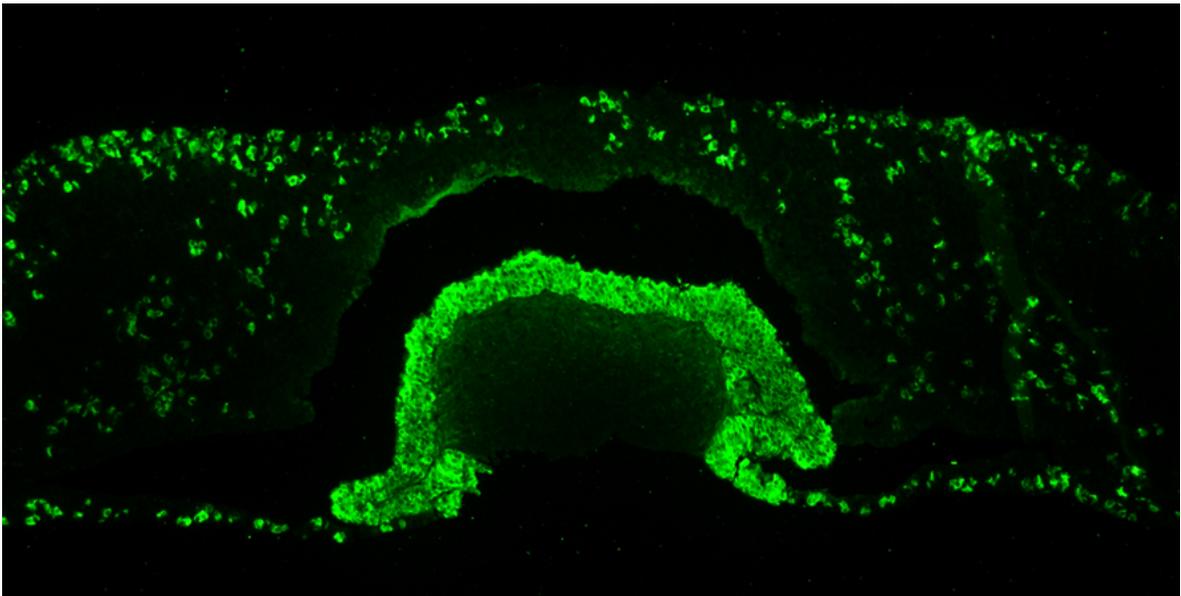


Distribución espacio-temporal de la proteína DLK1 durante el desarrollo hipofisario del ratón Swiss albino.

Spatiotemporal distribution of DLK1 protein during the pituitary development of Swiss albino mice.



Trabajo de Fin de Grado

ALEXIS RUFINO GÓMEZ

Tutores: Dra. Aixa Celina Rodríguez Bello y Dr. Ricardo Reyes Rodríguez

Grado en Biología. Julio 2024

Índice

1. Introducción	4
2. Justificación y objetivos	6
3. Material y métodos	6
A. Material	6
B. Métodos	7
1) Procesado histológico de las muestras	7
2) Tinción topográfica	9
3) Inmunohistoquímica	10
4) Captación y procesamiento de imágenes	12
5) Análisis semicuantitativo	13
4. Resultados	14
A. Desarrollo inmunohistoquímico de la proteína DLK1 en la hipófisis	14
1) Adenohipófisis	14
2) Neurohipófisis	15
B. Caracterización de células productoras de hormonas DLK1-ir	17
5. Discusión	21
6. Conclusiones	24
Bibliografía	26

Resumen

DLK1 (*Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) es una proteína transmembrana que cuenta con una región exoplásmica conformada por seis dominios semejantes a EGF (*Epidermal Growth Factor*) que le otorgan la capacidad de inhibir competitivamente receptores de tipo Notch, implicada en fenómenos de diferenciación celular, entre otros procesos. Ha sido descrita la presencia de inmunorreacción para DLK1 (DLK1-ir) en las distintas poblaciones de células secretoras de la adenohipófisis del ratón adulto y se conoce su distribución en la glándula durante el desarrollo embrionario de la rata; sin embargo, no existe hasta la fecha ningún trabajo que estudie la secuencia de expresión de DLK1 durante el desarrollo hipofisario del ratón.

En este Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la distribución de DLK1 a lo largo del desarrollo hipofisario del ratón y su relación con las células productoras de hormonas adenohipofisarias mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas de inmunoperoxidasa (IP) e inmunofluorescencia (IF). Se utilizaron embriones en estadios comprendidos entre e9.5 y e19.5 además de ratones postnatales de una (p7) y dos semanas (p15). Las muestras fueron fijadas con paraformaldehído e incluidas en parafina para obtener secciones de 5 μm que se procesaron para IP y dobles marcajes por IF.

Los resultados mostraron una intensa inmunorreacción para DLK1 en el estadio e9.5 tanto en la bolsa de Rathke como en la región del tubo neural correspondiente al primordio hipotalámico. DLK1-ir permaneció inalterada en todos los lóbulos de la adenohipófisis y en la neurohipófisis hasta e14.5. En los siguientes estadios del desarrollo embrionario comprendidos entre e14.5 y e19.5, DLK1-ir se vio reducida en el lóbulo intermedio. Se halló DLK1-ir en las células de los lóbulos anterior y tuberal de ratones postnatales, aunque disminuyó en los lóbulos intermedio y posterior.

La IF mostró colocalización de DLK1 con todas las hormonas producidas por cada tipo celular del lóbulo anterior (ACTH, TSH, GH, FSH y PRL), así como del lóbulo intermedio (ACTH) y tuberal (TSH, FSH y PRL) de la adenohipófisis durante su diferenciación. En conjunto, nuestros resultados sugieren un papel regulador para DLK1 tanto en el desarrollo hipofisario como en la diferenciación de las distintas poblaciones de células secretoras.

Palabras clave: *DLK1, NOTCH, desarrollo embrionario, adenohipófisis, diferenciación.*

Abstract

DLK1 (*Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1*) is a transmembrane protein with an exoplasmic region consisting of six EGF (*Epidermal Growth Factor*)-like domains that give it the ability to competitively inhibit Notch receptors, involved in cell differentiation, among other processes. The presence of immunoreactivity for DLK1 (DLK1-ir) has been described in the different populations of secretory cells of the adenohypophysis of the adult mouse and its distribution in the gland during the embryonic development of the rat is known; however, the sequence of DLK1 expression during the hypophyseal development of the mouse has not been studied to date.

In this Final Degree Project, we have characterized the distribution of DLK1 throughout the mouse's pituitary development and its relationship with adenohypophyseal hormone-producing cells employing immunohistochemical techniques of immunoperoxidase (IP) and immunofluorescence (IF). Embryos at stages between e9.5 and e19.5 as well as one (p7) and two (p15) week postnatal mice were used. Samples were fixed with paraformaldehyde and embedded in paraffin to obtain 5 µm sections that were processed for IP and double labeling by IF.

The results showed intense DLK1-ir at stage e9.5 in both Rathke's pouch and in the region of the neural tube corresponding to the hypothalamic primordium. DLK1-ir remained unaltered in all lobes of the adenohypophysis and in the neurohypophysis until e14.5. At late stages of embryonic development between e14.5 and e19.5, DLK1-ir was reduced in the intermediate lobe. In postnatal mice, DLK1-ir was present in anterior and tuberal lobe cells but decreased in the intermediate and posterior lobes.

The colocalization of DLK1 with all hormones produced by the anterior lobe (ACTH, TSH, GH, FSH and PRL), as well as intermediate (ACTH) and tuberal lobe (TSH, FSH and PRL) cells of the adenohypophysis during their differentiation process suggests a regulatory role for DLK1 in both pituitary development and differentiation of the secretory cell populations.

Key words: *DLK1, NOTCH, embryonic development, adenohypophysis, cell differentiation.*

1. Introducción

La hipófisis es una glándula neuroendocrina que tiene un papel fundamental en la fisiología de los vertebrados al regular procesos como el crecimiento, la reproducción, el metabolismo o la respuesta al estrés (Lym Cheung *et al.*, 2013).

Este órgano cuenta con dos regiones de distinto origen embrionario: la adenohipófisis, constituida por tres lóbulos: lóbulo anterior, intermedio y tuberal; y la neurohipófisis, conformada por el lóbulo posterior y la eminencia media (Gardner y Shoback, 2011; Pawlina y Ross, 2020). La neurohipófisis deriva del neuroectodermo mientras que la adenohipófisis, de una invaginación del estomodeo conocida como bolsa de Rathke (Reyes *et al.*, 2008; Kelberman *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2016; Pawlina y Ross, 2020; Alatzoglou *et al.*, 2020).

El lóbulo anterior adenohipofisario cuenta con cinco tipos de células glandulares secretoras de hormonas: adrenocorticotropas (ACTH), gonadotropas (LH y FSH), tirotropas (TSH), somatotropas (GH) y lactotropas (PRL). El proceso de diferenciación de estos tipos celulares está regulado por diversas moléculas señalizadoras y factores de transcripción. Entre estos factores de transcripción se encuentran Pit-1, que participa en la diferenciación de las células somatotropas, lactotropas y tirotropas, y Tpit, que tiene especial relevancia en la diferenciación de células melanotropas y corticotropas (Kelberman *et al.*, 2009; Gardner y Shoback, 2011; Inoshita y Nishioka, 2018).

DLK1 es una glucoproteína transmembrana que cuenta con una región exoplásmica formada por 6 dominios EGF de repetición en tándem y un dominio de escisión mediada por TACE (enzima convertidora de TNF- α). La escisión mediada por TACE genera una forma soluble de la proteína que contiene los dominios EGF (Wang *et al.*, 2006; Puertas-Avenidaño *et al.*, 2011; Traustadottir *et al.*, 2013) a la que se le han atribuido funciones fisiológicas como el control de la diferenciación de preadipocitos (Traustadottir *et al.*, 2013). Se ha descrito la capacidad de represión de DLK1 sobre el factor transcripcional Pit-1 en cultivos de células MCF-7, sugiriendo un papel inhibitorio sobre la diferenciación de células somatotropas (Ansell *et al.*, 2007). Este resultado está en consonancia con el fenotipo embrionario y adulto de talla inferior descrito por Lee *et al.* (2003) en ratones en los que DLK1 se sobreexpresaba; sin embargo, Puertas-Avenidaño *et al.* (2011) describieron un fenotipo que también presentaba una talla reducida en ratones *knockout* macho adultos *DLK1*^{-/-}, cuya causa sugirieron que podría estar relacionada con la disminución del 19,7% de células

somatotropas que hallaron en las hipófisis de estos ratones. Por otro lado, otros autores como Lym Cheung *et al.* (2013) plantearon que la expresión de DLK1 en otros tejidos podría ser la responsable de las diferencias de peso y tamaño en ratones *knockout DLK1^{-/-}*.

Se ha comprobado que DLK1 puede actuar como un ligando no canónico en vías de señalización Notch e inhibir competitivamente la activación de este tipo de receptores (Baladrón *et al.*, 2005; Sánchez-Solana *et al.*, 2011; Falix *et al.*, 2012). Los receptores característicos de estas vías de señalización (receptores Notch) son proteínas transmembrana que contienen un factor de transcripción latente en su dominio citosólico (NICD: *Notch Intracellular Domain*). Este factor de transcripción se escinde del resto de la proteína tras la interacción de la región exoplásmica del receptor con su ligando (Delta o Serrate) y migra al núcleo, donde se integra en un complejo proteico que activa la transcripción de genes de respuesta a Notch (Alberts *et al.*, 2015).

Puertas-Avendaño *et al.* (2011) atribuyeron un posible papel regulador a DLK1 como factor yuxtacrino o paracrino entre células gonadotropas y lactotropas en ratones macho adultos de la cepa 129/SvJ. La participación de vías de tipo Notch podría explicar este fenómeno de comunicación celular atendiendo a dos factores: el contacto directo entre las células mencionadas y la presencia de un ligando para receptores Notch (DLK1) en una de ellas (Falix *et al.*, 2012; Alberts *et al.*, 2015). Estas observaciones junto a la actividad reguladora que ejerce DLK1 en la diferenciación celular han sido comprobadas en distintos tejidos (Ansell *et al.*, 2007; Sánchez-Solana *et al.*, 2011), apuntando a que su expresión a lo largo del desarrollo embrionario en la adenohipófisis podría afectar a la diferenciación de poblaciones celulares secretoras de la misma. En este sentido, Dutta *et al.*, (2008) observaron en peces cebra mutantes *mib*, en los que se bloquean rutas de señalización Notch activadas por Delta, un incremento en el número de células lactotropas y una reducción del número de células corticotropas en la porción distal de la adenohipófisis, concluyendo que el bloqueo de este tipo de vías de señalización influyó en la diferenciación de estos tipos celulares en su modelo experimental.

Se ha demostrado la distribución de células DLK1-inmunoactivas en el lóbulo anterior de la adenohipófisis y la ausencia de estas en el lóbulo intermedio en ratones macho adultos de la cepa 129/SvJ (Puertas-Avendaño *et al.*, 2011). Además, Nakakura *et al.* (2009) describieron la distribución de la proteína DLK1 en todos los tipos celulares secretoras de la

adenohipófisis de embriones de rata a lo largo de la ontogenia. En este trabajo se hallaron por primera vez células corticotropas DLK1-ir en el lóbulo anterior en el estadio e15.5, tirotropas DLK1-ir en e17.5, gonadotropas DLK1-ir en e18.5 y lactotropas DLK1-ir en e20.5. Sin embargo, no hay ningún trabajo hasta la fecha que haya descrito la expresión de DLK1 durante el desarrollo de la hipófisis en el ratón.

2. Justificación y objetivos

Partiendo del papel fundamental que tiene la hipófisis como glándula reguladora del sistema endocrino, conocer con detalle los procesos que determinan su desarrollo embrionario es de gran interés para la endocrinología por la valiosa información que puede aportar a la hora de comprender su fisiología. Por otro lado, no se ha analizado hasta la fecha la distribución espacio-temporal de la proteína DLK1 (con demostrada actividad reguladora en la diferenciación de poblaciones celulares secretoras adenohipofisarias) en la hipófisis del ratón durante el desarrollo embrionario y postnatal. Por ello, este Trabajo de Fin de Grado tiene como **objetivo general** estudiar la presencia de la proteína DLK1 en la adenohipófisis de ratón desde la formación de la bolsa de Rathke hasta las primeras semanas de vida postnatal.

Para llevar a cabo este objetivo general, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- i. Estudiar mediante inmunohistoquímica la distribución de la proteína DLK1 durante el desarrollo embrionario y postnatal de la hipófisis.
- ii. Estudiar mediante doble inmunofluorescencia la colocalización de la proteína DLK1 con las distintas poblaciones de células productoras de hormonas durante su diferenciación.

3. Material y métodos

A. Material

Para elaborar este trabajo se utilizaron cinco ratones Swiss albino postnatales de siete y quince días (p7 y p15, n=5) y veinticuatro embriones de ratón Swiss albino de diferentes estadios de desarrollo: e9.5, e11.5, e13.5, e14.5, e17.5, e18.5 y e19.5 (n=3 para todos salvo e18.5, en el que n=6). Se ha considerado el momento de la observación del tapón vaginal en la ratona como el día embrionario e0.5.

Los embriones y los ratones postnatales fueron sacrificados con arreglo a las disposiciones del Real Decreto RD53/2013 bajo la aprobación del Comité de Ética de la Investigación y Bienestar Animal de la Universidad de La Laguna mediante inyección con sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/mL) (CEIBA2023-3304). Los animales fueron adquiridos en el Estabulario Central del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna.

Los embriones y ratones p7 fueron decapitados con unas tijeras de disección y las cabezas se lavaron haciendo uso de una disolución de cloruro sódico al 0,9%. Por otra parte, los ratones p15 fueron decapitados y diseccionados para extraer las hipófisis, que también fueron lavadas con cloruro sódico al 0,9%. Posteriormente, se llevó a cabo la fijación mediante inmersión en paraformaldehído al 4%. Durante la fijación se limpiaron las cabezas de los embriones y ratones p7, retirando las estructuras tegumentarias que las revestían para favorecer la penetración del fijador.

Tras 24 horas de fijación, las piezas se transfirieron a etanol al 70% hasta el momento de la inclusión.

B. Métodos

1) Procesado histológico de las muestras

i. Inclusión en parafina

Se empleó parafina como medio de inclusión (Paraplast®). La parafina solidifica a menos de 59°C, por lo que se debe trabajar con ella a temperaturas superiores para mantenerla líquida y permitir que penetre en la muestra. A tal efecto, se empleó una estufa (Thermo Scientific Heraeus® Function Line) a 61°C.

Por otra parte, la parafina tiene un marcado carácter hidrofóbico, por lo que debemos eliminar previamente el contenido en agua de las muestras para permitir una infiltración adecuada de esta. Las cabezas fueron deshidratadas al exponerlas a una serie de disoluciones de etanol crecientes en concentración durante los periodos de tiempo recogidos en la Tabla 1 y, tras la deshidratación, se siguió el protocolo especificado en esta misma figura para completar la inclusión.

Debido a que la parafina no es miscible con el etanol absoluto, se requiere el uso de una sustancia intermedia que sí sea miscible tanto con el etanol absoluto como con la parafina. En este caso se ha empleado tolueno.

Inclusión en parafina	Deshidratación	1. Etanol (70%)	≥12h
		2. Etanol (96%)	2 x 30min
		3. Etanol (100%)	3 x 1h
	4. Tolueno I	15 min	
	5. Tolueno II	20 min	
	6. Parafina I	2h	
	7. Parafina II	≥12h	
	8. Parafina III	≥24h	

Tabla 1: Protocolo de inclusión en parafina.

Tras la inclusión de las piezas en parafina se hizo uso de moldes metálicos atemperados en la estufa a 61°C para crear los bloques. Los moldes se rellenaron con parafina líquida y, cuando las muestras fueron introducidas y orientadas adecuadamente en estos, se colocó la base de un cassette de inclusión (al cual se le había retirado la tapa previamente) en cada molde para devolverlo a la estufa a 61°C durante toda una noche. A la mañana siguiente se extrajeron los moldes con las muestras y los cassettes de la estufa para que solidificaran a temperatura ambiente y, tras una hora, fueron inmersos en un baño de agua fría.

ii. Corte, montaje y desparafinado

Los bloques de parafina que contenían las muestras se cortaron empleando un microtomo (Shandon Finesse 325[®]), obteniendo secciones de 5 µm de grosor. El montaje de las secciones se hizo sobre portaobjetos adherentes Thermo Scientific™ SuperFrost Plus haciendo uso de una placa calefactora (VWR[®] Hotplate W10) a 37 °C. Las secciones fueron montadas en serie (para aquellos cortes destinados a tinciones topográficas e inmunohistoquímicas para el estudio de la distribución de DLK1) y en paralelo (generando cinco series, una para cada una de las hormonas

adenohipofisarias que se detectaron por inmunohistoquímica para la caracterización de las células DLK1-ir).

Tras el montaje, las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas según el protocolo recogido en la Tabla 2.

Desparafinado	1. Tolueno I	15 min
	2. Tolueno II	15 min
	3. Tolueno III	15 min
Rehidratación	4. Etanol (100%)	5 min
	5. Etanol (96%)	5 min
	6. Etanol (70%)	5 min
	7. Agua destilada	5 min

Tabla 2-. Protocolo de desparafinado y rehidratación.

2) Tinción topográfica

Se realizaron series topográficas con la técnica de tinción de Hematoxilina-Eritrosina siguiendo el protocolo recogido en la Tabla 3.

	1. Hematoxilina de Harris	2 min
	2. Agua corriente	5 min
	3. Agua destilada	1 min
	4. Eritrosina	2 min
	5. Lavado rápido en agua destilada	(2 inmersiones)
Deshidratación	6. Etanol (96°)	1 min
	7. Etanol (100°) I	2 min
	8. Etanol (100°) II	2 min
Aclarado	9. Tolueno I	5 min
	10. Tolueno II	5 min
Montaje con Eukitt ®		

Tabla 3-. Protocolo de tinción Hematoxilina-Eritrosina.

3) Inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten detectar proteínas sobre secciones de tejido usando anticuerpos específicos.

En este trabajo se utilizaron dos métodos:

- i. Método inmunoenzimático indirecto para la realización de marcajes simples de DLK1. Se rehidrataron los cortes en tampón Tris salino (TBS) y después de los pasos de saturación con SFB (suero fetal bovino) al 1% y permeabilización con TBS-Triton X-100 (Fig. 1), las muestras fueron incubadas durante una noche con un antisuero policlonal de conejo contra DLK1 (Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente fueron expuestas a anticuerpos Goat anti-Rabbit biotinilados (LSBio) en una dilución 1/1000 durante una hora y, posteriormente, a una dilución 1/1000 de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch) durante una hora. La interacción entre la biotina conjugada al anticuerpo secundario y el complejo estreptavidina-HRP posibilitó la detección del antígeno gracias a la actividad peroxidasa de la HRP, que fue revelada con una combinación de glucosa oxidasa-diaminobenzidina (DAB) y DAB-níquel (Shu *et al.*, 1988).
- ii. Doble marcaje mediante inmunofluorescencia indirecta para DLK1 con las distintas hormonas adenohipofisarias. Las muestras fueron incubadas durante una noche con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-DLK1 (1/1000) (Santa Cruz Biotechnology) y con los antisueros policlonales Guinea pig anti-PRL (1/500) (US Biological) y Rabbit anti-ACTH (1/1000), anti-FSH (1/800), anti-GH (1/800) y anti-TSH (1/600). El antisuero para cada hormona fue incubado junto al anticuerpo para DLK1 en muestras montadas en paralelo sobre cinco portaobjetos: uno para cada hormona. Al día siguiente, las muestras se incubaron con antisuero Goat anti-Mouse biotinilado (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1/1000 durante una hora y, posteriormente con el complejo estreptavidina-Cy3 (emisión en rojo) (Jackson ImmunoResearch) a dilución 1/1000 durante una hora y con un antisuero Goat anti-Rabbit conjugado a Alexa Fluor 488[®] (emisión en verde) (Jackson ImmunoResearch) dilución 1/300. En los cortes a los que se les aplicó el anticuerpo primario anti-PRL, el anticuerpo secundario empleado fue Goat anti-Guinea pig conjugado a Alexa Fluor 488[®] (Jackson ImmunoResearch).

El montaje de las preparaciones se hizo con glicerina tamponada al 70% con TBS o, en el caso de las muestras sometidas a técnicas de inmunofluorescencia, con una solución de montaje comercial que incluye DAPI para el marcaje de núcleos (Fluoroshield™, SIGMA).

Las técnicas inmunohistoquímicas que han sido utilizadas quedan descritas detalladamente en la Figura 1.

	Inmunoenzimática	Inmunofluorescencia		
Día 1	1. Lavado con TBS (pH 7,4)		3 x 10 min	
	2. Bloqueo con SFB (1%)		20 min	
	3. Lavado con TBS		2 x 10 min	
	4. Permeabilización con TBS-T (0,2%)		10 min	
	5. Anticuerpo primario: Rabbit anti-DLK1 (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,2%)	5. Anticuerpos primarios: - Mouse anti-DLK1 (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,2%) - Rabbit anti-ACTH (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,2%) - Rabbit anti-FSH (dilución 1/800 en TBS-T al 0,2%) - Rabbit anti-GH (dilución 1/800 en TBS-T al 0,2%) - Rabbit anti-TSH (dilución 1/600 en TBS-T al 0,2%) - Guinea pig anti- PRL (dilución 1/500 en TBS-T al 0,2%)	12 h	
Día 2	6. Lavado rápido con TBS		-	
	7. Lavado con TBS		3 x 10 min	
	8. Lavado con TBS-T (0,05%)		10 min	
	9. Anticuerpo secundario: Goat anti-Rabbit biotilado (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,05%)	9. Anticuerpo secundario: Goat anti-mouse biotilado (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,05%)	1 h	
	10. Lavado con TBS		3 x 5 min	
	11. Lavado con TBS-T (0,05%)		5 min	
	12. Estreptavidina-Peroxidasa (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,05%)	12. - Cy3- Estreptavidina (dilución 1/1000 en TBS-T al 0,05%) - Alexa Fluor 488-Goat anti-Rabbit (dilución 1/300 en TBS-T al 0,05%) - Alexa Fluor 488-Goat anti-Guinea pig (dilución 1/500 en TBS-T al 0,05%)	1 h	
	13. Lavado con TBS	2 x 5 min	13. Lavado con TBS	3 x 5 min
	14. Lavado con tampón Tris-HCl (pH 7,6)	5 min	14. Montaje con glicerina tamponada con TBS al 70% o solución de montaje (Fluoroshield™)	
	15. Revelado con Shu			
16. Lavado con tampón Tris-HCl	2 min			
17. Lavado con TBS	3 x 5 min			
14. Montaje con glicerina tamponada con TBS al 70%				

Figura 1-. Protocolos de inmunohistoquímica aplicados.

La interacción entre los elementos que hacen posible el inmunomarcaje queda representada esquemáticamente en la Figura 2.

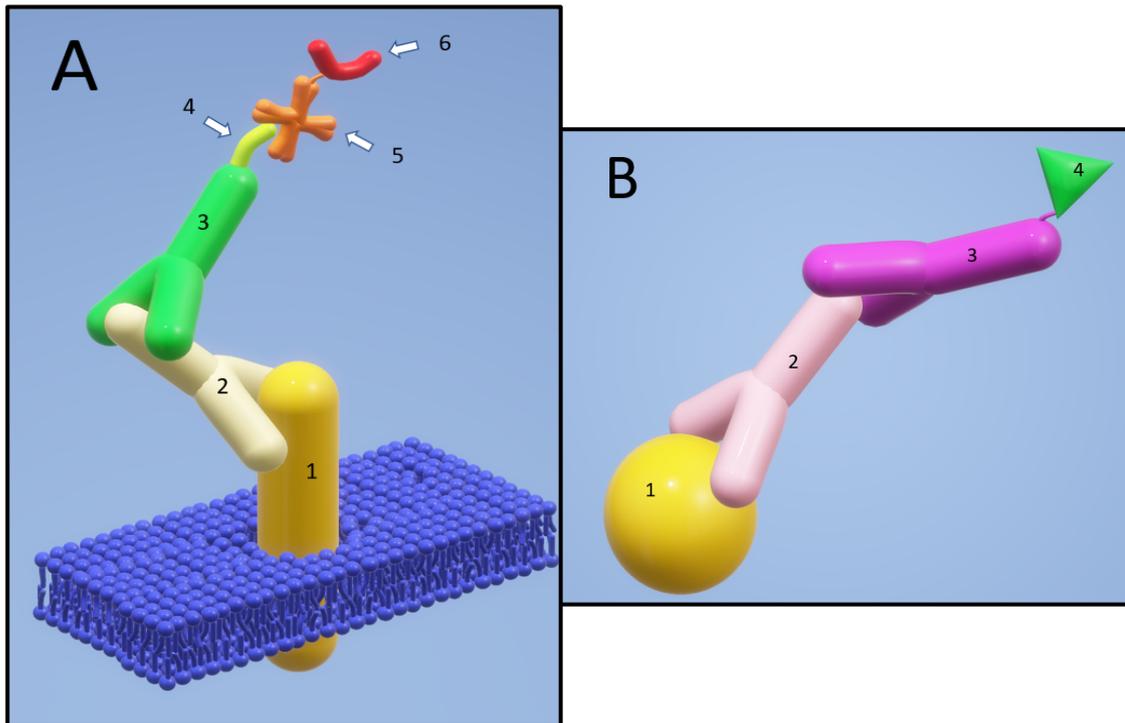


Figura 2-. Representación tridimensional esquemática de la interacción entre el antígeno [1], el anticuerpo primario [2], el anticuerpo secundario [3] y los diferentes elementos que permiten el marcaje por fluorescencia [4,5 y 6]. A; 1: DLK1, 2: Mouse anti-DLK1, (3: Goat anti-Mouse, 4: Biotina), (5: Estreptavidina, 6: Cy3). B; 1: Hormona adenohipofisaria, 2: Rabbit anti-ACTH, Rabbit anti-FSH, Rabbit anti-GH, Rabbit anti-TSH o Guinea pig anti-PRL, (3: Goat anti-Rabbit o Goat anti-Guinea pig, 4: Alexa Fluor 488®). Los elementos que aparecen entre paréntesis se adquirieron ya conjugados.

Controles de especificidad

Los controles de especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas se realizaron sustituyendo el antisuero específico por suero normal u omitiendo el primer antisuero.

4) Captación y procesamiento de imágenes

Una vez procesadas, las muestras fueron analizadas con un microscopio óptico (LEICA DM4000 B) dotado de una lámpara de epifluorescencia y cámara (LEICA DFC300 FX). Para cada composición de inmunofluorescencia se tomaron tres imágenes excitando cada uno de los fluoróforos empleados: Cy3 (de emisión en rojo), Alexa Fluor 488® (de emisión en verde) y DAPI (de emisión en azul). Posteriormente, estas imágenes fueron procesadas

haciendo uso de ImageJ y el software Leica Q-Win® (Analysis Image System Leica Q-Win®, Barcelona, Spain) para superponerlas y detectar colocalización.

5) Análisis semicuantitativo

Ratones p15 (n=3) fueron empleados para estimar el porcentaje de células DLK1-ir (Ecuación 1) y el porcentaje de cada tipo celular secretor que colocaliza con DLK1 (Ecuación 2). Se obtuvieron dieciocho secciones de cada hipófisis que fueron dispuestas en seis portaobjetos, resultando en un total de dieciocho portaobjetos con tres cortes en cada uno. En dos de las secciones de cada portaobjetos se generaron dos cuadrículas aleatorias de 200µm² para el conteo de células positivas, y en la restante, solamente una. Para ello, se hizo uso del software Leica Q-Win® (Analysis Image System Leica Q-Win, Barcelona, Spain).

Solo se contabilizaron células con inmunomarcaje citoplasmático que carecían de este en el núcleo.

$$\text{Ecuación 1: } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células DLK1-ir promedio}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totales promedio}} \times 100$$

$$\text{Ecuación 2: } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células DLK1-ir} \cap \text{hormona hipofisaria-ir promedio}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células DLK1-ir promedio}} \times 100$$

4. Resultados

A. Desarrollo inmunohistoquímico de la proteína DLK1 en la hipófisis

La presencia de células DLK1-inmunorreactivas (DLK1-ir) se analizó mediante inmunohistoquímica durante el desarrollo hipofisario desde el estadio e9.5 hasta el estadio p15 de desarrollo postnatal en ratones Swiss albino. La inmunorreacción frente a DLK1 se observó desde las primeras etapas del desarrollo embrionario en la bolsa de Rathke (BR), primer esbozo de la adenohipófisis. También se detectó una fuerte inmunorreacción en la zona ventricular (ZV) correspondiente a la futura región del hipotálamo (Fig. 3a, b).

1) Adenohipófisis

Células DLK-ir se observaron por primera vez en la bolsa de Rathke en el estadio e9.5 del desarrollo embrionario, cuando la bolsa establece contacto con el primordio hipotalámico (Fig. 3a, b). Se observó una intensa inmunorreacción en toda la bolsa de Rathke (Fig. 3b). En el estadio e11.5, la intensidad y extensión de la inmunorreacción fue similar a la de e9.5 (Fig. 3c, d en comparación con Fig. 3a, b). En el estadio e13.5, se produce el cierre de la bolsa de Rathke (Fig. 3e) y un aumento de la proliferación celular en la región rostral de esta (puntas de flecha, Fig. 3f). En este estadio, la inmunorreacción frente a DLK1 fue intensa en todo el esbozo hipofisario. En el estadio e14.5, células DLK1-ir también se observaron en toda la adenohipófisis (Fig. 3g, h). En este estadio, aunque el lóbulo tuberal se extiende rostralmente, la inmunorreacción fue más leve en comparación con el estadio anterior (Fig. 3g-i en comparación con la Fig. 3e). En el estadio e17.5 se mantuvo la inmunorreacción frente a DLK1 en toda la hipófisis, aunque se observó una disminución en las células del lóbulo intermedio (Fig. 3j). En el lóbulo anterior no todas las células fueron DLK1-ir y sólo un escaso número de células DLK1-ir se observaron en el lóbulo tuberal (Fig. 3j). A partir del estadio e17.5, la inmunorreacción se mantuvo prácticamente sin cambios hasta el final del desarrollo embrionario (Fig. 3j-l). En el día postnatal p7, una disminución en la inmunorreacción frente a DLK1 en el lóbulo intermedio fue más evidente, volviéndose prácticamente indetectable al final de la segunda semana de desarrollo postnatal p15 (LI; compare las figuras 3m y 3n). Por el contrario, se mantuvo similar en los lóbulos anterior y tuberal (LA, LT; Fig. 3m, n).

2) Neurohipófisis

En el estadio e9.5 de desarrollo embrionario, se observaron células DLK1-ir en la zona ventricular del hipotálamo basal, que incluye la zona neurohipofisaria (Fig. 3a, b). La inmunorreacción frente a DLK1 se mantuvo durante la evaginación y el desarrollo de la neurohipófisis tanto en el lóbulo posterior como en la eminencia media, como se observa en los estadios e11.5 y e13.5 (Fig. 3c-e), observándose también una intensa inmunorreacción en el estadio e14.5 (Fig. 3g, h). En las etapas posteriores hasta el final de la embriogénesis y las primeras semanas de desarrollo postnatal, la inmunorreacción frente a DLK1 fue detectable, sin embargo, su intensidad disminuyó en el lóbulo posterior (Fig. 3j-n) observándose en pituicitos y fibras nerviosas (Fig. 3k, k'). Además, se observaron tanicitos y fibras DLK1-ir en la eminencia media (Fig. 3l, l').

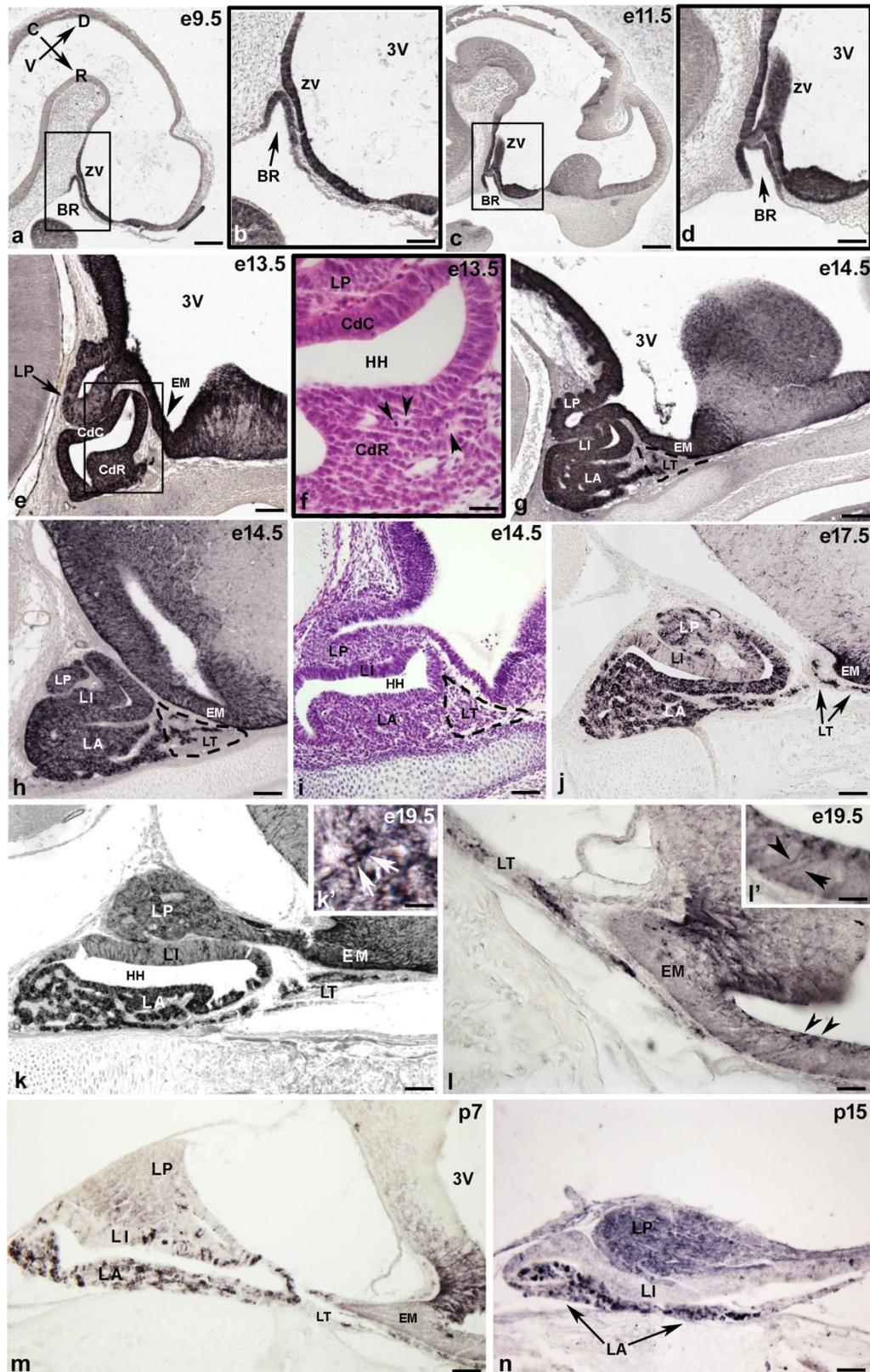


Figura 3-. Secciones sagitales que muestran la distribución de DLK1-ir durante el desarrollo embrionario (a-l) y postnatal (m, n) de la hipófisis del ratón. Los ejes rostrocaudal (R-C) y dorsoventral (D-V) están representados por flechas en la imagen a. (a y c) La bolsa de Rathke y la zona ventricular del primordio hipotalámico DLK1-ir en los estadios e9.5 (a) y e 11.5 (c). (b y d)

Muestra las áreas enmarcadas DLK1-ir (flechas) ampliadas. (e) Sección sagital de la bolsa de Rathke en el estadio e13.5 que muestra inmunorreactividad frente a DLK1 en ambas caras de la bolsa de Rathke (dorsorostral y dorsocaudal), en el futuro lóbulo posterior (flecha) y en la eminencia media (punta de flecha). El área enmarcada en el recuadro se muestra ampliada en la imagen (f) con la tinción de hematoxilina-eritrosina mostrando en detalle la cara dorsorostral de la bolsa donde se aprecian células en mitosis (puntas de flecha). (g,h) Inmunorreacción frente a DLK1 en los lóbulos anterior, intermedio y tuberal (este último señalado con línea discontinua) además de en el lóbulo posterior y en la eminencia media, en el estadio embrionario e14.5. La imagen (i) muestra una sección aproximadamente del mismo nivel teñida con hematoxilina-eritrosina en e14.5. (j) Inmunorreacción frente a DLK1 en la hipófisis en el estadio e17.5. (k,k') Inmunorreacción frente a DLK1 en la hipófisis en el estadio e19.5. En el inserto (k') se muestra una ampliación del lóbulo posterior donde se observan pituicitos DLK1-ir (flechas blancas). Las imágenes (l y l', inserto) muestran el lóbulo tuberal y la eminencia media en el estadio e 19.5 con tanicitos DLK1-ir que extienden sus prolongaciones de un lado a otro de la pared hipotalámica (puntas de flecha en inserto). (m y n) Imágenes que muestran inmunorreacción frente a DLK1 en la hipófisis de postnatales en los estadios p7 y p15 respectivamente. BR: Bolsa de Rathke; CdC: Cara dorsocaudal; CdR: Cara dorsorostral; EM: Eminencia media; HH: Hendidura hipofisaria; LA: Lóbulo anterior; LI: Lóbulo intermedio; LP: Lóbulo posterior; LT: Lóbulo tuberal; ZV: Zona ventral del primordio hipotálamo; 3V: Tercer ventrículo. Barras de escala: a,c:100 μ m; b,d,e,g,h,i,j,k,m,n: 50 μ m; f,k',l,l': 20 μ m.

B. Caracterización de células productoras de hormonas DLK1-ir

Para la identificación de los diferentes tipos de células secretoras que expresan DLK1 se analizaron embriones en el estadio e18.5 y postnatales en el estadio p15 mediante doble inmunofluorescencia. El doble marcaje en e18.5, cuando las distintas poblaciones de células secretoras se están diferenciando, mostró colocalización de DLK1-ir en células ACTH-ir (Fig. 4a-c), células TSH-ir (Fig. 4d-f), células GH-ir (Fig. 4g-i), células FSH- ir (Fig. 4j-l) y células PRL-ir (Fig. 4m-o) en el lóbulo anterior de la adenohipófisis. En este mismo estadio también se detectaron células DLK1-ir/ACTH-ir en el lóbulo intermedio (Fig. 5a-d) y células DLK1/TSH-ir (Fig. 6a-c), DLK1-ir/FSH-ir (Fig. 6d-f) y DLK1-ir/PRL-ir (Fig. 6g-i) en el lóbulo tuberal.

El doble marcaje en p15, cuando todos los tipos celulares se han diferenciado en su totalidad, mostró que la inmunorreacción frente a DLK1 se mantenía en todos los tipos de células productoras de hormonas de la adenohipófisis (Fig. 7a-r). En este estadio, el análisis semicuantitativo de las células DLK1-ir mostró que el 32 ± 9 % de las células del lóbulo anterior eran DLK1-ir. Asimismo, el análisis de las células doblemente marcadas (DLK1-hormona), mostró que el 29 ± 5 % de las células DLK1-ir eran GH-ir, el 24 ± 4 % PRL-ir, el 22 ± 3 % ACTH-ir, el 12 ± 2 % TSH-ir y el 9 ± 2 % FSH-ir (Fig. 8).

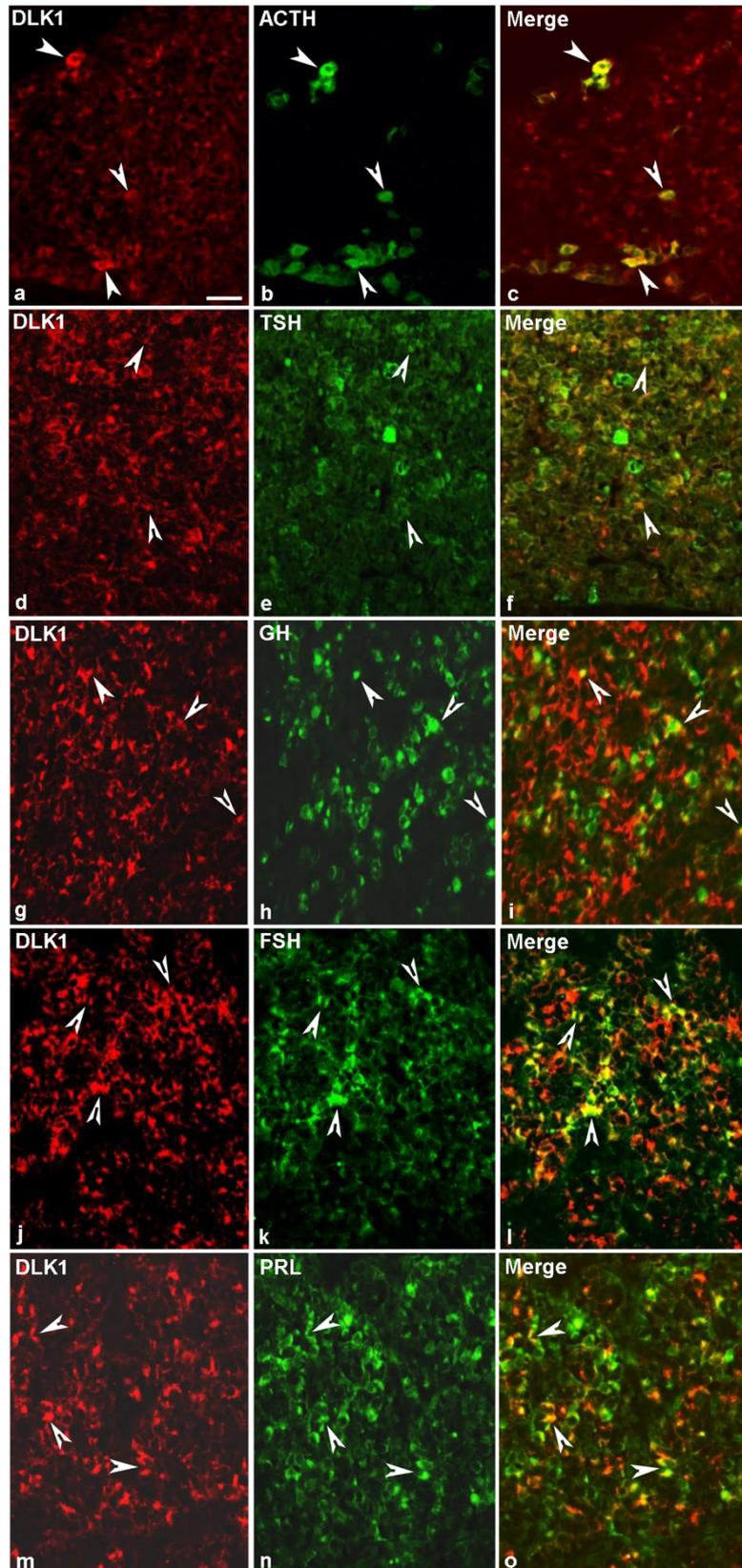


Figura 4-. Secciones sagitales del lóbulo anterior de la adenohipófisis de embriones e18.5 mostrando la colocación de DLK1-ir en los distintos tipos de células secretoras adenohipofisarias (puntas de flecha). Barra de escala: 25 μ m.

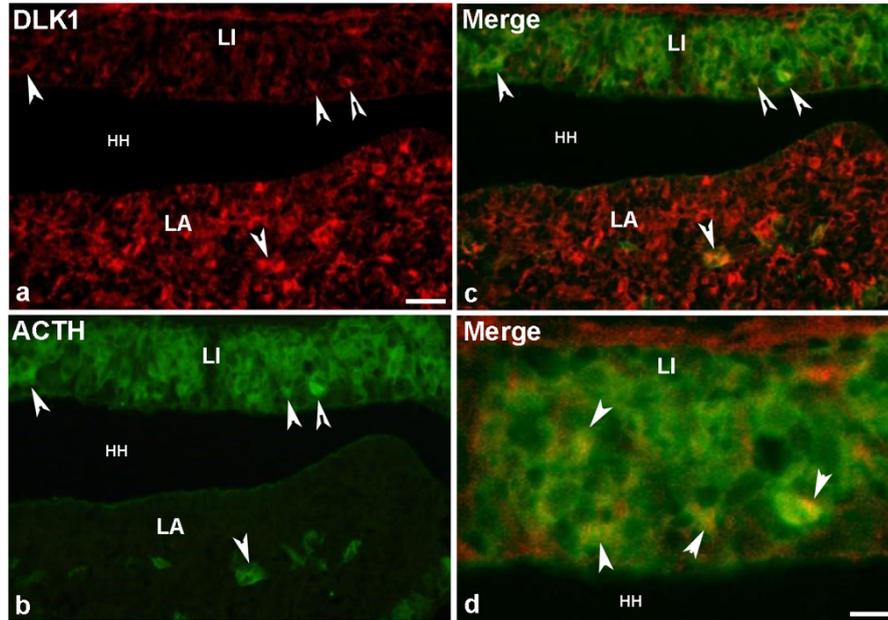


Figura 5-. Colocalización de DLK1-ir y ACTH-ir (puntas de flecha) en el lóbulo anterior (LA) e intermedio (LI) de la adenohipófisis, en secciones sagitales de embriones e18.5 (a-c). La imagen d) muestra a mayor aumento la colocalización en células del LI. LA: Lóbulo anterior; LI: Lóbulo Intermedio; HH: Hendidura hipofisaria. Barras de escala: a-c: 20 μ m; d: 10 μ m.

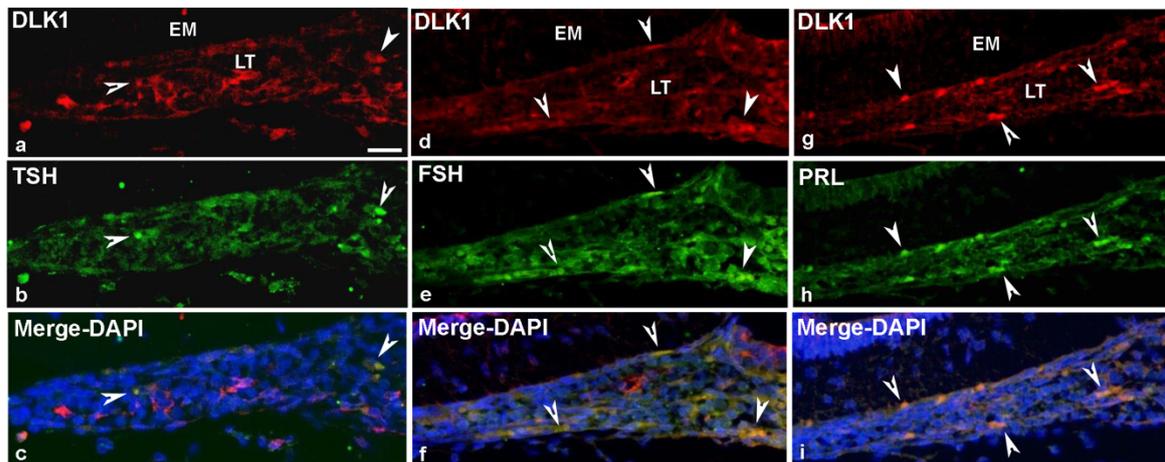


Figura 6-. Secciones sagitales de embriones en e18.5 que muestran la colocalización de DLK1-ir en células TSH-ir, FSH-ir y PRL-ir del lóbulo tuberal de la adenohipófisis (puntas de flecha). Las imágenes "Merge" (c,f,i) incluyen el marcaje de núcleos con DAPI. EM: Eminencia media; LT: Lóbulo tuberal. Barra de escala: 20 μ m.

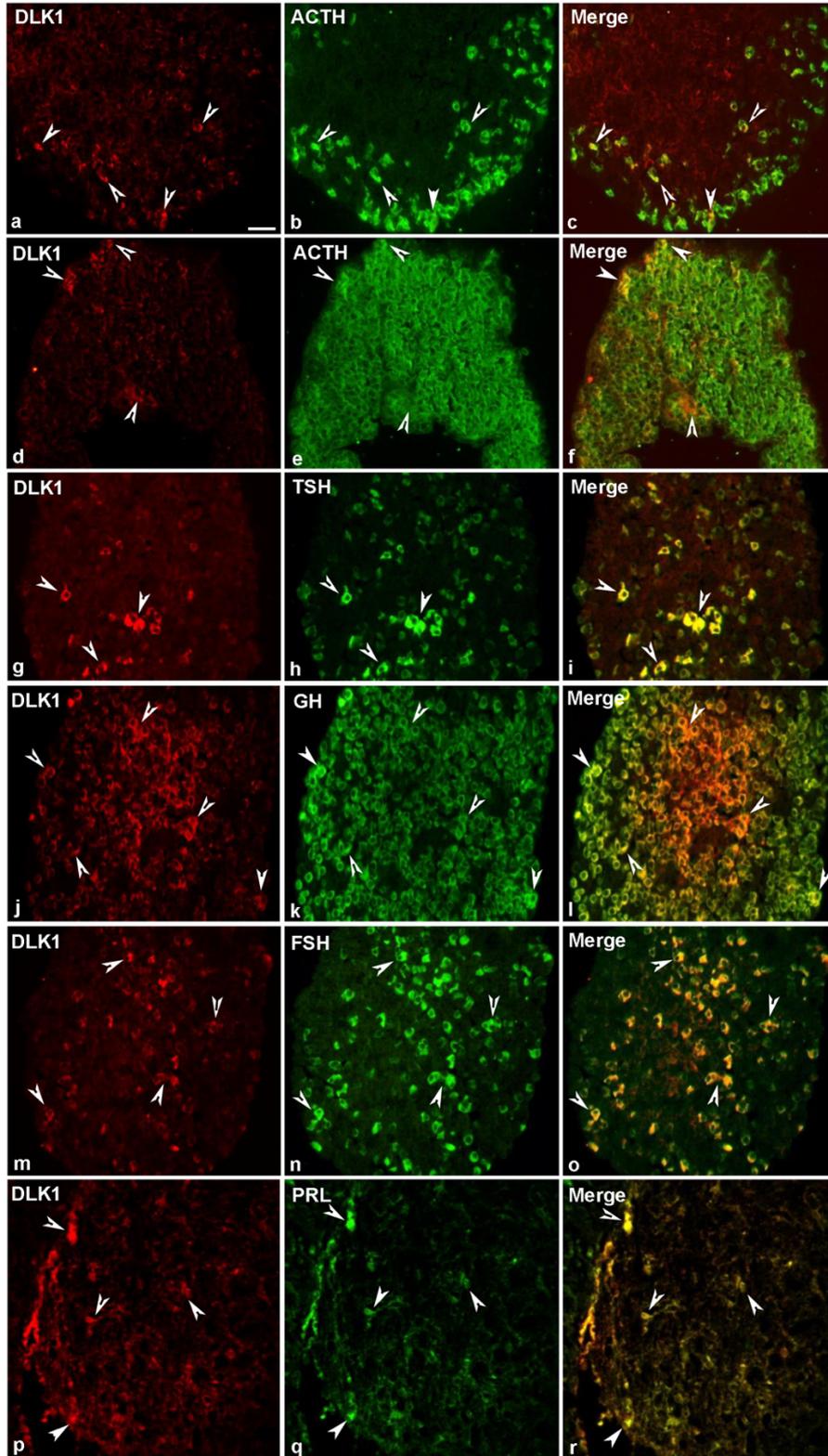


Figura 7-. Secciones horizontales de hipófisis de postnatales p15 que muestran la colocación de DLK1-ir (puntas de flecha) en los distintos tipos de células secretoras del lóbulo anterior (a-c y g-r) e intermedio (d-f) de la adenohipófisis. Barra de escala: 25 μ m.

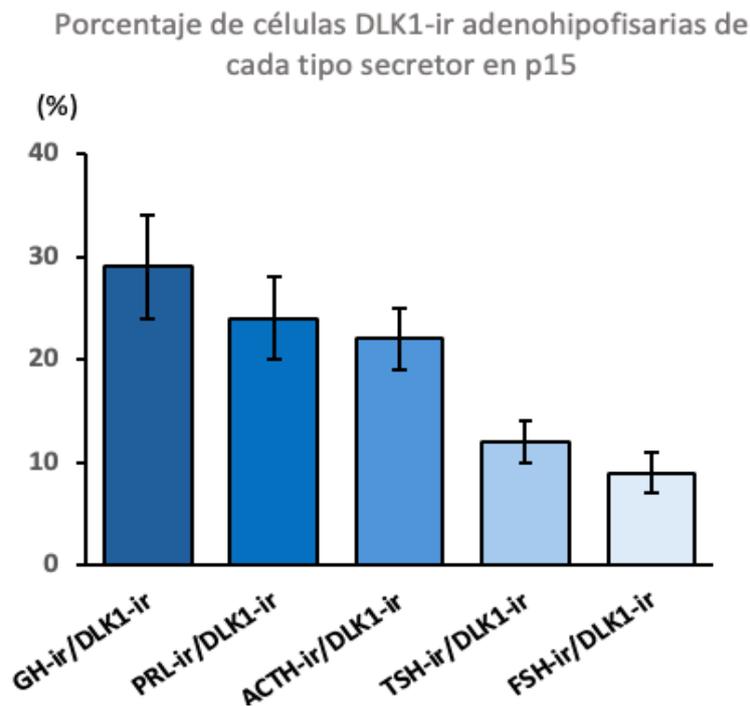


Figura 8-. Porcentaje de células DLK1-ir que colocaliza con GH, PRL, ACTH, TSH y FSH en el lóbulo anterior de la adenohipófisis de ratones p15.

5. Discusión

En este Trabajo de Fin de Grado se describe la distribución de la proteína DLK1 en la hipófisis del ratón Swiss albino durante el desarrollo embrionario y postnatal; en concreto, desde el inicio de la formación de la bolsa de Rathke en el estadio e9.5 hasta la segunda semana de vida postnatal, en el estadio p15. Además, se demuestra la colocalización de DLK1 en todos los tipos de células secretoras diferenciadas con las distintas hormonas en cada uno de los lóbulos adenohipofisarios en los estadios e18.5 y p15.

Nakakura *et al.* (2009) demostraron en la rata mediante técnicas de inmunofluorescencia que la expresión de DLK1 comienza en una fase temprana del desarrollo embrionario de la hipófisis, concretamente en el estadio e11.5. De igual modo que estos autores, hemos observado al comienzo del desarrollo hipofisario la presencia de inmunorreacción para DLK1 en la bolsa de Rathke y en la región del neuroectodermo correspondiente al primordio hipotalámico (Figura 3a), lo que sugiere que DLK1 podría tener algún papel regulador durante la morfogénesis de la glándula. Adicionalmente, en el trabajo de Nakakura *et al.* (2009) se describió una regionalización de la expresión de DLK1, que se

concentraba en la zona dorsal del LA en el estadio e14.5; sin embargo, en nuestro estudio no hemos observado esta regionalización en ninguno de los estadios del desarrollo embrionario del ratón analizados.

Nakakura *et al.* (2009) señalaron que la expresión de DLK1-ir en el LA de la rata comienza en las células corticotropas a partir de e15.5; en tirotropas, de e17.5; en gonadotropas, de e18.5; en somatotropas, de e19.5 y en lactotropas, de e20.5. En concordancia con estos resultados, los dobles marcajes realizados en nuestro estudio han mostrado la colocalización de DLK1 en todas las células productoras de hormonas (ACTH, TSH, FSH, GH y PRL) del lóbulo anterior en el estadio e18.5 (Figura 4) y cómo dicha colocalización se mantenía hasta el estadio p15 de desarrollo postnatal (Figura 7).

Por otro lado, la expresión de DLK1 ha sido descrita solo en las células tirotropas del lóbulo tuberal de embriones de rata en el estadio e19.5 (Nakakura *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados muestran la presencia de DLK1 en los tres tipos de células productoras de hormonas presentes en el lóbulo tuberal del ratón Swiss albino en el estadio e18.5; TSH, FSH y PRL (Figura 6).

Se ha demostrado que, en los procesos que gobiernan la diferenciación de la hipófisis, se ven implicadas una gran variedad de moléculas señalizadoras y factores de transcripción, adoptando un papel fundamental las rutas de señalización de tipo Notch (Raetzman *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007; Alatzoglou *et al.*, 2020). Algunos genes cuya transcripción es regulada positivamente por estas rutas son Hes1 y Hes5, que parecen estar implicados en el mantenimiento del estado indiferenciado de células progenitoras adenohipofisarias en ratones durante el desarrollo embrionario. Además, se ha observado que ratones deficientes en estos genes experimentan una marcada hipoplasia hipofisaria (Kita *et al.*, 2007). Este trabajo pone de manifiesto la colocalización de DLK1 con células corticotropas en el lóbulo intermedio en e18.5 y p15. Llama especialmente la atención la presencia de células que carecen de inmunorreacción para ACTH en la zona periluminal del lóbulo intermedio de e18.5 (Figura 5). Este resultado está en consonancia con la descripción de Kita *et al.*, (2007) del patrón de expresión de Hes1 en el estadio e17.5, que coincide con la ubicación de nichos de células madre indiferenciadas en el lóbulo intermedio del ratón. En este trabajo, la doble inmunofluorescencia en el estadio e18.5 ha revelado la ausencia de ACTH en las células de esta región periluminal y la expresión de DLK1 en múltiples células

corticotropas contiguas del lóbulo intermedio (Figura 5). Teniendo en cuenta que DLK1 actúa como un inhibidor competitivo de las rutas de tipo Notch (Baladrón *et al.*, 2005; Sánchez-Solana *et al.*, 2011; Falix *et al.*, 2012), que existe una forma soluble del dominio exoplásmico de DLK1 de demostrada función reguladora en otros órganos endocrinos (Wang *et al.*, 2006; Rodríguez Cano, 2021) y que estudios inmunohistoquímicos con microscopía electrónica en ratones adultos han revelado la presencia de DLK1 en vesículas de secreción en células adenohipofisarias (Puertas-Avenidaño *et al.*, 2011), su expresión en las células corticotropas que mostramos en la Figura 5 sugiere que podría estar regulando la diferenciación de las mismas actuando de forma paracrina, autocrina y/o yuxtacrina. Asimismo, hemos hallado colocalización de DLK1 en algunas células ACTH-ir del lóbulo intermedio en p15.

Nuestro estudio inmunohistoquímico de la distribución de DLK1 en la hipófisis de ratones Swiss albino en los estadios p7 y p15 revela la desaparición de la inmunorreacción en el tercio más caudal del lóbulo intermedio en p7 y una menor intensidad del marcaje en este en p15, estadio en el que se observan solo unas pocas células DLK-1-ir en los márgenes del lóbulo intermedio. En relación con la expresión de DLK1 en estadios posteriores, ha sido descrita la ausencia de DLK1-ir en el lóbulo intermedio de ratones 129/SvJ de cuatro meses (Puertas-Avenidaño *et al.*, 2011); sin embargo, sería necesario estudiar la expresión de DLK1 en el ratón adulto de la cepa Swiss albino en futuros trabajos para comprobar si la inmunorreacción que observamos en postnatales se mantiene en el lóbulo intermedio del adulto o si, por el contrario, está ausente como se ha descrito en la cepa 129/SvJ (Puertas-Avenidaño *et al.*, 2011), una cepa de ratón diferente a la utilizada en nuestro estudio.

Atendiendo a la bibliografía consultada y los resultados de este Trabajo de Fin de Grado, parece ser que DLK1 juega un papel importante en el proceso de proliferación y diferenciación de las células adenohipofisarias del ratón, además de en el mantenimiento de la funcionalidad de estas células tras su diferenciación; sin embargo, futuras investigaciones, como un estudio de la distribución de DLK1 durante el desarrollo embrionario de la hipófisis en ratones *knockout DLK1^{-/-}*, se hacen indispensables para dilucidar las múltiples incógnitas que se acumulan en torno a las funciones que podría desempeñar DLK1 en el desarrollo y la fisiología de la hipófisis.

6. Conclusiones

Del presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- a) En el ratón Swiss albino, la proteína DLK1 está presente a partir del estadio e9.5 del desarrollo embrionario en todas las células de la bolsa de Rathke.
- b) Células DLK-ir se observaron en la hipófisis del ratón Swiss albino de cada estadio embrionario y postnatal analizado: e9.5, e11.5, e13.5, e14.5, e17.5, e18.5, e19.5, p7 y p15.
- c) En el estadio e18.5, el lóbulo anterior hipofisario presentó numerosas células DLK1-ir. La colocalización con las diferentes hormonas demostró la presencia de DLK1 en todos los tipos celulares secretores de hormonas en este lóbulo.
- d) Del total de células DLK1-ir caracterizadas en el lóbulo anterior en el estadio p15, un 29 ± 5 % fueron GH-ir; un 24 ± 4 %, PRL-ir; un 22 ± 3 %, ACTH-ir; un 12 ± 2 %, TSH-ir y un 9 ± 2 %, FSH-ir.
- e) En el estadio e18.5, el lóbulo tuberal hipofisario presentó células DLK1-ir que también fueron FSH-ir, PRL-ir o TSH-ir.
- f) En el estadio e18.5 en el lóbulo intermedio, se observó la presencia DLK1-ir en parte de las células ACTH-ir.
- g) En el lóbulo intermedio de p7 y p15 se observó una reducción de DLK1-ir respecto a los estadios finales del desarrollo embrionario.
- h) La proteína DLK1 puede ser un importante factor regulador de la proliferación y diferenciación de las células productoras de hormonas durante el desarrollo de la glándula hipofisaria del ratón.

Conclusions

The following conclusions can be drawn from this Final Degree Project:

- a) In the Swiss albino mouse, DLK1 protein is present from stage e9.5 of embryonic development in all cells of Rathke's pouch.
- b) DLK1-ir cells were observed in the pituitary gland of the Swiss albino mouse at each embryonic and postnatal stage analyzed: e9.5, e11.5, e13.5, e14.5, e17.5, e18.5, e19.5, p7 y p15.
- c) At stage e18.5, the anterior pituitary lobe showed numerous DLK1-ir cells. Colocalization with different hormones demonstrated the presence of DLK1 in all hormone-secreting cell types in this lobe.
- d) Of the total DLK1-ir cells characterized in the anterior lobe at p15 stage, $29 \pm 5 \%$ were GH-ir; $24 \pm 4 \%$, PRL-ir; $22 \pm 3 \%$, ACTH-ir; $12 \pm 2 \%$, TSH-ir and $9 \pm 2 \%$, FSH-ir.
- e) At stage e18.5, the pituitary tuberal lobe had DLK1-ir cells that were also FSH-ir, PRL-ir or TSH-ir.
- f) At stage e18.5 in the intermediate lobe, DLK1-ir was present in part of the ACTH-ir cells.
- g) In the intermediate lobe of p7 and p15, a reduction of DLK1-ir was observed with respect to the late embryonic developmental stages.
- h) DLK1-ir may be an important regulatory factor in the proliferation and differentiation of hormone-producing cells during the development of the mouse pituitary gland.

Bibliografía

1. Alatzoglou, K. S., Gregory, L. C. y Dattani, M. T. (2020). Development of the Pituitary Gland. *Comprehensive Physiology*, 10, 389-413. doi: 10.1002/cphy.c150043
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Keith, R. y Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. (6ª ed.). Omega.
3. Ansell, P. J., Zhou, Y., Schjeide, B. M., Kerner, A., Zhao, J., Zhang, X. y Klibanski, A. (2007). Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (DLK1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 271(1-2), 55-63. doi: 10.1016/j.mce.2007.04.002
4. Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M. J., Nueda, M. L., Díaz-Guerra, M. J. M., García-Ramírez, J. J., Bonvini, E., Gubina, E. y Laborda, J. (2005). dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Experimental Cell Research*, 303(2), 343-359. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.10.001
5. Cheung, L. Y. M., Rizzoti, K., Lovell-Badge, R. y Le Tissier, P. R. (2013). Pituitary Phenotypes of Mice Lacking the Notch Signalling Ligand Delta-Like 1 Homologue. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(4), 391-401. doi: 10.1111/jne.12010
6. Dutta, S., Dietrich, J. E., Westerfield, M. y Varga, Z. M. (2008). Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary. *Developmental Biology*, 319(2), 248-257. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.04.019
7. Falix, F. A., Aronson, D. C., Lamers, W. H. y Gaemers, I. C. (2012). Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1822(6), 988-995. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.003
8. Gardner, D. y Shoback, D. (2011). *Greenspan. Endocrinología básica y clínica* (9ª ed.). McGrawHill.
9. Hong, G. K., Payne, S. C. y Jane, J. A. (2016). Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 49(1), 21-32. doi: 10.1016/j.otc.2015.09.002
10. Inoshita, N. y Nishioka, H. (2018). The 2017 WHO classification of pituitary adenoma: overview and comments. *Brain Tumor Pathology*, 35(2), 51-56. doi: 10.1007/s10014-018-0314-3
11. Kelberman, D., Rizzoti, K., Lovell-Badge, R., Robinson, I. C. y Dattani, M. T. (2009). Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr. Rev.*, 30: 790-829. doi: 10.1210/er.2009-0008
12. Kita, A., Imayoshi, I., Hojo, M., Kitagawa, M., Kokubu, H., Ohsawa, R., Ohtsuka, T., Kageyama, R. y Hashimoto, N. (2007). Hes1 and Hes5 Control the Progenitor Pool, Intermediate Lobe Specification, and Posterior Lobe Formation in the Pituitary Development. *Molecular Endocrinology*, 21(6), 1458-1466. doi:10.1210/me.2007-0039
13. Lee, K., Villena, J. A., Moon, Y. S., Kim, K. H., Lee, S., Kang, C. y Sul, H. S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.*, 111(4), 453-461. doi: 10.1172/JCI15924
14. Microsoft Excel (versión 2306) [Software]. (2023).
15. Nakakura, T., Sato, M., Suzuki, M., Hatano, O., Takemori, H., Taniguchi, Y., Minoshima, Y. y Tanaka, S. (2009). The spatial and temporal expression of delta-like protein 1 in the rat pituitary gland during development. *Histochemistry And Cell Biology*, 131(1), 141-153. doi: 10.1007/s00418-008-0494-8
16. Pawlina, W. y Ross, M. (2020) *Histology: A text and atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology*. (8ª ed.). Wolters Kluwer.
17. Puertas-Avendaño, R. A., González-Gómez, M. J., Ruvira, M. D., Ruiz-Hidalgo, M. J., Morales-Delgado, N., Laborda, J., Díaz, C. y Bello, A. R. (2011). Role of the Non-Canonical Notch

- Ligand Delta-Like Protein 1 in Hormone-Producing Cells of the Adult Male Mouse Pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*, 23: 849-859. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02189.x
18. Raetzman L. T., Wheeler, B. S., Ross, S. A., Thomas, P. Q., Camper, S.A. (2006). Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Molecular Endocrinology*, 20(11), 2898-2908. doi: 10.1210/me.2005-0394
 19. Reyes, R., Martínez, S., González, M., Tramu, G., y Bello, A. R. (2008). Origin of Adenohypophysial Lobes and Cells from Rathke's Pouch in Swiss Albino Mice. Proliferation and Expression of Pitx 2 and Calbindin D28K in Corticotropic and Somatotropic cell Differentiation. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 37: 263-271. doi: 10.1111/j.1439-0264.2007.00839.x
 20. Rodríguez Cano, M. M. (2021). *Papel de las proteínas DLK y los receptores Notch en adipogénesis y osteogénesis* [Tesis de doctorado, Universidad de Castilla-La Mancha]. <https://hdl.handle.net/10578/29710>
 21. Sánchez-Solana, B., Nueda, M. L., Ruvira, M. D., Ruiz-Hidalgo, M. J., Monsalve, E. M., Rivero, S., García-Ramírez, J. J., Díaz-Guerra, M. J. M., Baladrón, V. y Laborda, J. (2011). The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1813(6), 1153–1164. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.004
 22. Shu, S., Ju, G. y Fan, L. (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Letters*, 85(2), 169-171. doi: 10.1016/0304-3940(88)90346-1
 23. Traustadottir, G., Kosmina, R., Sheikh, S., Jensen C. H. y Andersen, D. (2013). Preadipocytes proliferate and differentiate under the guidance of Delta-like 1 homolog (DLK1). *Adipocyte*, 2(4), 272-275. doi: 10.4161/adip.24994
 24. Wang, Y. y Sul, H. S. (2006). Ectodomain Shedding of Preadipocyte Factor 1 (Pref-1) by Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme (TACE) and Inhibition of Adipocyte Differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(14), 5421–5435. doi:10.1128/mcb.02437-05
 25. Zhu, X., Wang, J., Ju, B. G. y Rosenfeld, M. G. (2007). Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(6), 605–611. doi: 10.1016/j.ceb.2007.09.011

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera expresar el mayor agradecimiento posible a mis tutores del TFG. No solamente agradezco todos los conocimientos y la experiencia que me han brindado a nivel académico, científico y profesional; también quiero resaltar todo lo que me han aportado a nivel personal. Detrás de cada charla en nuestro café de las once se escondía un pequeño consejo, un libro increíble que leer o sencillamente pásabamos el rato compartiendo nuestro entusiasmo por la célula, pero cada detalle ha ido calando en mí y siempre llevaré un pedacito de vosotros conmigo en cada paso que dé en mi carrera científica.

Aixa, quiero agradecerte en particular la forma tan apasionada con la que hablas de la célula. A lo largo de estos años has abierto mis ojos a un mundo increíble que permanece invisible a escala macroscópica. Gracias por todos los artículos que buscaste para mí, por haberme apoyado en cada iniciativa que he tenido como los congresos o las clases en el instituto y todas las charlas que tuvimos en tu despacho en las que surgieron reflexiones tan interesantes y tantas lecciones de vida.

Ricardo, muchas gracias por endulzar todos los días el departamento con tu gran sentido del humor y entusiasmo. Me has enseñado muchísimas cosas a lo largo de este tiempo y espero que algún día surja una colaboración contigo en otro trabajo.

Muchísimas gracias a los dos por las infinitas correcciones que habéis hecho y todo el tiempo que habéis dedicado a mi aprendizaje.

Por otra parte, quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Gerard Tramu por el suministro de los antisueros contra las hormonas hipofisarias.

Me gustaría darles las gracias a mis profesoras de Biología y Geología de la ESO y Bachillerato: Mar y Luisa.

Por una parte, me gustaría agradecerle a Mar que me haya inculcado desde el principio la importancia del rigor en el lenguaje científico. Siempre recordaré con muchísimo cariño tus clases de Geología y tu divertidísima ironía.

Luisa, muchísimas gracias por saciar mi curiosidad en innumerables recreos dejándome usar el microscopio. Ojalá te hicieras a la idea del grado de nitidez con el que recuerdo la primera

preparación histológica que me mostraste. Estoy convencido de que en tus clases se forjó el inmenso interés que siento por el mundo microscópico y la fisiología. Gracias también por dejarme dar aquella clase en tercero que, curiosamente, era del sistema endocrino.

Gracias a Hailey por todo el apoyo emocional y las risas que me has dado en los momentos más difíciles y las campañas de estudio. En fin, ya sabes que un 4,8...

Quisiera agradecer a Mari, Nerea y Victoria todos los buenos momentos que compartimos estos años y la ilusión que siempre os ha hecho cada pequeño logro que he ido consiguiendo en el laboratorio.

Me gustaría darle las gracias a Víctor por escuchar tantas veces lo guay que es la hipófisis y por intentar regalarme mi primer libro de Histología. Gracias también por el apoyo que me has dado y por inspirarme enormemente.

Quisiera agradecer a Valeria y Dario todos los buenos momentos y debates que tuvimos. Habéis sido un referente para mí en la búsqueda de armonía y paz. Gracias por sacarme una sonrisa todos los días con el cafetinsho correspondiente.

Además, me gustaría darle las gracias a Laurette. Te dije que te pondría aquí por enseñarme a pegar cubres, pero con el tiempo resultó que te convertiste en una figura referente para mí por tu férrea determinación y toda tu sabiduría. Gracias también por amenizar todos los días el trabajo de laboratorio a golpe de carcajada.

Por otro lado, quisiera expresar todo mi agradecimiento a Olga y Sheyma, no os imagináis la felicidad que me da ser parte del equipo que formamos y cuánto me han ayudado vuestras palabras y compañía en los momentos más caóticos de esta etapa.

Quisiera agradecer a mis abuelos su apoyo, que no entiende de distancias ni tiempo, y la perspectiva resiliente que siempre han sembrado en mí y tanto me ha ayudado a lo largo de este camino.

Me gustaría darle las gracias a mi madre, Sol. Gracias por todo lo que has luchado por mí y por apoyarme incondicionalmente en cada paso que doy. Por último, quiero darle las gracias a mis hermanos, Nilo y Aday por el infinito apoyo emocional que han supuesto siempre.