hipofisário (Kendall *et al.*, 1991). Esse modelo foi criado a fim de se analisar se a ausência da subunidade alfa poderia, de alguma forma, interferir no processo de migração (fator quimiotático) dos neurônios produtores de GnRH (que se formam na placa olfatória e migram para o hipotálamo) (Wray *et al.*, 1989). Embora a subunidade alfa participe do processo de conjugação dos hormônios glicoproteicos, tal fato ocorre somente em uma fase mais tardia da formação glandular (por volta do E14.5), e de forma curiosa, sua expressão é detectada bem antes, no início da formação glandular, por volta do E11.5 (Simmons *et al*., 1990).

Embora tal hipótese não tenha sido comprovada, o modelo nocaute desenvolvido caracterizava-se por um quadro de hiperplasia hipofisária, mais evidente na fase adulta, dado também observado em nosso estudo, com aumento expressivo da linhagem tireotrófica (tanto hipertrofia como hiperplasia) (Kendall *et al*., 1995). Foi descrito que o aumento dos tireotrofos ocorre concomitante à redução da linhagem somatotrófica e lactotrófica, levando a um possível efeito direto da ausência do TSH sobre a transcrição dos demais hormônios, GH (Schaufele *et al*., 1992) e PRL (Begeot *et al*., 1984). Além disto, acredita-se que ocorra um “desvio” dos precursores da linhagem *Pou1f1(Pit1)*-dependente para formação dos tireotrofos, principalmente por não se observar comprometimento das linhagens gonadotrófica e corticotrófica (Kendall *et al*., 1995).

Em contrapartida, a morfologia e o tamanho da hipófise do camundongo mutante para o gene *Pou1f1* é semelhante ao do selvagem no período fetal, indicando que o *Pou1f1* seria “dispensável” para se iniciar a expansão do lobo anterior. Entretanto, uma semana após o nascimento, a hipófise do camundongo mutante de *Pou1f1* é nitidamente menor que a dos selvagens (Ward *et al*., 2006). No presente estudo, observou-se o mesmo achado.

Quanto à morfologia hipofisária do animal mutante Ames (*Prop1*$^{-/-}$), observou-se quadro de dismorfologia hipofisária, com hipoplasia em todos

os períodos analisados, exceto no dia do nascimento (P0). Sabe-se que, embora não haja diferença volumétrica hipofisária entre o animal selvagem e o mutado no período pré-natal e no primeiro dia de vida, existe uma dismorfologia hipofisária significativa (Ward *et al*., 2005). No período pós-natal, as diferenças volumétricas se acentuam, sendo que, na 8ª semana, o volume da hipófise do animal mutado é cerca de dez vezes menor que o normal (Ward *et al*., 2005). A dismorfologia observada da glândula pode dever-se ao fato de que o *Prop1* participa não somente do processo de diferenciação celular, mas também da morfogênese, incluindo processo de proliferação e apoptose glandular (Ward *et al*., 2006).

Sabe-se que tanto o volume como o formato do SNC dependem de quantas vezes as células-tronco neurais “re-entrem” ou “re-iniciem” o processo do ciclo celular (Ohnuma e Harris, 2003). O fato de termos observado um aumento dos marcadores de células-tronco/progenitoras nos modelos com hipoplasia hipofisária (modelos mutantes espontâneos para os genes *Prop1* e *Pou1f1*) e uma redução dos marcadores no modelo com hiperplasia e que tais processos sejam mais evidentes na glândula adulta, sugere a possibilidade de que, da mesma forma que ocorre com a formação do SNC (Kabos *et al*., 2002), o processo de ciclo celular e célula-tronco também possam ter uma interferência no volume e na forma final da hipófise (Drouin *et al*., 2010; Monahan *et al*., 2012).

5.2 A imunolocalização do SOX2 ocorre na região da zona marginal e em nichos difusos no lobo anterior da hipófise

As pesquisas envolvendo marcadores de células-tronco/progenitoras apontam para a zona da camada marginal como um provável sítio que contenha tais células na vida adulta (Chen *et al*., 2009; Fauquier *et al*., 2008; Garcia-Lavandeira *et al*., 2009; Gleiberman *et al*., 2008; Krylyshkina *et al*., 2005; Rizzoti, 2010; Vankelecom, 2007a; b; Yoshida *et al*., 2009). Embora os estudos tenham demonstrado distintos marcadores para as células-tronco/progenitoras (Tabela 14), o SOX2 parece ocupar uma posição

“central” e, por isto, optamos por fazer sua análise transcricional pela RT-qPCR e proteica por meio da imuno-histoquímica.

Foi demonstrado que células expressando SOX2 são progenitoras multipotentes capazes de gerar todos os subtipos celulares da glândula adulta (Chen *et al*., 2009; Fauquier *et al*., 2008). Estas células SOX2 positivas estariam presentes não só na zona da camada marginal, mas também em nichos difusos pela glândula (Chen *et al*., 2009; Fauquier *et al*., 2008; Yoshida *et al*., 2011). O método de análise dos telomeros e o fato de ter-se evidenciado células com telomeros maiores nestes dois locais reforçam tal hipótese (Garcia-Lavandeira *et al*., 2009).

A imunolocalização do SOX2 nas três linhagens no presente estudo, demonstrando uma imunomarcação expressiva na zona da camada marginal e em nichos difusos pela glândula, foi particularmente notável nos animais no período P0 na linhagem Ames (*Prop1)* (figura 13). Corroborando com o achado deste estudo, o modelo de camundongo transgênico ablativo levando ao hipopituitarismo com toxina diftérica (Fu *et al*., 2012; Fu e Vankelecom, 2012) também evidenciou esse mesmo local como nicho de células-tronco/progenitoras. Em outro estudo, Yoshida *et al* (2011) observaram uma redução expressiva no percentual de células SOX2+ tanto na zona da camada marginal com no parênquima glandular em ratos no período pós-natal (Yoshida *et al*., 2011), resultado semelhante ao que obtivemos na IHQ.

Embora Chen e cols (2009) tenham referido que haveria uma alteração quanto à região de imunolocalização do SOX2, uma vez que observaram padrão predominantemente nuclear nas células na zona da camada marginal que circundam a fenda, nas camadas subsequentes, a localização ocorreria mais no citoplasma. Em nossa análise, ambos os locais foram observados, mas foi evidenciada a imunomarcação somente no núcleo (Chen *et al*., 2009).

Cogita-se, ainda, se não seriam estes dois locais, sítios “distintos” de células-tronco/progenitoras, em que os nichos difusos no lobo anterior seriam células já em uma fase “mais posterior” (mais “progenitora” que

"tronco"), aguardando somente o estímulo para o início da diferenciação celular (do Inglês, "*commitment*") proporcionando, assim, uma maior flexibilidade de reposta de acordo com a demanda metabólica, enquanto que as células que circundariam a fenda, na camada marginal, estariam ainda em uma fase mais "indiferenciada" (mais "tronco" que "progenitora") (Chen *et al*., 2009). Embora Fauquier *et al*. (2008) também tenham encontrado uma diferença na região de imunolocalização de SOX2, a imunomarcação nuclear ocorreria com as células/esferas hipofisárias em meio ainda indiferenciado, enquanto que a expressão observada no citoplasma ocorreu com as esferas já na fase de diferenciação, inclusive com a colocalização de SOX9 e S100β com redução progressiva da intensidade até na fase posterior de diferenciação com colocalização de hormônios (Fauquier *et al*., 2008; Kim *et al*., 2011).

Tais hipóteses são especulativas e ainda necessitam de comprovação. Diferenças metodológicas com relação ao anticorpo utilizado e quanto aos *backgrounds* das linhagens poderiam explicar tal discrepância nos achados.

5.3 Os marcadores de células-tronco/progenitoras estão reduzidos na linhagem αGSU (*Cga*) e aumentados nas linhagens Ames (*Prop1*) e Snell (*Pou1f1*)

Apesar de já terem sido identificadas células-tronco/progenitoras na hipófise (Chen *et al*., 2005; Fauquier *et al*., 2008; Fu *et al*., 2012; Krylyshkina *et al*., 2005), não se sabia qual seria o padrão de expressão desses marcadores nos quadros de hipopituitarismo congênito.

Observamos que, nos animais nocautes da linhagem αGSU, houve uma redução dos marcadores *Nanog*, *Nr2e1* (*Tlx*) e *Oct4* (*Pou5f1*) no período de 4S (período puberal) e da *Nestina* no período com 8S (da vida adulta). Esta queda mais expressiva dos marcadores no período de 4S foi acompanhada de uma redução do fator de transcrição *Hesx1.*

Sabe-se que o gene *Hesx1* é um fator de transcrição e sua expressão é regulada pelo *Lhx3* e *Prop1* (Savage *et al*., 2003). Enquanto o *Lhx3* é

necessário para manter a sua expressão, *Prop1/β-catenina* são necessários para sua repressão (Sheng e Westphal, 1999; Sornson *et al*., 1996). O *Hesx1* estaria presente no "início" da via de diferenciação celular na linhagem "*Pou1f1* (*Pit*)-dependente" (Zhu e Rosenfeld, 2004). Sendo assim, como discutido anteriormente, neste modelo animal, observa-se um aumento da subpopulação tireotrófica em detrimento da subpopulação somatotrófica e lactotrófica (Kendall *et al*., 1995). Com isto, a redução dos marcadores de células-tronco/progenitoras, principalmente na fase de maior demanda metabólica glandular (período puberal), poderia estar correlacionada a um maior "aporte" de células-tronco/progenitoras na tentativa de "suprir" esta maior demanda e o fato do marcador *Hesx1* estar diminuído reforçaria tal hipótese de aumento da diferenciação na tentativa de suprir a deficiência tireotrófica. Sabe-se, no entanto, que, apesar de haver uma alteração na formação dos hormônios FSH e LH (que também são glicoproteicos), não há alteração quantitativa (hiperplasia) nem qualitativa (hipertrofia) nos gonadotrofos como se observa nos tireotrofos (Kendall *et al*., 1995).

Enquanto na linhagem que apresenta comprometimento tardio na formação e conjugação dos hormônios glicoproteicos (αGSU) observou-se uma redução dos marcadores de células-tronco, nas linhagens com alteração dos fatores de transcrição precoces Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$) e Ames (*Prop1*$^{-/-}$) observou-se aumento.

Concomitante às elevações observadas dos marcadores de células-tronco/progenitoras no período puberal, houve maior expressão dos fatores de transcrição hipofisários, *Hesx1*, *Otx2* e *Hes1* tanto na linhagem Ames (*Prop1*$^{-/-}$) como na linhagem Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$).

A elevação do *Hesx1* na linhagem mutante do *Prop1*, Ames, era esperada, uma vez que ocorre a ausência do fator inibitório direto (pelo complexo *Prop1/βcatenina*) (Gage PJ *et al*., 1996b). O que não esperávamos, em um primeiro momento, era o aumento do fator de transcrição *Hesx1* na linhagem Snell, uma vez que nesta ocorre mutação no fator *Pou1f1* (*Pit1*), porém a atividade inibitória do *Prop1*, inibidor do *Hesx1*,

encontra-se, a princípio, preservada. Por outro lado, estudos *in vitro* evidenciaram que o *Lhx3* (que apresenta ação ativadora sobre o *Hesx1*), além de ser um fator de transcrição precoce, também agiria conjuntamente com outros fatores de transcrição nas fases mais tardias de diferenciação hipofisária e produção hormonal (Zhu *et al*., 2007) e, dentre estes fatores, destacar-se-ia o *Pou1f1 (Pit1*) (Sloop *et al*., 2001). Com base nestes dados, cogitamos se a ausência do *Pou1f1* (*Pit1)* não faria com que houvesse "compensatoriamente" um aumento do *Lxh3* e isto poderia ocasionar uma "hiperativação" do *Hesx1*. Uma das possíveis formas de se comprovar ou não tal hipótese seria, em estudos posteriores, fazer a análise concomitante do *Lhx3* nesta linhagem.

O *Hes1* é um fator de transcrição que regularia a manutenção das células indiferenciadas (Hitoshi *et al*., 2002). Sua expressão já foi descrita tanto em "neuroesferas" reprimindo o "comprometimento" celular na via de diferenciação neuronal (Kabos *et al*., 2002), como na "*side population*" da hipófise (Chen *et al*., 2009). Em nosso estudo, encontramos aumento do *Hes1* concomitante a uma maior expressão dos marcadores em ambas as linhagens com comprometimento de fatores transcricionais precoces (*Prop1* e *Pou1f1*). Adicionalmente, alguns autores pontuam que o *Hes1* teria uma ação não só na manutenção das células-tronco, controlando o ciclo celular, e diferenciação (Kabos *et al*., 2002), mas também teria um papel pelo mecanismo de ciclo celular, no tamanho, no volume e na integridade estrutural do SNC (Hatakeyama *et al*., 2004). Frente a tal fato, especulamos se haveria correlação deste gene com o quadro de hipoplasia observada nos mutantes de ambas as linhagens, Ames (*Prop1*$^{-/-}$) e Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$).

Com relação ao *Otx2,* outro fator de transcrição precoce na hipófise, observou-se um aumento nos períodos de maior expressão nos marcadores de células-tronco/progenitoras, coincidente ao observado com o fator *Hes1*, uma vez que tanto a expressão quanto a repressão do *Otx2* teria correlação direta com via de sinalização *Notch/Hes* (Muranishi *et al*., 2011).

O processo de hipoplasia observada nos animais da linhagem Snell (*Pou1f1)*, após o final da primeira onda de crescimento hipofisário (P7), seria

decorrente, em parte, à redução da proliferação celular primária (Ward *et al*., 2006). Na linhagem Ames (*Prop1*$^{-/-}$), semelhante ao observado na linhagem Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$), não se observa uma diferença volumétrica hipofisária entre o animal selvagem e o mutado no período pré-natal e no primeiro dia do nascimento (Ward *et al*., 2006). No entanto, apresentam uma dismorfologia hipofisária significativa, com menor expressão dos marcadores de proliferação celular nos animais mutados (Ward *et al*., 2005). Em nosso estudo, observamos uma redução dos níveis de expressão do fator de proliferação *Ki67* nos animais mutantes *Pou1f1*$^{-/-}$ na puberdade (4S), e nos animais mutantes *Prop1*$^{-/-}$ na puberdade (4S) e vida adulta (8S), mas não no período do nascimento (P0).

No período pós-natal na linhagem Ames (*Prop1*$^{-/-}$), as diferenças volumétricas se acentuam (na 8ª semana de vida, o volume da hipófise do animal mutado é cerca de dez vezes menor que o normal). Este processo seria decorrente da apoptose observada na glândula, assim como ocorreria no animal Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$), que, além de se observar aumento da apoptose, também apresenta redução da proliferação, como citado previamente, no sétimo dia de vida (P7) (Ward *et al*., 2006).

Embora tenhamos visto uma redução do fator de proliferação celular *Ki67* em ambas as linhagens Ames (*Prop1*$^{-/-}$) e Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$), não observamos alteração nos fatores de apoptose (*Caspase 3* e *-7)* em nenhum dos tempos analisados. Acreditamos, provavelmente, que tal fato tenha ocorrido pela diferença na metodologia empregada, Tunel X Caspase; contagem de células X RT-qPCR (Ward *et al*., 2006). De forma semelhante, Fu *et al*. (2012) também analisaram a *Caspase 3* para avaliar se o aumento do número de células SOX2 positivas nos animais transgênicos com ablação somatotrófica seria predominantemente por redução da apoptose e também não obtiveram diferença na análise do marcador da via final comum (Fu *et al*., 2012).

Embora alguns trabalhos coloquem o *S100β* e o *Sox9* como marcadores de células-tronco/progenitoras (Chen *et al*., 2009; Garcia-Lavandeira *et al*., 2009), existem evidências que apontam que esses seriam

mais fortemente associados à diferenciação (em estágio precoce) da célula (Fauquier *et al*., 2008; Kim *et al*., 2011). Além disto, o *S100β* também seria um marcador da célula foliculoestelada (Nakajima *et al*., 1980), subpopulação que estaria dispersa em "nichos" pelo lobo anterior e a qual se questiona se estaria ou não relacionada às células-tronco/progenitoras.

As esferas hipofisárias provenientes do lobo anterior das hipófises adultas apresentariam um estágio após serem colocadas em meios de diferenciação celular em que ocorreria redução progressiva da imunofluorescência com SOX2 concomitante ao aumento de SOX9, NESTINA e S100β, que seria uma fase "intermediária" entre a célula tronco/progenitora e a célula diferenciada produtora de hormônios (Fauquier *et al*., 2008; Kim *et al*., 2011). Em nossos estudos, evidenciamos um aumento de expressão de *Sox9* nos períodos de 4S e 8S nos mutantes das linhagens *Prop1*$^{-/-}$ e *Pou1f1*$^{-/-}$, o que nos faz especular que, além de haver um aumento do número de células-tronco/progenitoras, também há uma elevação de células "comprometidas" a entrar na via final de diferenciação celular, mas isso não ocorre pela falta dos fatores de transcrição envolvidos. Por outro lado, na linhagem αGSU (*Cga*), os níveis transcricionais do *S100β* no dia do nascimento foi estatisticamente maior quando comparado à vida adulta, o que corrobora com o fato de que a diferenciação celular terminal na linhagem *Pou1f1/Pit*-dependente ocorra predominantemente no período pós-natal (Simmons *et al*., 1990).

5.4 Análise conjunta do RT-qPCR e IHQ: maior transcrição na vida adulta dos marcadores de células-tronco/progenitoras nos mutantes das linhagens Ames (*Prop1)* e Snell (*Pou1f1*) utilizando-se os selvagens como calibradores, mas baixo índice de imunolocalização de SOX2 na IHQ

Nos animais da linhagem αGSU, a imunomarcação da proteína pela imuno-histoquímica demonstrou um padrão de expressão/imunolocalização muito semelhante nos animais mutantes quando comparados aos animais selvagens. Provavelmente isto ocorra pelo fato de a subunidade alfa

(regulada pelo gene *Cga*) participar somente da fase final de formação do hormônio glicoproteico (Simmons *et al*., 1990).

Em ambos os animais selvagens Snell (*Pou1f1*$^{+/+}$) e Ames (*Prop1*$^{+/+}$), há o mesmo padrão de expressão de *S*OX2 com queda significativa no *pool* das células no período adulto (dados observacionais), reforçando o fato de que a presença de células-tronco na hipófise de animais adultos equivaleria a um pequeno percentual das células da glândula (Chen *et al*., 2005; 2009; Fauquier *et al*., 2008).

Nos animais mutantes das linhagens Ames (*Prop1*$^{-/-}$) e Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$), no entanto, observou-se uma maior expressão de *Sox2* pelo RT-qPCR nos períodos de puberdade e vida adulta quando se utilizou os selvagens nos respectivos tempos como calibradores. Provavelmente tal achado se deva a uma maior indiferenciação celular, uma vez que os fatores de transcrição *Prop1* e *Pou1f1*, precoces na cascata de diferenciação glandular, estariam comprometidas nas linhagens Ames e Snell, respectivamente (Ward *et al*., 2006). Embora a imuno-histoquímica não tenha mostrado maior expressão nos animais mutados na vida adulta, acreditamos que tal fato se deva à perda de sensibilidade do método para valores menos expressivos. Além disto, foi feita a imunolocalização somente com um marcador (SOX2), ao contrário do RT-qPCR, em que usamos vários marcadores de células-tronco/progenitoras.

Em contrapartida, quando procedemos a *análise* evolutiva do *Sox2*, na linhagem Ames, mas utilizando-se o P0 do selvagem como calibrador, observamos que, embora a curva de expressão do mutante seja maior que a do selvagem, ocorre uma queda nos valores de expressão relativa evolutivamente, assim como evidenciado na imuno-histoquímica.

Embora se tenha observado maior número de núcleos celulares imunorreativos ao SOX2 ao nascimento nos camundongos Ames mutantes (*Prop1*$^{-/-}$), os níveis transcricionais pelo RT-qPCR estiveram dentro do padrão de erro do método utilizando-se o P0 do selvagem como calibrador. Acreditamos que este achado tenha ocorrido mais pela presença de proteína residual do que pelo processo de transcrição contínua, como o

observado em células progenitoras SOX2 positivas, que, mesmo depois em cultura e *in vitro*, ainda permaneceram imunopositivas (Fauquier *et al*., 2008).

Além disto, vale a pena ressaltar que, na técnica de RT-qPCR, a análise dos resultados utilizando-se o método de Livak $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001) consiste na análise relativa (sempre em relação a determinado calibrador), não em valores “absolutos”, como na IHQ.

Assim, o fato de não detectarmos um aumento da imunolocalização do SOX2 na vida adulta pode ser devido à baixa sensibilidade do método quando estamos lidando com números reduzidos. Neste caso, a sensibilidade do PCR em tempo real seria maior (transcrição). Por outro lado, pode estar havendo transcrição, mas sem a tradução proteica.

5.5 Divergências encontradas nos marcadores de células-tronco/progenitoras das linhagens em estudo já descritos na hipófise

Embora os marcadores de células-tronco/progenitoras já tenham sido extensamente estudados em outros órgãos (Beltrami *et al*., 2003; Rando, 2006; Tsuchiya *et al*., 2007), os estudos específicos envolvendo a hipófise são muito recentes. Na Tabela 14, faz-se uma análise comparativa entre os principais estudos, além dos marcadores e da metodologia empregada, para maior entendimento do tema.

Um dos marcadores de nossa análise foi a nestina, uma proteína de filamento intermediário classe VI, expressa primariamente em células nervosas, mas também apresentam expressão em células endoteliais vasculares (Klein *et al*., 2003). Em nosso estudo, encontramos seus níveis reduzidos na linhagem transgênica αGSU no período da vida adulta, mas seus valores não se alteraram nas demais linhagens. Na verdade, alguns autores questionam se ela seria mesmo um marcador de células-tronco/progenitoras, pois os estudos foram discrepantes quanto à sua expressão (Tabela 14) (Galichet *et al*., 2010; Gleiberman *et al*., 2008). Sua forma “estrelada” se parece, morfologicamente, a uma célula

foliculoestelada, porém com o marcador S100 negativo (Krylyshkina *et al*., 2005).

Embora Krylyshkina *et al*. (2005) tenha evidenciado imunomarcação para nestina na zona da camada marginal, e não tenham visto colocalização com hormônios ou S100 (marcador da célula foliculoestelada), os autores não evidenciaram a capacidade de diferenciação celular (Krylyshkina *et al*., 2005). Apesar de Gleiberman e cols. (2008) terem analisado o desenvolvimento hipofisário pós-natal de camundongos transgênicos Rosa 26 que expressariam GFP (*Protein Fluorescein Green – proteína fluorescente verde*) pelo mecanismo regulatório da expressão de nestina e terem evidenciado a expressão da mesma na vida adulta (Gleiberman *et al*., 2008), tal dado não se repetiu em outro estudo com o uso do modelo experimental semelhante (Galichet *et al*., 2010).

No estudo do Fauquier *et al*. (2008), inicialmente, houve imunomarcação somente de SOX2, SCA1 e E-caderina, mas, após sete dias em cultura, houve queda do SCA1, surgimento do S100β, Nestina e SOX9 (Fauquier *et al*., 2008; Kim *et al*., 2011). Tal dado nos faz questionar se a nestina não seria na verdade um marcador, assim como Sox9 e S100β, de quando a célula iniciaria o processo de diferenciação celular (do Inglês, "*commitment*"). Outro ponto ainda de questionamento é se ela estaria relacionada à formação vascular, uma vez que se observou sua localização semelhante aos pericitos (Moore *et al*., 2006).

Enquanto o *Nanog* é um fator de transcrição relacionado à proliferação e autorrenovação de células-tronco (Rodda *et al*., 2005), o *Cd44* participa de uma série de funções celulares, sendo uma glicoproteína de adesão celular (Williams *et al*., 2013). Ambos marcadores apresentaram-se elevados nos mutantes Ames (*Prop1*$^{-/-}$) e Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$), estando o *Nanog* reduzido na linhagem αGSU, fato que também ocorreu com o marcador *Oct4* (*Pou5f1*), que seria necessário para a pluripotencialidade da célula tronco (Rodda *et al*., 2005). A escolha de tais marcadores para compor o nosso estudo em questão foi baseada, principalmente, nos dados de Chen *et al*. (2009), que evidenciaram que, comparando-se a subpopulação ("*non Sca1 High*") à

população em maior quantidade pelo FACS ("*main population*"), evidenciaram outros marcadores diferentes dos que tinham sido encontrados (Chen *et al*., 2005), como *Oct4* e *Nestina* (Chen *et al*., 2009). Embora o regulador pluripotencial *Nanog* (Cavaleri, Scholer, 2003; Chambers *et al*., 2003; Rodda *et al*., 2005) não tenha sido evidenciado no *microarray*, ele foi detectado no RT-qPCR com expressão maior na subpopulação com níveis não tão elevados de *Sca1* ("*non Sca1 High*") (Chen *et al*., 2009).

Estudos demonstraram que células expressando SOX2 são capazes de gerar todos os subtipos hipofisários (Chen *et al*., 2009; Fauquier *et al*., 2008). Fauquier *et al*. (2008) evidenciaram que uma pequena subpopulação de células-tronco/progenitoras, presentes na glândula hipofisária adulta e que expressava SOX2, possuía a habilidade de formar esferas em cultura e se diferenciar em todos os subtipos celulares produtores de hormônios (Fauquier *et al*., 2008). As células SOX2 positivas, por sua vez, são mais abundantes na hipófise no final da primeira onda de crescimento hipofisário (P7) quando comparada à glândula adulta (Chen *et al*., 2009; Gremeaux *et al*., 2012). Em nossos estudos, observou-se uma elevação da expressão de *Sox2* nos mutantes das linhagens Ames (*Prop1*$^{-/-}$) e Snell (*Pou1f1*$^{-/-}$) utilizando-se os respectivos selvagens como calibradores. Na linhagem αGSU, não houve alteração nos níveis transcricionais.

Um dos grupos com maior número de estudos em células-tronco e hipófise é da Bélgica, liderado pelo Hugo Vankelecom. Ele foi "pioneiro" na detecção conforme exposto previamente, utilizando a técnica de citometria de fluxo (Chen *et al*., 2005). Em 2010, Vankelecom publica um artigo intitulado: "*Stem cells in the pituitary gland: a burgening field*" (Vankelecom; Gremeaux, 2010). Porém, ele próprio, três anos depois, critica o "*boom"* (grande número) de estudos envolvendo tal tema no artigo cujo título foi "*Pituitary stem cells drop their mask*", questionando vários pontos antes então descritos, inclusive termos definidos pelo próprio grupo como "nichos", "zona da camada marginal", entre outros (Vankelecom, 2012).

Adicionalmente, outro estudo que comparou o perfil de células-tronco embrionárias e adultas não sítio específicas demonstrou permanência de expressão de *Oct4*, mas não de *Nanog* e *Sox2*, o que nos faz inferir que há diferenças de expressão entre os diversos marcadores, não se podendo estabelecer aquele que seria unanimamente mais adequado (Ulloa-Montoya *et al*., 2007). A mesma afirmação foi feita na análise crítica do Vankelecom (Vankelecom, 2012) com relação ao marcador escolhido no primeiro estudo do grupo, *Sca1* (Chen *et al*., 2005). Assim, ainda não se definiu exatamente quais seriam os melhores marcadores de células-tronco/progenitoras hipofisárias, sabendo-se apenas que haveria diferença entre os diversos tecidos (Asakura *et al*., 2002; Kubota *et al*., 2003; Tsuchiya *et al*., 2007)

Embora haja discrepância entre os marcadores de células-tronco, a maioria dos estudos não leva em consideração a diferença entre linhagens e *backgrounds* distintos. Com base nisto, optamos por fazer a análise dos mais comumente referidos e encontramos diferenças nas expressões, tempo e linhagem dependentes.

Além da importância dos marcadores de células-tronco como ferramenta para análise da possível presença dessas, sabe-se que também existem correlações entre eles, como, por exemplo, *Sox2*, *Nanog* e *Oct4* formariam um circuito regulatório que manteria a célula no estado indiferenciado (Rodda *et al*., 2005); *Sox2* teria um papel estimulatório sobre *Nestina* e *Nr2e1* (*Tlx)* (Shimozaki *et al*., 2012).

Assim, não só estudos envolvendo os marcadores isolados, mas a interação na possível via entre eles tornam-se necessários.

Tabela 5 – – Principais estudos envolvendo células-tronco/progenitoras e hipófise.

Estudo/Autor	Modelo animal	Detalhes estudo	Marcadores analisados	Técnica utilizada	Principais conclusões
Lepore, 2005 (Lepore et al., 2005)	Camundongo adulto (HS Dola fêmeas) Cultura de cels (2005)	Células formadoras de colônias adulto/ provenientes cels foliculoesteladas	Sca1, AMCA	Cultura de células/ FACS Imunofluorescencia Análise AMCA RT-PCR	11 ciclos celulares/ potencial diferenciação GH+
Krylyshkina, 2005 (Krylyshkina et al., 2005)	Camundongo	Imunolocalização	Nestina	IHQ	Imunolocalização de cels nestina + na zona camada marginal
Lepore, 2007 (Lepore et al., 2007)	Camundongo transgênico adulto GFP/promotor GH+	Transplante cels por microcanais	--------	IHQ	Capacidade de se dividir e diferenciar cels GH+ *in vivo*
Chen, 2009 (Chen et al., 2009)	Camundongos FVB fêmeas adultas	"*Side Population*" incubadas Hoechst e marcadas *Sca1*	Sca1, Sox2, Sox9, CD44, Lgr5 (*não Sca high* x *Sca high*) Oct4, Bmi1 e nestina (não *Sca high* X MP) Nanog (somente RT-qPCR)	Imunofluorescência tecido e esferas microarray esferas/ (semi) RT-qPCR array	Aumento de marcadores de cels tronco/ progenitoras; Cels Sox2+ mais abundantes P7 do que fase adulta; Esferas hipofisarias potencial de diferenciação Imunolocalização Maior índice proliferação (ki67) cels não *Sca high*
Fauquier, 2008 (Fauquier et al., 2008)	Camundongo adulto e período embrionário	Esferas hipofisarias (camundongo adulto) Imunomarcação (periodo embrionário e adulto)	Sox2, Sox9, S100, Sca1, E-caderina, hormônios BrDU e imunolocalização	- Isolamento esferas hipofisarias de camundongos adultos - Immunofluorescencia (in situ e nas esferas)	Capacidade de diferenciação celular das cels Sox2+ Imunolocalização zona marginal e nichos difusos Progenitor multipotente (SOX2+/SOX9-) Celulas transitórias (SOX2+/SOX9+)
Gleiberman, 2008 (Gleiberman et al., 2008)	Camundongo transgênico expressa GFP pelo mecanismo regulatório da expressão nestina/ Rosa 26 Cruzamentos secundários com animais receptor de estrógeno induzido por tamoxifeno e camundongo gene retinoblastoma	Análise no desenvolvimento hipofisario e pos natal (P0, P7 e p21 dias, 5 meses, 10 meses) Esferas provenientes cels expressando nestina-GFP	*Nestina, Sox2, Oct4, Hesx1, Sca1* *Ki67*	- IHQ - cultura esferas - RT-qPCR	- Evidência de células expressando nestina de origem na vida adulta - Haveria duas subpopulações de cels tronco, ate o período embrionário (nestina-) e pos período embrionário (nestina +)

Cont. Tabela 5

Estudo/Autor	Modelo animal	Detalhes estudo	Marcadores analisados	Técnica utilizada	Principais conclusões
Garcia-Lavandeira, 2009 (Garcia-Lavandeira et al., 2009)	Ratos Sprague-Dowley Análise comparativa telomeros hipofise humana Camundongo Cdk-4 (deficiente em quinase dependente ciclina) Modelo c/ hipopituitarismo	Análise expressão período pos natal (10, 20, 30, 60 dias) Esferas hipofisarias provenientes cels GPS Análise tamanho dos telômeros	GFRa2 (receptor alfa 2 do fator neurotrofico derivado da cel da glia) Oct4, Sox2, Sox9, SSEA4 Prop1 Sem alteração: Sox4, Nestina, Nanog, Isl1 e Pax6 Outros avaliados: S100, vimentina e Ki67/ hormônios	Imunohistoquimica Imunofluorescencia Isolamento cels GFRa2+ e formação esferas Western Blot Prop1 PCR semi-quantitativo Análise telômeros	Expressão GfRa2 zona camada marginal Células "GPS": GFRa2+, Prop+, Sox2+ Animais CdK4 (n/n): aumento 3x subpopulação GPS Células com maiores telomeros estariam localizadas Z. camada marginal e espalhadas pela glândula
Yoshida, 2009 (Yoshida et al., 2009)	Ratos Wistar-Imamichi	Análise período embrionário e pos natal (E11-P5; P60)	Prop1 e Sox2	Imunohistoquimica Hibridização *in situ* para Prop1	- Durante o período embrionario Prop1 co-localiza com Sox2 - Imunomarcação na camada marginal e nichos difusos pela glândula
Galichet, 2010 (Galichet et al., 2010)	Camundongo transgênico expressa GFP pelo mecanismo regulatório da expressão nestina/ Rosa 26- Cre Lox	Análise período embrionário	Nestina	Imunofluorescência Radioimunoensaio (dosagem hormonal)	- Animais apresentaram hipopituitarismo "intermediário" - Resultados conflitantes com grupo do Gleiberman (mas modelos animais não foram idênticos/ promotor/iniciador)
Yoshida, 2011 (Yoshida et al., 2011)	Ratos Wistar-Imamichi machos Rato transgênico S100β-GFP	Análise período embrionário, pós natal precoce e tardio (P60 e P600)	*Prop1*, Sox2, S100 Pit1	Imunohistoquimica RT-qPCR (Prop1 e S100β)	Imunomarcação camada marginal e nichos difusos pela glândula Redução progressiva percentual cels Sox2+ na vida adulta Alteração expressão qualitativa e quantitativa nos períodos analisados
Fu, 2012 (Fu et al., 2012)	Camundongo transgênico GH/Cre/iDTR que expressa receptor DT	Análise após ablação precoce e tardia	Sox2/ Sca1 BrdU/ Caspase 3 e Tunel	- Imunofluorescência - Esferas hipofisarias	- Aumento de somatotrofos a partir de cels Sox2+

5.6 *Nr2e1* (*Tlx*): um novo marcador de célula tronco/progenitora na hipófise

O *Nr2e1*, ou *"Nuclear Receptor Tailess*" (*TLX*), é um receptor nuclear importante por ser um regulador da manutenção e autorrenovação das células-tronco neuronais tanto no cérebro embrionário como adulto (Li, W. *et al*., 2008). Apesar de sua possível presença na hipófise ter sido aventada pelos estudos experimentais envolvendo correlação gênica (Mortensen *et al*., 2011), sua expressão direta na glândula não havia sido descrita.

Observa-se sua expressão em cérebros de animais no dia embrionário E8, pico E13.5, redução por volta E16, com níveis muito reduzidos ao nascimento. A expressão aumenta novamente após o nascimento com níveis elevados no cérebro adulto (Monaghan *et al*., 1997). Este perfil bifásico de expressão pode estar relacionado a um papel tanto no desenvolvimento cerebral como na função cerebral adulta (Shi *et al*., 2004).

Existem dois modelos experimentais descritos que apresentam alteração neste gene:

- Camundongos knockout *Nr2e1* (*TLX)*: apresentam defeitos límbicos graves, agressividade, redução da copula, comportamento agressivo e retinopatias (Monaghan *et al*., 1997);

- Camundongos Fierce: mutante espontâneo homozigoto para deleção TLX, apresenta agressão patológica semelhante ao nocaute (Young *et al*., 2002).

As células NR2E1 (TLX) positivas isoladas do cérebro adulto conseguem proliferar-se, autorrenovar e se diferenciar nos três tipos neuronais adultos *in vitro*. Em contraste, células *null-Tlx* isoladas de cérebros de camundongos adultos falham em proliferar-se. Ao se reintroduzir o *Tlx*, resgata-se a capacidade de proliferação e de autorrenovação (Shi *et al*., 2004).

Estudos recentes sugerem que *Nr2e1* seria um importante regulador da proliferação das células-tronco neuronais por meio do controle da proliferação e diferenciação (Shi *et al*., 2004). Com a análise de proliferação (pela imunomarcação tanto de BrdU como de Ki67), os autores constataram

que células expressando *Nr2e1* (*Tlx*) são aquelas que estão ativamente se dividindo de progenitores neurais no ciclo celular. Por outro lado, a análise da apoptose (método Tunel) pela contagem do número total de células imunomarcadas revelou que a morte celular no cérebro dos animais transgênicos não foi maior, sugerindo que a redução do número de células-tronco/progenitoras não foi pelo aumento da morte celular programada por apoptose (Li, W. *et al*., 2008). Pela correlação do BrdU (injetado em período curto 2h) e Ki67, eles fizeram uma "predição" da extensão do ciclo celular e constataram que as células progenitoras *Tlx*$^{-/-}$ se dividiriam de forma mais lenta do que as progenitoras do animal selvagem. Assim, a função do *Nr2e1* (*Tlx*) nos precursores neuronais seria a de influenciar a decisão de "reentrada" no ciclo celular em vez de saída do ciclo, tornando-se uma célula diferenciada (Li, W. *et al*., 2008).

Curiosamente, além de o *Nr2e1* ter uma alça de *feedback* negativa própria, essa seria antagonizada pelo *Sox2*, que aumentaria a atividade do promotor do *Nr2e1* em até cinco vezes, conforme estudos demonstrados *in vitro* (Shimozaki *et al*., 2012). Desta forma, haveria uma correlação direta entre a manutenção da célula tronco/indiferenciada por ação do *Nr2e1* (*TLX*), estímulo pelo Sox2 e ação pelo controle do ciclo celular (via p21 e ciclina D) (Shimozaki *et al*., 2012).

O aumento da expressão relativa dos mutantes da linhagem Ames (*Prop1*$^{-/-}$) do *Nr2e1* (*Tlx*) em todos os tempos e de forma intensa, concomitante ao aumento do *Sox2*, e redução do fator de proliferação *Ki67*, em relação aos selvagens, nos fez conjecturar se tal via de manutenção de células-tronco/indiferenciadas também não estaria presente na hipófise (Drouin *et al*., 2010; Monahan *et al*., 2012). Estudos envolvendo a análise do ciclo celular nos tempos observados podem comprovar ou não tal hipótese.

5.7 Considerações finais

Embora a linha de pesquisa de células-tronco/progenitoras na hipófise seja recente, muitos avanços têm sido alcançados nos últimos anos.

Dentre os diferenciais do presente estudo, destacam-se os seguintes aspectos:

1) análise de marcadores de células-tronco/progenitoras em modelos de camundongos com hipopituitarismo congênito;

2) abordagem de três linhagens diferentes de camundongos com hipopituitarismo por alterações em pontos distintos de fatores de transcrição/conjugação hormonal;

3) avaliação em vários períodos da vida pós-natal;

4) utilização de duas técnicas distintas para análise de marcadores de células-tronco/progenitoras;

5) análise de vários genes descritos na literatura como possíveis marcadores de células-tronco/progenitoras;

6) descrição de um novo marcador de célula-tronco/progenitora na hipófise (*Nr2e1*).

Os achados na presente pesquisa vêm adicionar à literatura novos dados envolvendo marcadores de células-tronco/progenitoras – hipófise – hipopituitarismo.

A evidência por Suga *et al*. (2011) de que, ao se gerar o “meio” apropriado para sinalizações das vias adequadas, foi possível a criação em cultura de células hipofisárias multipotentes que foram capazes de “resgatar” deficiências hormonais em modelos animais submetidos à ablação glandular, coloca esta terapia como possível opção terapêutica nos casos de hipopituitarismo adquiridos (Kalani, 2012; Suga *et al*., 2011; Zeng e Liu, 2011).

Com relação ao hipopituitarismo genético, no entanto, mais pesquisas são necessárias. Nosso estudo demonstrou o oposto referido por Castinetti *et al.* (2011), em que eles aventaram que o quadro de hiperplasia hipofisária poderia estar relacionada a um “excesso” de células progenitoras

hipofisárias enquanto o processo de hipoplasia poderia estar relacionado a uma falta delas (Castinetti *et al.*, 2011).

Estudos adicionais utilizando-se os mesmos modelos aqui apresentados e a pesquisa da dinâmica hipofisária em outras linhagens, como os camundongos nocautes para o gene *Nr2e1* referidos previamente, tornam-se necessários e promissores.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O estudo de caracterização de células-tronco/progenitoras hipofisárias nos camundongos Snell (*Pou1f1*), Ames (*Prop1*) e αGSU (nocaute para o gene *Cga*) durante o período pós-natal do desenvolvimento hipofisário nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

1) As regiões de reserva de células-tronco em animais com hipopituitarismo congênito são semelhantes às dos animais selvagens e estão localizadas na zona da camada marginal e em nichos esparsos distribuídos pelo lobo anterior da hipófise;

2) Neste trabalho demonstramos pela primeira vez que o *Nr2e1* é um novo marcador de células-tronco/progenitoras na hipófise;

3) Os marcadores de células-tronco/progenitoras *Nanog*, *Sox2*, *Cd44* e *Nr2e1* tiveram expressão variável com predomínio de aumento no período puberal nas linhagens Snell (*Pou1f1*) e Ames (*Prop1*) e redução (*Nanog* e *Nr2e1*) de expressão nos animais nocautes para o gene *Cga* (α-GSU). Ao mesmo tempo, observamos uma redução da proliferação celular hipofisária nas linhagens Snell e Ames. Portanto, defeitos moleculares nos fatores de transcrição expressos mais precocemente na diferenciação hipofisária (*Pou1f1* e *Prop1*) impedem a diferenciação celular hipofisária com acúmulo das células-tronco/progenitoras;

4) Estes achados justificam a hipoplasia hipofisária observada em animais com defeitos em fatores de transcrição expressos no início da diferenciação hipofisária, nos quais o acúmulo de células-tronco pode ser um indicador da indiferenciação hipofisária.

7 ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do Comitê Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da USP.

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19.05.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **118/10** intitulado: "IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM HIPÓFISE DE MODELOS ANIMAIS COM HIPOPITUUTARISMO", apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Luciani R. S. Carvalho
Pesquisador (a) Executante: Claudia Veiga Chang

CEP-FMUSP, 19 de maio de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

ANEXO B: Comissão Interna de Biossegurança

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados

A Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente Modificados da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU em sessão de 19.05.10** para o Nível de Biossegurança (NB-1)" o Protocolo de Pesquisa nº **118/10** intitulado: "**IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM HIPÓFISE DE MODELOS ANIMAIS COM HIPOPITUITARISMO**", apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA. CQB concedido:0217/06.

Pesquisador (a) Responsável: Luciani R.S. Carvalho

Pesquisador (a) Executante: Claudia veiga Chang

CIBio em OGM´s, 19 de maio de 2010

PROF. DR. CARLOS ALBERTO MOREIRA FILHO
Coordenador
Comissão de Biossegurança em OGM's

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

ANEXO C: Tabela - Análise comparativa dos percentuais dos núcleos imunopositivos para SOX2 a IHQ na linhagem Snell

Tempo	Selvagem	Mutante	*p*
P0	0,27 ± 0,007 0,27 (0,27 – 0,28) (n=2)	0,017 (n=1)	***
P7	0,17 ± 0,04 0,19 (0,12 – 0,20) (n=3)	0,18 ± 0,03 0,18 (0,16 -0,22) (n=3)	*0,827* (1)
4S	0,07 ± 0,005 0,08 (0,07 – 0,08) (n=3)	0,01 (n=1)	***
8S	0,02 ± 0,01 0,02 (0,01 – 0,05) (n=4)	0,06 ± 0,04 0,08 (0,01 – 0,10) (n=3)	*0,372*(1)
p	*0,016*(2)	*0,250*(3)	

(1) Mann-Whitney
(2) Kruskal-Wallis entre P0, 4S e 8S devido à diferença entre os tamanhos amostrais
(3) Wilcoxon entre os tempos P0 e 8S
*** Sem comparação devido ao tamanho amostral

ANEXO D: Tabela - Análise comparativa dos percentuais dos núcleos imunopositivos para SOX2 a IHQ na linhagem Ames.

Tempo	Selvagem	Mutante	*p*
P0	0,21 ± 0,06 0,21 (0,16 - 0,27) (n=3)	0,51 ± 0,00 0,51 (0,51 - 0,51) (n=2)	***
P7	0,12 ± 0,01 0,12 (0,11 - 0,12) (n=2)	0,27 ± 0,03 0,27 (0,25 - 0,29) (n=2)	***
4S	0,04 ± 0,01 0,04 (0,03 - 0,05) (n=3)	0,12 ± 0,08 0,14 (0,04 - 0,19) (n=3)	*0,127* (1)
8S	0,04 ± 0,01 0,04 (0,03 - 0,05) (n=2)	0,03 ± 0,01 0,03 (0,02 - 0,04) (n=2)	***
p	*0,250* (2)	***	

NOTA: (1) Mann-Whitney; (2) Wilcoxon entre os tempos P0 e 4S;*** Sem comparação devido ao tamanho amostral.

ANEXO E: Genotipagem Linhagem Ames

Digestão Hinfl 37 ^{0}C

1) Preparar PCR

Primer A - Prop1for6 5' GAG CTG GGG AGA CCT AAG CTT TGC C 3'

Primer B - Prop1rev11 5' GCC CAG ATG TCA GGA TAC TG 3'

Reagente	1 Amostra	10 Amostras
ddH2O	16	160
10X PCR Buffer	2,5	25
dNTPs	4	40
Primer A, 10pmol/µL	0.6	6
Primer B, 10pmol/µL	0.6	6
BSA (50mg/mL)	0,1	1
Taq	0,2	2
Vol total	24	240

2) Aliquotar 1 µL DNA nos tubos de PCR;
3) Adicionar 24 µL do coquetel de PCR por tubo. Volume final da reação 25µL;
4) Colocar na termocicladora;
5) Amplificação: 92 ^{o}C 3'

   30 ciclos de 90 ^{o}C 30'', 55 ^{o}C 30'', 72 ^{o}C 30''

   72 ^{o}C 10'

   4 ^{o} C até remover
6) Digestão enzima Hinf1 a 37 ^{o}C por 2 horas

Diluir meio H (10x) em ddH2O

Adicionar 2µL de enzima de restrição em cada tubo de Eppendorf.

Reagente	1 Amostra	10 Amostras
ddH2O	1,6	16
10X buffer H	0,2	2
Hinf 1	0,2	2
Vol final	2	20

7) Correr em gel 2%.

Fragmentos esperados:

+/+ 97,40

df/+ 135,97,40

df/df 135

ANEXO F: Genotipagem Linhagem Snell

Reagente	1 amostra	10 amostras
ddH2O	14,7	147
10X PCR Buffer	2,5	25
dNTPs	4	40
Primer A, 10pmol/µL	1,25	12,5
Primer B, 10pmol/µL	1,25	12,5
BSA (50mg/mL)	0,125	1,25
Taq	0,2	2
Vol total	24	240

Todos os primers devem estar a 10pmol/µL
1ª PCR
Primer A - 5'GCT GCT AAG GAT GCT CTG G 3'
Primer B - 5' CCT TGG AAA TAG AGA ACA GGC 3'
Nested PCR
Primer C - 5' ACA CTT CGG GGA CCC CAG CA 3'
Primer D - 5' CTC TGC CTT CGG TTG CAG GA 3'

1) Aliquotar 1 µL DNA nos tubos;
2) Adicionar 24 µL PCR em cada tubo. Vol final da reação PCR 25 µL;
3) Colocar na termo-cicladora;
4) PCR 1: Amplificar de acordo com protocolo:
92 ^{o}C 3'
30 ciclos de 92 ^{o}C 30'', 55 ^{o}C 30'', 72 ^{o}C 30''
72 ^{o}C 10'
4 ^{o}C até remover
5) Diluir produto da PCR para 250 µL adicionando 225µL ddH2O
6) Preparar coquetel acima substituindo Primers C e D
7) Repetir condições acima no passo 5, exceto aumentar temperatura de anelamento de 55 ^{o}C para 60 ^{o}C e usar 25 ciclos;
8) Digestão com Ava II a 37 ^{o}C por 2 horas.
Adicionar 2 µL de enzima restrição a cada tubo.

Reagente	1 Amostra	10 Amostras
ddH2O	1,65	16,5
10X buffer H	0,2	2
HInf 1	0,15	1,5
Vol final	2	20

9) Incubar overnight
10) Correr em gel Agarose 2-3%.

Fragmentos Esperados
+/+ 80 bp
dw/+ 80,101
dw/dw 101

ANEXO G: Genotipagem Linhagem αGSU

1) Preparar PCR

Reagente	1 Amostra	10 Amostras
ddH2O	14,2	142
10X PCR Buffer	2,5	25
dNTPs	4	40
Primer A, 10pmol/µL	0,75	7,5
Primer B, 10pmol/µL	0,75	7,5
Primer C, 10pmol/µL	0,75	7,5
Primer D, 10pmol/µL	0,75	7,5
BSA (50mg/mL)	0,1	1
Taq	0,2	2
Vol total	24	240

Primer A - mouse alfa intron 2, sense

Primer B - reverse neo +790, antisense

Primer C - oligo for hibridação com alfa c DNA (intron 3 sense)

Primer D - intron 3 anti sense

2) Aliquotar 1 µL DNA nos tubos;
3) Adicionar 24 µL PCR em cada tubo. Volume final da reação PCR 25 µL;
4) Colocar na termo-cicladora;
5) PCR 1: Amplificar de acordo com protocolo

   94 ^{o}C 3'

   30 ciclos de 92 ^{o}C 30'', 65 ^{o}C 2', 72 ^{o}C 2'

   72 ^{o}C 10'

   4 ^{o}C até remover
6) Por ser deleção, não é necessária enzima de restrição;
7) Visualizar bandas em gel agarose 1,5%

Fragmentos esperados:

+/+ 770, 220

+/αGSU 770,610, 220

αGSU/αGSU 610

ANEXO H: Imuno-histoquímica convencional

Anticorpo:

Ac SOX2 Rb pAb Abcam, cod. ab97959, lote gr1356-1, 100 ug (1mg/ml), Título: 1/1600

Procedimento Imuno-histoquímico:

1. Desparafinização dos cortes de 3µ de espessura, do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60 ^{o}C por 15 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos.

2. Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada.

3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck, E.U.A.) em panela a vapor; após a fervura da água da panela, colocar a cuba com as lâminas em solução de recuperação, por 40 minutos. Deixar esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada.

4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.

5. Bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed) por 10 minutos a 37 ^{o}C. Escorrer e incubar com o Ac primário.

6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37° C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4 ^{o}C.

Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.

7. Incubação com o polímero Super Picture ^{TM} HRP Polymer Conjugate Rabbit Primary (DAB) por 30 minutos a 37 ^{o}C.

Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.

8. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 ^{o}C.

Lavagens em água corrente e água destilada.

10. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreendem, um controle positivo sabidamente positivo para o Ac em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

ANEXO I: Extração de RNA utilizando-se o *Rnase mini Kit*

Passo 0

- Eppendorf 1: preparar 1 ml de etanol 70%- 700 µl etanol puro + 300 µl de água miliQ

- Eppendorf 2: adicionar 10 µl DNase I + 70 µl do buffer RDD. Inverter o tubo e centrifugar para recolher o líquido

Passo 1

- Adicionar buffer RLT- vol= 600 µl no eppendorf contendo as hipófises

Passo 2

- Homogeneizar os tecidos utilizando pistilo

Passo 3

- Adicionar 1 volume (600 µl) de etanol 70% no eppendorf e "*up and down*"

Passo 5

- Transferir 700µl da amostra para *RNeasy spin coluna* com eppendorf de 2 ml- centrifugar por 15 seg >10.000rpm

- Descartar lisado

Passo 6- etapa do *RNase free DNase set*

- Adicionar 350 µl buffer RW1 para *RNeasy spin coluna* - centrifugar por 15 seg >10.000rpm

- Descartar lisado

- Adicionar 80 µl do mix DNase/RDD (já feito o mix antes do processo) para RNeasy spin coluna- e deixar em temperatura ambiente (20-30 °C) por 15 minutos

- Adicionar 350 µl buffer RW1 para *RNeasy spin coluna* - centrifugar por 15 seg >10.000rpm

- Descartar lisado

Passo 7

- Adicionar 500µl do buffer RPE à *RNeasy spin coluna* e centrifugar por 15 seg em 10000 rpm

- Descartar lisado

Passo 8

- Adicionar 500µl do buffer RPE a *RNeasy spin coluna* e centrifugar por 2 min em 10000 rpm

- Descartar lisado

Passo 9

- Trocar tubo eppendorf de 2 ml (desprezar o tubo antigo) e centrifugar por 1 min na velocidade máxima

Passo 10

- Trocar tubo para 1,5 ml e adicionar 50 µl RNase water a *RNeasy spin coluna* e centrifugar por 1 min a 10000rpm para eluir o RNA

- Repetir o passo 10 com eluente desta centrifugação

- Desprezar a *RNeasy spin coluna* e guardar o eluente

ANEXO J: Protocolo síntese de cDNA

- Quantidade de RNA total: usar 3 µg do RNA total para volume de 50 µl de reação total

Passo 1

- Diluir o RNA original em água com objetivo de manter [ ] de 1 µg/µl
- Utilizamos 3µg (3 µl) de RNA em 22 µl água miliQ (vol=25 µl)

Passo 2

- Kit com inibidor de RNase

- Componentes:	2 amostras	1 amostra
10x RT buffer	10 mcl	5 mcl
10x RT random primers	10 mcl	5 mcl
25x dNTP mix (100nm)	4 mcl	2 mcl
Multiscribe reverse transcriptase	5 mcl	2,5 mcl
H2O nuclease-free	21 mcl	10,5 mcl
Volume total	50 mcl	25 mcl

Passo 3

Para preparar a reação do cDNA RT

-Pipetar 25 mcl de 2x RT master mix em cada tubo individual

-Pipetar 25 mcl da amostra de RNA diluído em água em cada eppendorf e "*up and down*"

-Volume total= 50 mcl/tubo eppendorf 0,2 ml

-Selar e *"spin down*" os tubos

Passo 4

Realizando a transcriptase reversa

- Programar as condições do termociclador:

-step 1- T=25 ^{o}C; T=10 min;

-step 2- T=37 ^{o}C; T=120 min;

-step 3- T=85 ^{o}C; T=5 min

-step 4- T=4 ^{o}C; T=∞

-Estocar a - 20°C

ANEXO K: Protocolo PCR EM TEMPO REAL

Passo 1

- "*Spin down"* todos reagentes po 10-15 seg
- Fazer mix dos componentes em tubos de 1,5 ml

Placa 96 poços

2x SABbioscience RT^2 qPCR master mix---------- 675 mcl

Diluted first strand cDNA synthesis reaction---------- 50 mcl

H_2O---------- 625 mcl

Volume total---------- 1350 mcl

Passo 2

- Pipetar 25 microlitros por poço na placa de PCR Array.

ANEXO L: Tabela 9 – Componentes da placa de array RT-qPCR.

SIMBOLO	GENEBANK	DESCRIÇÂO
Sox2	NM_011443	*Mus musculus SRY-box containing gene 2 (Sox2), mRNA*
Nr2e1	NM_152229	*Mus musculus nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1*
CD44	NM_009851	*Mus musculus CD44 antigen (Cd44), transcript variant 1, mRNA*
Oct4	NM_013633	*Mus musculus Octamer binding proten 4, mRNA*
Nestin	NM_016701	*Mus musculus nestin (Nes), mRNA*
Hesx1	NM_010420	*Mus musculus homeobox gene expressed in ES cells (Hesx1), mRNA*
Otx2	NM_144841	*Mus musculus orthodenticle homolog 2 (Drosophila) (Otx2), mRNA*
S100b	NM_009115	*Mus musculus S100 protein, beta polypeptide, neural (S100b), mRNA*
Nanog	NM_028016	*Mus musculus Nanog homeobox (Nanog), mRNA*
Ki67	NM_001081117	*Mus musculus antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 (Mki67),mRNA*
Hes1	NM_008235	*Mus musculus hairy and enhancer of split 1 (Drosophila) (Hes1), mRNA*
Sox9	NM_011448	*Mus musculus SRY-box containing gene 9 (Sox9), mRNA*
Sox3	NM_009237	*Mus musculus SRY-box containing gene 3 (Sox3), mRNA*
Casp 3	NM_009810	*Mus musculus caspase 3 (Casp3), mRNA*
Casp 7	NM_007611	*Mus musculus caspase 7 (Casp7), mRNA*
HPRT	NM_013556	*Mus musculus hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt), mRNA*
GAPDH	NM_008084	*Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA*
Actb	NM_007393	*Mus musculus actin, beta (Actb), mRNA*
PPC	SA_00103	*Positive PCR Control*
MGDC	SA_00106	*Mouse Genomic DNA Contamination*

ANEXO M: Tabela - Variabilidade dos genes endogenos na linhagem Ames (*Prop1*).

Endógeno	**Comparações** [(1)]			
	P0xP0	**P0xP7**	**P0x4S**	**P0x8S**
Prop1$^{+/+}$	*NA*	*0,109*	*0,109*	*0,109*
Prop1$^{-/-}$	*0,177*	*0,050*	*0,050*	*0,050*

NOTA: Valores referentes às comparações entre tempos (P0 selvagem) quanto à expressão relativa do gene HPRT, com relação aos outros tempos do selvagem e a todos os tempos do mutante. *Prop1*$^{+/+}$ e *Prop1*$^{-/-}$ P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata.
(1) Wilcoxon
(2) Mann Whitney
NA: não se aplica

ANEXO N: Tabela - Análise comparativa dos percentuais dos núcleos imunopositivos para SOX2 a IHQ na linhagem αGSU.

	Espécie		
Fase	**Selvagem**	**Mutante**	***p*** [(1)]
P0	0,22 ± 0,06 0,20 (0,17 – 0,29) (n=3)	0,21 ± 0,05 0,19 (0,17 – 0,26) (n=3)	*0,658*
P7	0,21 ± 0,05 0,19 (0,18 – 0,27) (n=3)	0,22 ± 0,03 0,22 (0,19 – 0,25) (n=3)	*0,658*
4S	0,02 ± 0,02 0,01 (0,01 – 0,05) (n=3)	0,04 ± 0,03 0,04 (0,01 – 0,06) (n=3)	*0,487*
8S	0,05 ± 0,02 0,05 (0,04 – 0,07) (n=3)	0,04 ± 0,04 0,05 (0,00 – 0,07) (n=3)	*0,822*
p [(2)]	*0,033*	*0,033*	

(1) Mann-Whitney
(2) Friedman
Resumo descritivo em média ± dp; mediana (mínimo – máximo)

ANEXO O: Tabela - Análise estatística da expressão relativa dos genes na linhagem αGSU por RT-qPCR.

	Tempo					
Gene	**P0**	**P7**	**4S**	**8S**	***p***	**Comparação**
Nanog	2,42 (1,38 - 2,61)	1,12 (0,80 - 1,96)	0,23 (0,11 - 0,23)	1,18 (0,94 - 1,18)	*0,017*	P0 > 4S
Nestina	1,10 (0,72 - 1,16)	0,96 (0,59 - 1,18)	0,54 (0,36 - 0,54)	0,27 (0,23 - 0,38)	*0,017*	ns
Oct4	1,48 (0,82-3,00)	1,06 (0,68 – 7,00)	0,03 (0,03 – 0,12)		*0,194*	ns
NR2e1	2,34 (0,96 – 2,36)	2,34 (1,38 – 7,56)	0,06 (0,03 – 0,19)	1,36/1,77	*0,194*	ns
Hesx1	0,72 (0,65 - 0,77)	0,90 (0,90 - 0,92)	0,36 (0,31 - 0,52)	0,60 (0,42 - 0,70)	*0,017*	P7 > 4S
S100β	2,70 (2,37 – 2,81)	2,34 (2,18 – 2,53)	1,67 (1,62 – 1,77)	0,41 (037 – 0,46)	*0,0017*	P0 > 8S

NOTA: Teste Friedman, *post hoc* Dunn para comparações múltiplas. P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata.

Anexo P: Tabela - Análise estatística da expressão relativa dos genes na linhagem Snell por RT-qPCR.

	Tempo					
Gene	**P0**	**P7**	**4S**	**8S**	***p***	
Cd44	1,08 (1,00 - 1,11)	1,64 (1,55 - 1,90)	2,95 (2,77 - 3,21)	2,96 (2,92 - 3,37)	*0,017*	ns
Hes1	1,22 (1,21 - 1,28)	1,63 (1,41 - 1,67)	2,38 (2,35 - 2,73)	2,32 (2,27 - 2,39)	*0,017*	ns
Hesx1	1,28 (1,27 - 1,81)	1,41 (1,14 - 1,84)	5,86 (2,40 - 6,07)	3,08 (2,32 - 3,57)	*0,033*	ns
Ki67	0,72 (0,71 - 0,84)	0,70 (0,68 - 0,77)	0,24 (0,21 - 0,25)	0,34 (0,32 - 0,35)	*0,017*	ns
Nanog	1,15 (0,82 - 1,33)	1,55 (1,07 - 2,02)	4,54 (3,10 - 4,54)	2,17 (1,90 - 2,63)	*0,017*	ns
Nr2e1	0,24 (0,20 - 0,62)	3,31 (2,24 - 3,62)	5,21 (2,74 - 10,71)	1,52 (1,02 - 1,71)	*0,017*	ns
Otx2	0,78 (0,77 - 1,09)	1,31 (1,23 - 1,64)	3,14 (2,41 - 3,90)	2,47 (2,28 - 4,70)	*0,017*	ns
S100	1,27 (1,22 - 1,33)	1,09 (1,01 - 1,33)	4,42 (4,01 - 4,44)	1,22 (1,21 - 1,27)	*0,058*	ns
Sox2	1,09 (0,98 - 1,47)	1,39 (1,36 - 2,10)	2,57 (2,19 - 3,74)	3,52 (3,06 - 5,04)	*0,033*	ns
Sox9	0,97 (0,92 - 1,06)	1,46 (1,34 - 1,68)	2,95 (2,59 - 3,02)	3,52 (3,52 - 3,54)	*0,0017*	0 < 8

NOTA: Teste Friedman, *post hoc* Dunn para comparações múltiplas; P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata.

ANEXO Q: Tabela - Análise estatística da expressão relativa dos genes na linhagem Ames por RT-qPCR.

	Tempo					
Gene	**P0**	**P7**	**4S**	**8S**	***p***	
Cd44	1,20 (1,14 - 1,45)	1,66 (1,50 - 1,92)	3,50 (2,51 - 3,53)	3,06 (2,84 - 3,17)	*0,017*	ns
Hes1	1,62 (1,46 - 1,65)	1,85 (1,68 - 1,96)	2,83 (2,73 - 3,18)	3,15 (2,87 - 3,49)	*0,017*	ns
Hesx1	3,89 (3,31 - 4,80)	13,40 (12,47 - 24,05)	21,68 (12,04 - 24,74)	9,66 (6,94 - 11,6)	*0,017*	ns
Ki67	0,74 (0,73 - 0,80)	0,73 (0,72 - 0,85)	0,28 (0,27 - 0,28)	0,64 (0,59 - 0,75)	*0,147*	ns
Nanog	1,66 (1,64 - 1,78)	7,36 (5,87 - 13,16)	8,87 (7,62 - 11,15)	9,74 (8,09 - 11,9)	*0,074*	ns
Nr2e1	4,7 (2,9 - 7,9)	14,6 (12,5 - 19,2)	29,8 (17,8 - 30,0)	115,6 (18 - 144)	*0,074*	ns
Otx2	1,88 (1,72 - 2,18)	4,79 (4,64 - 7,00)	5,85 (4,99 - 6,45)	6,12 (5,92 - 7,03)	*0,053*	ns
S100	2,89 (2,48 - 3,45)	0,45 (0,42 - 0,50)	6,77 (6,68 - 6,96)	6,04 (5,91 - 6,43)	*0,001*	P7 < 4S
Sox2	1,89 (1,38 - 2,05)	2,53 (2,45 - 3,86)	4,92 (3,38 - 5,06)	4,51 (3,77 - 5,29)	*0,074*	ns
Sox9	0,95 (0,83 - 0,95)	1,64 (1,63 - 1,82)	3,12 (2,05 - 3,18)	2,52 (2,42 - 2,57)	*0,017*	ns
Oct4	0,18 (0,09 – 0,21)	1,02 (0,94 – 1,33)	2,20 (0,68 – 4,17)	3,21 (1,14 – 3,31)	*0,053*	ns

NOTA: Teste Friedman, *post hoc* Dunn para comparações múltiplas. (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata).

Anexo R: Tabela - Análise evolutiva da expressão do gene *Sox2* em animais mutantes e selvagens da linhagem Ames (*Prop1*) usando o P0 do selvagem como calibrador.

	Grupo		
Tempo	**+/+**	**-/-**	***p*(1)**
P7	0,40 (0,38 – 0,68) ab	1,31 (1,17 – 1,74) a	*0,049*
4S	0,98 (0,82 – 1,39) a	0,18 (0,16 – 0,23) b	*0,049*
8S	0,15 (0,12 – 0,18) b	0,79 (0,68 – 0,85) ab	*0,049*
p(2)	*0,027*	*0,027*	

NOTA: (1) Mann-Whitney; (2) Friedman letras diferentes indicam diferenças significativas (*p<0,05*) pelo teste de Dunn para comparações múltiplas; (P0 e P7, n= *pool* 6, em triplicata; 4S e 8S, n= *pool* 4, em triplicata)

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Araujo RV, Chang CV, Cescato VA, Fragoso MC, Bronstein MD, Mendonca BB, Arnhold IJ, Carvalho LR. PROP1 overexpression in corticotrophinomas: evidence for the role of PROP1 in the maintenance of cells committed to corticotrophic differentiation. *Clinics (São Paulo).* 2013;68(6):887-91.

2. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2002;159(1):123-34.

3. Bartke A. The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine. *Gen Comp Endocrinol.* 1965;5(4):418-26.

4. Beby F, Lamonerie T. The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Exp Eye Res.* 2013;111:9-16.

5. Begeot M, Hemming FJ, Dubois PM, Combarnous Y, Dubois MP, Aubert ML. Induction of pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone alpha subunit. *Science.* 1984;226(4674):566-8.

6. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-76.

7. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):872-84.

8. Borrelli E, Heyman RA, Arias C, Sawchenko PE, Evans RM. Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature.* 1989;339(6225):538-41.

9. Bottner A, Keller E, Kratzsch J, Stobbe H, Weigel JF, Keller A, Hirsch W, Kiess W, Blum WF, Pfaffle RW. PROP1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):5256-65.

10. Buckwalter MS, Katz RW, Camper SA. Localization of the panhypopituitary dwarf mutation (df) on mouse chromosome 11 in an intersubspecific backcross. *Genomics.* 1991;10(3):515-26.

11. Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA. Genealogy of the Anterior Pituitary Gland: Tracing a Family Tree. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10(9):343-352.

12. Camper SA, Saunders TL, Katz RW, Reeves RH. The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics.* 1990;8(3):586-90.

13. Capela A, Temple S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron.* 2002;35(5):865-75.

14. Castinetti F, Davis SW, Brue T, Camper SA. Pituitary stem cell update and potential implications for treating hipopituitarism. *Endocr Rev.* 2011;32(4):453-71.

15. Cavaleri F, Scholer HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell.* 2003;113(5):551-2.

16. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003;113(5):643-55.

17. Chen J, Crabbe A, Van Duppen V, Vankelecom H. The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. *Mol Endocrinol.* 2006;20(12):3293-307.

18. Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S, Vankelecom H. Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells.* 2009;27(5):1182-95.

19. Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, Caesens P, Denef C, Vankelecom H. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology.* 2005;146(9):3985-98.

20. Cheng TC, Beamer WG, Phillips JA, 3rd, Bartke A, Mallonee RL, Dowling C. Etiology of growth hormone deficiency in little, Ames, and Snell dwarf mice. *Endocrinology.* 1983;113(5):1669-78.

21. Childs GV. Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(5):168-75.

22. Cohen LE. Genetic disorders of the pituitary. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(1):33-9.

23. Dasen JS, Barbera JP, Herman TS, Connell SO, Olson L, Ju B, Tollkuhn J, Baek SH, Rose DW, Rosenfeld MG. Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* 2001;15(23):3193-207.

24. Dattani MT, Robinson IC. The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man. *Clin Genet.* 2000;57(5):337-46.

25. De Jersey J, Carmignac D, Le Tissier P, Barthlott T, Robinson I, Stockinger B. Factors affecting the susceptibility of the mouse pituitary gland to CD8 T-cell-mediated autoimmunity. *Immunology.* 2004;111(3):254-61.

26. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703-16.

27. Drouin J, Bilodeau S, Roussel-Gervais A. Stem cells, differentiation and cell cycle control in pituitary. *Front Horm Res.* 2010;38:15-24.

28. Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):2907-12.

29. Fu Q, Gremeaux L, Luque RM, Liekens D, Chen J, Buch T, Waisman A, Kineman R, Vankelecom H. The adult pituitary shows stem/progenitor cell activation in response to injury and is capable of regeneration. *Endocrinology.* 2012;153(7):3224-35.

30. Fu Q, Vankelecom H. Regenerative capacity of the adult pituitary: multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation. *Stem Cells Dev.* 2012;21(18):3245-57.

31. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287(5457):1433-8.

32. Gage PJ, Brinkmeier ML, Scarlett LM, Knapp LT, Camper SA, Mahon KA. The Ames dwarf gene, df, is required early in pituitary ontogeny for the extinction of Rpx transcription and initiation of lineage-specific cell proliferation. *Mol Endocrinol.* 1996a;10(12):1570-81.

33. Gage PJ, Roller ML, Saunders TL, Scarlett LM, Camper SA. Anterior pituitary cells defective in the cell-autonomous factor, df, undergo cell lineage specification but not expansion. *Development.* 1996b;122(1):151-60.

34. Galichet C, Lovell-Badge R, Rizzoti K. Nestin-Cre mice are affected by hypopituitarism, which is not due to significant activity of the transgene in the pituitary gland. *PLoS One.* 2010;5(7):e11443.

35. Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA, Ryan AK, Blasco MA, Dieguez C, Malumbres M, Alvarez CV. A GRFa2/Prop1/stem (GPS) cell niche in the pituitary. *PLoS One.* 2009;4(3):e4815.

36. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-5.

37. Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, Fishell G, Rosenfeld MG, Enikolopov G. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(17):6332-7.

38. Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC. Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA.* 1988;7(10):679-90.

39. Gremeaux L, Fu Q, Chen J, Vankelecom H. Activated phenotype of the pituitary stem/progenitor cell compartment during the early-postnatal maturation phase of the gland. *Stem Cells Dev.* 2012;21(5):801-13.

40. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene.* 1993;8(1):203-7.

41. Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development.* 2004;131(22):5539-50.

42. Himes AD, Raetzman LT. Premature differentiation and aberrant movement of pituitary cells lacking both Hes1 and Prop1. *Dev Biol.* 2009;325(1):151-61.

43. Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 2002;16(7):846-58.

44. Horvath E, Kovacs K. Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol.* 2002;26(4):219-28.

45. Horvath E, Lloyd RV, Kovacs K. Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyroidectomy cells. A morphologic study of the rat pituitary including immunoelectron microscopy. *Lab Invest.* 1990;63(4):511-20.

46. Ikeno Y, Hubbard GB, Lee S, Dube SM, Flores LC, Roman MG, Bartke A. Do Ames dwarf and calorie-restricted mice share common effects on age-related pathology? *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 2013;3.

47. Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol.* 1999;62(3):205-18.

48. Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M, Miyai S. Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem.* 2002;110(1-2):50-3.

49. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(2):139-63.

50. Kabos P, Kabosova A, Neuman T. Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21(CIP1/WAF1) in human neural stem cells. *J Biol Chem.* 2002;277(11):8763-6.

51. Kalani MY. The "cookbook" approach to generating cell type of interest: anterior pituitary cells from embryonic stem cells. *World Neurosurg.* 2012;77(3-4):404-6.

52. Kawamura K, Kouki T, Kawahara G, Kikuyama S. Hypophyseal development in vertebrates from amphibians to mammals. *Gen Comp Endocrinol.* 2002;126(2):130-5.

53. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2442-55.

54. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev.* 2009;30(7):790-829.

55. Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI, Camper SA. Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes Dev.* 1995;9(16):2007-19.

56. Kendall SK, Saunders TL, Jin L, Lloyd RV, Glode LM, Nett TM, Keri RA, Nilson JH, Camper SA. Targeted ablation of pituitary gonadotropes in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 1991;5(12):2025-36.

57. Kim GL, Wang X, Chalmers JA, Thompson DR, Dhillon SS, Koletar MM, Belsham DD. Generation of immortal cell lines from the adult pituitary: role of cAMP on differentiation of SOX2-expressing progenitor cells to mature gonadotropes. *PLoS One.* 2011;6(11):e27799.

58. Kita A, Imayoshi I, Hojo M, Kitagawa M, Kokubu H, Ohsawa R, Ohtsuka T, Kageyama R, Hashimoto N. Hes1 and Hes5 control the progenitor pool, intermediate lobe specification, and posterior lobe formation in the pituitary development. *Mol Endocrinol.* 2007;21(6):1458-66.

59. Klein T, Ling Z, Heimberg H, Madsen OD, Heller RS, Serup P. Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem.* 2003;51(6):697-706.

60. Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Denef C, Vankelecom H. Nestin-immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculo-stellate cells. *Endocrinology.* 2005;146(5):2376-87.

61. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(11):6487-92.

62. Lepore DA, Roeszler K, Wagner J, Ross SA, Bauer K, Thomas PQ. Identification and enrichment of colony-forming cells from the adult murine pituitary. *Exp Cell Res.* 2005;308(1):166-76.

63. Lepore DA, Thomas GP, Knight KR, Hussey AJ, Callahan T, Wagner J, Morrison WA, Thomas PQ. Survival and differentiation of pituitary colony-forming cells in vivo. *Stem Cells.* 2007;25(7):1730-6.

64. Levy A. Physiological implications of pituitary trophic activity. *J Endocrinol.* 2002;174(2):147-55.

65. Li S, Crenshaw EB, 3rd, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature.* 1990;347(6293):528-33.

66. Li W, Sun G, Yang S, Qu Q, Nakashima K, Shi Y. Nuclear receptor TLX regulates cell cycle progression in neural stem cells of the developing brain. *Mol Endocrinol.* 2008;22(1):56-64.

67. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG. Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature.* 1992;360(6406):765-8.

68. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

69. Matsuo I, Kuratani S, Kimura C, Takeda N, Aizawa S. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes Dev.* 1995;9(21):2646-58.

70. Mehta A, Dattani MT. Developmental disorders of the hypothalamus and pituitary gland associated with congenital hypopituitarism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(1):191-206.

71. Mendonca BB, Osorio MG, Latronico AC, Estefan V, Lo LS, Arnhold IJ. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):942-5.

72. Monaghan AP, Bock D, Gass P, Schwager A, Wolfer DP, Lipp HP, Schutz G. Defective limbic system in mice lacking the tailless gene. *Nature.* 1997;390(6659):515-7.

73. Monahan P, Himes AD, Parfieniuk A, Raetzman LT. p21, an important mediator of quiescence during pituitary tumor formation, is dispensable for normal pituitary development during embryogenesis. *Mech Dev.* 2012;128(11-12):640-52.

74. Moore KA, Lemischka IR. *Science.* 2006;311(5769):1880-5.

75. Mortensen AH, MacDonald JW, Ghosh D, Camper SA. Candidate genes for panhypopituitarism identified by gene expression profiling. *Physiol Genomics.* 2011;43(19):1105-16.

76. Muranishi Y, Terada K, Inoue T, Katoh K, Tsujii T, Sanuki R, Kurokawa D, Aizawa S, Tamaki Y, Furukawa T. An essential role for RAX homeoprotein and NOTCH-HES signaling in Otx2 expression in embryonic retinal photoreceptor cell fate determination. *J Neurosci.* 2011;31(46):16792-807.

77. Nakajima T, Yamaguchi H, Takahashi K. S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res.* 1980;191(2):523-31.

78. Nasonkin IO, Ward RD, Bavers DL, Beuschlein F, Mortensen AH, Keegan CE, Hammer GD, Camper SA. Aged PROP1 deficient dwarf mice maintain ACTH production. *PLoS One.* 2011;6(12):e28355.

79. Nasonkin IO, Ward RD, Raetzman LT, Seasholtz AF, Saunders TL, Gillespie PJ, Camper SA. Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in Prop1 knockout mice. *Hum Mol Genet.* 2004;13(22):2727-35.

80. Nolan LA, Kavanagh E, Lightman SL, Levy A. Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol.* 1998;10(3):207-15.

81. Nolan LA, Levy A. A population of non-luteinising hormone/non-adrenocorticotrophic hormone-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy. *J Neuroendocrinol.* 2006;18(9):655-61.

82. Ohnuma S, Harris WA. Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron.* 2003;40(2):199-208.

83. Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H, Eto K. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol.* 1994;164(2):409-19.

84. Otsuka Y, Ishikawa H, Omoto T, Takasaki Y, Yoshimura F. Effect of CRF on the morphological and functional differentiation of the cultured chromophobes isolated from rat anterior pituitaries. *Endocrinol Jpn.* 1971;18(2):133-53.

85. Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15(1):7-13.

86. Pogoda HM, Hammerschmidt M. Molecular genetics of pituitary development in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(4):543-58.

87. Porter TE, Wiles CD, Frawley LS. Evidence for bidirectional interconversion of mammotropes and somatotropes: rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning. *Endocrinology.* 1991;129(3):1215-20.

88. Raetzman LT, Ross SA, Cook S, Dunwoodie SL, Camper SA, Thomas PQ. Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev Biol.* 2004;265(2):329-40.

89. Raetzman LT, Ward R, Camper SA. Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia. *Development.* 2002;129(18):4229-39.

90. Raetzman LT, Wheeler BS, Ross SA, Thomas PQ, Camper SA. Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Mol Endocrinol.* 2006;20(11):2898-908.

91. Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature.* 2006;441(7097):1080-6.

92. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods.* 2005;2(5):333-6.

93. Riepe FG, Partsch CJ, Blankenstein O, Monig H, Pfaffle RW, Sippell WG. Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to PROP1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4353-7.

94. Rizzoti K. Adult pituitary progenitors/stem cells: from in vitro characterization to in vivo function. *Eur J Neurosci.* 2010;32(12):2053-62.

95. Roberson MS, Schoderbek WE, Tremml G, Maurer RA. Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1994;14(5):2985-93.

96. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005;280(26):24731-7.

97. Savage JJ, Mullen RD, Sloop KW, Colvin SC, Camper SA, Franklin CL, Rhodes SJ. Transgenic mice expressing LHX3 transcription factor isoforms in the pituitary: effects on the gonadotrope axis and sex-specific reproductive disease. *J Cell Physiol.* 2007;212(1):105-17.

98. Savage JJ, Yaden BC, Kiratipranon P, Rhodes SJ. Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development. *Gene.* 2003;319:1-19.

99. Schaufele F, West BL, Baxter JD. Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 1992;6(4):656-65.

100. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123(3):513-22.

101. Sheng HZ, Westphal H. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends Genet.* 1999;15(6):236-40.

102. Shi Y, Chichung Lie D, Taupin P, Nakashima K, Ray J, Yu RT, Gage FH, Evans RM. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature.* 2004;427(6969):78-83.

103. Shimozaki K, Zhang CL, Suh H, Denli AM, Evans RM, Gage FH. SRY-box-containing gene 2 regulation of nuclear receptor tailless (Tlx) transcription in adult neural stem cells. *J Biol Chem.* 2012;287(8):5969-78.

104. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 1990;4(5):695-711.

105. Sloop KW, Parker GE, Hanna KR, Wright HA, Rhodes SJ. LHX3 transcription factor mutations associated with combined pituitary hormone deficiency impair the activation of pituitary target genes. *Gene.* 2001;265(1-2):61-9.

106. Snell GD. Dwarf, a New Mendelian Recessive Character of the House Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1929;15(9):733-4.

107. Sornson MW, Wu W, Dasen JS, Flynn SE, Norman DJ, O'Connell SM, Gukovsky I, Carriere C, Ryan AK, Miller AP, Zuo L, Gleiberman AS, Andersen B, Beamer WG, Rosenfeld MG. Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. *Nature.* 1996;384(6607):327-33.

108. Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, Ohgushi M, Soen M, Nakano T, Takata N, Wataya T, Muguruma K, Miyoshi H, Yonemura S, Oiso Y, Sasai Y. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature.* 2011;480(7375):57-62.

109. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267(5203):1456-62.

110. Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Long-term culture of postnatal mouse hepatic stem/progenitor cells and their relative developmental hierarchy. *Stem Cells.* 2007;25(4):895-902.

111. Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Pauwelyn KA, Chase LG, Luttun A, Crabbe A, Geraerts M, Sharov AA, Piao Y, Ko MS, Hu WS, Verfaillie CM. Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol.* 2007;8(8):R163.

112. Vankelecom H. Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin Cell Dev Biol.* 2007a;18(4):559-70.

113. Vankelecom H. Stem cells in the postnatal pituitary? *Neuroendocrinology.* 2007b;85(2):110-30.

114. Vankelecom H. Pituitary stem cells drop their mask. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012;7(1):36-71.

115. Vankelecom H, Gremeaux L. Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol.* 2010;166(3):478-88.

116. Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, Smyth HS. Reversible transdifferentiation: interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia. *Mod Pathol.* 2001;14(1):20-8.

117. Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, Camper SA. Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol Endocrinol.* 2005;19(3):698-710.

118. Ward RD, Stone BM, Raetzman LT, Camper SA. Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency. *Mol Endocrinol.* 2006;20(6):1378-90.

119. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(3):324-38.

120. Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989;46(2):309-18.

121. Yoshida S, Kato T, Susa T, Cai LY, Nakayama M, Kato Y. PROP1 coexists with SOX2 and induces PIT1-commitment cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(1):11-5.

122. Yoshida S, Kato T, Yako H, Susa T, Cai LY, Osuna M, Inoue K, Kato Y. Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem / progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary. *J Neuroendocrinol.* 2011;23(10):933-43.

123. Yoshimura F, Harumiya K, Ishikawa H, Otsuka Y. Differentiation of isolated chromophobes into acidophils or basophils when transplanted into the hypophysiotrophic area of hypothalamus. *Endocrinol Jpn.* 1969;16(5):531-40.

124. Young KA, Berry ML, Mahaffey CL, Saionz JR, Hawes NL, Chang B, Zheng QY, Smith RS, Bronson RT, Nelson RJ, Simpson EM. Fierce: a new mouse deletion of Nr2e1; violent behaviour and ocular abnormalities are background-dependent. *Behav Brain Res.* 2002;132(2):145-58.

125. Zeng Y, Liu YS. Vascular endothelial cells and pituitary hormone producing cells derived from embryonic stem cells therapy for hypopituitarism. *Med Hypotheses.* 2011;77(4):680-1.

126. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev.* 2007;87(3):933-63.

127. Zhu X, Rosenfeld MG. Transcriptional control of precursor proliferation in the early phases of pituitary development. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(5):567-74.