JULIANA MOREIRA SILVA

Análise da expressão de *Sox2* durante a puberdade e sua relação com a diferenciação terminal e produção hormonal hipofisária em animais com mutação espontânea no gene *Prop1*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de Carvalho

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Juliana Moreira
Análise da expressão de Sox2 durante a puberdade e sua relação com a diferenciação terminal e produção hormonal hipofisária em animais com mutação espontânea no gene Prop1 / Juliana Moreira Silva. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.PROP1 2.Hipopituitarismo/congênito 3.Puberdade 4.Camundongos Ames 5.Hipófise

USP/FM/DBD-254/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Normatização 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 Documentação; 2011.

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

À minha mãe, **Maria Moreira**, com todo meu amor e saudade,

Ao meu pai, **Ananias Soares**, pelo exemplo de vida,

Ao meu amor, **Miller Marques**, com todo meu carinho e gratidão,

À minha mentora, **Luciani Carvalho**, com toda a minha admiração.

“In the middle of difficulty lies opportunity.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Primeiramente à **Deus** por ter me dado muito mais do que preciso e mereço.

A minha mãe, **Maria Moreira de Lira** (*in memorian*), que me inspira e incentiva diariamente com seu exemplo de vida e pelo legado de incentivo a educação e a perseguição dos meus sonhos.

Ao meu pai, **Ananias Soares da Silva**, por sua integridade e humildade que são espelho e inspiração para mim.

Ao meu irmão, **João Carlos Moreira Silva**, pelo apoio indiscriminado e torcida em cada vitória alcançada.

Aos meus sobrinhos, **Lucas Gabriel** e **Maria Eduarda**, por serem o fôlego em meio ao caos e minhas bases de pureza e alegria.

Aos meus avós, **Hermilina Moreira** (*in memorian*) e **Laudelino Pereira**, por todo amor e carinho dedicados a mim.

A toda a minha família, tios, tias, primos e primas que tanto torcem e vibram pelo meu sucesso.

Ao meu amor, **Miller de Almeida Marques**, por ser meu refúgio e tornar a minha caminhada muito mais leve e feliz.

À minha sogra, **Elenita Rosa de Almeida**, por todas as palavras de carinho e incentivo e pelo exemplo de mulher.

À minha amiga, **Amanda Nunes**, um presente de Deus que tornou a minha caminhada acadêmica melhor e é um exemplo e inspiração para mim.

Aos meus amigos, **Juliana Machado**, **Thiago Zanadrea** e **Isabel Oβwald**, por serem partes essenciais da minha trajetória acadêmica que tornaram-se amigos pessoais e essenciais em minha vida.

Ao meu amigo, **João Luiz Oliveira Madeira**, por anos de incentivo e inspiração e por todos os desabafos, conselhos e conversas. Também por ter me conectado ao LIM/42 e ter dado início a tudo.

À minha orientadora, amiga e mãe-científica, **Luciani Renata Silveira de Carvalho**, um agradecimento especial, pela acolhida e disponibilidade, por ser um exemplo máximo de cientista e ser humano.

Aos mestres e mentores do Centro Universitário São Camilo.

À **Cláudia Chang** e **Cinthya Cirqueira**, pelo legado deixado e pela disponibilidade.

Aos colegas do LIM/42, que fazem a minha rotina agradável e divertida.

Aos colegas da Pós-Graduação, pelas trocas de conhecimento e desabafos.

Aos endocrinologistas e amigos, **Rafael Loch**, **Letícia Vilela** e **Nathalia Lisboa**, pelas parcerias e trocas constantes de conhecimento que tornaram esta caminhada muito mais proveitosa.

Às queridas funcionárias **Nilda Oliveira** e **Rosangele Zamboni**, por suas contribuições constantes.

Aos colegas do Biotério Central da FMUSP.

Aos colegas do LIM/05, em especial à **Mariana Veras**, pela generosidade em compartilhar suas experiências.

À minha amiga, **Marlene Inácio**, que tornou-se muito especial com seus conselhos, suporte e carinho.

À Profa **Berenice Bilharinho de Mendonça**, pela trajetória impecável que é fonte de inspiração, pela sua humanidade e capacidade de entender e ajudar o outro.

Sumário

1. Introdução..... 3

1.1. Embriogênese e organogênese hipofisária..... 4

1.1.1. Fatores de transcrição e vias de sinalização..... 5

1.2. Dinâmica celular hipofisária..... 11

1.3. Estágios do desenvolvimento puberal nos camundongos..... 12

1.3.1. Desenvolvimento puberal em camundongos fêmeas..... 13

1.3.2. Desenvolvimento puberal em camundongos machos..... 14

1.4. Células tronco hipofisárias..... 15

1.4.1. Principais marcadores de células tronco hipofisárias..... 18

1.5. Deficiência hipofisária hormonal múltipla..... 20

1.5.1. Modelos de deficiência hipofisária hormonal múltipla..... 21

2. Justificativa..... 26

3. Objetivos..... 27

3.1. Objetivo geral..... 28

3.2. Objetivos específico..... 28

4. Metodologia..... 29

4.1. Natureza do Estudo..... 30

4.2. Considerações éticas..... 30

4.3. Descrição da linhagem..... 30

4.4. Animais..... 31

4.5. Genotipagem..... 32

4.6. Sexagem..... 33

4.7. Dados antropométricos..... 33

4.8. RT-qPCR..... 33

4.8.1. Extração de RNA..... 33

4.8.2. Transcrição reversa..... 34

4.8.3. Análise da expressão gênica..... 34

4.8.3.1. Primers..... 34

4.8.3.2. Validação..... 35

4.8.3.3. Determinação da temperatura de anelamento..... 35

4.8.3.4. Otimização da concentração de primers..... 35

4.8.3.5. Curva padrão..... 36

4.8.3.6. qPCR..... 37

4.9. Dosagem hormonal sérica..... 39

4.9.1. Coleta..... 39

4.9.2. Imunoensaio..... 40

4.10. Imunohistoquímica..... 40

4.11. Imunofluorescência..... 41

4.11.1. Coleta e preparo da amostra..... 41

4.11.2. Reação de imunofluorescência..... 41

4.11.3. Determinação da intensidade de emissão de fluorescência.... 42

4.12. Análise histológica das gônadas..... 43

4.13. Análise estatística..... 45

5. Resultados..... 46

5.1. qPCR..... 48

5.2. Dosagem sérica hormonal..... 61

5.3. Imunohistoquímica..... 65

5.4. Imunofluorescência..... 66

5.5. Histologia gonadal..... 72

6. Discussão..... 75

6.1. O fator de transcrição PROP1 não é essencial para a diferenciação terminal hormonal hipofisária em camundongos Ames..... 76

6.2. Apesar de serem inférteis e apresentarem hipoplasia gonadal, os camundongos Ames apresentam morfologia e resposta gonadal normais em relação a animais controles..... 80

6.3. Perfil transcricional dos marcadores de proliferação e diferenciação corroboram com o fenômeno descrito..... 82

7. Conclusão..... 85

8. Anexos..... 88

9. Referencias..... 104

Lista de tabelas

TABELA 1. Animais utilizados para avaliar a morfologia gonadal, expressão gênica e proteica nos períodos P30 e P40..... 32

TABELA 2. Concentração de primers senso e reverso utilizada para validação..... 36

TABELA 3. Descrição dos genes utilizados na análise de expressão..... 38

TABELA 4. Descrição do Escore de Johnsen..... 44

TABELA 5. Dados antropométricos de camundongos Ames comparados a controles normais nos períodos P30 e P40..... 48

TABELA 6. Dosagem sérica dos hormônios hipofisários GH, LH, FSH, TSH e PRL em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d (n=8) e 40d (n=8)..... 61

Lista de figuras

Figura 1. Embriogênese e organogênese hipofisária de camundongos..... 5

Figura 2. Regulação molecular do desenvolvimento adenohipofisário..... 10

Figura 3. Nichos celulares de células tronco/progenitoras hipofisárias no período pós-natal..... 18

Figura 4. Linhagem Ames..... 22

Figura 5. Desenvolvimento hipofisário em camundongo normal e com deficiência dos fatores de transcrição *Prop1* e *Pit*..... 23

Figura 6. Dados antropométricos de comprimento naso-anal e peso..... 47

Figura 7. Expressão relativa dos genes marcadores de células tronco/progenitoras no P30 do animal Ames..... 49

Figura 8. Expressão relativa dos genes marcadores de proliferação e diferenciação celular no P30 do animal Ames..... 50

Figura 9. Expressão relativa dos genes codificadores dos fatores de transcrição hipofisários no P30 do animal Ames..... 51

Figura 10. Expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários no P30 do animal Ames..... 52

Figura 11. Expressão relativa dos genes marcadores de células tronco/progenitoras no P40 do animal Ames..... 53

Figura 12. Expressão relativa dos genes marcadores de proliferação e diferenciação celular em P40 do animal Ames..... 54

Figura 13. Expressão relativa dos genes codificadores dos fatores de transcrição hipofisários em P40 do animal Ames..... 55

Figura 14. Expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários no P40 do animal Ames..... 56

Figura 15. Expressão relativa dos genes marcadores de células tronco/progenitoras na vida adulta do animal Ames..... 57

Figura 16. Expressão relativa dos genes marcadores de proliferação e diferenciação celular na vida adulta do animal Ames..... 58

Figura 17. Expressão relativa dos genes codificadores dos fatores de transcrição hipofisários Sox3, Otx2 e Hesx1 na vida adulta do animal Ames..... 59

Figura 18. Expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários na vida adulta do animal Ames..... 60

Figura 19. Dosagem sérica dos hormônios hipofisários LH e FSH em camundongos machos e fêmeas nos períodos 30d e 40d..... 61

Figura 20. Dosagem sérica do hormônio hipofisário GH em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d e 40d..... 62

Figura 21. Dosagem sérica do hormônio hipofisário TSH em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d e 40d..... 62

Figura 22. Dosagem sérica do hormônio hipofisário PRL em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d e 40d..... 63

Figura 23. Imunolocalização de SOX2 em camundongo controle (A) e mutado (B) em P40..... 65

Figura 24. Imunofluorescência “whole mount” de hipófise utilizando o marcador de células tronco hipofisárias SOX2 em camundongos machos adultos (60d)..... 68

Figura 25. Imunofluorescência “whole mount” de hipófise utilizando o marcador de células tronco hipofisárias LH em camundongos machos adultos (60d)..... 69

Figura 26. Imunofluorescência “whole mount” de hipófise utilizando o marcador de células tronco hipofisárias FSH em camundongos machos adultos (60d)..... 70

Figura 27. Imunofluorescência “whole mount” de hipófise utilizando o marcador de células tronco hipofisárias GH em camundongos machos adultos (60d)..... 71

Figura 28. Histologia de ovários de camundongos fêmeas no período de 30d corados em HE..... 73

Figura 29. Representação gráfica da contagem de folículos de fêmeas mutantes em P30 e P40..... 73

Figura 30. Histologia de testículos de camundongos machos no período de 30d corados em HE..... 74

Figura 31. Resumo do perfil de expressão dos marcadores de célula tronco/progenitoras, proliferação e diferenciação celular hipofisários, além dos genes codificadores dos hormônios hipofisários..... 84

Lista de gráficos

GRÁFICO 1. Representação gráfica da intensidade de emissão de fluorescência do marcador de células tronco hipofisárias SOX2 e dos hormônios hipofisários LH, FSH e GH em camundongos machos no período P60..... 53

Lista de siglas

Actb	Beta actina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
αGSU	Subunidade Alfa Glicoproteica
Cd44	Gene codificador do antígeno Cd44
cDNA	DNA complementar
Cga	Gene codificador da Unidade Alfa Glicoproteica
DAB	Diaminobenzidina
DP	Desvio-padrão
dpc	Dias pós-coito
E	Dia embrionário
FSH	Hormônio foliculoestimulante
Fsh	Gene codificador do hormônio foliculoestimulante
Gapdh	*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GFP	*Green Fluorescein Protein*
GH	Hormônio de crescimento
Gh	Gene codificador do hormônio de crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
HE	Hematoxilina-Eosina
Hprt	*Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*
Hesx1	*Homeobox Gene Expressed in Embrionic Stem Cell 1*
IHQ	Imuno-histoquímica
IF	Imunofluorescência
Ki67	*Antigen Identified by Monoclonal Antibody Ki 67*
LH	Hormônio Luteinizante
Lh	Gene codificador do hormônio luteinizante

Nanog	*Nanog Homeobox*
Nestin	Nestina
NTC	*Non transcript control*
Nr2e1	*Nuclear Receptor Subfamily 2, Group E, Member 1*
Otx2	*Orthodenticle Homeobox 2*
P	Dia do período pós-natal
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pit1	*Pituitary-Specific Transcription Factor 1 (Pou1f1)*
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
Prl	Gene codificador do Hormônio Prolactina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
S100β	*S100 Protein Beta Polypeptide Neural*
Sox2	SRY-Box Containing Gene 2
Sox3	SRY-Box Containing Gene 3
Sox9	SRY-Box Containing Gene 9
TSH	Hormônio Tireoestimulante
Tsh	Gene codificador de Hormônio Tireoestimulante

RESUMO

Silva JM. *Análise da expressão de sox2 durante a puberdade e sua relação com a diferenciação terminal e produção hormonal hipofisária em animais com mutação espontânea no gene Prop1* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A hipófise é uma glândula vital que produz e secreta hormônios relacionados ao crescimento, fertilidade, lactação e resposta ao estresse. Vários fatores de transcrição controlam as fases iniciais da organogênese hipofisária: HESX1, GLI2, OTX2, LHX3, LHX4, SOX2 e SOX3, enquanto os fatores de transcrição como o PROP1 e POU1F1 (PIT-1) estão envolvidos na diferenciação celular terminal. Estes fatores participam de uma cascata de eventos responsáveis pela formação de hormônios hipofisários (LH, FSH, TSH, GH e PRL) e, quando ausentes, provocam a deficiência de um ou mais hormônios. A linhagem Ames, camundongo com mutação espontânea no fator de transcrição PROP1, é extensivamente utilizada como modelo animal para estudo do hipopituitarismo congênito. Este estudo objetiva a avaliação da dinâmica celular hipofisária envolvida na diferenciação das células produtoras de hormônios a partir de células tronco durante a puberdade, período de alta demanda hipofisária. Durante períodos que não demandam elevação dos níveis de hormônios hipofisários, há o aumento da expressão de SOX2 em camundongos Ames. O fator de transcrição PROP1 não é essencial para a diferenciação de gonadotrofos e somatotrofos, havendo o aumento da expressão dos genes codificadores dos hormônios hipofisários e normalização da secreção de GH, LH, FSH e TSH em camundongos com mutação espontânea no *Prop1*. Apesar do fenótipo de retardo de crescimento e infertilidade, estes animais apresentam morfologia e diferenciação celular gonadal normais, havendo a produção de espermatozoides e desenvolvimento de folículos em animais mutados.

Descritores: PROP1; Hipopituitarismo/congênito; Puberdade; Camundongos Ames; Hipófise.

ABSTRACT

Silva JM. *Analysis of Sox2 expression during puberty and its relation with terminal differentiation and pituitary hormone production in animals with spontaneous mutation in the Prop1 gene* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

The pituitary gland produces and secretes hormones related to growth, fertility, lactation and stress response. The initial phases of the anterior pituitary gland development are regulated by many transcription factors, including HESX1, GLI2, OTX2, LHX3, LHX4, SOX2 and SOX3 as well as the transcription factors PROP1 and POU1F1 (PIT-1) that are involved in terminal differentiation. These factors participate in a cascade of events responsible for the formation of pituitary hormones (LH, FSH, TSH, GH and PRL). In the absence of one or more transcription factors, it is observed the deficiency of hormones produced by the pituitary gland. The Ames strain, a mice lineage with spontaneous mutation in the *Prop1* gene, is extensively used as an animal model to study congenital hypopituitarism. This study aims to evaluate the cellular dynamic involved in the differentiation of pituitary stem/progenitor cells into pituitary hormone producing cells during puberty, a pituitary high demand period. During periods that do not demand increased pituitary hormones levels, there is an increase in SOX2 expression in the Ames mice. The transcription factor PROP1 is not essential for somatotroph and gonadotroph differentiation with increased expression of pituitary hormones codifying gene and normal secretion of GH, LH, FSH, and TSH in *Prop1* spontaneous mutants. Despite presenting with growth delay and infertility, these animals have normal gonadal morphology and cell differentiation, producing spermatozoa and follicular development in mutants.

Descriptors: PROP1; Hypopituitarism/congenital; Puberty; Ames mice; Pituitary gland.

Introdução

1.1 Embriogênese e organogênese hipofisária

A hipófise é uma glândula vital que produz e secreta hormônios relacionados ao crescimento, fertilidade, lactação e estresse, sendo regulada por estímulos hipotalâmicos. A glândula hipofisária está localizada na sela túrcica próxima a face superior do osso esfenoide, na base do crânio. A glândula madura é composta pela adenohipófise (lobos anterior e intermediário) e neurohipófise (lobo posterior), que são estruturas distintas fisiológica e morfologicamente (Kelberman, Rizzoti et al. 2009).

O lobo anterior deriva do ectorderma oral e, quando maduro, produz e secreta hormônios hipofisários produzidos por cinco tipos celulares distintos: somatotrofos, gonadotrofos, lactotrofos, tireotrofos e corticotrofos. O lobo posterior, por sua vez, tem origem embrionária no neuroectoderma, sendo composto por uma projeção dos neurônios da eminência média hipotalâmica. A neurohipófise é responsável pele armazenamento e secreção dos hormônios antidiurético (ADH) e ocitocina (Kelberman, Rizzoti et al. 2009).

O desenvolvimento hipofisário é semelhante em humanos e camundongos (Scully and Rosenfeld 2002). Em camundongos, o primeiro sinal de desenvolvimento hipofisário ocorre em 7,5 dias pós coito (dpc) com o desenvolvimento da placa hipofisária e, por volta de 9 dpc, ocorre o espessamento do ectoderma oral que sofre uma invaginação e dá origem à uma bolsa de Rathke rudimentar, primórdio dos lobos anterior e intermediário (Kelberman, Rizzoti et al. 2009). Aos 10,5 dpc uma região restrita do diencéfalo ventral, acima da bolsa de Rathke, dá origem ao infundíbulo, do qual a porção posterior e haste hipofisária irão derivar. É também aos 10,5 dpc que a bolsa de

Rathke se desenvolve totalmente e, aos 12,5 dpc, é completamente separada do ectoderma oral subjacente (Kelberman, Rizzoti et al. 2009) (Burrows, Douglas et al. 1999) (Figura 1). Uma sucessão de interações gênicas é necessária para que a morfogênese hipofisária ocorra corretamente, tornando a hipófise extremamente sensível a variações genéticas de perda ou ganho de função.

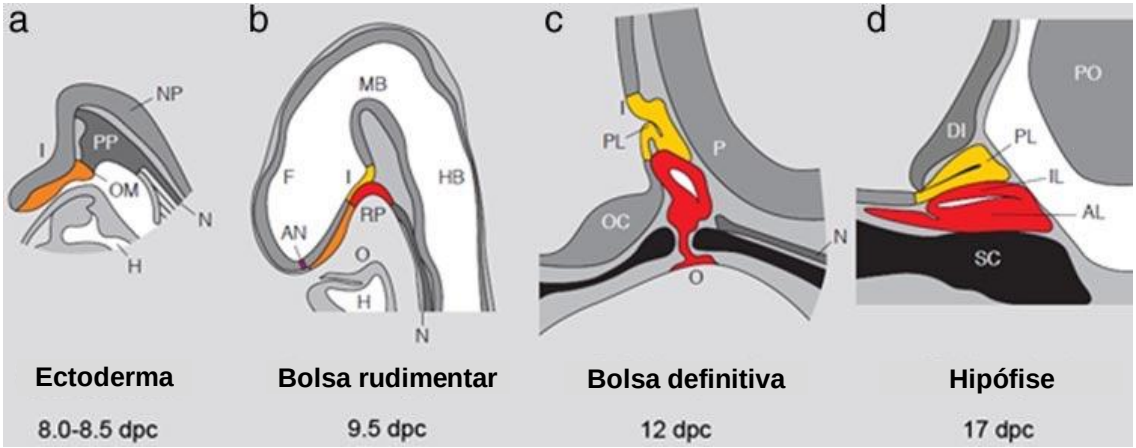

Figura 1. Embriogênese e organogênese hipofisárias de camundongo. Os estágios de de desenvolvimento estão indicados em dias pós coito (dpc). AL, Lobo anterior; AN, Poro neural anterior; DI, Diencéfalo; F, Prosencéfalo; H, Coração; HB, Rombencéfalo; I, Infundíbulo; IL, Lobo intermediário; MB, Mesencéfalo; N, Notocorda; NP, Placa Neural; O, Cavidade oral; OC, Quiasma óptico; OM, Membrana oral; P, Flexura pontinha; PL, Lobo posterior; PO, Ponte; PP, Placa pré-cordal; RP, Bolsa de Rathke; SC, Cartilagem esfenoidal.
Adaptado (Sheng and Westphal 1999)

1.1.1 Fatores de transcrição e vias de sinalização hipofisárias

Vários fatores de transcrição controlam a embriogênese e organogênese hipofisária, bem como as fases finais de síntese dos hormônios hipofisários. Dentre estes, estão fatores envolvidos nas fases iniciais do comprometimento e diferenciação celular, como HESX1, GLI2, OTX2, LHX3, LHX4, SOX2 e SOX3. Enquanto os fatores de transcrição PROP1 e POU1F1 (PIT-1) estão envolvidos na diferenciação terminal e produção hormonal da glândula (Schoenmakers,

Alatzoglou et al. 2015) (Figura 2). Além disso, fatores de conjugação tardios, como a subunidade alfa dos hormônios glicoproteicos (CGA) são importantes para tornar os hormônios hipofisários LH, FSH e TSH biologicamente ativos.

O fator de transcrição HESX1 é um membro da classe de proteínas "paired-like homeobox" e é um importante fator regulador da expressão do PROP1, sendo eles fatores de transcrição com expressão opostas (Thomas, Johnson et al. 1995, Sornson, Wu et al. 1996, Dasen, Martinez Barbera et al. 2001, Schoenmakers, Alatzoglou et al. 2015). A ativação inicial do HESX1 é mediada pelos genes *Lhx1* e *Lhx3* (Sornson, Wu et al. 1996, Sheng and Westphal 1999, Savage, Yaden et al. 2003). Variantes patogênicas no gene *Hex11* foram descritas em fenótipos variáveis, levando principalmente a deficiência hormonal hipofisária combinada, displasia septo óptica, agenesia de corpo caloso e hipoplasia nervo óptica (Dattani, Martinez-Barbera et al. 1998, Brickman, Clements et al. 2001, Carvalho, Woods et al. 2003).

O fator de transcrição OTX2 ("Orthodenticle Homeobox 2") é essencial para o desenvolvimento normal do cérebro, cerebelo, glândula pineal e olho, com papel desde a embriogênese até a vida adulta (Beby and Lamonerie 2013). Sua expressão ou repressão tem correlação direta com via de sinalização Notch/Hes (Muranishi, Terada et al. 2011) e parece desempenhar função direta no desenvolvimento do hipotálamo, da haste hipofisária e nos derivados da bolsa de Rathke (Matsuo, Kuratani et al. 1995). Em humanos, mutações em heterozigose têm sido relacionadas a graves malformações oculares, anormalidades cerebrais e hipopituitarismo (Cohen 2012).

O fator de expressão precoce LHX3 ("LIM Homeobox Protein 3") é encontrado na retina, motoneurônios, glândula pineal e na hipófise (Sloop,

Parker et al. 2001). Camundongos transgênicos com variantes patogênicas no gene *Lhx3* possuem alterações no desenvolvimento hipofisário em fases muito precoces da formação glandular (Kelberman, Rizzoti et al. 2009). No entanto, sua ação nas fases terminais na formação hipofisária e 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) (Sloop, Parker et al. 2001, Savage, Yaden et al. 2003). Variantes patogênicas neste gene levam a hiperplasia hipofisária associada a deficiência auditiva sensorioneural, dificuldades respiratórias e anomalias esqueléticas (Bhangoo, Hunter et al. 2006, Kriström, Zdunek et al. 2009, Bechtold-Dalla Pozza, Hiedl et al. 2012).

Os fatores de transcrição SOX2 e SOX3 ("Sex determining region Y-box 2 e 3") são membros da família SOX (SRY – grupo relacionado a alta mobilidade do DNA) de fatores de transcrição. O SOX2 é expresso na bolsa de Rathke das semanas 4,5 a 9 de desenvolvimento hipofisário e tem expressão mantida durante o desenvolvimento da adenohipófise e do diencéfalo. Este fator tem um papel importante no desenvolvimento do cérebro e hipófise, além de ter função descrita na formação ocular e auditiva (Xatzipsalti, Voutetakis et al. 2019). Já o fator de transcrição SOX3 é localizado na posição Xp.27.1 e expresso no sistema nervoso central, particularmente no diencéfalo ventral. O SOX3 contém em sua estrutura um domínio de ligação ao DNA, que é conservado entre outras proteínas da família SOX, além de um domínio N-terminal curto e uma região C-terminal que abrange quatro tratos de poli alanina relacionados à ativação transcricional. A expressão de SOX3 é essencial para o desenvolvimento hipotalâmico e hipofisário normal e a duplicação do gene ou expansão e deleção

dos tratos de poli alanina foram descritas em casos com fenótipos variáveis de hipopituitarismo (Hamel, Smits et al. 1996, Lagerström-Fermér, Sundvall et al. 1997, Woods, Cundall et al. 2005). Variantes em ponto no gene *Sox3* são raras (Jelsig, Diness et al. 2018, Yu, Chang et al. 2018). Em humanos, mutações no gene *SOX3* são causas de hipopituitarismo congênito ligado ao X e podem levar a um amplo espectro fenotípico, sendo o mais comum, além da deficiência hormonal hipofisária combinada, o retardo mental.

O fator de transcrição PROP1 ("Prophet of Pit1, Paired-Like Homeodomain Transcription Factor") é específico à hipófise e se expressa na glândula a partir do décimo dia de desenvolvimento embrionário do camundongo (E10-E10.5), tem seu pico de expressão no E12.5 e a sua expressão é reduzida por volta do E15.5 (Raetzman, Ward et al. 2002). Este fator é responsável pelo estímulo da expressão do *Pou1f1* e inibição da expressão do *Hesx1*. Além disso, o PROP1 regula a manutenção de células indiferenciadas, manutenção de células tronco e controla o ciclo celular e diferenciação terminal (Zhu, Gleiberman et al. 2007). Estudos genéticos demonstram que a regulação temporal da expressão do PROP1 é crítica para o desenvolvimento hipofisário normal em camundongos (Raetzman, Ross et al. 2004, Ward, Raetzman et al. 2005, Kelberman, Rizzoti et al. 2009). Sua expressão prematura na bolsa de Rathke leva à agenesia hipofisária (Dasen, Martinez Barbera et al. 2001).

Em humanos, mutações no *PROP1* são as causas mais comuns de hipopituitarismo congênito, que se manifesta inicialmente com déficit de GH (hormônio de crescimento), TSH (hormônio tireoestimulante), PRL (prolactina), gonadotrofinas (FSH e LH) e déficit variável e progressivo de ACTH (hormônio adenocorticotrófico) (Dattani and Robinson 2000, Bottner, Keller et al. 2004). 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 não esclarecido totalmente até o momento (Mendonca, Osorio et al. 1999, Riepe, Partsch et al. 2001, Turton, Mehta et al. 2005).

O fator de transcrição hipofisário POU1F1 ("POU Class 1 Homeobox 1"), também denominado PIT1, pertence à família de homeodomínio POU. É expresso tardiamente no desenvolvimento hipofisário, com pico de expressão por volta de E16.5, persistindo até a vida adulta (Simmons, Voss et al. 1990, Kelberman, Rizzoti et al. 2009). O POU1F1 é necessário para a diferenciação dos somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos na hipófise anterior e acredita-se que este seja o fator mais importante para expansão hipofisária pós-natal (Dattani and Robinson 2000). Mutações no gene *POU1F1* são associadas a deficiência hormonal hipofisária combinada, poupando o eixo gonadotrófico e corticotrófico (Tatsumi, Miyai et al. 1992, Arnhold, Nery et al. 1998, De Rienzo, Mellone et al. 2015). Contudo, recentemente, a associação de uma variante no *POU1F1* à deficiência isolada de GH foi relatada (Sobrier, Tsai et al. 2016).

Os hormônios glicoproteicos, dentre eles o TSH, FSH e 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 especificidade biológica a cada hormônio (Roberson, Schoderbek et al. 1994). Embora o fator αGSU esteja envolvido nas fases mais tardias da ativação hormonal pelos tireotrofos e gonadotrofos, sua expressão se inicia em um período precoce, por volta do E11.5 (Wray, Nieburgs et al. 1989). Devido a este fato, criou-se um modelo de animal transgênico nocaute para o gene *Cga*

(Kendall, Samuelson 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 produzidos na placa olfatória e migram, posteriormente, para região hipotalâmica (Wray, Nieburgs et al. 1989), porém tal hipótese não foi confirmada (Kendall, Samuelson et al. 1995).

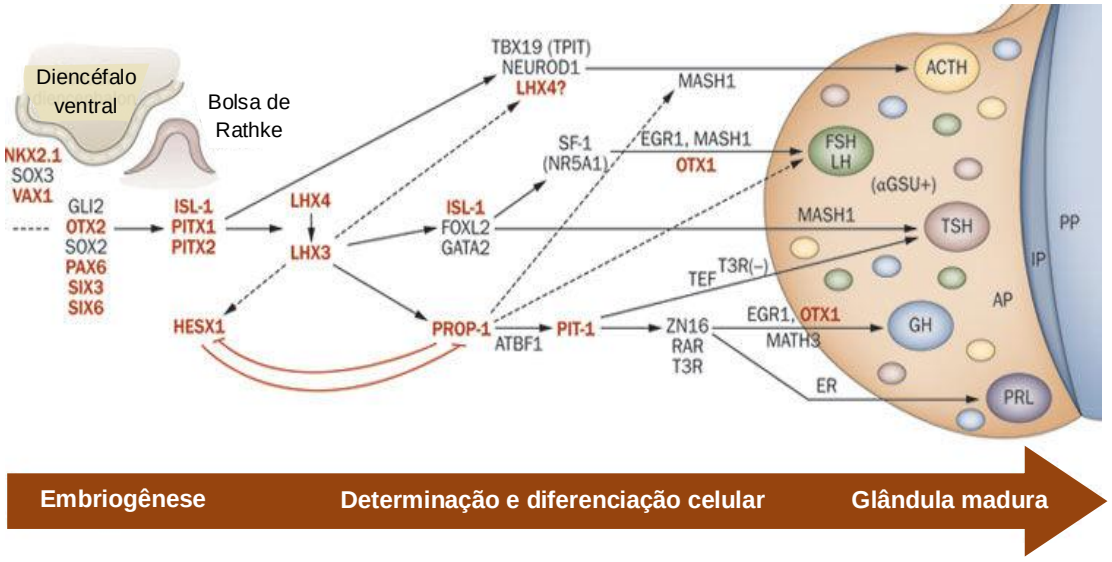

Figura 2. Regulação molecular do desenvolvimento adenohipofisário. Diversos fatores de transcrição contribuem para o estabelecimento dos primórdios da adenohipófise, a bolsa de Rathke e a subsequente diferenciação dos cinco tipos celulares secretores de hormônios hipofisários. Os fatores de transcrição essenciais para esses processos estão destacados em vermelho. As setas indicam relações entre genes precedentes em vias de sinalização moleculares, não necessariamente implicando em ativação direta. As extremidades planas indicam repressão. AP, Lobo anterior; IP, Lobo intermediário; PP, Lobo posterior.
Adaptado(Prince, Walvoord et al. 2011).

1.2 Dinâmica celular hipofisária

Embora as células da hipófise anterior sejam formadas durante o desenvolvimento embrionário, a glândula cresce e amadurece substancialmente nas primeiras semanas do período pós-natal, culminando com o aumento do volume glandular e número de células hipofisárias, bem como a diferenciação das células recém-formadas (Carbajo-Perez and Watanabe 1990, Nolan, Kavanagh et al. 1998, Levy 2002, Taniguchi, Yasutaka et al. 2002).

A hipófise adulta apresenta baixas taxas de renovação em comparação a tecidos com altas taxas de renovação celular, como o intestino, pele e medula óssea (Wilson 1986, Carbajo-Perez and Watanabe 1990, Nolan, Kavanagh et al. 1998, Nolan, Lunness et al. 1999, Levy 2002, Levy 2008). Apesar disso, são observadas mudanças dinâmicas na composição celular hipofisária de acordo com condições fisiológicas específicas, como durante o crescimento, a puberdade e lactação (Crane and Loomes 1967, Sasaki, Wu et al. 1990, Oishi, Okuda et al. 1993, Taniguchi, Yasutaka et al. 2002). Sabe-se ainda que ocorre a readaptação hipófisária em casos de deficiência hormonal induzida, a redução do *feedback* negativo dos hormônios periféricos aumenta a atividade e número de células da população celular hipofisária da linhagem específica por meio da diferenciação de células tronco/ progenitoras hipofisárias ou transdiferenciação (Fu, Gremeaux et al. 2012, Fu and Vankelecom 2012, Vankelecom 2012, Willems, Fu et al. 2016). Com isso, torna-se cada vez mais claro que a hipófise não é um sistema estático, mas remodela sua composição celular de acordo com necessidades fisiológicas e patológicas específicas.

1.3 Estágios do desenvolvimento puberal nos camundongos

A puberdade é a transição para a vida adulta com maturação sexual completa e alcance da capacidade reprodutiva. Neste período o sistema reprodutor se torna capaz de iniciar os eventos essenciais para a reprodução como a regulação do ciclo estral e ovulação em fêmeas e estabelecimento da espermatogênese em machos (Kumar and Boehm 2013). Estes eventos sofrem influência de diversos fatores internos e externos. As vias hormonais responsáveis pelo controle da reprodução são reguladas pelo no eixo hipotálamo –hipófise –gônada. Este eixo é composto por três componentes primordiais: o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) presente no hipotálamo; as gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), produzidas na hipófise; e os esteroides sexuais e outros produtos hormonais das gônadas (Sisk and Foster 2004). A puberdade é iniciada por eventos neuroendócrinos que ativam a liberação pulsátil de GnRH no sistema porta-hipofisário para estimular a secreção hipofisária de gonadotrofinas, que desencadeiam a produção gonadal de esteroides e maturação dos gametas (Sisk, Richardson et al. 2001).

O FSH é o promotor primário da gametogênese em ambos os sexos enquanto o LH tem a função de promover a secreção dos hormônios gonadais: estrogênio e progesterona nas fêmeas e androgênio nos machos. Um terceiro hormônio hipofisário, a prolactina, atua na lactação e no desenvolvimento dos ovários durante a gestação. Os hormônios gonadais tem a função de manter as características sexuais secundárias e condições adequadas do sistema

reprodutor. O desenvolvimento da maturidade sexual completa depende da interação de todos esses fatores, processo ainda não compreendido totalmente (Jackson Laboratory (Bar Harbor Me.) and Green 1966).

Ao nascimento, a hipófise do camundongo é fisiologicamente indiferenciada do ponto de vista gonadotrófico, além disso, os ovários são irresponsivos às gonadotrofinas (FRANCKE 1948, VIVIEN 1950). A diferenciação das gonadotrofinas ocorre no P6 em machos e por volta de P12 em fêmeas. A maturidade sexual coincide com a elevação dos níveis de gonadotrofinas, que ocorre após a quarta semana de desenvolvimento pós-natal (Jackson Laboratory (Bar Harbor Me.) and Green 1966).

1.3.1 Desenvolvimento puberal em camundongos fêmeas

A diferenciação da linhagem germinativa em camundongos fêmeas ocorre em duas fases. No 12dpc os primeiros ovócitos, localizados nos primórdios ovarianos, são denominados oogônias. Estas células iniciam o processo de divisão meiótica e, após P5, as oogônias permanecem quiescentes até a maturação sexual e com o início da puberdade os ovários tornam-se ativos através de estímulos hormonais. A partir da maturação sexual, a cada quatro dias um novo grupo de oogônias são estimuladas e seguem até o último estágio de diferenciação (Mayer, Acosta-Martinez et al. 2010).

Os primeiros sinais de maturidade sexual nas fêmeas são estrógeno dependentes: a abertura da vagina e esfregaço vaginal com células cornificadas. Os ovários iniciam a resposta ao FSH exógeno de P6 a P9 com diminuição as 3 semanas de idade até os níveis de FSH serem elevados novamente a níveis de

maturidade ovariana aos 30 dias do desenvolvimento pós-natal (Jackson Laboratory (Bar Harbor Me.) and Green 1966). A ovulação ocorre geralmente a partir de P20 período que as fêmeas, cinco dias após o início da resposta dos primeiros folículos.

O ciclo reprodutivo de camundongos fêmeas é conhecido como ciclo estral e é caracterizado pelo proestro, estro, metestro (diestro I) e diestro (diestro II) (Evans and Long 1922). A ovulação ocorre do início do proestro ao fim do estro e a duração média dos ciclos ovulatórios é de quatro dias. Durante o ciclo estral, a prolactina, LH e FSH permanecem em níveis reduzidos e se elevam na fase do proestro. Os níveis de estradiol começam a se elevar no metestro, alcançando níveis máximos durante o proestro e retornando a níveis basais no estro. A secreção de progesterona também é elevada durante o metestro e diestro, decaindo posteriormente e alcançando o segundo pico ao final do proestro (Evans and Long 1922, SCHWARTZ 1964).

1.3.2 Desenvolvimento puberal em camundongos machos

A maturação sexual nos camundongos machos evidencia-se pelo desenvolvimento total da atividade espermática. A diferenciação das células germinativas de camundongos machos ocorre continuamente nos túbulos seminíferos localizados nos testículos do animal (Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001). As células espermáticas em diferentes fases são classificadas em quatro categorias: espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides. As células pré-meióticas são chamadas de espermatogônias e incluem desde células tronco regenerativas a células em processo de

diferenciação terminal (Nelson, Karelus et al. 1990). Com o início da meiose, as células germinativas são chamadas de espermatócitos e, após a meiose, as células haploides são denominadas espermátides. O produto final da diferenciação terminal da linhagem espermática, ou espermatogênese, são os espermatozoides.

A espermatogênese e esteroidogênese testicular são controladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada, portanto, pelos hormônios GnRH, LH e FSH (Nelson, Karelus et al. 1990). O eixo é responsivo aos níveis de testosterona, que quando atinge níveis plasmáticos suficientes, exerce *feedback* negativo. Os hormônios LH e FSH, por sua vez, exercem efeitos sobre as células de Sertoli, que são cruciais para a progressão da espermatogênese. A inibina produzida pelas células de Sertoli, juntamente com a testosterona e o 17-β estradiol, reduzem a secreção de FSH e LH por feedback negativo, mantendo assim, um controle rigoroso da homeostase do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular (Nelson, Karelus et al. 1990, Mendis-Handagama and Ariyaratne 2001).

1.4 Células tronco hipofisárias

Apesar de diversos estudos, os mecanismos relacionados a neogênese de células hipofisárias produtoras de hormônios durante a renovação celular homeostática, desenvolvimento pós-natal inicial e plasticidade e adaptação patológica ou fisiológica ainda não são entendidos (McNicol and Carbajo-Perez 1999, Levy 2002, Melmed 2003, Denef, Pals et al. 2005). Algumas evidências demonstram que tais mecanismos ocorrem através de transdiferenciação e/ou mitose de células hormonais maduras (Yoshimura, Harumiya et al. 1970,

Scheithauer, Kovacs et al. 1985, Horvath, Lloyd et al. 1990, Scheithauer, Sano et al. 1990, Porter, Wiles et al. 1991, Kineman, Faught et al. 1992, Stefaneanu, Kovacs et al. 1992, Childs 2000, Vidal, Horvath et al. 2000, Vidal, Horvath et al. 2001, Childs 2002, Taniguchi, Yasutaka et al. 2002). Contudo, outros estudos demonstram a capacidade de diferenciação de células tronco/progenitoras em células hipofisárias secretoras de hormônios, sugerindo esta via como principal na resposta a dinâmica fisiológica ou patológica glandular (Taniguchi, Tamatani et al. 1995).

As células tronco/progenitoras hipofisárias tem sido vastamente estudadas desde os anos sessenta e podem participar de diversos processos na formação de novas células endócrinas durante o desenvolvimento pós-natal, renovação celular basal, reação a lesões hipofisárias e adaptação dinâmica (Messier 1966, Yoshimura, Harumiya et al. 1969, Yoshimura, Harumiya et al. 1970, Otsuka, Ishikawa et al. 1971, Landolt 1973, Wilson 1986, Borrelli, Heyman et al. 1989, Carbajo-Perez and Watanabe 1990, Horvath and Kovacs 2002, Inoue, Mogi et al. 2002, Melmed 2003). A zona marginal (MZ) é considerada o primeiro nicho de células tronco/progenitoras na adenohipófise. A camada celular circundando a fenda abriga as células tronco, bem como as células progenitoras, em diferentes estágios de desenvolvimento. Estas células marginais raramente se dividem. Esta divisão pode ocorrer simetricamente, para dar origem a outra célula tronco, ou assimetricamente, gerando uma célula progenitora que migra para o território glandular do lobo anterior. Alguns dos principais marcadores de células tronco/progenitoras estão indicados próximos a MZ por colchetes (Figura 3). As células migram de acordo com o processo natural da transição epitélio-mesenquimal, o que é indicado pela expressão de

vimentina (Pérez Millán, Brinkmeier et al. 2016). Há, ainda, a atração de células tronco/progenitoras por gradientes de moléculas tróficas, como a neuturina, que migram se afastando da zona marginal. Estas células também formam clusters em ilhas no parênquima do lobo. Estes nichos secundários são formados e renovados de forma lenta e contínua por células tronco/progenitoras da zona marginal e a extensão do pool destas células é controlado e restrito pela demanda glandular de acordo com a quantidade de células, sobrevida, apoptose e diferenciação. Na renovação celular basal (Figura 3 - porção inferior esquerda), as células progenitoras pouco a pouco se diferenciam em células produtoras de hormônio. Em casos de aumento de demanda endócrina repentina (Figura 3 - porção inferior direita), as células progenitoras se diferenciam rapidamente no tipo celular recrutado, resultando em redução transitória do pool de células tronco/progenitoras, que é reparado simultaneamente através do aumento da atividade mitótica deste grupo celular. Portanto, estas células permanecem armazenadas na hipófise, prontas para responder às necessidades do sistema endócrino (Vankelecom 2012).

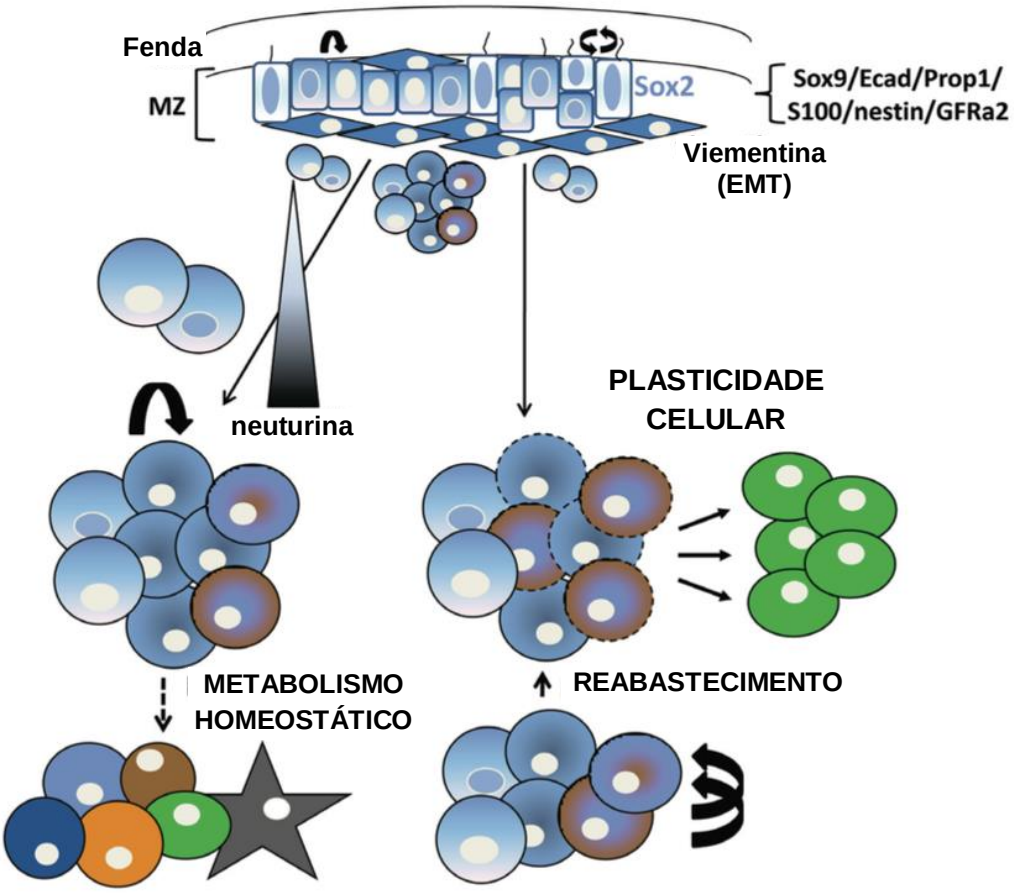

Figura 3. Nichos celulares de células tronco/progenitoras hipofisárias no período pós-natal. Mecanismos envolvidos na manutenção e diferenciação de células tronco/ progenitoras hipofisárias (Vankelecom 2012).

1.4.1 Principais marcadores de células tronco hipofisárias

Em diversos tecidos, células tronco têm sido identificadas baseado na expressão de fatores associados a este grupo celular, além de fatores embriogênicos, a capacidade de auto renovação e proliferação clonal, o potencial de diferenciação e/ou a habilidade de reparação tecidual após perda celular ou lesões. Alguns fatores expressos em células tronco/progenitoras hipofisárias e utilizados na identificação destas serão abordados nos próximos parágrafos.

O fator de transcrição SOX2 é necessário para manutenção de diversas subpopulações de células-tronco (Boiani and Scholer 2005, Fauquier, Rizzoti et al. 2008, Vankelecom and 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, Rizzoti et al. 2008). Mutações em heterozigose tanto em camundongos como humanos está associada ao hipopituitarismo com anormalidades variáveis na morfologia hipofisária (Kelberman, Rizzoti et al. 2006).

O SOX2, juntamente com SOX1 e SOX3, estão agrupados na subfamília B1 do grupo SOX e estão envolvidos em diversas fases do desenvolvimento embrionário e diferenciação celular, apresentando papel central na embriogênese (Pevny and 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, Rizzoti et al. 2006). O SOX2 é imprescindível para o desenvolvimento e função normais hipotálamo-hipofisária (Kelberman, Rizzoti et al. 2006), sua expressão constante na zona da marginal no período embrionário e na vida adulta o faz o principal marcador central de células tronco/ progenitoras na hipófise, capazes de suprir a demanda metabólica glandular (Fauquier, Rizzoti et al. 2008, Yoshida, Kato et al. 2011);

O fator de transcrição OCT4 (POU5F1) (“Octamer-binding protein 4”) contém o homeodomínio POU. Este fator de transcrição tem papel importante no desenvolvimento embrionário especialmente durante a embriogênese precoce, sendo necessário para a manutenção da pluripotencialidade da célula

tronco/progenitora (Rodda, Chew et al. 2005). Entre outros fatores estão o NANOG, um fator de transcrição relacionado à proliferação e autorrenovação de células-tronco (Cavaleri and Schöler 2003, Chambers, Colby et al. 2003, Rodda, Chew et al. 2005), o fator CD44 é uma glicoproteína de adesão celular que participa de uma série de funções celulares, (Williams, Motiani et al. 2013) e o fator de transcrição NR2E1 (TLX) é um marcador de células-tronco neuronais que foi descrito como regulador essencial da manutenção das células- tronco neuronais e da autorrenovação de neurônios no cérebro adulto (Shi, Chichung Lie et al. 2004).

1.5 Deficiência hipofisária hormonal múltipla

Deficiência hipofisária hormonal múltipla (MPHD, do inglês “Multiple Pituitary Hormonal Deficiency”) se caracteriza pela redução ou ausência de hormônio do crescimento (GH) associado a pelo menos um outro hormônio hipofisário diminuído. A prevalência de deficiência de hormônio de crescimento (DGH) é estimada em 1 a cada 8000 indivíduos mundialmente (*Genetics Home Reference, NIH*). MPHD é causada por fatores genéticos e ambientais. As causas genéticas de MPHD normalmente resultam em desenvolvimento hipofisário e secreção hormonal insuficientes, geralmente manifestados na primeira infância. Mutações em genes expressos no desenvolvimento cerebral, hipotalâmico e/ou hipofisário podem causar MPHD. Genes relacionados aos processos iniciais de desenvolvimento cerebral causam, além de MPHD, disfunções craniofaciais (MPHD sindrômica), enquanto variantes em genes expressos no hipotálamo, ou intrínsecos à glândula hipofisária, são responsáveis

pela forma não sindrômica da doença. A complexidade genética da MPHD pode ser explicada pela heterogeneidade dos fatores relacionados à esta condição, contribuindo para um amplo espectro fenotípico. Até então, trinta genes já foram relacionados à patogênese da MPHD, sendo os genes *GLI2*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *OTX2*, *POU1F1*, *PROP1* e *SOX2* os mais estudados.

1.5.1 Modelos animais de deficiência hipofisária hormonal múltipla

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 (Snell 1929). Além da redução do tamanho, 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, Saunders et al. 1990), com deficiência de GH, PRL e TSH (Camper, Saunders et al. 1990, Li, Crenshaw et al. 1990, Lin, Lin et al. 1992, Gage, Brinkmeier et al. 1996, Sornson, Wu et al. 1996, Nasonkin, Ward et al. 2004, Ward, Raetzman et al. 2005).

Embora a linhagem Ames (Figura 4) tenha sido descrita previamente (Bartke 1965, Cheng, Beamer et al. 1983), foi somente em 1991 que Buckwalter e colaboradores (Buckwalter, Katz et al. 1991) descreveram a localização da mutação no cromossomo 11, e, em 1996, Sornson e colaboradores (Sornson, Wu et al. 1996) fizeram a correlação com gene *Prop1*. 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 oitava semana de vida, no entanto, o volume hipofisário do camundongo mutante é cerca de oito vezes menor que o do selvagem (Ward, Raetzman et al. 2005, Ward, Stone et al. 2006).

Figura 4. Linhagem Ames. Camundongos selvagem (a direita) e com mutação espontânea em homozigose no gene *Prop1* (a esquerda) com oito semanas de vida (adulto).

Em humanos, variantes no gene *PROP1* estão associadas a deficiência de GH, PRL, TSH e gonadotrofinas, que podem evoluir e progredir com deficiência de ACTH (Bottner, Keller et al. 2004, Madeira, Nishi et al. 2017). Já no modelo Ames, mutante espontâneo do gene *Prop1*, nota-se a deficiência de GH, PRL, TSH, com gonadotrofinas parcialmente comprometidas e sem alteração corticotrófica (Nasonkin, Ward et al. 2011).

Além dos distúrbios hormonais, o desenvolvimento hipofisário de animais *Prop1*$^{df/df}$ também é afetado. Há um bloqueio na migração ventral, resultando em dismorfismo da bolsa de Rathke e hipoplasia do lobo anterior, observados no E14.5 (Nasonkin, Ward et al. 2004, Raetzman, Ross et al. 2004, Ward, Raetzman et al. 2005). Ao nascimento, o dismorfismo persiste, apesar da glândula ser normoplásica. Devido a ausência do gene *Prop1*, o *Pou1f1* (*Pit1*) não é ativado, comprometendo a linhagem PIT1 dependente e levando a não expansão glandular durante o desenvolvimento pós-natal. Por volta dos onze dias após o nascimento (P11), observa-se hipoplasia hipofisária, parcialmente atribuída a intensa atividade apoptótica das células luminais estratificadas, devido a vascularização deficiente (Figura 5).

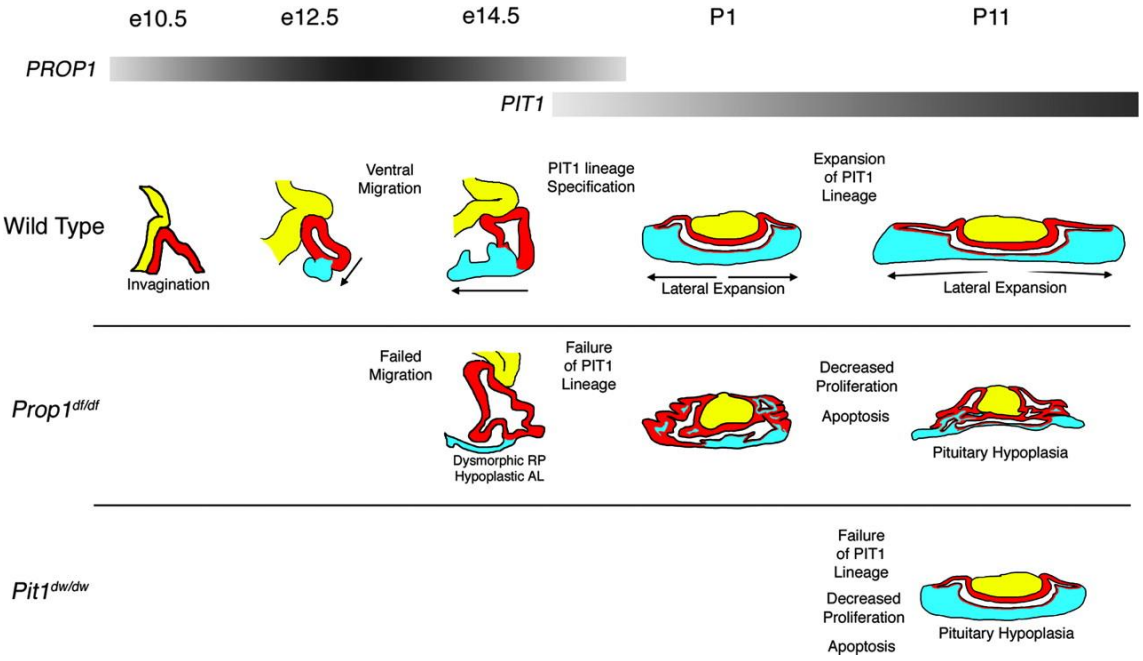

Figura 5. Desenvolvimento hipofisário em camundongo normal e com deficiência dos fatores de transcrição *Prop1* e *Pit*. O desenvolvimento hipofisário em camundongos normais tem início com a invaginação do ectoderma oral para formar a bolsa de Rathke. Ao E12.5, com o pico de expressão de *Prop1*, as células progenitoras migram ventralmente para o lobo anterior em desenvolvimento e diferenciam. Ao E14.5, a ativação do *Pit1* sinaliza

a especificação da linhagem PIT1 dependente. Após o nascimento, de P1 a P11, a linhagem PIT1 inicia proliferação ativa e o lobo anterior é expandido lateralmente. Nos animais *Prop1*$^{-/-}$, a migração ventral é bloqueada, resultando na dismorfologia da fenda de Rathke e hipoplasia do lobo anterior por volta do E14.5. A hipófise *Pit1*$^{-/-}$ não exibe qualquer dismorfologia ou alterações vasculares. As células migram da bolsa de Rathke ao lobo anterior, mas a linhagem PIT1 não é capaz de se diferenciar. Isto causa a redução da proliferação durante o desenvolvimento pós-natal e hipoplasia hipofisária que é acompanhada por um aumento na apoptose. Os perfis de expressão de *Prop1* e *Pit1* é mostrado nas barras superiores em tons de preto. Amarelo, lobo posterior em desenvolvimento; Vermelho, células luminais estratificadas; Azul, células do lobo anterior (Ward, Stone et al. 2006).

Justificativa

Diante dos dados da literatura que demonstram a capacidade hipofisária de se regenerar após dano induzido, passando a diferenciar células tronco no tipo celular ablado em modelos transgênicos. Além do recrutamento de células tronco hipofisárias para suprir demandas fisiológicas em períodos de alta demanda. Nota-se a ausência de estudos que demonstram se tais fenômenos ocorrem em um modelo de hipopituitarismo congênito durante um período de alta demanda hipofisária, como a puberdade. Portanto, este estudo contribuirá à literatura com dados que demonstram a capacidade hipofisária de formar seus diferentes tipos celulares a partir de células tronco para suprir o aumento fisiológico da demanda hormonal que ocorre em camundongos normais durante a maturação sexual, ou mutante na ausência do fator de transcrição PROP1, importante para a diferenciação terminal de células hipofisárias.

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar e confirmar o padrão de expressão do marcador de células tronco hipofisárias *Sox2* e dos genes codificadores dos hormônios GH, LH, FSH, TSH e PRL em camundongos com mutação espontânea no gene *Prop1* no período puberal.

3.2 Objetivo específico

3.2.1 Caracterizar e correlacionar a expressão dos marcadores de proliferação, fatores de transcrição e diferenciação celular hipofisários em camundongos com mutação espontânea no gene *Prop1* no período puberal;

3.2.2 Confirmar o padrão de expressão transcricional encontrado a nível proteico na hipófise e plasma;

3.2.3 Analisar a histologia gonadal dos camundongos com mutação espontânea no gene *Prop1* e correlacioná-la aos dados transcricionais e proteicos.

Metodologia

4.1 Natureza do Estudo

Trata-se de um estudo experimental longitudinal desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no centro de bioterismo, que avaliou padrões de expressão gênica em camundongos com mutação espontânea no gene *Prop1* nos períodos P30 e P40 (período puberal).

4.2 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o registro nº 942/2017 (Anexo A) e desenvolvido com o auxílio do ARRIVE "guidelines" (Kilkenny, Browne et al. 2010) seguindo os princípios éticos da legislação brasileira de acordo com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos do CONCEA(MCTI 2013, MCTI 2015).

O estudo utilizou material coletado do projeto "Análise de marcadores de células-tronco/progenitoras em hipófises de modelos animais com hipopituitarismo", aprovado pela CEUA em 19/10/2014, sob o número 118/10.

4.3 Descrição da Linhagem

Foram utilizados camundongos com "background" da linhagem DF/B – *p*/+, *Prop1*^{df}, Ames. Nestes animais ocorre a troca espontânea de uma timina (T) por citosina (C) na posição 475 do cDNA (ENSMUST00000051159) levando a substituição de uma serina por uma prolina no códon 83. Os camundongos da linhagem Ames com a variante p.Ser83Pro em homozigose apresentam um retardo de crescimento após a primeira semana pós-natal, as fêmeas e machos

foram previamente caracterizados como inférteis, tendo GH e PRL indetectáveis e déficit de TSH, na vida adulta (6 semanas). Os animais com a mesma variante em heterozigose apresentam fenótipo semelhante ao selvagem.

4.4 Animais

Foram obtidos, por meio do cruzamento de fêmea e macho heterozigotos, animais com a variante p.Ser83Pro em homozigose. Os animais foram mantidos de acordo com o protocolo de manutenção do biotério central da Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo, com ciclo claro/escuro de 12 horas, água e ração padrão de purina “ad libitum”. Os sacrifícios foram realizados utilizando o anestésico inalatório isofluorano (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brasil), com posterior coleta de sangue via veia cava inferior, coleta das gônadas e decapitação para coleta de hipófise. Os animais mutados e selvagem foram pareados para sexo e idade, pesados e o comprimento naso-anal mensurado. Por fim, as amostras foram coletadas e dispostas em grupos de acordo com o experimento ao qual seriam submetidas, conforme demonstrado na Tabela 1.

Imediatamente após o sacrifício, o sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca. Os animais foram decapitados e foi realizada uma craniectomia látero-superior, separação da calota craniana e afastamento do encéfalo para acesso hipofisário e coleta da glândula. Posteriormente, as gônadas foram coletadas.

Tabela 1. Animais utilizados para avaliar a morfologia gonadal e hipofisária, expressão gênica e proteica nos períodos P30 e P40

Sexo	Genótipo	qPCR (n)	IF (n)	Histologia (n)	Dosagem hormonal (n)
Fêmea	+/+	5	3	3	4
	-/-	5	3	3	4
Macho	+/+	5	3	3	4
	-/-	5	3	3	4

Nota: IF – Imunofluorescência

4.5 Genotipagem

O DNA das caudas dos animais foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Truett e colaboradores (Truett, Heeger et al. 2000) (Anexo B) e, posteriormente, utilizado para amplificação por PCR do fragmento de 582 pares de base que inclui o códon 83 do gene *Prop1* (Primer Senso – 5' CGCAACAGTGATGTGAGGATGG 3'; Primer Reverso – 5' AAGGCTGGAGTGTCGGTCTTGA 3'), alterados nos animais portadores da variante Ser83Pro. A genotipagem foi então realizada seguindo o protocolo previamente estabelecido por Dollé e colaboradores (Dollé, Snyder et al. 2001) (Anexo C).

4.6 Sexagem

As amostras cujo sexo não pode ser determinado visualmente foram submetidas ao protocolo de sexagem descrito por Clapcote e Roder (Clapcote and Roder 2005)(Anexo D). Este protocolo constitui-se da amplificação por PCR dos fragmentos de 302 e/ou 331 pares de base, que incluem os genes *Jarid1c* (específico do cromossomo X) e *Jarid1d* (específico do cromossomo Y) utilizando os primers específicos para regiões compartilhadas entre ambos os genes (Primer Senso – 5' CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG 3'; Primer Reverso – 5' GGTTTCTTAAACCGTCACC 3').

4.7 Dados antropométricos

O comprimento naso-anal dos animais foi mensurado em centímetros por régua convencional graduada em milímetros. O peso foi avaliado em balança com sensibilidade para detectar variações da ordem de miligramas. Os dados foram coletados e as médias e desvio padrão dos valores foram definidos.

4.8 RT-qPCR

4.8.1 Extração de RNA

O RNA mensageiro para análise de expressão gênica foi obtido através da extração de RNA total das hipófises de camundongos isoladamente, separadas por sexo e genotipagem. O RNA foi extraído utilizando o "RNeasy Mini Kit" (QIAGEN, Valencia, CA, USA), conforme recomendações do fabricante (Anexo

E). Após a eluição do RNA, o material foi quantificado em aparelho espectrofotômetro NanoPhotometer P-300 (Implen, Munique, Alemanha) e foi determinada a pureza das amostras através das relações 260/280 e 260/230, sendo consideradas para transcrição reversa as amostras com relações maiores que 1,8 e 2,0, respectivamente. A integridade do RNA foi estabelecida por meio da visualização das bandas correspondentes as subunidades 28S e 18S de RNA ribossomal. Por fim, o material foi estocado a -80ºC.

4.8.2 Transcrição Reversa

O DNA complementar foi sintetizado a partir de 500 nanogramas de RNA total. E a transcrição reversa foi realizada através do kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo F).

4.8.3 Análise da expressão gênica

4.8.3.1Primers

Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer-Blast (NCBI) em regiões com 50% a 60% de GC e sequências alvo específicas com 75 a 150 pb. Estruturas secundárias para os mRNAs dos “amplicons” foram descartadas através do programa MFOLD. Os primers dos genes *Sox2*, *Nr2e1*, *CD44*, *Nanog*, *Hesx1*, *Otx2*, *S100β*, *Ki67*, *Sox9*, *Sox3*, *Sox2*, *Lh*, *Fsh*, *Gh*, *Tsh*, *Prl* e *Cga* foram

previamente descritos na literatura (Anexo G). As sequências nucleotídicas de cada primer estão detalhadas no Anexo G.

4.8.3.2 Validação

Todas as reações foram validadas de acordo com as diretrizes do "Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments" (MIQE) (Bustin, Benes et al. 2009).

4.8.3.3 Determinação da temperatura de anelamento

A temperatura que corresponde a maior eficiência de anelamento dos primers às sequências alvo foi determinada através de um gradiente em PCR convencional nas temperaturas de 54ºC, 55ºC, 57ºC, 60ºC e 62ºC. A especificidade de cada primer e temperatura foi determinada por meio da visualização de banda única com fragmento de tamanho correspondente ao "amplicon" esperado em gel de agarose 2%. Controles negativos para testar contaminação dos reagentes utilizados foram incluídos em todas as reações.

4.8.3.4 Otimização da concentração de primers

As concentrações ideais de primers para se obter o menor ciclo "threshold" (C_T), minimizando amplificação não específica, foram determinadas através de reações com concentrações variadas de primers senso e reverso (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de primers senso e reverso utilizada para validação

Primer reverso (nM)	**Primer senso (nM)**		
	50	**300**	**900**
50	50/50	50/300	50/900
300	300/50	300/300	300/900
900	900/50	900/300	900/900

Após a reação, os resultados foram tabulados e foi determinada, para as demais reações, a concentração ótima de menor C_T e ausência de amplificação inespecífica. As reações foram realizadas em quadriplicata e todos os produtos foram analisados em gel de agarose a 1% e curva de "melting".

4.8.3.5 Curva padrão

A eficiência de amplificação da qPCR foi determinada através da curva padrão com cinco diluições seriadas partindo de 500ng de RNA (500, 200, 100, 50, 25 ng) de amostras de animais selvagens e mutados. A partir dos dados obtidos, foi gerado um gráfico com os valores dos C_T's versus os fatores de diluição e fez-se uma análise de regressão linear a partir da inclinação da curva (R^2). A eficiência foi calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{Eficiência da PCR} = [10^{(-1/\text{inclinação da curva})} - 1] \times 100$$

Foram consideradas ideais as reações com eficiência entre 90% a 105%, ou seja, com resultados de R^2 próximos a um.

4.8.3.6 qPCR

Os cDNAs foram utilizados para análise da expressão gênica utilizando o kit “SYBR™ Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante (Anexo H).

Foram analisados genes codificadores de hormônios hipofisários, fatores de transcrição, marcadores de células-tronco/progenitoras, marcadores de proliferação e diferenciação celular e genes endógenos (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos genes utilizados na análise de expressão

Hormônios hipofisários		
Gene	**Referência**	**Descrição**
Gh	NM_008117	*Growth hormone*
Lh	NM_008497	*Luteinizing hormone beta subunit*
Fsh	NM_008045	*Follicle stimulating hormone beta subunit*
Tsh	NM_009432	*Thyroid stimulating hormone beta subunit*
Prl	NM_001163530	*Prolactin*
Cga	NM_009889	*Glycoprotein hormones alpha subunit*
Fatores de transcrição hipofisários		
Sox3	NM_009237	*SRY-box containing gene 3 (Sox3), mRNA*
Hesx1	NM_010420	*Homeobox gene expressed in ES cells (Hesx1)*
Otx2	NM_144841	*Orthodenticle homolog 2 (Otx2), mRNA*
Marcadores de células-tronco/progenitoras		
Sox2	NM_011443	*SRY-box containing gene 2 (Sox2), mRNA*
Nanog	NM_028016	*Nanog homeobox (Nanog), mRNA*
Cd44	NM_009851	*CD44 antigen (Cd44), transcript variant 1, mRNA*
Nr2e1	NM_152229	*Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1*
Marcadores de proliferação e diferenciação celular		
Ki67	NM_001081117	*Antigen identified by monoclonal antibody Ki67*
Sox9	NM_011448	*SRY-box containing gene 9 (Sox9), mRNA*
S100β	NM_009115	*S100 protein, beta polypeptide, neural (S100b)*
Endógenos		
Actb	NM_007393	*Actin beta*
Hprt	NM_013556	*Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*

As amostras foram amplificadas em um termociclador “AriaMx Real-Time PCR System” (Agilent, Santa Clara, CA, USA) e a expressão dos genes foi normalizada utilizando amostras de hipófises dos animais selvagens pareados para sexo e idade e o gene endógeno de menor variabilidade.

A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak e Schmittgen (Livak and Schmittgen 2001), em que o ΔCT representa a diferença de expressão entre o gene-alvo e o endógeno da mesma amostra e o ΔΔCT corresponde a diferença entre o ΔCT da amostra mutante e o ΔCT do calibrador 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 “fold change”. Cada amostra foi reproduzida em triplicata.

4.9 Dosagem hormonal sérica

4.9.1 Coleta

Imediatamente após a eutanásia dos camundongos, o sangue total foi coletado em tubo seco com gel separador por meio de punção cardíaca. O sangue total foi mantido por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir a coagulação e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 1000g. O soro foi removido e armazenado a -20ºC.

4.9.2 Imunoensaio

Os hormônios hipofisários GH, LH, FSH, TSH e PRL foram quantificados no soro dos camundongos mutados e controles utilizando o painel de ensaio multiplex “Mouse Pituitary Magnetic Bead Panel” (MPTMAG-49K, Merck, USA). O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram diluídas na proporção de 1:2 no buffer do ensaio e adicionadas a placa de ensaio juntamente aos controles e padrões disponibilizados pelo kit e, após a adição dos reagentes e incubações necessárias, a intensidade das fluorescências emitidas foram lidas em um equipamento Luminex 200TM (Luminex, USA) e processadas e analisadas por meio do software Milliplex Analyst 3.5.5.0 (Merck, USA) utilizando uma curva padrão e controles disponibilizados com o kit.

4.10 Imunohistoquímica

As amostras foram previamente cortadas em micrótomo rotativo automático Leica RM2255 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), distendidas em banho-maria à 50ºC e submetidas a secagem completa em estufa Orion 515 (FANEM, São Paulo, SP, Brasil) a 60ºC. Algumas lâminas foram selecionadas para coloração histológica de hematoxilina-eosina para evidenciar as estruturas citoplasmáticas e nucleares do tecido.

As lâminas de melhor qualidade morfológica foram selecionadas para marcações com anticorpo contra SOX2. As lâminas foram desparafinadas com xilol, hidratadas em etanol e lavadas 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 bloqueio de proteínas inespecíficas. A etapa seguinte consistiu da cobertura com anticorpo primário anti-SOX2 (título: 1/1600) crescido em coelho (ab97959, Abcam, San Francisco, CA, USA). As lâminas permaneceram a temperatura ambiente por 12 horas. O polímero com anticorpo anti-coelho marcado com HRP ("Horseradish Peroxidase") foi acrescentado e a revelação final realizada com DAB (Diaminobenzidina, tetracloridrato) (Sigma D5637) (Anexo I).

4.11 Imunofluorescência

4.11.1 Coleta e preparo das amostras

Imediatamente após a coleta, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e DMSO 1% e mantidas a 4ºC até que o protocolo fosse continuado.

4.11.2 Reação de Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada para determinar a estrutura em três dimensões das hipófises de camundongos Ames mutados e controles, para avaliação da expressão dos hormônios hipofisários a nível proteico e análise volumétrica da hipoplasia hipofisária já descrita e observada no camundongo Ames. As amostras foram submetidas a três lavagens de cinco minutos cada em PBS 1x além de desidratação gradual com metanol 25%, 50%, 75% e 100% por

cinco minutos cada e uma incubação overnight a -20ºC. As amostras foram reidratadas gradualmente com metanol (25%, 50%, 75% e 100%)/PBT 0.5% (PBS 1x e Triton 0,5%) por cinco minutos cada e incubadas em acetona a -20ºC por nove minutos e, logo após, incubadas em colagenase (1mg/mL) a temperatura ambiente sob leve agitação. Foram realizadas três lavagens em PBT 0,5% por cinco minutos cada e feita uma incubação de bloqueio “overnight” com buffer de incubação (IB) a 4ºC. Foi retirado o IB e acrescentados os anticorpos primários anti-SOX2 (ab97959, Abcam, UK) e anti-hormônios GH, LH e FSH na concentração de 1:250 e as amostras foram então incubadas overnight a 4ºC. Foram realizadas seis lavagens de 15 minutos em PBT 0,5% e as amostras foram incubadas em IB por duas horas a temperatura ambiente e sob leve agitação. Foi realizada uma incubação com iodeto de propídeo (excitação: 358nm e emissão: 463nm), para a coloração dos núcleos, na proporção de 1:1000 e o fluoróforo Alexa Fluor®488 (excitação: 493nm e emissão: 520nm) a 4ºC overnight em câmara escura. Os anticorpos secundários foram removidos em seis lavagens de 15 minutos em PBT 0,5% e a amostra foi por fim disposta em lâmina específica com agarose 1%. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência confocal Zeiss LSM 780-NLO (Carl Zeiss, USA) e o processamento e análise das imagens foi realizado no software “ZEN Black Microscope and Imaging” (Carl Zeiss, USA).

4.11.3 Determinação da intensidade de emissão de fluorescência

A intensidade de emissão de fluorescência do marcador de células tronco hipofisárias SOX2 e dos hormônios hipofisários GH, LH e FSH foi determinada

por meio da média de intensidade de emissão das fluorescências de dez campos independentes em três imagens de cada grupo de estudo (controles e Ames mutado). Os dados foram representados em unidade arbitrária.

4.12 Análise histológica das gônadas

Avaliação histológica das gônadas de camundongos machos e fêmeas do grupo mutado e controle foi realizada. Após o sacrifício, a cavidade abdominal dos animais foi aberta e os ovários e testículos removidos, o excesso de gordura dissecado e as gônadas fixadas por imersão em parafolmaldeído 4% por 24 horas. Após a fixação, foi realizada a desidratação gradual em solução crescente de álcool etílico e incluídos em parafina.

A análise gonadal deu-se por cortes seriados de 5 µm de espessura dos blocos de parafina, adotando como referência o eixo vertical de cada órgão (sentido longitudinal). Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Os folículos foram categorizados em quatro classes: pequenos (folículos primordiais e primários – com uma camada de células escamosas ou cúbicas na granulosa), em desenvolvimento (com mais de uma camada de células na granulosa), antrais (com presença de antro) e pré-ovulatórios (com presença de uma rima de células do cumulus ao redor do oócito).

Os testículos foram categorizados de acordo com o escore de Johnsen, por meio da análise de túbulos seminíferos isolados e média de escores encontrados em cada túbulo, que foram classificados de acordo com as

características descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição do Escore de Johnsen

Pontuação	Descrição
10	Espermatogênese completa com muitos espermatozoides. Epitélio germinativo organizado, com espessura regular e luz aberta.
9	Muitos espermatozoides. Epitélio germinativo desorganizado, com evidente descolamento ou obliteração do lúmen.
8	Apenas alguns espermatozóides. (<5 – 10)
7	Ausência de espermatozóides e presença de muitas espermátides.
6	Ausência de espermatozóides e presença de algumas espermátides. (<5 – 10)
5	Ausência de espermatozoides e espermátides. Presença de muitos espermatócitos.
4	Ausência de espermatozoides e espermátides. Presença de alguns espermatócitos. (<5)
3	Presença de espermatogônias.
2	Ausência de células germinativas e presença de células de Sertoli.
1	Ausência de células.

Fonte: (Johnsen, 1970)(Johnsen 1970)

4.13 Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando o software “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS) versão 24.0 (SPSS Inc., USA).

Os resultados foram representados pela média e/ou mediana ± desvio-padrão. Todos os dados foram testados para a normalidade de distribuição dos valores pelo teste de Shapiro-Wilk e para a homogeneidade da variância pelo teste de Levene (Field 2009).

Variáveis contínuas e normalmente distribuídas foram avaliadas através de teste t de “student”, enquanto que as variáveis não distribuídas normalmente e com variância não homogênea foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença entre as médias dos grupos estudados. Estas mesmas variáveis foram também avaliadas pelo teste Mann-Whitney. Foram considerados significativos os valores menores a 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

A determinação dos padrões de expressão de genes codificadores dos marcadores de células tronco hipofisárias, fatores de transcrição, marcadores de proliferação e diferenciação e hormônios hipofisários foram determinados e correlacionados aos níveis circulantes dos hormônios hipofisários, expressão proteica hipofisária de SOX2, GH, LH e FSH, além da resposta gonadal aos estímulos das gonadotrofinas hipofisárias em um modelo de hipopituitarismo congênito com mutação espontânea no gene *Prop1*.

Neste modelo, foi determinado que machos e fêmeas apresentam comprimento e peso reduzidos em comparação ao camundongo controle normal de mesmo sexo e idade (Figura 2 e Tabela 5).

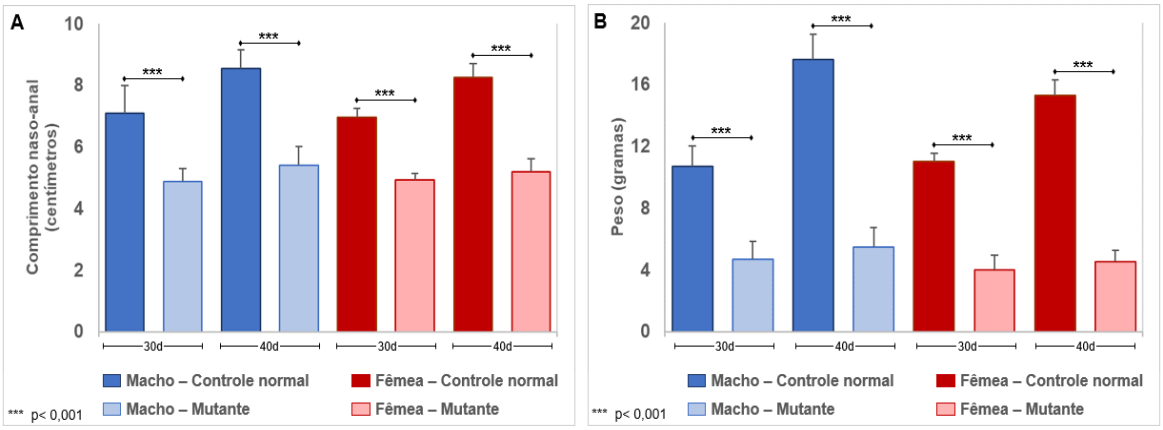

Figura 6. Dados antropométricos de comprimento naso-anal (A) e peso (B) de camundongos Ames (barras azuis e vermelhas claras) comparados a controles normais (barras azuis e vermelhas escuras) nos períodos de 30 dias (30d) e 40 dias (40d).

Tabela 5. Dados antropométricos de camundongos Ames comparados a controles normais nos períodos P30 e P40.

Grupo	Genótipo	n	Peso (Média)	DP	p	Comprimento (Média)	DP	p
Fêmea 30d	+/+	6	11,04	0,49	<0,0001	6,96	0,29	<0,0001
	-/-	6	4,02	0,95		4,92	0,22	
Fêmea 40d	+/+	5	15,30	1,01	<0,0001	8,26	0,45	<0,0001
	-/-	6	4,51	0,76		5,2	0,43	
Macho 30d	+/+	6	10,71	1,33	<0,0001	7,1	0,91	0,0003
	-/-	6	4,71	1,16		4,88	0,43	
Macho 40d	+/+	6	17,64	1,60	<0,0001	8,56	0,61	<0,0001
	-/-	6	5,46	1,29		5,42	0,60	

5.1 qPCR

Como a variação entre as expressões do genes avaliados neste estudo foram normais e sem diferença estatística entre o sexos, os resultados da análise transcricional é representado como a média entre os grupos de macho e fêmea mutados e normais de cada período analisado.

- **Puberdade: P30**

As hipófises de animais Ames e controles normais de ambos os sexos foram coletadas no trigésimo dia após o nascimento, correspondendo ao início da maturação sexual do camundongo normal (quarta semana do desenvolvimento pós-natal). Os resultados estão descritos nas figuras abaixo (Figuras 7-10, Dados brutos Anexo I).

- **Marcadores de células tronco/progenitoras**

Nos camundongos mutados observa-se o aumento da expressão relativa de todos os marcadores de células tronco/progenitoras, com relevância estatística para todos os genes avaliados, inclusive o gene *Sox2*, principal marcador de células tronco/ progenitoras hipofisárias (Figura 7, Dados brutos Anexo I).

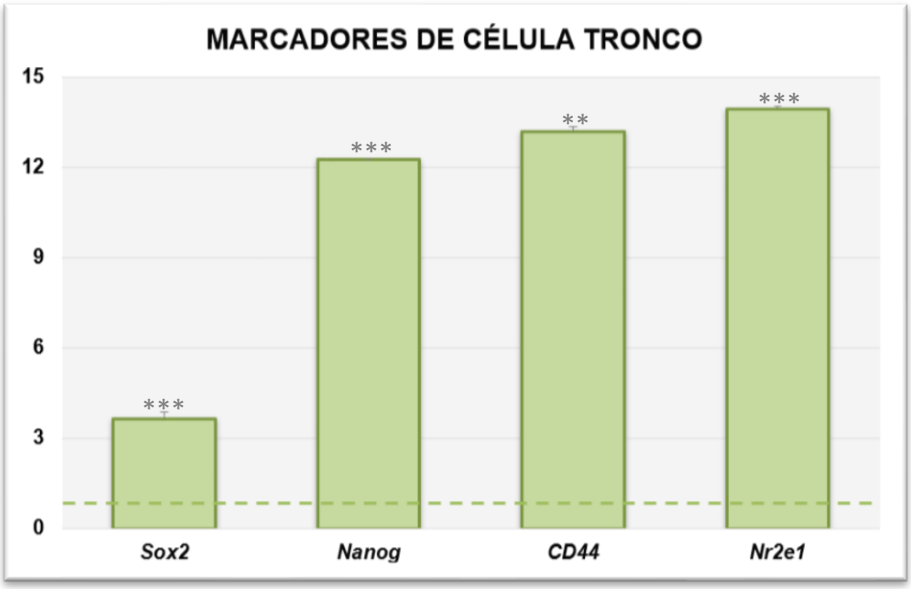

Figura 7. Expressão relativa dos genes marcadores de células tronco/progenitoras no P30 do animal Ames (n=10).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P30 em relação ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

- **Marcadores de proliferação e diferenciação celular**

Observa-se a diminuição da expressão relativa do marcador de proliferação celular *Ki67*, com consequente aumento na expressão dos marcadores de diferenciação *Sox9* e *S100β* (Figura 8, Dados brutos Anexo I).

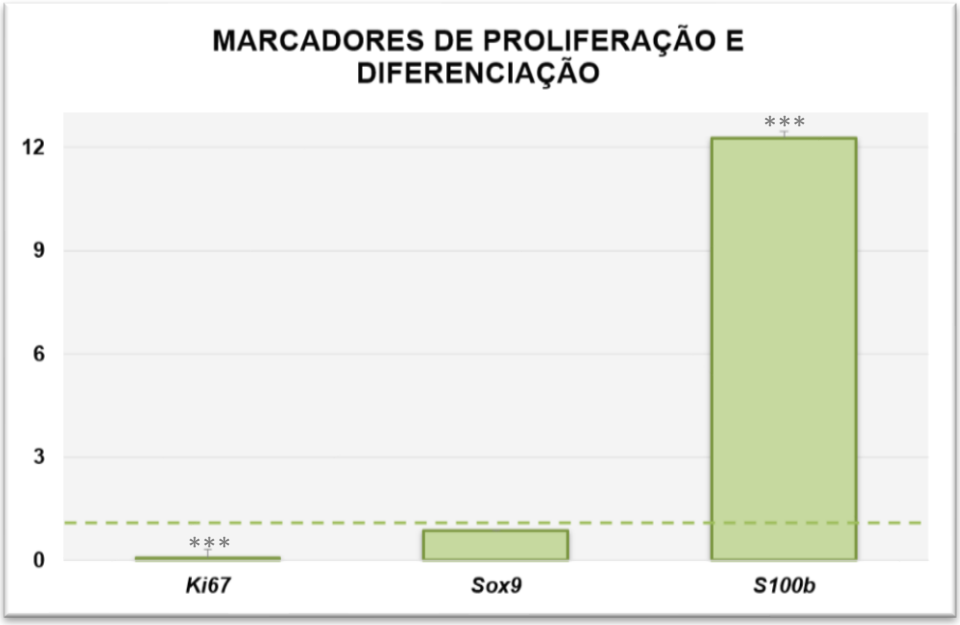

Figura 8. Expressão relativa dos genes marcadores de proliferação e diferenciação celular no P30 do animal Ames (n=10).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P30 em relação ao selvagem, representado como 1. ***p<0,001.

- **Fatores de transcrição hipofisários**

Observa-se o aumento da expressão relativa dos fatores de transcrição hipofisários precoces *Otx2*, *Sox3* e *Hesx1* (Figura 9, Dados brutos Anexo I).

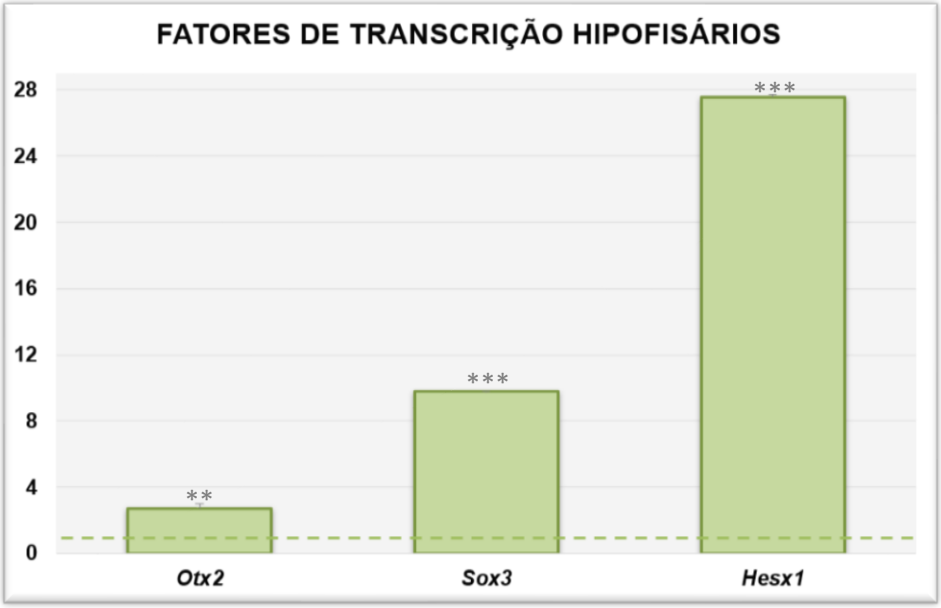

Figura 9. Expressão relativa dos genes codificadores dos fatores de transcrição hipofisários no P30 do animal Ames (n=10).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P30 em relação ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

- **Hormônios hipofisários**

Apesar da mutação espontânea presente no fator de transcrição hipofisário *Prop1*, observa-se o aumento da expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários FSH e TSH, enquanto a expressão dos genes codificadores dos hormônios PRL, GH, LH e CGA apresenta-se reduzida (Figura 10, Dados brutos Anexo I).

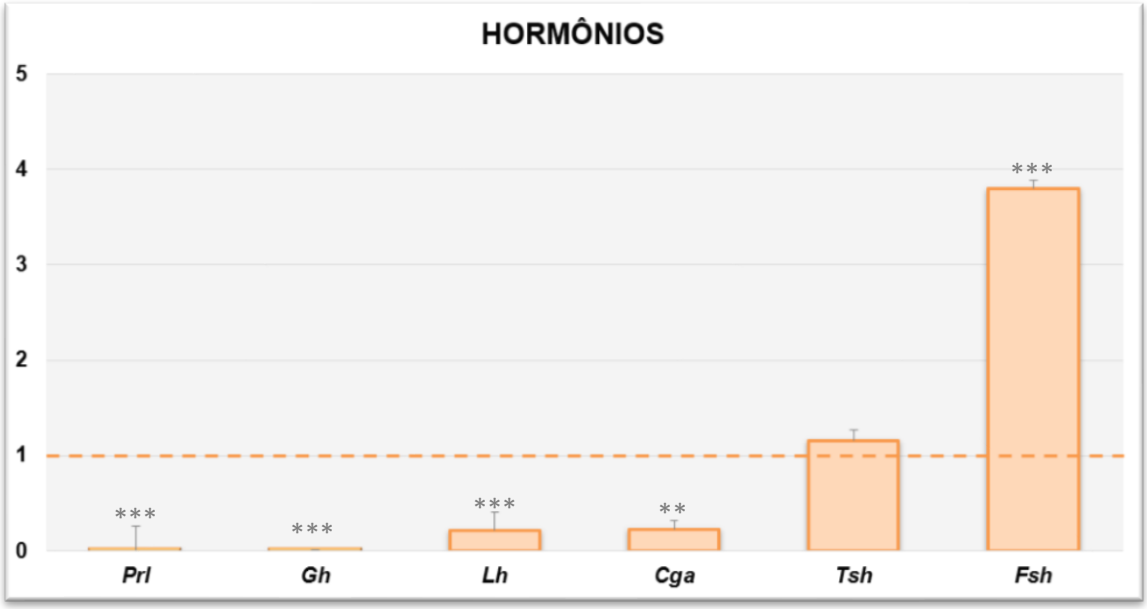

Figura 10. Expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários no P30 do animal Ames (n=10).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P30 em relação ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

Puberdade: P40

As hipófises de animais Ames e controles normais de ambos os sexos foram coletadas no quadragésimo após o nascimento, correspondente ao período de maturação sexual completa no camundongo normal (quarta semana do desenvolvimento pós-natal). Os resultados podem ser observados nas figuras abaixo (Figuras 11- 14, Dados brutos Anexo I).

- **Marcadores de células tronco/progenitoras**

Nesse grupo de fêmeas mutante e selvagem observa-se a redução da expressão relativa de todos os marcadores de células tronco/progenitoras com

relevância estatística para todos os genes avaliados (Figura 11, Dados brutos Anexo I).

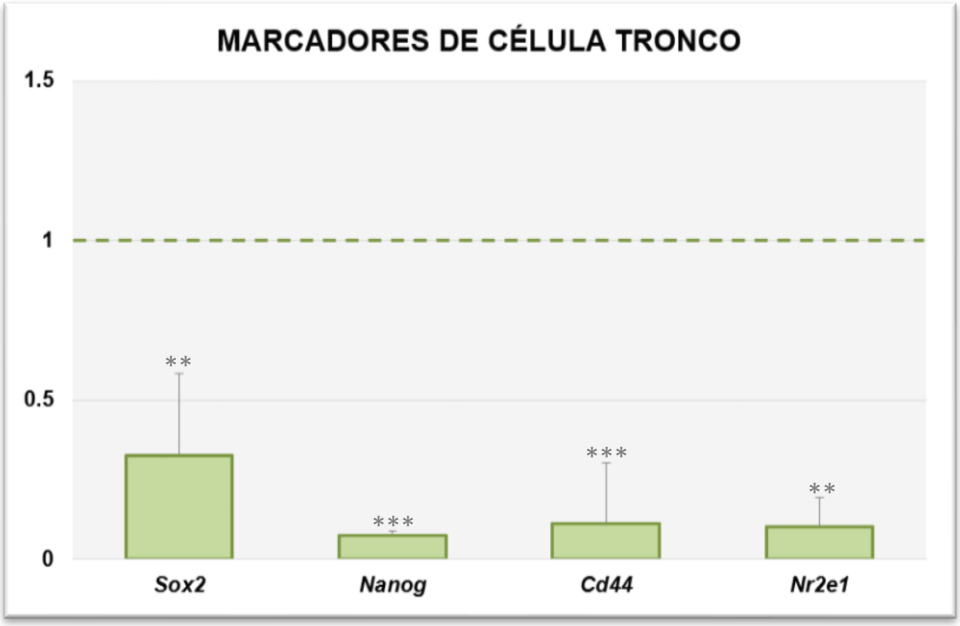

Figura 11. Expressão relativa dos genes marcadores de células tronco/progenitoras no P40 do animal Ames (n=10).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

- **Marcadores de proliferação e diferenciação celular**

Em P40 observa-se a diminuição da expressão relativa do marcador de proliferação celular *Ki67* e dos marcadores de diferenciação celular *Sox9* e *S100β* (Figura 12, Dados brutos Anexo I).

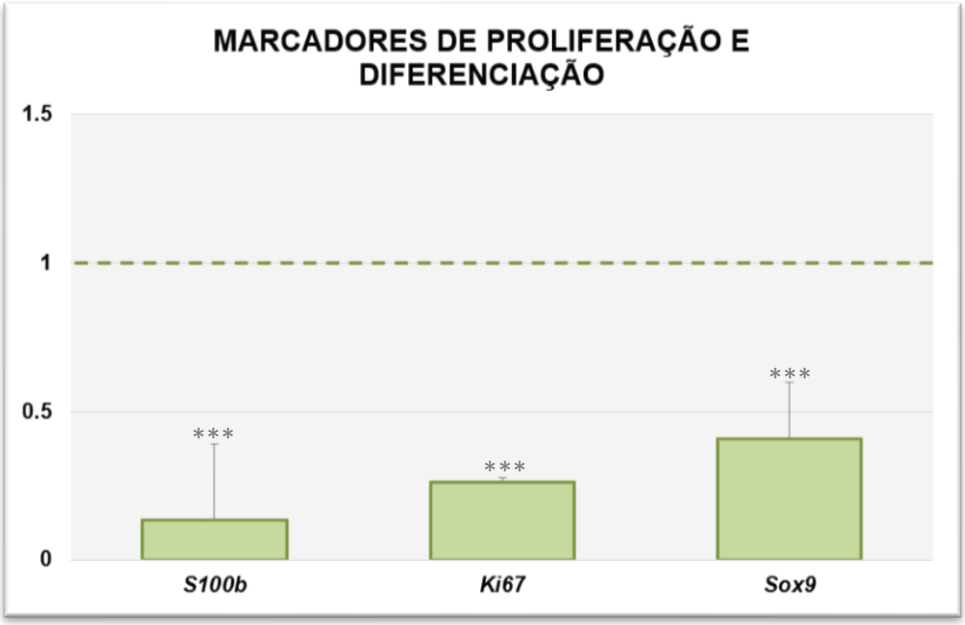

Figura 12. Expressão relativa dos genes marcadores de proliferação e diferenciação celular em P40 do animal Ames (n=10).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. ***p<0,001.

- **Fatores de transcrição hipofisários**

Observa-se a redução da expressão dos fatores de transcrição hipofisários *Hesx1* e *Sox3* e o aumento da expressão relativa do *Otx2* (Figura 13, Dados brutos Anexo I).

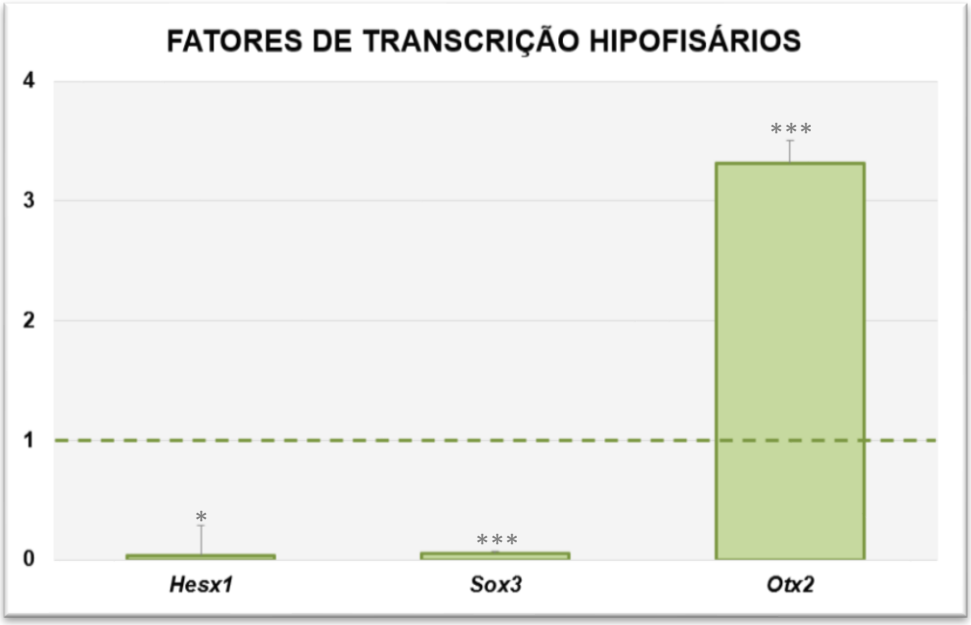

Figura 13. Expressão relativa dos genes codificadores dos fatores de transcrição hipofisários em P40 do animal Ames (n=10).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. *p<0,05 e ***p<0,001.

- **Hormônios hipofisários**

As amostras coletadas no P40 (quarta semana do desenvolvimento pós-natal) apresentam aumento da expressão de FSH. Além disso, observa-se o aumento da expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios LH, PRL e GH. Há ainda a redução da expressão dos genes codificadores da subunidade alfa glicoproteica CGA, somada a redução da expressão do gene codificador do TSH (Figura 14, Dados brutos Anexo I).

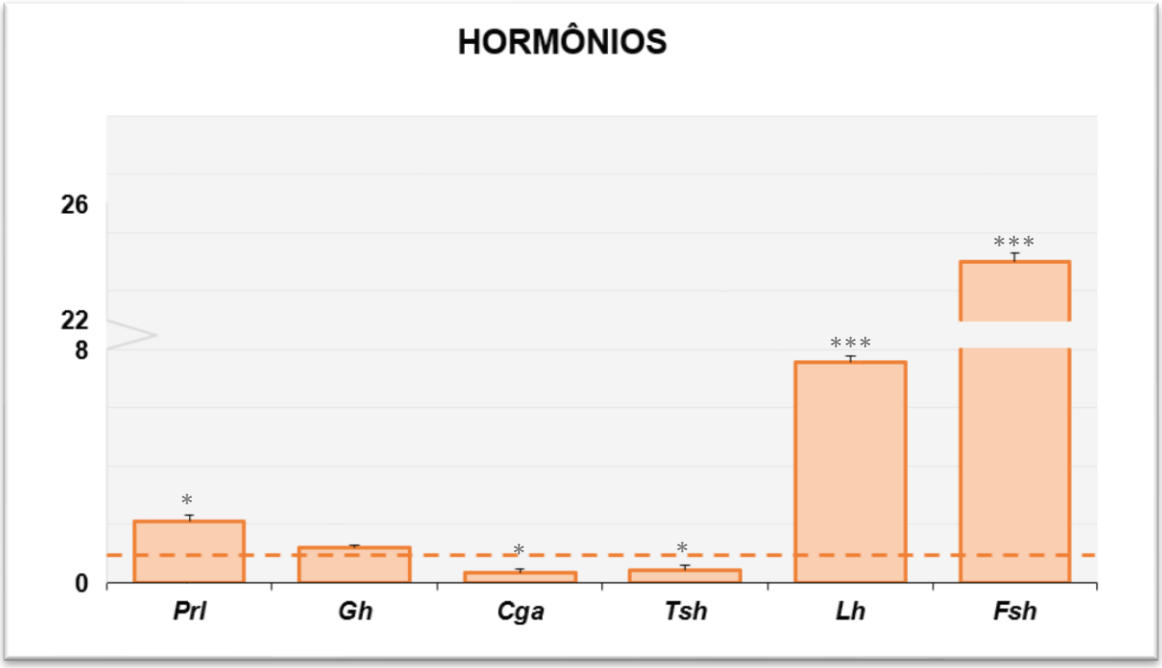

Figura 14. Expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários no P40 do animal Ames (n=10).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. *p<0,05 e ***p<0,001.

Adulto

A expressão dos marcadores de células tronco/progenitoras, proliferação, diferenciação, dos fatores de transcrição e genes codificadores dos hormônios hipofisários foi avaliada em camundongos mutados e controles normais na vida adulta P60 (oitava semana do desenvolvimento pós-natal) como controle negativo para expressão dos hormônios hipofisários.

- **Marcadores de células tronco/progenitoras**

Observa-se a expressão semelhante dos marcadores de célula tronco/progenitoras *Nanog* e *Nr2e1* em camundongos mutados e selvagens e aumento da expressão do marcador de células tronco/ progenitoras hipofisárias *Sox2* e do *Cd44* em P60 de camundongo macho (Figura 15, Dados brutos Anexo I).

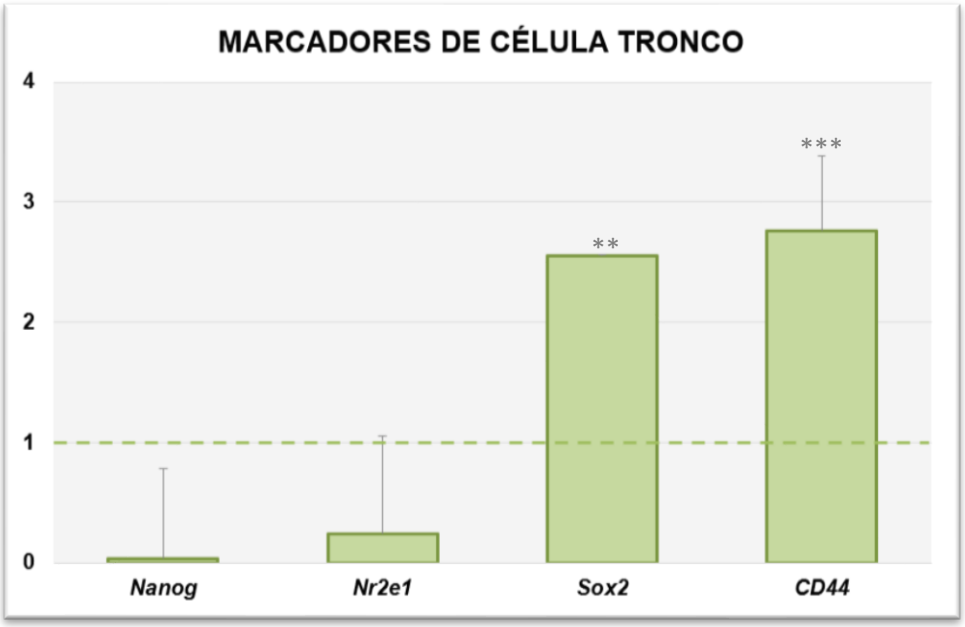

Figura 15. Expressão relativa dos genes marcadores de células tronco/progenitoras na vida adulta do animal Ames (n=6).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

- **Marcadores de proliferação e diferenciação celular**

Observa-se a diminuição da expressão relativa do marcador de proliferação celular *Ki67* e do marcador de diferenciação *S100β*, com aumento na expressão do marcador de diferenciação *Sox9* (Figura 16, Dados brutos Anexo I).

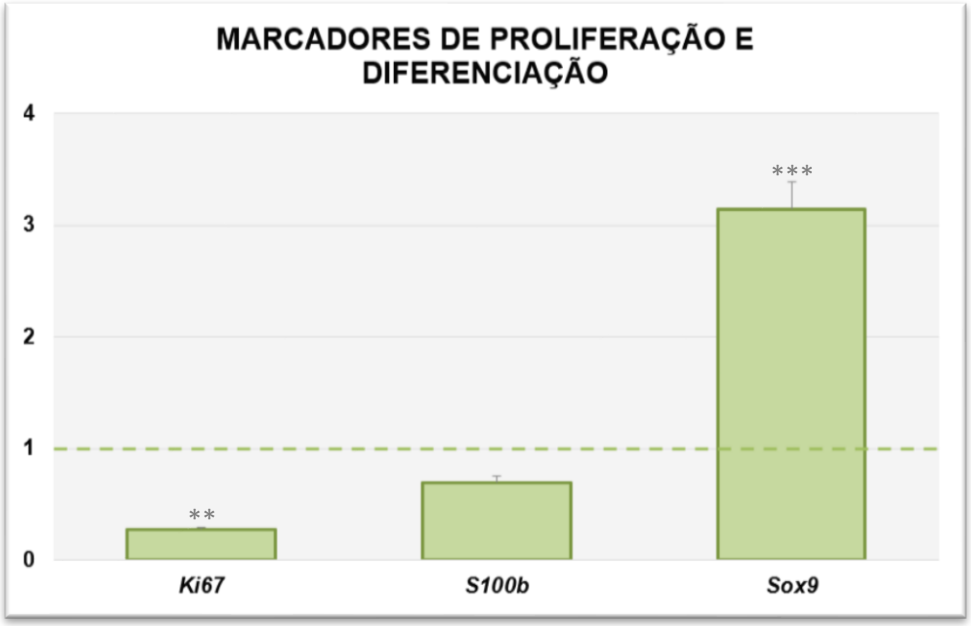

Figura 16. Expressão relativa dos genes marcadores de proliferação e diferenciação celular na vida adulta do animal Ames (n=6).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

- **Fatores de transcrição hipofisários**

Observa-se a redução da expressão do fator de transcrição hipofisário *Sox3* e o aumento da expressão relativa dos genes *Hesx1* e *Otx2* (Figura 17, Dados brutos Anexo I).

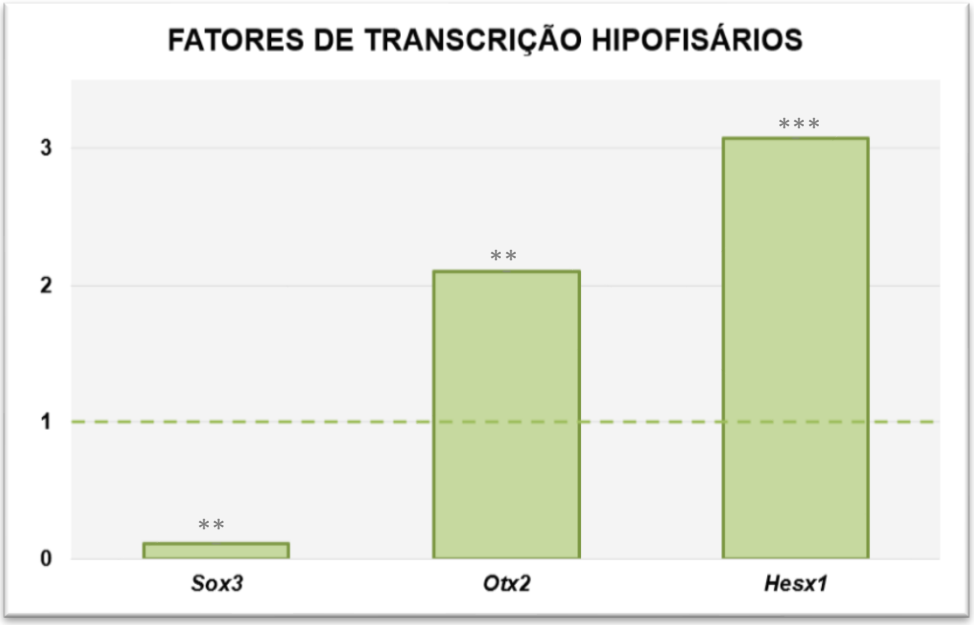

Figura 17. Expressão relativa dos genes codificadores dos fatores de transcrição hipofisários Sox3, Otx2 e Hesx1 na vida adulta do animal Ames (n=6).
NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. **p<0,01 e ***p<0,001.

- **Hormônios hipofisários**

Como esperado, a expressão dos genes codificadores dos hormônios hipofisários apresenta-se diminuída em relação ao selvagem, na vida adulta do animal Ames mutado (Figura 18, Dados brutos Anexo I).

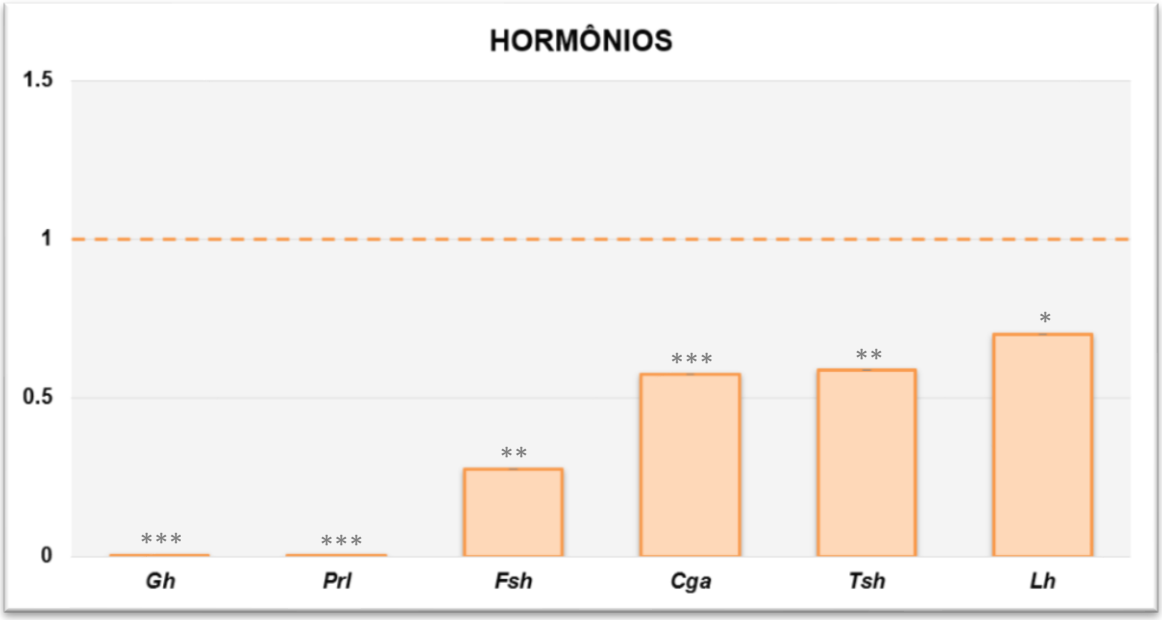

Figura 18. Expressão relativa dos genes codificadores dos hormônios hipofisários na vida adulta do animal Ames (n=6).

NOTA: Os valores estão expressos em "fold change", relacionando as médias dos mutantes machos e fêmeas em P40 ao selvagem, representado como 1. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

5.2 Dosagem sérica hormonal

A dosagem das gonadotrofinas hipofisárias no sangue (Figura 19) não diferiu significantemente entre animais mutados e controles normais em nenhum dos grupos ou sexos para o hormônio luteinizante (LH) (Figura 19 – A e C), enquanto que o FSH mostrou-se estatisticamente diferente, com maior valor para o controle normal, no período P30 para machos e fêmeas (Figura 19 – B e D). Em P40, não houve diferença nas doses circulantes de FSH entre controles e mutados (Figura 19 – B e D).

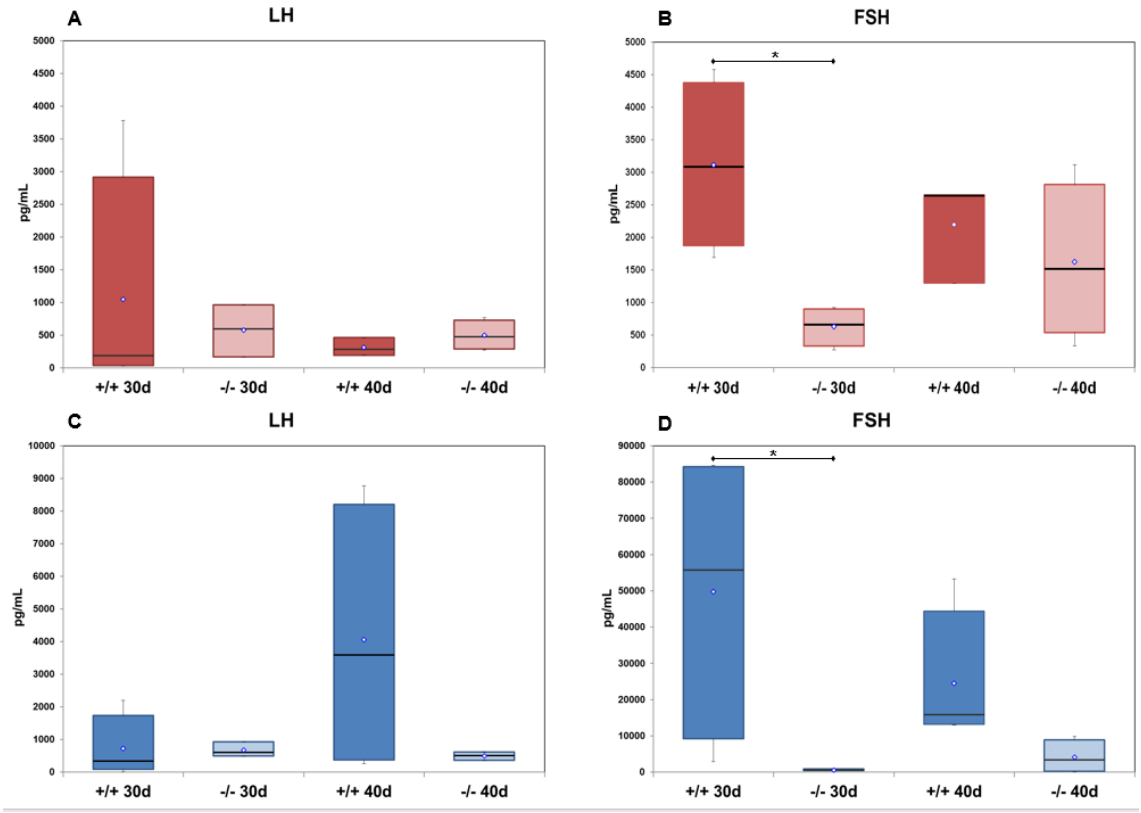

Figura 19. Dosagem sérica dos hormônios hipofisários LH e FSH em camundongos machos e fêmeas nos períodos 30d (n=8) e 40d (n=8).

A dosagem de hormônio de crescimento (GH) não foi diferente estatisticamente entre mutados e controles normais nas fêmeas em nenhum dos

períodos estudados (Figura 20A), enquanto nos machos houve maior secreção de GH em P30 em machos normais comparados aos mutados e nenhuma diferença em P40 (Figura 20B).

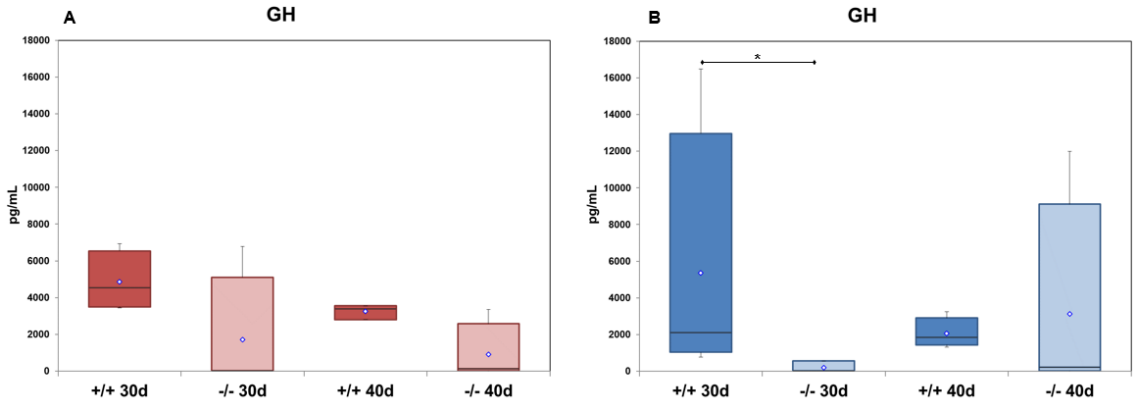

Figura 20. Dosagem sérica do hormônio hipofisário GH em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d (n=8) e 40d (n=8).

A dosagem do hormônio tireoestimulante (TSH) (Figura 21) não diferiu significantemente entre animais mutados e controles normais em nenhum dos grupos ou sexos.

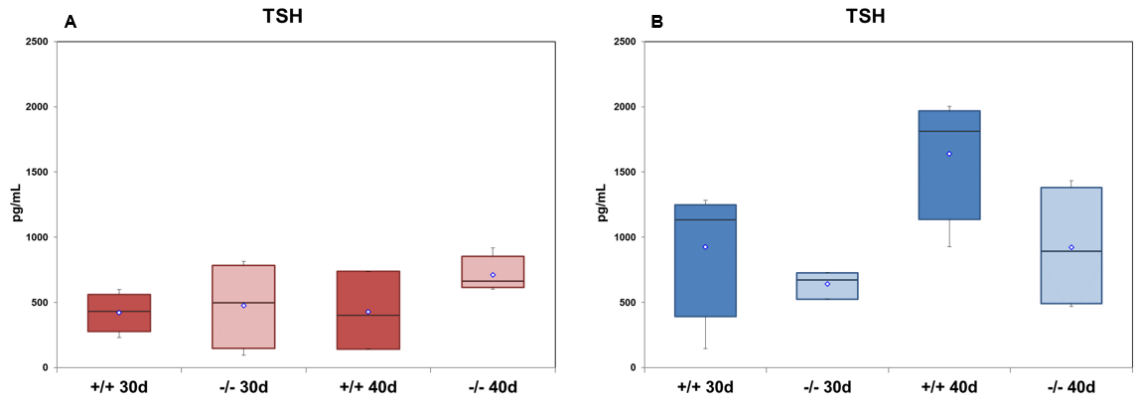

Figura 21. Dosagem sérica do hormônio hipofisário TSH em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d (n=8) e 40d (n=8).

Observa-se o aumento da secreção de prolactina (PRL) (Figura 22) nos controles normais em ambos os sexos e em todos os períodos estudados.

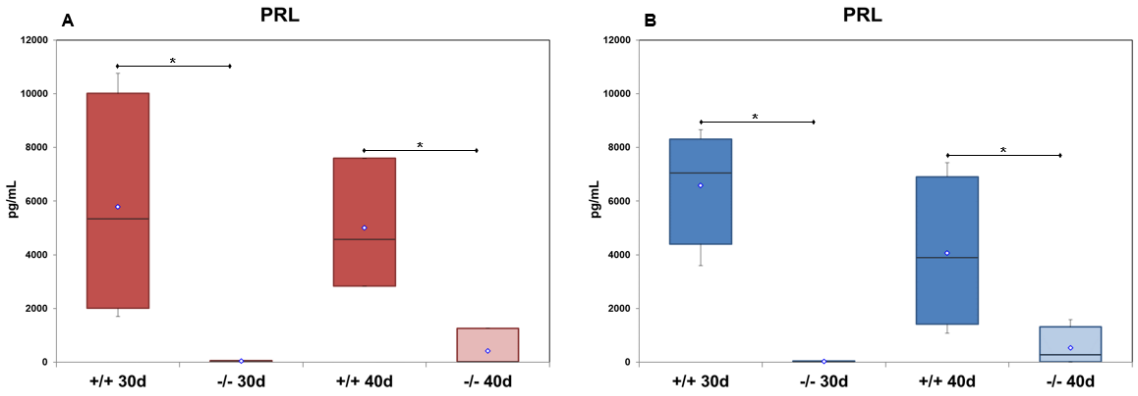

Figura 22. Dosagem sérica do hormônio hipofisário PRL em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d (n=8) e 40d (n=8).

Os dados brutos, expressos como a mediana de cada grupo estudado em picograma por militros, e os desvios e significâncias correspondentes estão representados como mediana na tabela 6.

Tabela 6. Dosagem sérica dos hormônios hipofisários GH, LH, FSH, TSH e PRL em camundongos machos e fêmeas nos períodos de 30d (n=8) e 40d (n=8).

Grupo		GH			LH			FSH			TSH			PRL		
		Mediana	DP	p	Mediana	DP	p	Mediana	DP	p	Mediana	DP	p	Mediana	DP	p
♀	-/- 30d	28,28	3384,3	0,194	382	416	0,546	661,5	300	0,029	497,5	332,16	0,779	48,85	20,68	0,029
	+/+ 30d	4530	1629,9		184,73	1829		3088,5	1299,7		431,5	150,85		5346,5	4221,22	
	-/- 40d	131,48	1636,3	0,064	609	224	0,274	1515	1182,9	0,500	672	104,29	0,149	21,28	19,4	0,035
	+/+ 40d	3466	387,14		339	995		2647	776,55		1133,5	522,72		7049,5	2144	
♂	-/- 30d	14,62	316,61	0,05	475,5	228	0,943	519	238,12	0,05	663	140,43	0,408	637,99	6678,82	0,05
	+/+ 30d	2098	7442,85		372,5	136,72		55713,5	40816,2		569,5	298,37		6085,5	2408,7	
	-/- 40d	226,67	5923,34	1,00	503,5	138	0,343	3352,5	4714,5	0,087	891,5	480,73	0,080	283	733,33	0,05
	+/+ 40d	1857,5	824,13		3586,5	4239		15829,5	1935,6		1812,5	485,1		3887,5	2861,74	

5.3 Imunohistoquímica

Inicialmente, a técnica de imunohistoquímica foi utilizada para validação dos dados transcricionais do marcador de células tronco/ progenitoras hipofisárias SOX2 a nível proteico.

Como já descrito na literatura, houve imunomarcação para SOX2 na região que circunda a fenda de Rathke e em nichos difusos pela glândula tanto nos animais selvagens (Figura 23A), como nos mutados (Figura 23B) em P40.

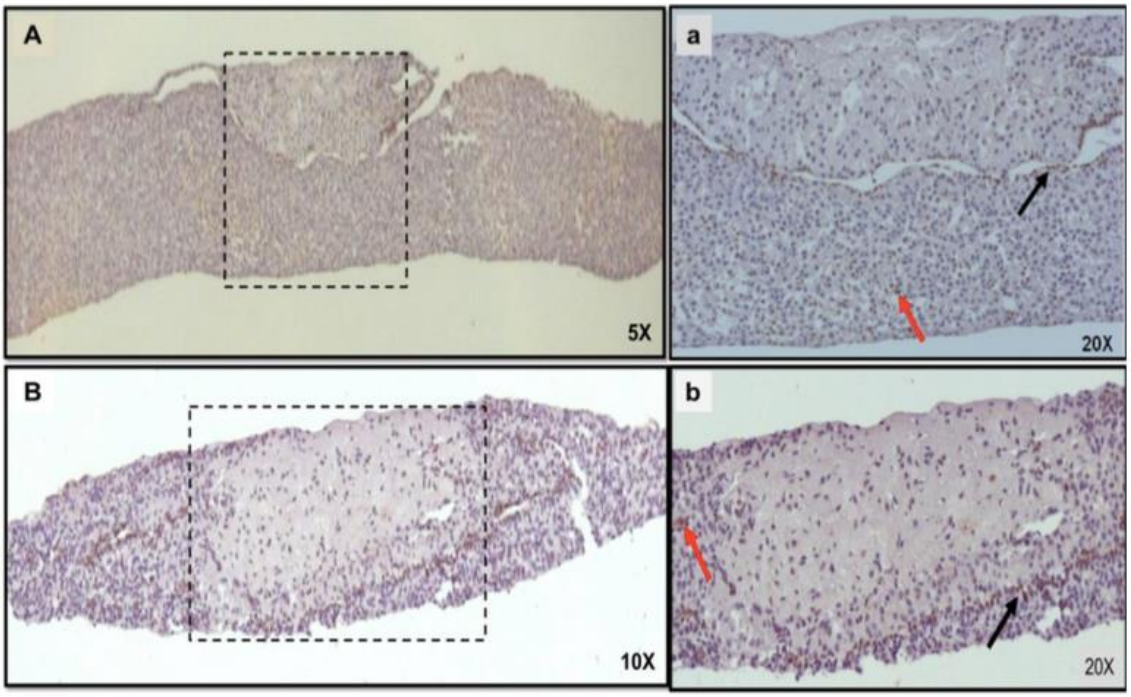

Figura 23. Imunolocalização de SOX2 em camundongo controle (A) e mutado (B) em P40. Observa-se expressão de SOX2 na zona marginal (setas pretas) e em nichos difusos pela glândula (seta vermelha). SOX2 (1:1600).

A dismorfologia glandular e qualidade das lâminas tornou a imunohistoquímica inadequada para análise da expressão dos hormônios hipofisários a nível proteico.

Sendo assim, optamos por uma técnica que permitisse a visualização volumétrica do tecido, devido a hipoplasia e dismorfologia do animal mutado, e que utilize a amostra a fresco, eliminando as dificuldades técnicas relacionadas à qualidade da lâmina e técnica de desparafinização.

5.4 Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada em hipófises de camundongos mutados e controles normais em P60 para padronização do método e posterior expansão do número de animais e períodos analisados.

Observa-se o aumento da expressão proteica de SOX2 no animal mutados, o que condiz com o esperado, uma vez que espera-se a redução de células hipofisárias diferenciadas. A marcação nuclear do anticorpo mostrou-se específica e condizente com a localização previamente determinada pela imuno-histoquímica.

Observa-se redução da expressão de LH no animal mutado, como esperado. O anticorpo contra LH mostrou-se específico, possibilitando a visualização da marcação citoplasmática correspondente na zona marginal do lobo anterior hipofisário.

Observa-se o aumento da expressão de FSH no animal mutado em relação ao controle normal, fato que deve-se, provavelmente, ao número maior de células hipofisárias devido a hipoplasia e dismorfologia da glândula. O anticorpo contra FSH mostrou-se específico, possibilitando a visualização da marcação citoplasmática correspondente na zona marginal do lobo anterior hipofisário.

Observa-se redução da expressão de GH no animal mutado em relação ao controle normal. O anticorpo contra GH mostrou-se específico, possibilitando a visualização da marcação citoplasmática no lobo anterior hipofisário.

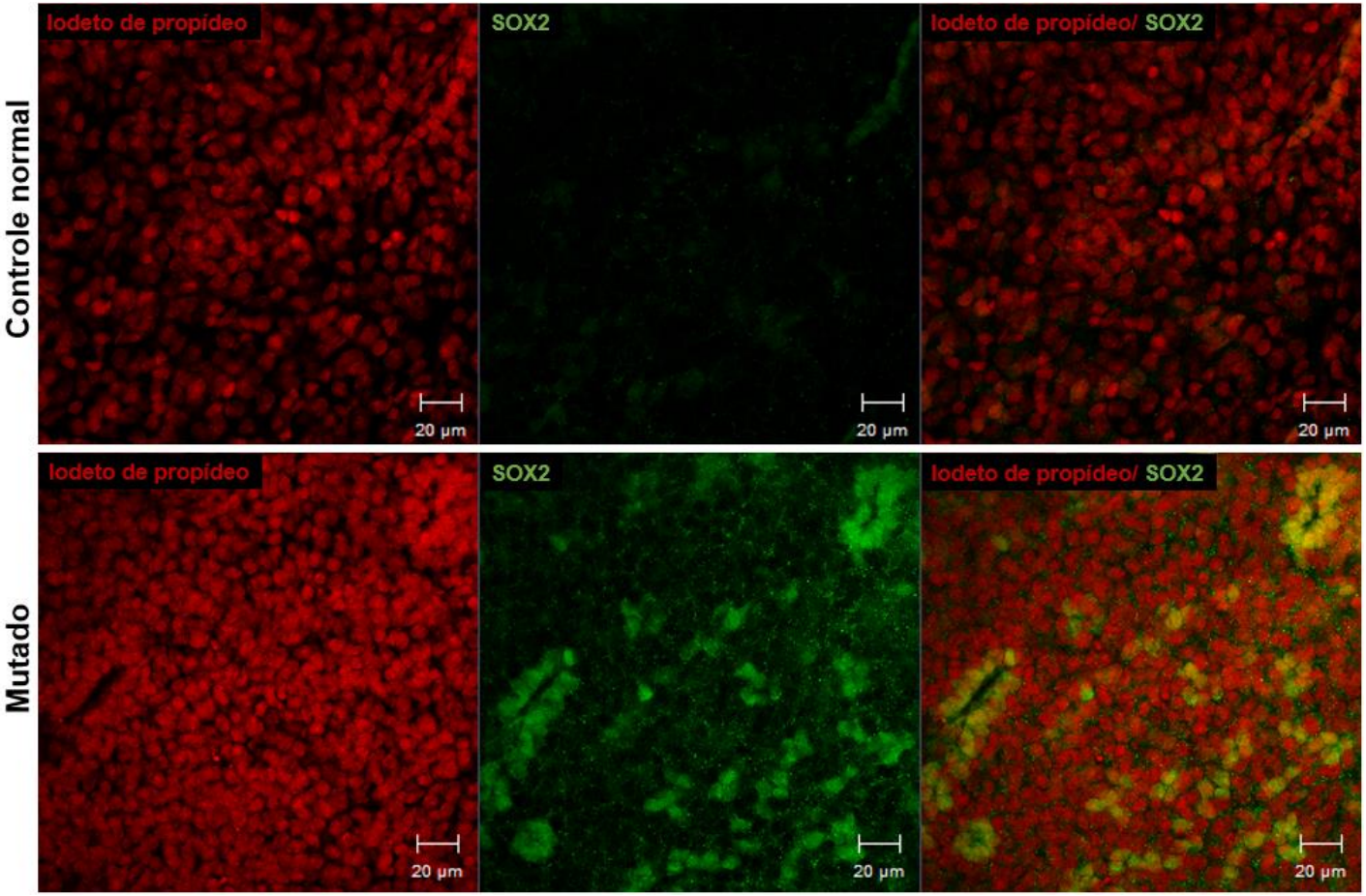

Figura 24. Imunofluorescência "whole mount" de hipófise utilizando o marcador de células tronco hipofisárias SOX2 em camundongos machos adultos (60d), representado em verde. Núcleos marcados por iodeto de propídeo, representado em vermelho. Aumento de 40x.

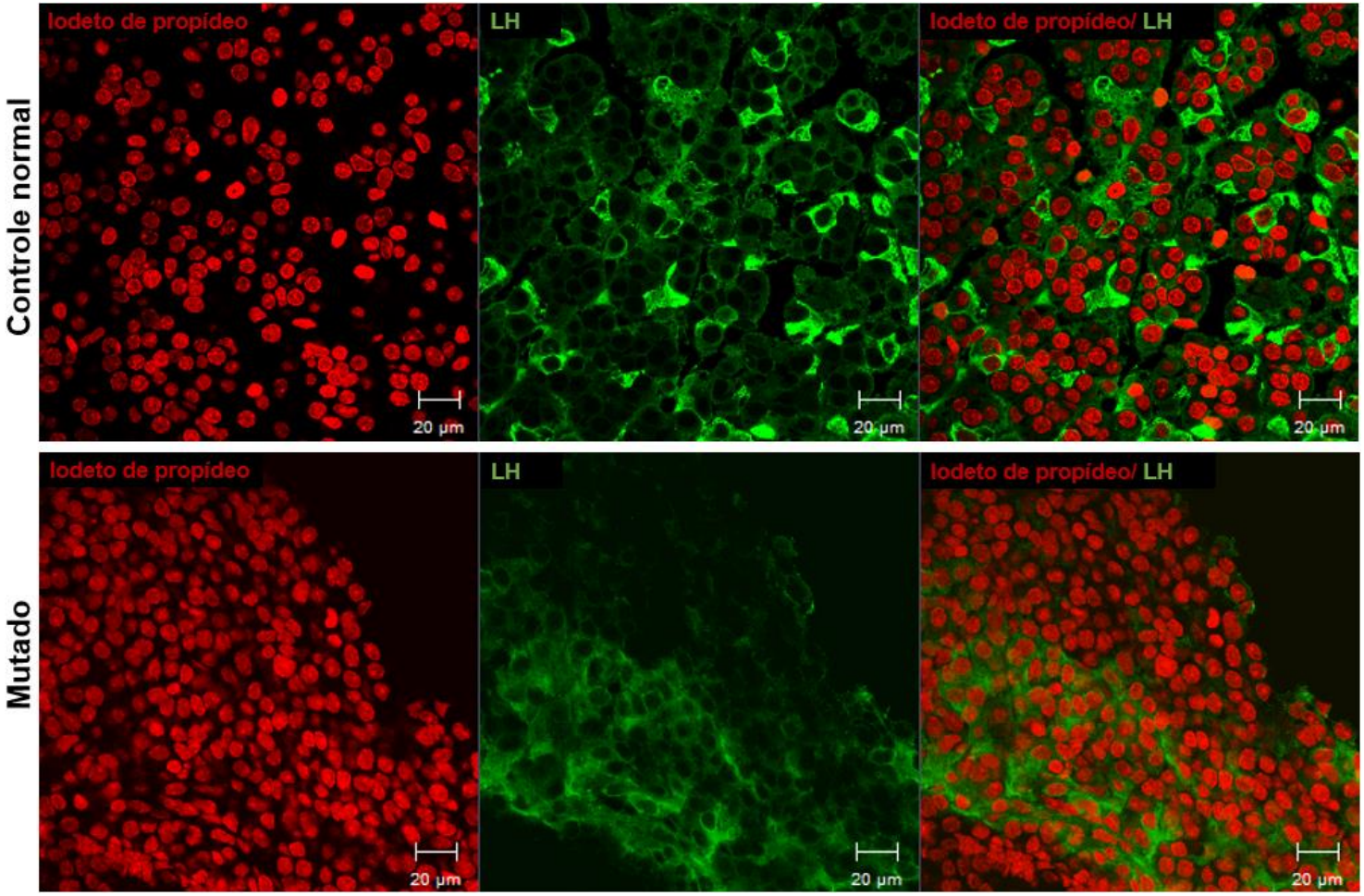

Figura 25. Imunofluorescência “whole mount” de hipófise do hormônio LH em camundongos machos adultos (60d), representado em verde. Núcleos marcados por iodeto de propídeo, representado em vermelho. Aumento de 40x.

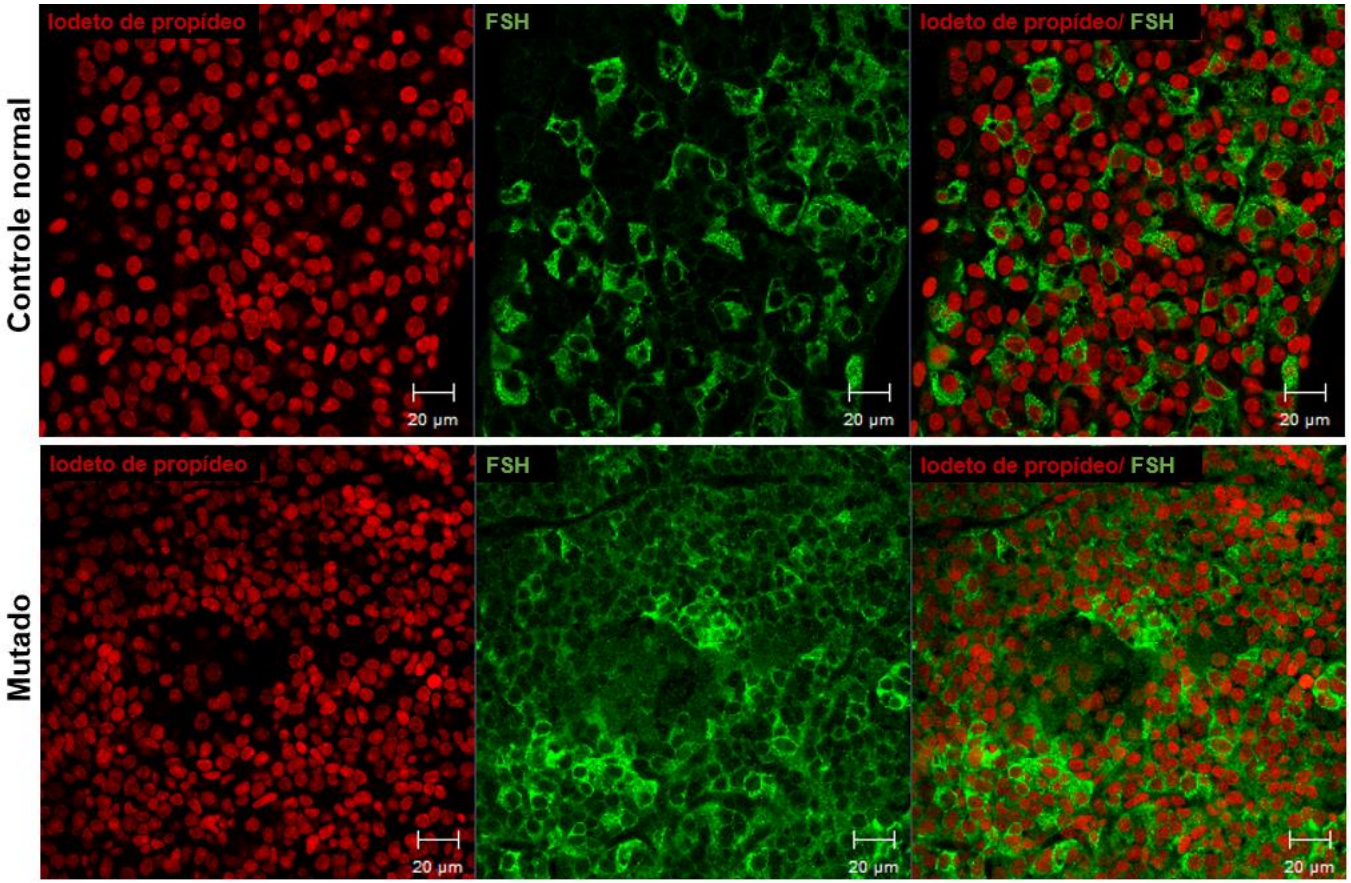

Figura 26. Imunofluorescência *whole mount* de hipófise do hormônio FSH em camundongos machos adultos (60d), representado em verde. Núcleos marcados por iodeto de propídeo, representado em vermelho. Aumento de 40x.

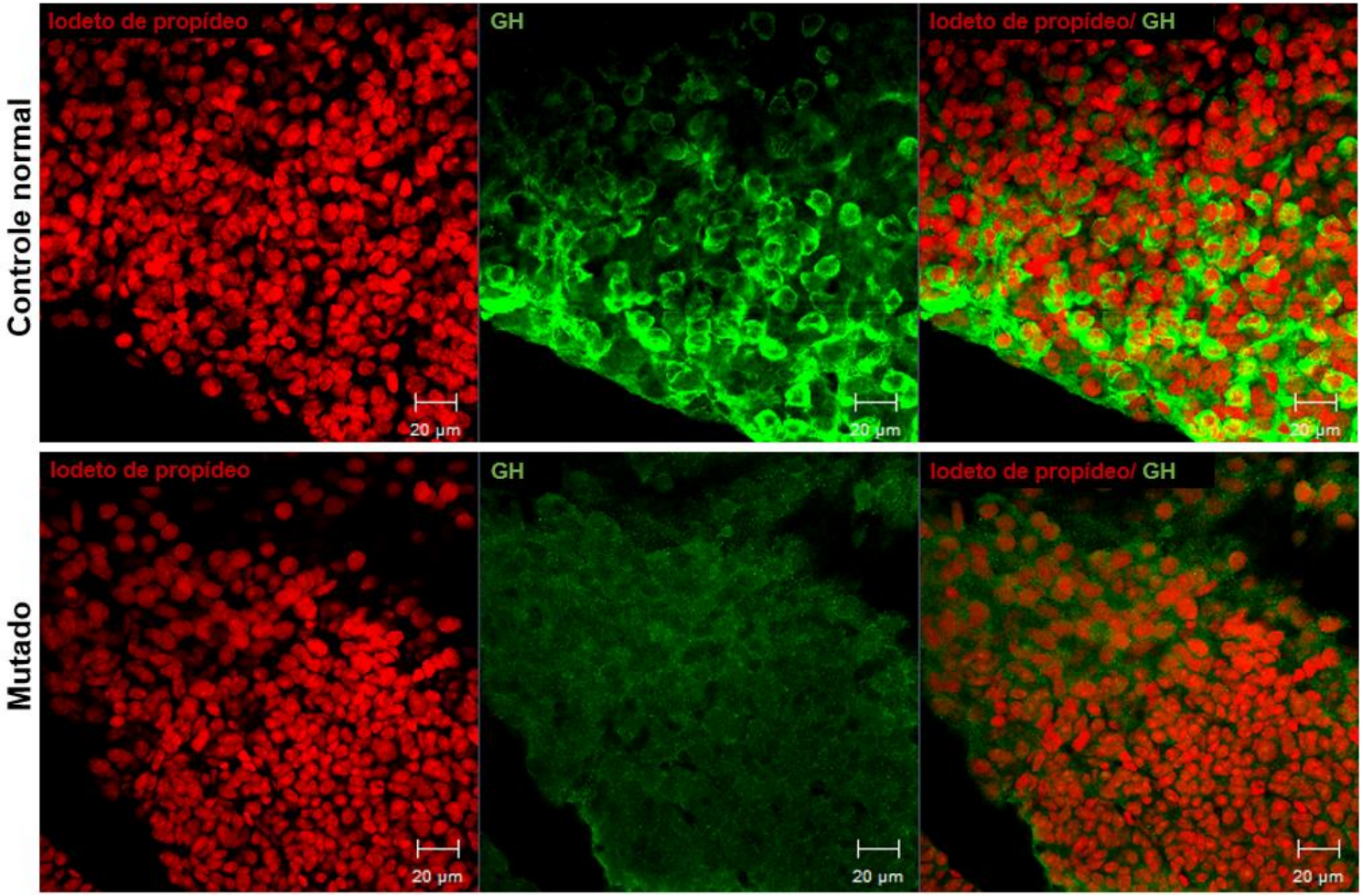

Figura 27. Imunofluorescência "whole mount" de hipófise do hormônio GH em camundongos machos adultos (60d), representado em verde. Núcleos marcados por iodeto de propídeo, representado em vermelho. Aumento de 40x.

As intensidades de emissão dos marcadores correspondentes a cada proteína analisada estão representadas graficamente (Gráfico 1), demonstrando o aumento da expressão de SOX2 nos animais mutados (n=3), bem como aumento da expressão de LH e GH nos controles normais (n=3).

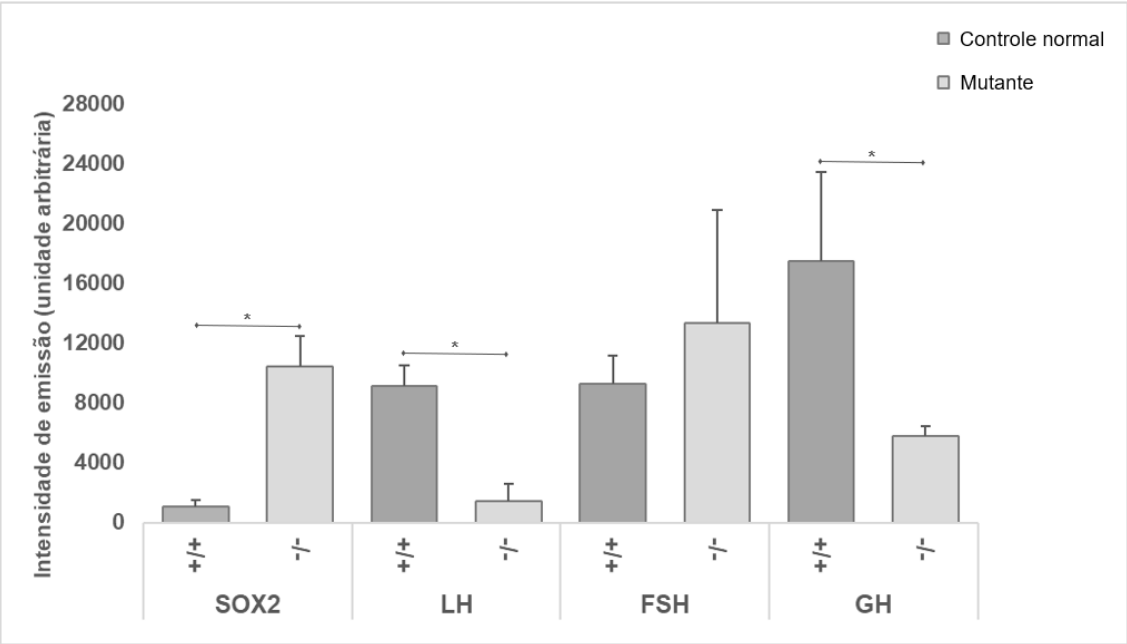

Gráfico 1. Representação gráfica da intensidade de emissão de fluorescência do marcador de células tronco hipofisárias SOX2 e dos hormônios hipofisários LH, FSH e GH em camundongos machos no período P60. * $p<0,05$

5.5 Histologia gonadal

Os ovários das fêmeas mutadas apresentam morfologia normal, apesar de estarem reduzidos em tamanho. Os folículos encontrados nos animais mutados eram de tipo, número e morfologia semelhante aos das fêmeas controle de mesma idade (Figuras 28 e 29). Apesar dos dados encontrados serem de acordo com a normalidade, as fêmeas mutadas são inférteis.

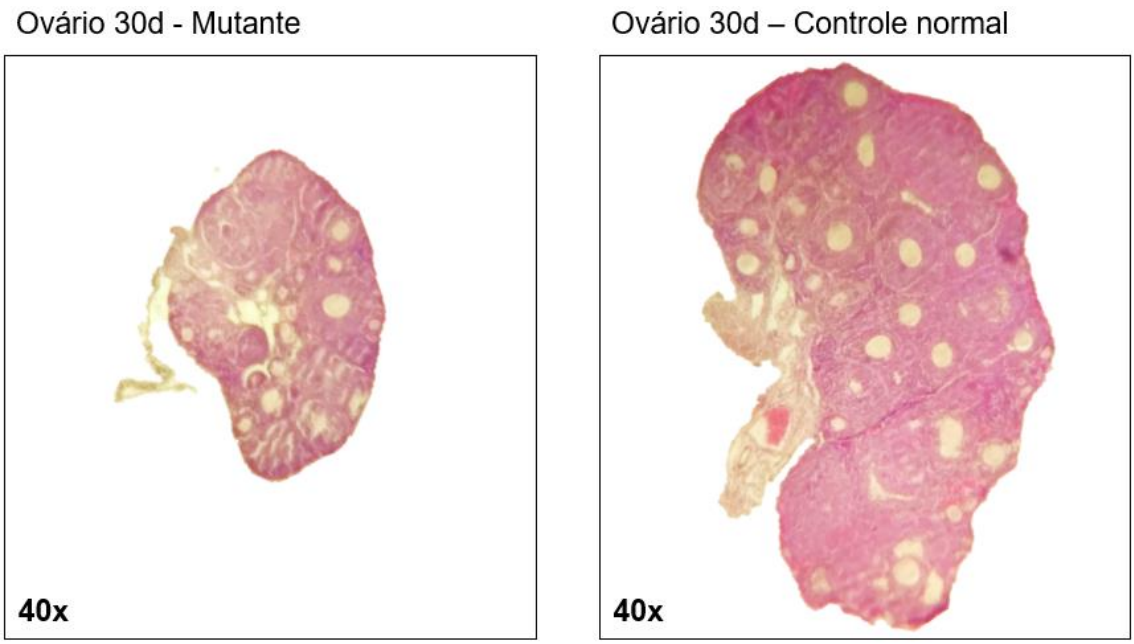

Figura 28. Histologia de ovários de camundongos fêmeas no período de 30d corados em HE. Aumento de 40x.

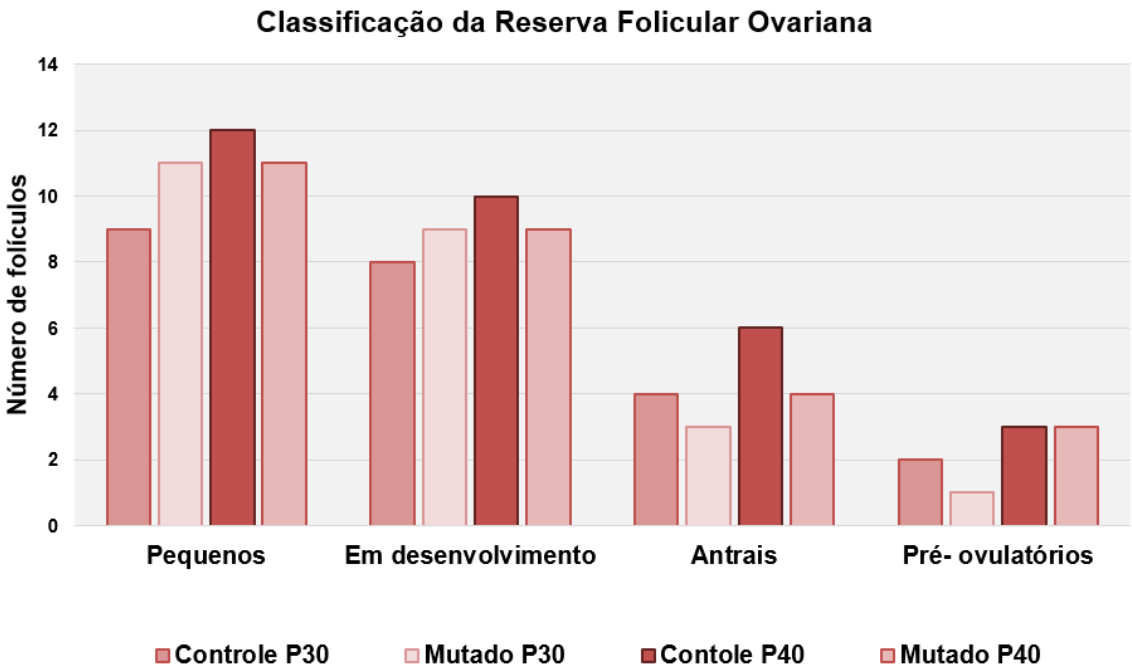

Figura 29. Representação gráfica da contagem de folículos de fêmeas mutantes em P30 e P40. Os folículos foram classificados como pequenos (folículos primordiais e primários), em desenvolvimento (com mais de uma camada de células na granulosa), antrais (com presença de antro) e pré-ovulatórios (com presença de uma rima de células do cumulus ao redor do oócito).

Apesar de serem inférteis, os testículos dos animais mutados são normais e aparentemente maiores que os de controles normais (em relação ao tamanho corporal) (dados observacionais). A espermatogênese foi iniciada nos animais mutados, apesar de apresentarem menos espermatozoides nos túbulos seminíferos em relação aos controles normais (Figura 30). Adicionalmente, os túbulos seminíferos são menores em diâmetro que em animais controle. O escore de Johnsen dos animais mutados variou entre 7 e 8, enquanto os normais tiveram escore entre 8 e 9.

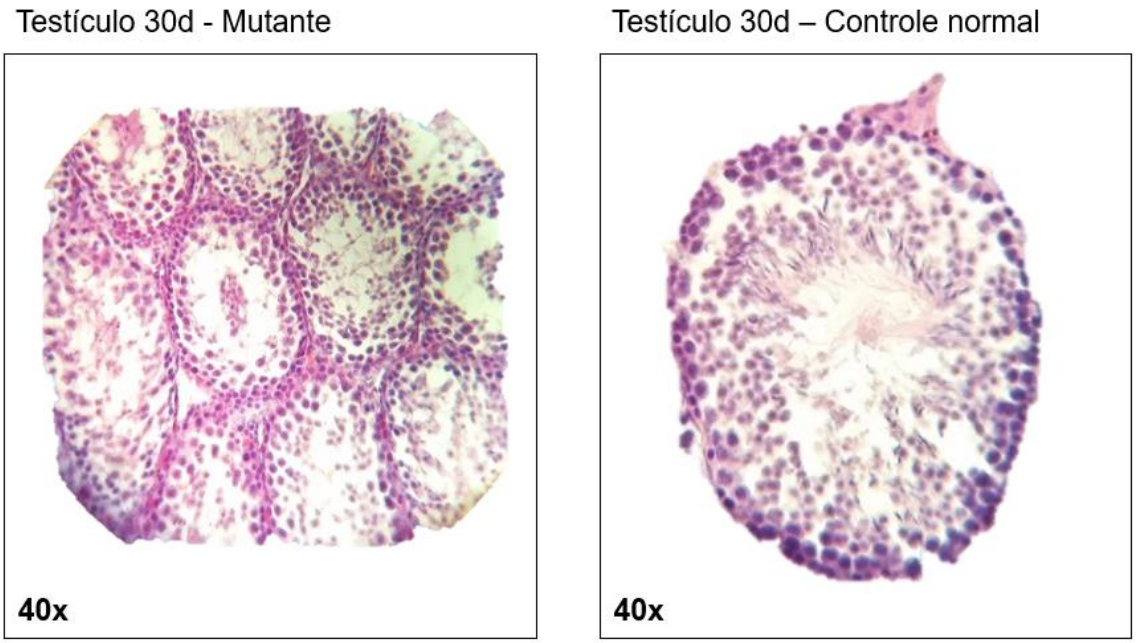

Figura 30. Histologia de testículos de camundongos machos no período de 30d corados em HE. Aumento de 40x.

Discussão

Neste estudo, foi demostrado pela primeira vez o dinamismo entre a expressão do marcador de células tronco hipofisárias *Sox2* e hormônios hipofisários. Além disso, também foi observada a recuperação da capacidade de diferenciação de células tronco/progenitoras hipofisárias em modelo animal de hipopituitarismo congênito por mutação espontânea no gene *Prop1* durante o período puberal. Somado ao mecanismo de produção hormonal a partir de células tronco/progenitoras hipofisárias, a análise temporal do período puberal do camundongo Ames evidenciou que, com a progressão da maturação sexual, há a redução da expressão do marcador de células tronco/progenitoras hipofisárias $SOX2^{+}$, evoluindo com a elevação dos genes codificadores dos hormônios LH (7,54x), FSH (25x) e PRL (2,09X) em relação ao animal selvagem, além da normalização da expressão do gene codificador de GH (1,11x).

6.1 O fator de transcrição PROP1 não é essencial para a diferenciação terminal hormonal hipofisária em camundongos Ames

A provável função do fator de transcrição PROP1 é regular a liberação de células progenitoras da zona marginal e promover a diferenciação terminal atráves do mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (Davis, Castinetti et al. 2010, Pérez Millán, Brinkmeier et al. 2016). O PROP1 forma um complexo com a β-catenina para ativar o gene *Pou1f1* (Ward, Raetzman et al. 2005, Himes and Raetzman 2009, Cheung, Davis et al. 2017). Contudo, o PROP1 não é estritamente necessário para a ativação do *Pou1f1*, uma vez que pequenas populações de células tireotróficas, somatotróficas e lactotróficas $POU1F1^{+}$ estão presentes no lobo anterior hipofisário de camundongos $Prop1^{df/df}$ (Gage, Brinkmeier et al. 1996).

Camundongos com hiperexpressão do PROP1 apresentam diminuição da expressão dos genes *Lhb* e *Fshb* e hipogonadismo transiente, sugerindo que a repressão do PROP1 é importante para o desenvolvimento e diferenciação dos gonadotrofos (Cushman, Watkins-Chow et al. 2001). A hiperexpressão do PROP1 leva também ao retardo de crescimento e puberdade em camundongos machos (Cushman, Watkins-Chow et al. 2001). Estes dados reforçam os achados deste estudo, onde houve hiperexpressão dos genes *Lhb* e *Fshb* além de gônadas com aspecto morfológico e funcional normais na ausência do fator de transcrição PROP1.

Apesar da hipoexpressão do PROP1 ser necessária para o início da expressão de genes relacionados a diferenciação das células hipofisárias, este fator de transcrição é importante em processos anteriores da cascata de diferenciação terminal. No presente estudo foi constatado que as células tronco/ progenitoras hipofisárias são capazes de diferenciar-se e formar somatotrofos, gonadotrofos e tireotrofos e secretar os hormônios correspondentes a estes tipos celulares, mesmo na ausência de um fator até então considerado essencial para a diferenciação terminal hipofisária, o PROP1. Este fenômeno é comprovado pelo aumento da expressão do marcador hipofisário de células tronco/ progenitoras SOX2 no início da maturação sexual de machos e fêmeas (P30), com posterior redução de expressão no período de maturação sexual completa (P40), concomitante à normalização dos níveis séricos de GH, LH, FSH e TSH e aumento da expressão dos genes codificadores destes hormônios.

A normalização ou elevação da expressão de genes codificadores dos hormônios hipofisários não é esperada em animais $Prop^{df/df-}$, uma vez que o fator de transcrição PROP1 é essencial para a diferenciação terminal da linhagem

gonadotrófica, ativação do gene *Pou1f1* (*Pit1)* e posterior determinação da linhagem PIT1 dependente (Sornson, Wu et al. 1996, Raetzman, Ward et al. 2002, Davis, Keisler et al. 2016). Portanto, com os dados apresentados neste estudo, sugere-se a participação de fator(es) que compensem a ausência do *PROP1* como mecanismo de "backup" para períodos de maior demanda hipofisária, como a puberdade. Este fenômeno já foi descrito em diversas condições fisiológicas (Rizzoti, Akiyama et al. 2013) e patológicas (Fu, Gremeaux et al. 2012, Fu and Vankelecom 2012, Willems, Fu et al. 2016), atribuindo o sistema de "backup" hipofisário ao pool de células tronco/ progenitoras presentes na hipófise, que diferenciam-se em células produtoras hormonais para suprir a demanda necessária.

Em modelos de hipopituitarismo adquirido, já foi observada a resposta a danos hipofisários e recuperação das linhagens hormonais afetadas (Borrelli, Heyman et al. 1989, Vankelecom 2007, Fu, Gremeaux et al. 2012, Fu and Vankelecom 2012, Willems, Fu et al. 2016). Já em modelos de hipopituitarismo congênito, não existem estudos que demonstrem a recuperação da capacidade de diferenciação de células tronco/progenitoras em células hipofisárias.

Os dados obtidos neste estudo sugerem o recrutamento do pool de células tronco/ progenitoras hipofisárias durante a maturação sexual de camundongos Ames e diferenciação progressiva da linhagem celulares gonadotrófica. Contudo, apesar dos camundongos com mutação espontânea no gene *Prop1* serem capazes de recuperar a capacidade de diferenciar os diversos tipos celulares hipofisários e produzir e secretar hormônios, não foram demonstrados sinais de restauro do das deficiências hormonais, uma vez que os camundongos *Prop1*$^{df/df}$ não recuperam o retardo de crescimento, além de serem inférteis e apresentarem hipotireoidismo,

corroborando com a manutenção do fenótipo previamente descrito, com deficiência de GH, TSH e PRL e comprometimento gonadotrófico parcial, o que difere dos casos de recuperação descritos em hipopituitarismo adquirido, onde ocorre também o restauro do fenótipo. Gage e colaboradores (Gage, Brinkmeier et al. 1996) também demonstraram a presença de células somatotróficas em hipófises de camundongos Ames mutados, relacionando o déficit de crescimento dos camundongos mutados a falhas na secreção de GH.

Em humanos, variantes no gene *PROP1* são as principais causas de hipopituitarismo congênito e causam deficiências de GH, TSH, PRL, LH e FSH (Wu, Cogan et al. 1998, Osorio, Marui et al. 2002, Navardauskaite, Dusatkova et al. 2014). As alterações morfológicas hipofisárias são variáveis e caraterizadas por neurohipófise tópica (Mendonca, Osorio et al. 1999, Osorio, Marui et al. 2002, Obermannova, Pfaeffle et al. 2011, Navardauskaite, Dusatkova et al. 2014), além de casos de hiperplasia seguida por hipoplasia hipofisária não associadas a diferenças fenotípicas ou hormonais (Turton, Mehta et al. 2005), o que não é observado em camundongos (Davis, Keisler et al. 2016). Assim como descrito por Ward e colaboradores (Ward, Raetzman et al. 2005), em humanos também são descritos casos de hipoplasia hipofisária. Sabe-se ainda que, em humanos com tumores hipofisários e mutações inativadoras no gene *PROP1*, a análise histológica tumoral revelou a presença de todos os tipos celulares produtores de hormônios hipofisários, além da presença de células foliculoesteladas (consideradas uma das populações de células tronco/progenitoras hipofisária) e ausência de traços proliferativos (Zygmunt-Górska, Starzyk et al. 2009). Estes dados corroboram com os achados do presente estudo onde mostra-se a expressão de genes codificadores dos hormônios hipofisários com redução do marcador de proliferação

celular Ki67. Apesar das semelhanças fenotípicas entre o modelo animal Ames e o curso do hipopituitarismo em humanos, sabe-se que o camundongo com mutação espontânea no gene *Prop1* não evolui com deficiência de ACTH, enquanto que, em humanos, este fenótipo é variável mesmo em membros de uma mesma família (Mendonca, Osorio et al. 1999, Osorio, Marui et al. 2002, Bottner, Keller et al. 2004, Nasonkin, Ward et al. 2011, Obermannova, Pfaeffle et al. 2011, Navardauskaite, Dusatkova et al. 2014).

6.2 Apesar de serem inférteis e apresentarem hipoplasia gonadal, os camundongos Ames apresentam morfologia e resposta gonadal normais em relação a animais controles

A maturação sexual em camundongos é dependente da ação gonadotrófica e a liberação das gonadotrofinas LH e FSH é simultânea. Sugere-se que o padrão de expressão anormal dos genes codificadores dos hormônios hipofisários LH e FSH durante a puberdade do animal *Prop1*$^{-/-}$, não relacionado ao padrão de expressão gonadotrófico normal, pode explicar a falta de reflexo funcional destes achados.

Em experimentos realizados por Bartke e colaboradores, foi demonstrado o retardo da maturação sexual de camundongos Ames de ambos os sexos em aproximadamente três semanas e a capacidade fértil de animais mutados macho formarem prole sem tratamento hormonal prévio (Chandrashekar, Zaczek et al. 2004). Além disso, o mesmo grupo demonstrou a restauração da fertilidade de

camundongos Ames machos e a capacidade de maturação sexual completa de machos e fêmeas após tratamento com GH, levotiroxina e prolactina por quarenta dias (108). Estes dados sugerem a capacidade regenerativa da linhagem gonadotrófica e da necessidade da interação de mais de um fator para que ocorra a resposta às gonadotrofinas e desenvolvimento das características de sexuais secundárias e fertilidade dos camundongos. Sendo assim, a falta de GH no início da quarta semana de desenvolvimento pós-natal (puberdade) pode ter contribuído para a ausência de maturação sexual completa e restauro da fertilidade dos animais mutantes espontâneos para o gene *Prop1*. Corroborando com esses dados, estudos mostram que camundongos “knockout” para o receptor de GH, apesar de apresentarem redução das gonadotrofinas e retardo puberal, são subferteis, demonstrando a relação do GH com a puberdade e fertilidade (Chandrashekar, Zaczek et al. 2004). Portanto, a deficiência de GH dos camundongos Ames pode ser um fator determinante para a falta de reflexo funcional na recuperação da capacidade de produção hormonal hipofisária. (Bartke 1965, Vergara, Smith-Wheelock et al. 2004).

Neste estudo foram observados número e morfologia semelhante de folículos ovarianos em fêmeas mutadas e controles, dado também observado por Batke e colaboradores (BARTKE 1964), que também demonstraram que as fêmeas mutadas tem ciclos ovarianos normais e tornam-se férteis após estimulo hormonal (Bartke, Brown-Borg et al. 2001, Bartke, Wright et al. 2001). Schneider e colaboradores (Schneider, Matkovich et al. 2017) avaliaram a reserva folicular de fêmeas mutadas com doze meses de idade e constataram uma reserva de folículos primordiais três vezes maior que a dos controles normais, além de reservas normais de folículos primários e terciários. Nos camundongos mutados machos, observou-

se morfologia testicular semelhante aos controles, com testículos aumentos nos camundongos mutados em relação ao tamanho do animal, quando comparado ao controle. Os dados histológicos corroboraram com o que já havia sido descrito na literatura e refletem o fenômeno observado a nível transcricional, proteico e sérico.

Na vida adulta, porém, não é observado o aumento da expressão de marcadores de diferenciação ou relacionados a produção hormonal, sugerindo que a recuperação observada no período puberal é transitória e relacionada ao aumento da demanda hipofisária.

6.3 Perfil transcricional dos marcadores de proliferação e diferenciação corroboram com o fenômeno descrito

Na adenohipófise normal, o número de células proliferativas decai progressivamente, ao passo que o número de células diferenciadas aumenta. No início da organogênese hipofisária, as células apresentam as maiores taxas proliferativas em respostas a fatores de crescimento tanto no animal mutado como no selvagem (Ward, Raetzman et al. 2005, Ward, Stone et al. 2006). A hipófise do camundongo continua crescendo do fim do período embrionário até o início da vida neonatal e continua expandindo, chegando a tornar-se quatorze vezes maior do nascimento a vida adulta (Ward, Raetzman et al. 2005). Nestes períodos as células proliferativas estão dispersas no lobo anterior dos camundongos neonato e adulto, enquanto camundongos *Prop*$^{-/-}$ têm poucas células proliferativas do nascimento até P15, quando estas células começam a morrer na glândula dismórfica (Ward, Raetzman et al. 2005). No presente estudo, observou-se que a expressão do

marcador de proliferação *Ki67* permanece reduzida durante todo o período puberal do camundongo Ames em comparação ao animal selvagem, sugerindo a redução na proliferação e reforçando a hipótese de que as células produtoras de hormônios sejam produtos da diferenciação de células tronco/progenitoras hipofisárias.

Durante o fim do período embrionário e início do período pós-natal há uma fração significante de células diferenciadas se proliferando. Cerca de 7% dos corticotrofos estão se dividindo ao fim do desenvolvimento embrionário, o que se mantem nos primeiros dias após o nascimento (Taniguchi, Kominami et al. 2000). Além disso, a população de tireotrofos também aumenta significantemente após o nascimento, acreditando-se que cerca de 20% dos tireotrofos derivam de tireotrofos pré-existentes (Carbajo-Perez and Watanabe 1990, Taniguchi, Yasutaka et al. 2001, Taniguchi, Yasutaka et al. 2002). Também foi reportado, em estudos anteriores, que em torno de um quarto dos somatotrofos se dividem as 3 semanas do desenvolvimento pós-natal (Carbajo-Perez and Watanabe 1990, Taniguchi, Yasutaka et al. 2001, Taniguchi, Yasutaka et al. 2002). Contudo, apesar da capacidade regenerativa de hipófises normais, hipófises *Prop1*$^{-/-}$ exibem falha na diferenciação terminal, o que leva ao aumento da apoptose no período pós-natal e a subsequente falha da expansão glandular de P8 a P11 (Ward, Raetzman et al. 2005). Neste estudo, observou-se a elevação na expressão do marcador de diferenciação *S100β* (12,25x) em comparação ao animal selvagem durante o início do período puberal (dia 3), mais uma vez reforçando a hipótese de que a formação de células produtoras de hormônios hipofisários ocorre a partir da diferenciação de células tronco/progenitoras SOX2^{+}.

Figura 31. Resumo do perfil de expressão dos marcadores de célula tronco/progenitoras, proliferação e diferenciação celular hipofisários, além dos genes codificadores dos hormônios hipofisários. Os resultados estão expressos em *fold change* e o animal selvagem é representado como 1 (linha pontilhada)

Conclusão

O padrão de expressão do marcador de células tronco/progenitoras hipofisárias SOX2 mostrou-se elevado no início do período correspondente a maturação sexual nos camundongos Ames, com posterior redução no período correspondente a ao fim da maturação sexual. A dinâmica transcricional observada para o marcador de células tronco/ progenitoras hipofisárias foi compatível ao nível de expressão dos genes codificadores dos hormônios hipofisários, estando eles com expressão reduzida em P30, com exceção do gene codificador de FSH, e aumentada em P40 para os genes codificadores de LH, FSH, PRL e normal para o gene codificador de GH.

A expressão dos marcadores de proliferação, diferenciação e fatores de transcrição hipofisários foi determinada e caracterizada no período puberal e vida adulta dos animais com mutação espontânea no gene Prop1. Estes dados foram de suma importância para o entendimento da dinâmica celular envolvida na puberdade e maturação sexual do Ames, bem como para determinar o processo envolvido na recuperação transitória da capacidade de diferenciação terminal e produção hormonal do camundongo Ames mutado no período puberal.

Foi comprovada, a nível proteico, diferenciação celular hipofisária e secreção hormonal na ausência do fator de transcrição PROP1, até então tido como um fator essencial para a diferenciação terminal das células produtoras hormonais, sendo a sua deficiência um dos principais fatores causadores de hipopituitarismo congênito. Apesar dos resultados encontrados mostrarem a diferenciação terminal e secreção de alguns dos hormônios hipofisários, o animal ainda apresenta importante déficit de crescimento, hipotireoidismo e infertilidade.

Ainda são necessários estudos complementares que determinem o(s) fator(es) que compensam a ausência do PROP1 e participem da cascata de

diferenciação de células produtoras de hormônios hipofisários. Também carece de esclarecimentos o fato do animal mutado secretar alguns hormônios em um período de alta demanda e, ainda assim, não recuperar as deficiências fenotípicas descritas.

Anexos

ANEXO A: Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

MEDICINA
USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE SOX2 DURANTE A PUBERDADE E SUA RELAÇÃO COM A DIFERENCIAÇÃO TERMINAL E PRODUÇÃO HORMONAL EM ANIMAIS COM MUTAÇÃO ESPONTÂNEA NO GENE PROP1"**, registrada com o **nº 942/2017**, sob a responsabilidade de **Luciani Renata Silveira de Carvalho** e **Juliana Moreira Silva**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 25.10.17

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03-10-2017 Término: 24-06-2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Ames (Prop)
Nº de animais	**48**
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	Machos/fêmeas
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 25 de Outubro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

ANEXO B: Extração de DNA

Preparo das soluções estoque para volume final de 500mL:

***Alkaline Lysis Reagent*:**

NaOH (25 mM) ---------- 0,5g

Na_2-EDTA $2H_2O$ (0,2 mM) ---------- 0,03722g

***Neutralization Reagent*:**

Tris-HCl (40 mM) ---------- 3,152g

1. Foram obtidos aproximadamente 2mm da cauda dos camundongos e o material foi disposto em tubo *Eppendorf* com capacidade para 1,5mL.

2. Adiciona-se 75 µL de *Alkaline Lysis Reagent*.

3. As amostras foram aquecidas a 95ºC por 30 minutos e, logo após, resfriadas a 4ºC.

4. Adiciona-se 75 µL de *Neutralization Reagent.*

5. Foram utilizados 3 µL da solução final para a reação de PCR.

ANEXO C: Protocolo de Genotipagem da Linhagem Ames

O fragmento de 582 pares de base, que inclui a variante Ser83Pro no gene *Prop1* da linhagem Ames, foi amplificado por PCR utilizando os primers e condições a seguir:

Primer Forward – 5' CGCAACAGTGATGTGAGGATGG 3'

Primer Reverse – 5' AAGGCTGGAGTGTCGGTCTTGA 3'

1. Preparo da PCR

Reagente	1 Amostra (µL)	10 Amostras (µL)
10x PCR Buffer	2,5	25
dNTPs	0,5	5
Primer Forward 250nmol	1	10
Primer Reverse 250nmol	1	10
Taq	0,2	2
ddH_20	16,8	168
Volume total	22	220

2. Alíquotar 3 µL de DNA nos tubos de PCR;

3. Adicionar 22 µL do mix de PCR ao tubo;

4. Colocar os tubos no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95ºC	10'
30	95ºC	20''
	58ºC	30''
	72ºC	1'
1	72ºC	10'

5. Correr 5 µL do produto de PCR em gel de agarose 1%;

Fragmento esperado: 582 pb

6. Digerir 10 µL do produto de PCR com a enzima *Pfl*M*I* (Van91I) de acordo com as condições abaixo:

Reagente	1 Amostra (µL)	10 Amostras (µL)
***Pfl*M*I* (Van91I)**	0,1	1
10x Anza Buffer	2	20
ddH2O	7,9	79
Produto de PCR	10	100
Volume total	20	200

7. Incubar em banho-maria a 37ºC por 2 horas;

8. Correr o volume total da reação em gel de agarose 2%.

Fragmentos esperados:

+/+	582 pb
df/+	582 pb, 364 pb, 218 pb
df/df	364 pb, 218 pb

ANEXO D: Sexagem

Os fragmentos de 302 e/ou 331 pares de base, que incluem os genes *Jarid1c* (específico do cromossomo X) e *Jarid1d* (específico do cromossomo Y) foram amplificados por PCR utilizando os primers e condições a seguir:

Primer Forward – 5' CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG 3'

Primer Reverse – 5' GGTTTCTTAAACCGTCACC 3'

1. Preparo da PCR

Reagente	1 Amostra (µL)	10 Amostras (µL)
5x PCR Buffer	5	50
dNTPs	0,5	5
Primer Forward 250nmol	1	10
Primer Reverse 250nmol	1	10
Taq	0,2	2
ddH_20	14,3	143
Volume total	22	220

2. Alíquotar 3 µL de DNA nos tubos de PCR;

3. Adicionar 22 µL do mix de PCR ao tubo;

4. Colocar os tubos no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94ºC	5'
35	94ºC	20''
	54ºC	1'
	72ºC	40"
1	72ºC	10'

ANEXO E: Extração de RNA

1. Preparar 1 mL de etanol 70%: 700 µL etanol 100% + 300 µL de água miliQ;

2. Adicionar 600 µL de buffer RLT no eppendorf contendo as amostras de hipófises;

3. Homogeneizar os tecidos utilizando pistilo;

4. Adicionar 1 volume (600 µl) de etanol 70% no eppendorf e homogeneizar;

5. Transferir 700µl da amostra para a coluna RNeasy spin acoplada a um eppendorf de 2 mL e centrifugar por 15 seg a 10.000rpm;

6. Descartar o lisado;

***RNase free DNase set*:**

8. Adicionar 350 µL do buffer RW1 a coluna RNeasy spin e centrifugar por 15 seg a 10.000rpm e descartar a solução eluída;

9. Adicionar 80 µL do mix DNase/RDD a RNeasy spin coluna e deixar a temperatura ambiente (20-30 °C) por 15 minutos;

10. Adicionar 350 µL do buffer RW1 a coluna RNeasy spin e centrifugar por 15 seg a 10.000rpm e descartar a solução eluída;

11. Adicionar 500µL do buffer RPE à coluna RNeasy spin e centrifugar por 15 seg a 10000 rpm e descartar a solução eluída;

12. Adicionar 500µL do buffer RPE a coluna RNeasy spin e centrifugar por 2 min a 10000 rpm e descartar a solução eluída;

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

14. Trocar tubo para 1,5 ml e adicionar 50 µL de água RNase *free* a coluna RNeasy spin e centrifugar por 1 min a 10000rpm para eluir o RNA;

15. Repetir o passo 10 com eluente desta centrifugação;

16. Desprezar a coluna RNeasy spin e armazenar o RNA a -80ºC.

ANEXO F: Síntese de cDNA

1. Diluir 200 ng de RNA, ajustando o volume final para 25 μL

2. Preparo da transcrição reversa

Reagente	1 Amostra (μL)	10 Amostras (μL)
10x RT *Buffer*	5	50
10x RT *random primers*	5	50
25x dNTP mix (100nm)	2	20
***Multiscribe* RT**	2,5	25
H_2O *nuclease-free*	10,5	105
Volume total	25	250

3. Preparo da transcrição reversa

- Pipetar 25µL de 2x RT *master mix* em cada tubo eppendorf

- Pipetar 25µL da amostra de RNA

- Volume total= 50µL /tubo eppendorf 0,2mL

- Selar e *spin down* os tubos

4. Colocar os tubos no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	25ºC	10’
1	37ºC	120’
1	85ºC	5’’
1	4ºC	∞

- Estocar a - 20°C

ANEXO G: Sequências nucleotídicas dos primers utilizados nas reações de qPCR

Gene	*Primers*	Referência
Gh	S: CGCTTCTCGCTGCTGCTCAT AS: GTCCGAGGTGCCGAACATCA	(Rabeler, Mittag et al. 2004)
Lh	S: CAGTCTGCATCACCTTCACC AS: GCAGTACTCGGACCATGCTA	(Rabeler, Mittag et al. 2004)
Fsh	S: TCCCAGACCATGATGAAGTTGA AS: CAGCTATGGCAGCAGATTGC	(Aikawa, Sato et al. 2006)
Tsh	S: CCGCACCATGTTACTCCTTA AS: GTTCTGACAGCCTCGTGTAT	(Rabeler, Mittag et al. 2004)
Prl	S: GCAGTCACCATGACCATGAA AS: AGATTGGCAGAGGCTGAACA	(Rabeler, Mittag et al. 2004)
Cga	S: TGTTGCTTCTCCAGGGCATAT AS: TGGAACCAGCATTGTCTTCTTG	(Chen, Bangaru et al. 2009)
Sox3	S: GAACGCATCAGGTGAGAGAAG AS: GTCGGAGTGGTGCTCAGG	(Lee, Tan et al. 2012)
Hesx1	S: CCCAGATCTTCCCAGTGAGACTTC AS: GATTCTGTCTTCCTCTAAGTTTAGC	(Sajedi, Gaston-Massuet et al. 2008)
Otx2	S: GGAGAGGACGACATTTACTAGG AS: TTCTGACCTCCATTCTGCTG	(Yang, Kalkan et al. 2014)
Sox2	S: GCGGAGTGGAAACTTTTGTCC AS: CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT	(Zhao, Ajima et al. 2015)
Nanog	S: ATCCCGAGAACTATTCTTG AS: GGTACTTCTGCTTCTGAAAC	(Wei, Hu et al. 2017)
Cd44	S: CATCGAGAAGAGCACCCCAG AS: TGAGTGCACAGTTGAGGCAA	(Pereira, Ferreira-Guimarães et al. 2014)
Nr2e1	S: GGTTCAGACAGCTCCGATTAGAC AS: TGGAGAGCGGCAATGGCGGCAGC	(Shi, Deng et al. 2016)
Ki67	S: GCTGTCCTCAAGACAATCATCA AS: GGCGTTATCCCAGGAGACT	(Chern, Liao et al. 2012)
Sox9	S: CAAGCGGAGGCCGAAGA AS: CAGCTTGCACGTCGGTTT	(Xian, Georgess et al. 2017)
S100β	S: GTGGTGGACAAAGTGATGGA AS: GGAAGTCACACTCCCCATCC	(Marchese, Di Maria et al. 2017)

ANEXO H: Protocolo de qPCR

1. Preparar o cDNA, diluindo a amostra em 1:10;

2. Diluir os primers para 5 µM;

3. Preparar a placa;

Reagente	1 Amostra (µL)
SYBR® Green Mix	10
Primers	1
cDNA	1
H_2O *nuclease-free*	8
Volume total	20

4. Colocar a placa no termociclador e ajustar o programa de acordo com as condições a seguir:

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	25ºC	10’
1	37ºC	120’
1	85ºC	5’’
1	4ºC	∞

ANEXO I: Protocolo de imunohistoquímica 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 60ºC 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 37ºC. 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 37ºC e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4ºC.

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 37ºC.

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 37ºC.

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 a 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 J: Dados brutos qPCR

Puberdade: Fêmea 1				
Gene	**ΔΔCT**	**DP**	**Fold change**	***p***
Sox2	-1,86	0,035	3,63	<0,00001
Sox9	0,225	0,155	0,855	0,355
Nanog	-3,615	0,240	12,252	0,00007
Nr2e1	-3,8	0,388	13,92	0,000156
Otx2	-1,445	0,277	2,722	0,006603
Hesx1	-4,785	0,070	27,57	<0,00001
Ki67	3,965	0,395	0,064	0,000038
S100b	-3,615	0,176	12,25	0,00045
CD44	-3,72	0,3919	13,177	0,003592
Sox3	-3,29	0,226	9,781	0,000236
Gh	9,9	0,014	0,001	<0,00001
Lh	2,22	0,190	0,2146	0,00090
Fsh	-1,925	0,091	3,797	0,000522
Tsh	-0,205	0,120	1,152	0,1167
Cga	2,17	0,091	0,2222	0,00187
Prl	13,14	0,254	0,00011	<0,00001

Puberdade: Fêmea 2				
Gene	**ΔΔCT**	**DP**	**Fold change**	***p***
Sox2	1,61	0,205	0,327	0,001283
Sox9	1,295	0,084	0,407	0,000265
Nanog	3,75	0,021	0,074	0,001726
Nr2e1	3,285	0,346	0,102	0,000071
Otx2	-1,73	0,254	3,317	0,000083
Hesx1	4,98	0,079	0,031	0,044368

Ki67	1,935	0,353	0,261	0,000301
S100b	2,895	0,070	0,134	0,00021
CD44	3,15	0,275	0,112	0,00013
Sox3	4,2	0,304	0,054	0,000147
Gh	-0,16	0,014	1,117	0,06484
Lh	-2,915	0,190	7,542	0,000014
Fsh	-4,645	0,091	25,01	<0,00001
Tsh	1,335	0,120	0,396	0,000122
Cga	1,615	0,091	0,326	0,000067
Prl	-1,065	0,254	2,09	0,000559

Adulto				
Gene	**ΔΔCT**	**DP**	**Fold change**	***p***
Sox2	-1,35	0,438	2,549	0,001173
Sox9	-1,65	0,127	3,138	0,000103
Nanog	5,105	0,256	0,029	0,000337
Nr2e1	2,565	0,052	0,168	0,070429
Otx2	-1,07	0,028	2,099	0,095323
Hesx1	-1,62	0,192	3,073	0,270084
Ki67	1,86	0,056	0,275	<0,00001
S100b	0,525	0,360	0,694	0,03825
CD44	-1,465	0,626	2,760	0,102131
Sox3	3,21	0,108	0,108	0,000308
Gh	18,03	0,131	3,73E-06	<0,00001
Lh	0,515	0,063	0,699	0,019197
Fsh	1,86	0,106	0,275	0,009329
Tsh	0,765	0,190	0,588	0,002472
Cga	0,8	0,049	0,574	0,000204

Prl	13,315	0,190	9,81E-05	<0,00001

Referências

Aikawa, S., T. Sato, T. Ono, T. Kato and Y. Kato (2006). "High level expression of Prop-1 gene in gonadotropic cell lines." J Reprod Dev **52**(2): 195-201.

Arnhold, I. J., M. Nery, M. R. Brown, T. C. Voss, T. C. VanderHeyden, M. E. Adess, D. L. Hurley, B. L. Wajchenberg and J. S. Parks (1998). "Clinical and molecular characterization of a Brazilian patient with Pit-1 deficiency." J Pediatr Endocrinol Metab **11**(5): 623-630.

BARTKE, A. (1964). "HISTOLOGY OF THE ANTERIOR HYPOPHYSIS, THYROID AND GONADS OF TWO TYPES OF DWARF MICE." Anat Rec **149**: 225-235.

Bartke, A. (1965). "The response of two types of dwarf mice to growth hormone, thyrotropin, and thyroxine." Gen Comp Endocrinol **5**(4): 418-426.

Bartke, A., H. Brown-Borg, J. Mattison, B. Kinney, S. Hauck and C. Wright (2001). "Prolonged longevity of hypopituitary dwarf mice." Exp Gerontol **36**(1): 21-28.

Bartke, A., J. C. Wright, J. A. Mattison, D. K. Ingram, R. A. Miller and G. S. Roth (2001). "Extending the lifespan of long-lived mice." Nature **414**(6862): 412.

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

Bechtold-Dalla Pozza, S., S. Hiedl, J. Roeb, P. Lohse, R. E. Malik, S. Park, M. Durán-Prado and S. J. Rhodes (2012). "A recessive mutation resulting in a disabling amino acid substitution (T194R) in the LHX3 homeodomain causes combined pituitary hormone deficiency." Horm Res Paediatr **77**(1): 41-51.

Bhangoo, A. P., C. S. Hunter, J. J. Savage, H. Anhalt, S. Pavlakis, E. C. Walvoord, S. Ten and S. J. Rhodes (2006). "Clinical case seminar: a novel LHX3 mutation presenting as combined pituitary hormonal deficiency." J Clin Endocrinol Metab **91**(3): 747-753.

Boiani, M. and H. R. Scholer (2005). "Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 872-884.

Borrelli, E., R. A. Heyman, C. Arias, P. E. Sawchenko and R. M. Evans (1989). "Transgenic mice with inducible dwarfism." Nature **339**(6225): 538-541.

Bottner, A., E. Keller, J. Kratzsch, H. Stobbe, J. F. Weigel, A. Keller, W. Hirsch, W. Kiess, W. F. Blum and R. W. Pfaffle (2004). "PROP1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5256-5265.

Brickman, J. M., M. Clements, R. Tyrell, D. McNay, K. Woods, J. Warner, A. Stewart, R. S. Beddington and M. Dattani (2001). "Molecular effects of novel mutations in Hesx1/HESX1 associated with human pituitary disorders." Development **128**(24): 5189-5199.

Buckwalter, M. S., R. W. Katz and S. A. Camper (1991). "Localization of the panhypopituitary dwarf mutation (df) on mouse chromosome 11 in an intersubspecific backcross." Genomics **10**(3): 515-526.

Burrows, H. L., K. R. Douglas, A. F. Seasholtz and S. A. Camper (1999). "Genealogy of the Anterior Pituitary Gland: Tracing a Family Tree." Trends Endocrinol Metab **10**(9): 343-352.

Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele and C. T. Wittwer (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem **55**(4): 611-622.

Camper, S. A., T. L. Saunders, R. W. Katz and R. H. Reeves (1990). "The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation." Genomics **8**(3): 586-590.

Carbajo-Perez, E. and Y. G. Watanabe (1990). "Cellular proliferation in the anterior pituitary of the rat during the postnatal period." Cell Tissue Res **261**(2): 333-338.

Carvalho, L. R., K. S. Woods, B. B. Mendonca, N. Marcal, A. L. Zamparini, S. Stifani, J. M. Brickman, I. J. Arnhold and M. T. Dattani (2003). "A homozygous mutation in

HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction." J Clin Invest **112**(8): 1192-1201.

Cavaleri, F. and H. R. Schöler (2003). "Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra." Cell **113**(5): 551-552.

Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie and A. Smith (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-655.

Chandrashekar, V., D. Zaczek and A. Bartke (2004). "The consequences of altered somatotropic system on reproduction." Biol Reprod **71**(1): 17-27.

Chen, S., M. L. Bangaru, L. Sneade, J. A. Dunckley, N. Ben-Jonathan and S. Kansra (2009). "Epidermal growth factor receptor cross-talks with ligand-occupied estrogen receptor-alpha to modulate both lactotroph proliferation and prolactin gene expression." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E331-339.

Cheng, T. C., W. G. Beamer, J. A. Phillips, A. Bartke, R. L. Mallonee and C. Dowling (1983). "Etiology of growth hormone deficiency in little, Ames, and Snell dwarf mice." Endocrinology **113**(5): 1669-1678.

Chern, C. M., J. F. Liao, Y. H. Wang and Y. C. Shen (2012). "Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice." Free Radic Biol Med **52**(9): 1634-1647.

Cheung, L. Y., S. W. Davis, M. L. Brinkmeier, S. A. Camper and M. I. Pérez-Millán (2017). "Regulation of pituitary stem cells by epithelial to mesenchymal transition events and signaling pathways." Mol Cell Endocrinol **445**: 14-26.

Childs, G. V. (2000). "Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system." Trends Endocrinol Metab **11**(5): 168-175.

Childs, G. V. (2002). "Development of gonadotropes may involve cyclic transdifferentiation of growth hormone cells." Arch Physiol Biochem **110**(1-2): 42-49.

Clapcote, S. J. and J. C. Roder (2005). "Simplex PCR assay for sex determination in mice." Biotechniques **38**(5): 702, 704, 706.

Cohen, L. E. (2012). "Genetic disorders of the pituitary." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **19**(1): 33-39.

Crane, W. A. and R. S. Loomes (1967). "Effect of age, sex, and hormonal state on tritiated thymidine uptake by rat pituitary." Br J Cancer **21**(4): 787-792.

Cushman, L. J., D. E. Watkins-Chow, M. L. Brinkmeier, L. T. Raetzman, A. L. Radak, R. V. Lloyd and S. A. Camper (2001). "Persistent Prop1 expression delays gonadotrope differentiation and enhances pituitary tumor susceptibility." Hum Mol Genet **10**(11): 1141-1153.

Dasen, J. S., J. P. Martinez Barbera, T. S. Herman, S. O. Connell, L. Olson, B. Ju, J. Tollkuhn, S. H. Baek, D. W. Rose and M. G. Rosenfeld (2001). "Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis." Genes Dev **15**(23): 3193-3207.

Dattani, M. T., J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, J. M. Brickman, R. Gupta, I. L. Mårtensson, H. Toresson, M. Fox, J. K. Wales, P. C. Hindmarsh, S. Krauss, R. S. Beddington and I. C. Robinson (1998). "Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse." Nat Genet **19**(2): 125-133.

Dattani, M. T. and I. C. Robinson (2000). "The molecular basis for developmental disorders of the pituitary gland in man." Clin Genet **57**(5): 337-346.

Davis, S. W., F. Castinetti, L. R. Carvalho, B. S. Ellsworth, M. A. Potok, R. H. Lyons, M. L. Brinkmeier, L. T. Raetzman, P. Carninci, A. H. Mortensen, Y. Hayashizaki, I. J. Arnhold, B. B. Mendonça, T. Brue and S. A. Camper (2010). "Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes." Mol Cell Endocrinol **323**(1): 4-19.

Davis, S. W., J. L. Keisler, M. I. Pérez-Millán, V. Schade and S. A. Camper (2016). "All Hormone-Producing Cell Types of the Pituitary Intermediate and Anterior Lobes Derive From Prop1-Expressing Progenitors." Endocrinology **157**(4): 1385-1396.

De Rienzo, F., S. Mellone, S. Bellone, D. Babu, I. Fusco, F. Prodam, A. Petri, R. Muniswamy, F. De Luca, M. Salerno, P. Momigliano-Richardi, G. Bona, M. Giordano and I. S. G. o. G. o. CPHD (2015). "Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort." Clin Endocrinol (Oxf) **83**(6): 849-860.

Denef, C., K. Pals, A. Hauspie, H. Vankelecom and E. Seuntjens (2005). "Combinatorial expression of phenotypes of different cell lineages in the rat and mouse pituitary." Ann N Y Acad Sci **1040**: 84-88.

Dollé, M. E., W. K. Snyder and J. Vijg (2001). "Genotyping the Prop-1 mutation in Ames dwarf mice." Mech Ageing Dev **122**(15): 1915-1918.

Evans, H. M. and J. A. Long (1922). "Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance." Proc Natl Acad Sci U S A **8**(3): 38-39.

Fauquier, T., K. Rizzoti, M. Dattani, R. Lovell-Badge and I. C. Robinson (2008). "SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2907-2912.

FRANCKE, C. (1948). "Some observations on the morphological structure of explanted immature ovaries and on ovario-hypophyses." Acta Neerl Morphol Norm Pathol **6**(1-2): 129-140.

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

Fu, Q. and H. Vankelecom (2012). "Regenerative capacity of the adult pituitary: multiple mechanisms of lactotrope restoration after transgenic ablation." Stem Cells Dev **21**(18): 3245-3257.

Gage, P. J., M. L. Brinkmeier, L. M. Scarlett, L. T. Knapp, S. A. Camper and K. A. Mahon (1996). "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 **10**(12): 1570-1581.

Hamel, B. C., A. P. Smits, B. J. Otten, B. van den Helm, H. H. Ropers and E. C. Mariman (1996). "Familial X-linked mental retardation and isolated growth hormone deficiency: clinical and molecular findings." Am J Med Genet **64**(1): 35-41.

Himes, A. D. and L. T. Raetzman (2009). "Premature differentiation and aberrant movement of pituitary cells lacking both Hes1 and Prop1." Dev Biol **325**(1): 151-161.

Horvath, E. and K. Kovacs (2002). "Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell?" Ultrastruct Pathol **26**(4): 219-228.

Horvath, E., R. V. Lloyd and K. Kovacs (1990). "Propylthiouracyl-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyroidectomy cells. A morphologic study of the rat pituitary including immunoelectron microscopy." Lab Invest **63**(4): 511-520.

Inoue, K., C. Mogi, S. Ogawa, M. Tomida and S. Miyai (2002). "Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells?" Arch Physiol Biochem **110**(1-2): 50-53.

Jackson Laboratory (Bar Harbor Me.) and E. L. Green (1966). Biology of the laboratory mouse, by the staff of the Jackson Laboratory. Earl L. Green, editor. New York,, McGraw-Hill.

Jelsig, A. M., B. R. Diness, S. Kreiborg, K. M. Main, V. A. Larsen and H. Hove (2018). "A complex phenotype in a family with a pathogenic SOX3 missense variant." Eur J Med Genet **61**(3): 168-172.

Johnsen, S. G. (1970). "Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males." Hormones **1**(1): 2-25.

Kelberman, D., K. Rizzoti, A. Avilion, M. Bitner-Glindzicz, S. Cianfarani, J. Collins, W. K. Chong, J. M. Kirk, J. C. Achermann, R. Ross, D. Carmignac, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson and M. T. Dattani (2006). "Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans." J Clin Invest **116**(9): 2442-2455.

Kelberman, D., K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson and M. T. Dattani (2009). "Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse." Endocr Rev **30**(7): 790-829.

Kendall, S. K., L. C. Samuelson, T. L. Saunders, R. I. Wood and S. A. Camper (1995). "Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice." Genes Dev **9**(16): 2007-2019.

Kilkenny, C., W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson and D. G. Altman (2010). "Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research." PLoS Biol **8**(6): e1000412.

Kineman, R. D., W. J. Faught and L. S. Frawley (1992). "The ontogenic and functional relationships between growth hormone- and prolactin-releasing cells during the development of the bovine pituitary." J Endocrinol **134**(1): 91-96.

Kriström, B., A. M. Zdunek, A. Rydh, H. Jonsson, P. Sehlin and S. A. Escher (2009). "A novel mutation in the LIM homeobox 3 gene is responsible for combined pituitary hormone deficiency, hearing impairment, and vertebral malformations." J Clin Endocrinol Metab **94**(4): 1154-1161.

Kumar, D. and U. Boehm (2013). "Genetic dissection of puberty in mice." Exp Physiol **98**(11): 1528-1534.

Lagerström-Fermér, M., M. Sundvall, E. Johnsen, G. L. Warne, S. M. Forrest, J. D. Zajac, A. Rickards, D. Ravine, U. Landegren and U. Pettersson (1997). "X-linked

recessive panhypopituitarism associated with a regional duplication in Xq25-q26." Am J Hum Genet **60**(4): 910-916.

Landolt, A. M. (1973). "Regeneration of the human pituitary." J Neurosurg **39**(1): 35-41.

Lee, K., J. Tan, M. B. Morris, K. Rizzoti, J. Hughes, P. S. Cheah, F. Felquer, X. Liu, S. Piltz, R. Lovell-Badge and P. Q. Thomas (2012). "Congenital hydrocephalus and abnormal subcommissural organ development in Sox3 transgenic mice." PLoS One **7**(1): e29041.

Levy, A. (2002). "Physiological implications of pituitary trophic activity." J Endocrinol **174**(2): 147-155.

Levy, A. (2008). "Stem cells, hormones and pituitary adenomas." J Neuroendocrinol **20**(1): 139-140.

Li, S., E. B. Crenshaw, E. J. Rawson, D. M. Simmons, L. W. Swanson and M. G. Rosenfeld (1990). "Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1." Nature **347**(6293): 528-533.

Lin, C., S. C. Lin, C. P. Chang and M. G. Rosenfeld (1992). "Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth." Nature **360**(6406): 765-768.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Madeira, J. L., M. Y. Nishi, M. Nakaguma, A. F. Benedetti, I. P. Biscotto, T. Fernandes, T. Pequeno, T. Figueiredo, M. M. Franca, F. A. Correa, A. P. Otto, M. Abrão, M. B. Miras, S. Santos, A. A. Jorge, E. F. Costalonga, B. B. Mendonca, I. J. Arnhold and L. R. Carvalho (2017). "Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations." Clin Endocrinol (Oxf) **87**(6): 725-732.

Marchese, E., V. Di Maria, D. Samengo, G. Pani, F. Michetti and M. C. Geloso (2017). "Post-natal Deletion of Neuronal cAMP Responsive-Element Binding (CREB)-1 Promotes Pro-inflammatory Changes in the Mouse Hippocampus." Neurochem Res **42**(8): 2230-2245.

Matsuo, I., S. Kuratani, C. Kimura, N. Takeda and S. Aizawa (1995). "Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head." Genes Dev **9**(21): 2646-2658.

Mayer, C., M. Acosta-Martinez, S. L. Dubois, A. Wolfe, S. Radovick, U. Boehm and J. E. Levine (2010). "Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(52): 22693-22698.

McNicol, A. M. and E. Carbajo-Perez (1999). "Aspects of anterior pituitary growth, with special reference to corticotrophs." Pituitary **1**(3-4): 257-268.

MCTI (2013). Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins

científicos e didáticos. C. N. d. C. d. Experimentação and Animal. Brasilia.

MCTI (2015). Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de

animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Melmed, S. (2003). "Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary." J Clin Invest **112**(11): 1603-1618.

Mendis-Handagama, S. M. and H. B. Ariyaratne (2001). "Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis." Biol Reprod **65**(3): 660-671.

Mendonca, B. B., M. G. Osorio, A. C. Latronico, V. Estefan, L. S. Lo and I. J. Arnhold (1999). "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 **84**(3): 942-945.

Messier, B. (1966). "Changes in the number of mouse thyrotropes following radiothyroidectomy." Acta Endocrinol (Copenh) **52**(3): 391-398.

Muranishi, Y., K. Terada, T. Inoue, K. Katoh, T. Tsujii, R. Sanuki, D. Kurokawa, S. Aizawa, Y. Tamaki and T. Furukawa (2011). "An essential role for RAX homeoprotein and NOTCH-HES signaling in Otx2 expression in embryonic retinal photoreceptor cell fate determination." J Neurosci **31**(46): 16792-16807.

Nasonkin, I. O., R. D. Ward, D. L. Bavers, F. Beuschlein, A. H. Mortensen, C. E. Keegan, G. D. Hammer and S. A. Camper (2011). "Aged PROP1 deficient dwarf mice maintain ACTH production." PLoS One **6**(12): e28355.

Nasonkin, I. O., R. D. Ward, L. T. Raetzman, A. F. Seasholtz, T. L. Saunders, P. J. Gillespie and S. A. Camper (2004). "Pituitary hypoplasia and respiratory distress syndrome in Prop1 knockout mice." Hum Mol Genet **13**(22): 2727-2735.

Navardauskaite, R., P. Dusatkova, B. Obermannova, R. W. Pfaeffle, W. F. Blum, D. Adukauskiene, N. Smetanina, O. Cinek, R. Verkauskiene and J. Lebl (2014). "High prevalence of PROP1 defects in Lithuania: phenotypic findings in an ethnically homogenous cohort of patients with multiple pituitary hormone deficiency." J Clin Endocrinol Metab **99**(1): 299-306.

Nelson, J. F., K. Karelus, L. S. Felicio and T. E. Johnson (1990). "Genetic influences on the timing of puberty in mice." Biol Reprod **42**(4): 649-655.

Nolan, L. A., E. Kavanagh, S. L. Lightman and A. Levy (1998). "Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment." J Neuroendocrinol **10**(3): 207-215.

Nolan, L. A., H. R. Lunness, S. L. Lightman and A. Levy (1999). "The effects of age and spontaneous adenoma formation on trophic activity in the rat pituitary gland: a comparison with trophic activity in the human pituitary and in human pituitary adenomas." J Neuroendocrinol **11**(5): 393-401.

Obermannova, B., R. Pfaeffle, A. Zygmunt-Gorska, J. Starzyk, R. Verkauskiene, N. Smetanina, O. Bezlepkina, V. Peterkova, H. Frisch, O. Cinek, C. J. Child, W. F.

Blum and J. Lebl (2011). "Mutations and pituitary morphology in a series of 82 patients with PROP1 gene defects." Horm Res Paediatr **76**(5): 348-354.

Oishi, Y., M. Okuda, H. Takahashi, T. Fujii and S. Morii (1993). "Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change." Anat Rec **235**(1): 111-120.

Osorio, M. G., S. Marui, A. A. Jorge, A. C. Latronico, L. S. Lo, C. C. Leite, V. Estefan, B. B. Mendonca and I. J. Arnhold (2002). "Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes." J Clin Endocrinol Metab **87**(11): 5076-5084.

Otsuka, Y., H. Ishikawa, T. Omoto, Y. Takasaki and F. Yoshimura (1971). "Effect of CRF on the morphological and functional differentiation of the cultured chromophobes isolated from rat anterior pituitaries." Endocrinol Jpn **18**(2): 133-153.

Pereira, F. V., C. A. Ferreira-Guimarães, T. Paschoalin, J. A. Scutti, F. M. Melo, L. S. Silva, A. C. Melo, P. Silva, M. Tiago, A. L. Matsuo, L. Juliano, M. A. Juliano, A. K. Carmona, L. R. Travassos and E. G. Rodrigues (2014). "A natural bacterial-derived product, the metalloprotease arazyme, inhibits metastatic murine melanoma by inducing MMP-8 cross-reactive antibodies." PLoS One **9**(4): e96141.

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

Porter, T. E., C. D. Wiles and L. S. Frawley (1991). "Evidence for bidirectional interconversion of mammotropes and somatotropes: rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning." Endocrinology **129**(3): 1215-1220.

Prince, K. L., E. C. Walvoord and S. J. Rhodes (2011). "The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease." Nat Rev Endocrinol **7**(12): 727-737.

Pérez Millán, M. I., M. L. Brinkmeier, A. H. Mortensen and S. A. Camper (2016). "PROP1 triggers epithelial-mesenchymal transition-like process in pituitary stem cells." Elife **5**.

Rabeler, R., J. Mittag, L. Geffers, U. Rüther, M. Leitges, A. F. Parlow, T. J. Visser and K. Bauer (2004). "Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism." Mol Endocrinol **18**(6): 1450-1460.

Raetzman, L. T., S. A. Ross, S. Cook, S. L. Dunwoodie, S. A. Camper and P. Q. Thomas (2004). "Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression." Dev Biol **265**(2): 329-340.

Raetzman, L. T., R. Ward and S. A. Camper (2002). "Lhx4 and Prop1 are required for cell survival and expansion of the pituitary primordia." Development **129**(18): 4229-4239.

Riepe, F. G., C. J. Partsch, O. Blankenstein, H. Monig, R. W. Pfaffle and W. G. Sippell (2001). "Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to PROP1 mutation." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4353-4357.

Rizzoti, K., H. Akiyama and R. Lovell-Badge (2013). "Mobilized adult pituitary stem cells contribute to endocrine regeneration in response to physiological demand." Cell Stem Cell **13**(4): 419-432.

Roberson, M. S., W. E. Schoderbek, G. Tremml and R. A. Maurer (1994). "Activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by a LIM-homeodomain transcription factor." Mol Cell Biol **14**(5): 2985-2993.

Rodda, D. J., J. L. Chew, L. H. Lim, Y. H. Loh, B. Wang, H. H. Ng and P. Robson (2005). "Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2." J Biol Chem **280**(26): 24731-24737.

Sajedi, E., C. Gaston-Massuet, C. L. Andoniadou, M. Signore, P. J. Hurd, M. Dattani and J. P. Martinez-Barbera (2008). "DNMT1 interacts with the developmental transcriptional repressor HESX1." Biochim Biophys Acta **1783**(1): 131-143.

Sasaki, F., P. Wu, D. Rougeau, G. Unabia and G. V. Childs (1990). "Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environment stress." Endocrinology **127**(1): 285-297.

Savage, J. J., B. C. Yaden, P. Kiratipranon and S. J. Rhodes (2003). "Transcriptional control during mammalian anterior pituitary development." Gene **319**: 1-19.

Scheithauer, B. W., K. Kovacs, R. V. Randall and N. Ryan (1985). "Pituitary gland in hypothyroidism. Histologic and immunocytologic study." Arch Pathol Lab Med **109**(6): 499-504.

Scheithauer, B. W., T. Sano, K. T. Kovacs, W. F. Young, Jr., N. Ryan and R. V. Randall (1990). "The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases." Mayo Clin Proc **65**(4): 461-474.

Schneider, A., S. J. Matkovich, T. Saccon, B. Victoria, L. Spinel, M. Lavasani, A. Bartke, P. Golusinski and M. M. Masternak (2017). "Ovarian transcriptome associated with reproductive senescence in the long-living Ames dwarf mice." Mol Cell Endocrinol **439**: 328-336.

Schoenmakers, N., K. S. Alatzoglou, V. K. Chatterjee and M. T. Dattani (2015). "Recent advances in central congenital hypothyroidism." J Endocrinol **227**(3): R51-71.

SCHWARTZ, N. B. (1964). "ACUTE EFFECTS OF OVARIECTOMY ON PITUITARY LH, UTERINE WEIGHT, AND VAGINAL CORNIFICATION." Am J Physiol **207**: 1251-1259.

Scully, K. M. and M. G. Rosenfeld (2002). "Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis." Science **295**(5563): 2231-2235.

Sheng, H. Z. and H. Westphal (1999). "Early steps in pituitary organogenesis." Trends Genet **15**(6): 236-240.

Shi, X., H. Deng, Z. Dai, Y. Xu, X. Xiong, P. Ma and J. Cheng (2016). "Nr2e1 Deficiency Augments Palmitate-Induced Oxidative Stress in Beta Cells." Oxid Med Cell Longev **2016**: 9648769.

Shi, Y., D. Chichung Lie, P. Taupin, K. Nakashima, J. Ray, R. T. Yu, F. H. Gage and R. M. Evans (2004). "Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells." Nature **427**(6969): 78-83.

Simmons, D. M., J. W. Voss, H. A. Ingraham, J. M. Holloway, R. S. Broide, M. G. Rosenfeld and L. W. Swanson (1990). "Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors." Genes Dev **4**(5): 695-711.

Sisk, C. L. and D. L. Foster (2004). "The neural basis of puberty and adolescence." Nat Neurosci **7**(10): 1040-1047.

Sisk, C. L., H. N. Richardson, P. E. Chappell and J. E. Levine (2001). "In vivo gonadotropin-releasing hormone secretion in female rats during peripubertal development and on proestrus." Endocrinology **142**(7): 2929-2936.

Sloop, K. W., G. E. Parker, K. R. Hanna, H. A. Wright and S. J. Rhodes (2001). "LHX3 transcription factor mutations associated with combined pituitary hormone deficiency impair the activation of pituitary target genes." Gene **265**(1-2): 61-69.

Snell, G. D. (1929). "DWARF, A NEW MENDELIAN RECESSIVE CHARACTER OF THE HOUSE MOUSE." Proc Natl Acad Sci U S A **15**(9): 733-734.

Sobrier, M. L., Y. C. Tsai, C. Pérez, B. Leheup, T. Bouceba, P. Duquesnoy, B. Copin, D. Sizova, A. Penzo, B. Z. Stanger, N. E. Cooke, S. A. Liebhaber and S. Amselem (2016). "Functional characterization of a human POU1F1 mutation associated with isolated growth hormone deficiency: a novel etiology for IGHD." Hum Mol Genet **25**(3): 472-483.

Sornson, M. W., W. Wu, J. S. Dasen, S. E. Flynn, D. J. Norman, S. M. O'Connell, I. Gukovsky, C. Carriere, A. K. Ryan, A. P. Miller, L. Zuo, A. S. Gleiberman, B. Andersen, W. G. Beamer and M. G. Rosenfeld (1996). "Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism." Nature **384**(6607): 327-333.

Stefaneanu, L., K. Kovacs, R. V. Lloyd, B. W. Scheithauer, W. F. Young, Jr., T. Sano and L. Jin (1992). "Pituitary lactotrophs and somatotrophs in pregnancy: a correlative in situ hybridization and immunocytochemical study." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **62**(5): 291-296.

Taniguchi, Y., R. Kominami, S. Yasutaka and Y. Kawarai (2000). "Proliferation and differentiation of pituitary corticotrophs during the fetal and postnatal period: a quantitative immunocytochemical study." Anat Embryol (Berl) **201**(4): 229-234.

Taniguchi, Y., R. Tamatani, S. Yasutaka and Y. Kawarai (1995). "Proliferation of pituitary corticotrophs following adrenalectomy as revealed by immunohistochemistry combined with bromodeoxyuridine-labeling." Histochem Cell Biol **103**(2): 127-130.

Taniguchi, Y., S. Yasutaka, R. Kominami and H. Shinohara (2001). "Proliferation and differentiation of thyrotrophs in the pars distalis of the rat pituitary gland during the fetal and postnatal period." Anat Embryol (Berl) **203**(4): 249-253.

Taniguchi, Y., S. Yasutaka, R. Kominami and H. Shinohara (2002). "Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells." Anat Embryol (Berl) **206**(1-2): 1-11.

Tatsumi, K., K. Miyai, T. Notomi, K. Kaibe, N. Amino, Y. Mizuno and H. Kohno (1992). "Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene." Nat Genet **1**(1): 56-58.

Thomas, P. Q., B. V. Johnson, J. Rathjen and P. D. Rathjen (1995). "Sequence, genomic organization, and expression of the novel homeobox gene Hesx1." J Biol Chem **270**(8): 3869-3875.

Truett, G. E., P. Heeger, R. L. Mynatt, A. A. Truett, J. A. Walker and M. L. Warman (2000). "Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT)." Biotechniques **29**(1): 52, 54.

Turton, J. P., A. Mehta, J. Raza, K. S. Woods, A. Tiulpakov, J. Cassar, K. Chong, P. Q. Thomas, M. Eunice, A. C. Ammini, P. M. Bouloux, J. Starzyk, P. C. Hindmarsh and M. T. Dattani (2005). "Mutations within the transcription factor PROP1 are rare in a cohort of patients with sporadic combined pituitary hormone deficiency (CPHD)." Clin Endocrinol (Oxf) **63**(1): 10-18.

Vankelecom, H. (2007). "Stem cells in the postnatal pituitary?" Neuroendocrinology **85**(2): 110-130.

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

Vankelecom, H. and L. Gremeaux (2010). "Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field." Gen Comp Endocrinol **166**(3): 478-488.

Vergara, M., M. Smith-Wheelock, J. M. Harper, R. Sigler and R. A. Miller (2004). "Hormone-treated snell dwarf mice regain fertility but remain long lived and disease resistant." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(12): 1244-1250.

Vidal, S., E. Horvath, K. Kovacs, S. M. Cohen, R. V. Lloyd and B. W. Scheithauer (2000). "Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism." Virchows Arch **436**(1): 43-51.

Vidal, S., E. Horvath, K. Kovacs, R. V. Lloyd and H. S. Smyth (2001). "Reversible transdifferentiation: interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia." Mod Pathol **14**(1): 20-28.

VIVIEN, J. H. (1950). "[Period of hypophyseal differentiation in the albino mouse]." C R Seances Soc Biol Fil **144**(3-4): 284-287.

Ward, R. D., L. T. Raetzman, H. Suh, B. M. Stone, I. O. Nasonkin and S. A. Camper (2005). "Role of PROP1 in pituitary gland growth." Mol Endocrinol **19**(3): 698-710.

Ward, R. D., B. M. Stone, L. T. Raetzman and S. A. Camper (2006). "Cell proliferation and vascularization in mouse models of pituitary hormone deficiency." Mol Endocrinol **20**(6): 1378-1390.

Wei, Y., Z. Hu, W. Gu, G. Liu, B. Shi, E. Liu and T. Liu (2017). "CD117+CD44+ Stem T Cells Develop in the Thymus and Potently Suppress T-cell Proliferation by Modulating the CTLA-4 Pathway." Stem Cell Res Ther **8**(1): 56.

Willems, C., Q. Fu, H. Roose, F. Mertens, B. Cox, J. Chen and H. Vankelecom (2016). "Regeneration in the Pituitary After Cell-Ablation Injury: Time-Related Aspects and Molecular Analysis." Endocrinology **157**(2): 705-721.

Williams, K., K. Motiani, P. V. Giridhar and S. Kasper (2013). "CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches." Exp Biol Med (Maywood) **238**(3): 324-338.

Wilson, D. B. (1986). "Distribution of 3H-thymidine in the postnatal hypophysis of the C57BL mouse." Acta Anat (Basel) **126**(2): 121-126.

Woods, K. S., M. Cundall, J. Turton, K. Rizotti, A. Mehta, R. Palmer, J. Wong, W. K. Chong, M. Al-Zyoud, M. El-Ali, T. Otonkoski, J. P. Martinez-Barbera, P. Q. Thomas, I. C. Robinson, R. Lovell-Badge, K. J. Woodward and M. T. Dattani (2005). "Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism." Am J Hum Genet **76**(5): 833-849.

Wray, S., A. Nieburgs and S. Elkabes (1989). "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 **46**(2): 309-318.

Wu, W., J. D. Cogan, R. W. Pfäffle, J. S. Dasen, H. Frisch, S. M. O'Connell, S. E. Flynn, M. R. Brown, P. E. Mullis, J. S. Parks, J. A. Phillips and M. G. Rosenfeld (1998). "Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency." Nat Genet **18**(2): 147-149.

Xatzipsalti, M., A. Voutetakis, L. Stamoyannou, G. P. Chrousos and C. Kanaka-Gantenbein (2019). "Congenital Hypopituitarism: Various Genes, Various Phenotypes." Horm Metab Res **51**(2): 81-90.

Xian, L., D. Georgess, T. Huso, L. Cope, A. Belton, Y. T. Chang, W. Kuang, Q. Gu, X. Zhang, S. Senger, A. Fasano, D. L. Huso, A. J. Ewald and L. M. S. Resar (2017). "HMGA1 amplifies Wnt signalling and expands the intestinal stem cell compartment and Paneth cell niche." Nat Commun **8**: 15008.

Yang, S. H., T. Kalkan, C. Morissroe, H. Marks, H. Stunnenberg, A. Smith and A. D. Sharrocks (2014). "Otx2 and Oct4 drive early enhancer activation during embryonic stem cell transition from naive pluripotency." Cell Rep **7**(6): 1968-1981.

Yoshida, S., T. Kato, H. Yako, T. Susa, L. Y. Cai, M. Osuna, K. Inoue and Y. Kato (2011). "Significant quantitative and qualitative transition in pituitary stem / progenitor cells occurs during the postnatal development of the rat anterior pituitary." J Neuroendocrinol **23**(10): 933-943.

Yoshimura, F., K. Harumiya, H. Ishikawa and Y. Otsuka (1969). "Differentiation of isolated chromophobes into acidophils or basophils when transplanted into the hypophysiotrophic area of hypothalamus." Endocrinol Jpn **16**(5): 531-540.

Yoshimura, F., K. Harumiya and H. Kiyama (1970). "Light and electron microscopic studies of the cytogenesis of anterior pituitary cells in perinatal rats in reference to the development of target organs." Arch Histol Jpn **31**(3): 333-369.

Yu, T., G. Chang, Q. Cheng, R. Yao, J. Li, Y. Xu, G. Li, Y. Ding, Y. Qing, N. Li, Y. Shen, X. Wang and J. Wang (2018). "Increased transactivation and impaired repression of β-catenin-mediated transcription associated with a novel SOX3 missense mutation in an X-linked hypopituitarism pedigree with modest growth failure." Mol Cell Endocrinol.

Zhao, W., R. Ajima, Y. Ninomiya and Y. Saga (2015). "Segmental border is defined by Ripply2-mediated Tbx6 repression independent of Mesp2." Dev Biol **400**(1): 105-117.

Zhu, X., A. S. Gleiberman and M. G. Rosenfeld (2007). "Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks." Physiol Rev **87**(3): 933-963.

Zygmunt-Górska, A., J. Starzyk, D. Adamek, E. Radwańska, P. Sucharski, I. Herman-Sucharska and J. J. Pietrzyk (2009). "Pituitary enlargement in patients with PROP1 gene inactivating mutation represents cystic hyperplasia of the intermediate pituitary lobe. Histopathology and over 10 years follow-up of two patients." J Pediatr Endocrinol Metab **22**(7): 653-660.