



LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Instituto de Anatomia Patológica

### **Caraterísticas histopatológicas das células folículo-estreladas em hipófises de ratos *wild type*, obesos e *high-fat diet* induzidos**

José Filipe Ferreira Soares de Melo

**Orientado por:**

Prof. Doutor Francisco Tortosa

---

**Fevereiro/2022**

## **RESUMO**

A hipófise anterior regula mecanismos tão vastos como o crescimento, o metabolismo ou a reprodução, através da secreção hormonal. As células folículo-estreladas (CFE), células não endócrinas situadas entre as células produtoras de hormonas da hipófise anterior, têm uma função ainda pouco conhecida. Apesar de tudo, com a sua organização em rede, parecem ter um importante papel na regulação e manutenção da população de células hormonais.

Neste trabalho, o primeiro do género de que há registo, 33 hipófises de três grupos de ratinhos (18 *wild type* [WT], 11 geneticamente obesos [OB] e 4 sob uma dieta rica em ácidos gordos [HFD]) foram analisadas de forma a avaliar se existiria alguma relação entre o número de CFE e as alterações do metabolismo basal de cada grupo de ratinhos. Recorreu-se à marcação imunohistoquímica pela proteína S-100, a técnicas de imunofluorescência e ao *software Image-J* para se conseguir calcular a percentagem de CFE presentes em cada amostra.

Chegou-se à conclusão de que, apesar de não se notarem diferenças significativas entre os ratinhos WT e OB, o grupo de ratinhos HFD teria uma percentagem de CFE significativamente superior aos outros dois grupos. Isto pode sugerir uma relação ainda desconhecida entre a dieta, em concreto uma dieta rica em ácidos gordos, e a apresentação de CFE na hipófise anterior. Os mecanismos e consequências fisiológicas subjacentes a esta alteração deverão, por isso, ser estudados, por forma a obter um maior esclarecimento da temática.

### **Palavras-chave**

Células Folículo-Estreladas, Proteína S-100, Metabolismo Basal, Hipófise

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

## **ABSTRACT**

The anterior pituitary gland regulates growth, metabolism, and reproduction by secreting hormones. Folliculo-stellate cells (FSC) are non-endocrine cells located among hormone-producing cells in the anterior pituitary glands, but little is known about the exact roles of those cells. Although, with their net organization, they seem to have an important role in the hormonal cells regulation and maintenance.

In this work, the first ever made in this area, 33 pituitaries of three groups of mice (18 wild type [WT], 11 genetically obese [OB] and 4 under a high-fat diet [HFD]) were studied in order to determine if there was any relation between the number of FSC and alterations of the basal metabolism in each group of mice. For that, immunohistochemical staining using the S-100 protein was used, as well as immunofluorescence techniques and also the Image-J software, to calculate the percentage of FSC present in each sample.

We found that, although there weren't noticed any significantly difference between WT and OB mice, the group of HFD mice tend to have significantly more percentage of FSC than the mice from other groups. This might suggest some yet unknown link between diet, precisely with a high-fat diet, and the presentation of FSC in the anterior pituitary. The physiologic mechanisms and consequences linked to this alteration must be studied, in order to obtain a major enlighten of this thematic.

## **Keywords**

Folliculo-stellate cells, S-100 protein, Basal Metabolism, Pituitary

## ÍNDICE

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| RESUMO.....                          | 2  |
| ABSTRACT .....                       | 3  |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....          | 5  |
| INTRODUÇÃO.....                      | 6  |
| MATERIAL E MÉTODOS.....              | 8  |
| Histologia e Imunohistoquímica ..... | 8  |
| Imunofluorescência .....             | 9  |
| Enquadramento estatístico.....       | 9  |
| RESULTADOS.....                      | 10 |
| DISCUSSÃO.....                       | 14 |
| CONCLUSÃO.....                       | 16 |
| AGRADECIMENTOS.....                  | 17 |
| BIBLIOGRAFIA .....                   | 18 |
| ANEXOS.....                          | 23 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH - *Adrenocorticotropic hormone*

ANXA1 - *Annexin A1*

BSA - Albumina sérica bovina

CFE - Células folículo-estreladas

FSC - *Folliculo-stellate cells*

FSH - *Follicle-stimulating hormone*

GH - *Growth hormone*

IL-6 - Interleucina 6

IQR - *Interquartile range*

HFD - *High-fat diet*

LH - *Luteinizing hormone*

OB - Obesos

OID - Obesidade induzida por dieta

ORBEA - Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais

PBS - Tampão fosfato-salino

S-100 - Proteína S-100

TA - Temperatura ambiente

TSH - *Thyroid stimulating hormone*

WT - *Wild type*

## INTRODUÇÃO

A glândula pituitária (hipófise), uma pequena estrutura alojada na sela turca, na base do cérebro, é uma estrutura endócrina altamente complexa que tem a capacidade para responder a múltiplos sinais provenientes de localizações quer centrais, quer periféricas.

[1] Esta regula e atua em diferentes sistemas do organismo, estando em estreita relação com o hipotálamo, formando o eixo de ação hipotálamo-hipófise. [2]

Anatomicamente, descrevem-se classicamente dois lobos de origem embriologicamente distinta, um anterior, ou adenohipófise, que provém da ectoderme, e um posterior, ou neurohipófise, com origem nos axónios hipotalâmicos, de cuja fisiologia e histologia há longas e consensuais descrições. [3] Em relação ao papel da hipófise anterior, conhece-se a sua ação no crescimento através da GH, na lactação com a prolactina, na atividade gonadal através da FSH e da LH, assim como na atividade adrenal e tiroideia com a ACTH e a TSH, respetivamente. [4] Quanto à neurohipófise destacam-se os efeitos da vasopressina, envolvida no balanço hídrico e da oxitocina, responsável pelas contrações uterinas e lactação. [5] Apesar de tudo o que já se sabe acerca desta complexa glândula, desde hormonas produzidas a interações com os diferentes sistemas, há muito que é ainda desconhecido. [6]

Na hipófise anterior, para além das células que constituem as glândulas endócrinas propriamente ditas, estão descritas também células tradicionalmente relatadas como de suporte, as células folículo-estreladas (CFE). [7] Estas células, caracterizadas pela sua aparência *star-like* e capacidade de formar folículos, não parecem ter a capacidade de produzir hormonas hipofisárias. [8, 9] No entanto, pela sua organização em rede, parecem ter um importante papel na regulação e manutenção da população de células hormonais, ao conduzirem fatores estimulatórios ou inibitórios provenientes do hipotálamo e transportarem os produtos secretórios da glândula. [10, 11]

Ainda assim, o papel fisiopatológico da rede de CFE é ainda parcamente compreendido. Após um longo período de pesquisas sobre a hipófise, várias hipóteses se aventaram acerca do papel das CFE na máquina adenohipofisária, funções essas tão variadas como a regulação parácrina, o *turnover* celular e o *crossstalk* neuroimune, mas muitos problemas permanecem ainda sem solução. [12 - 14]

Outros estudos sugerem ainda que estas células, que são positivas para a proteína S-100, pelo seu comportamento heterogéneo e plural, poderão ter uma origem extrahipofisária. [15, 16] Sendo que a sua proliferação poderá advir da invasão do lobo anterior da hipófise por outras estruturas durante a organogénese. [17, 18]

Com este trabalho, o primeiro do género, procuramos perceber se existe relação entre estas células e as alterações do metabolismo basal, associado à obesidade, recorrendo ao estudo de ratinhos *wild type* (WT), obesos (OB) e *high-fat diet* (HFD) induzidos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Neste estudo foram usados ratinhos B6 (C57BL/B6J, produção própria do Instituto Gulbenkian da Ciência) e ob/ob (*Jackson Laboratory [JAX]*, stock no. 000632). Todos os ratinhos usados para o estudo eram machos, sendo que foram mantidos em temperatura e humidade controlada, sob um ciclo de 12 horas de luz/escuro. Comida e água foram fornecidos *ad-libitum*. Modelo de obesidade induzida por dieta (OID) foi gerado colocando os animais numa HFD à oitava semana e com duração de 12 semanas. Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo comité de ética do Instituto Gulbenkian de Ciência e pelo Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais (ORBEA).

### **Histologia e Imunohistoquímica**

Para a preparação deste trabalho foram obtidas 37 glândulas hipofisárias: 19 de ratinhos WT (dos quais conseguimos avaliar 18), 14 ratinhos OB (dos quais conseguimos avaliar 11) e 4 HFD (todas avaliadas). O sacrifício e colheita de amostras foi realizado entre 01/11/2017 e 01/12/2017.

As glândulas hipofisárias dos ratinhos foram dissecadas e fixadas com formaldeído tamponado a 4%, imediatamente após extração. Subsequentemente, após a realização do exame macroscópico das glândulas, estas foram processadas de acordo com os procedimentos técnicos usuais para a obtenção de blocos de parafina, para avaliação histológica completa.

A presença e distribuição das CFE foi estudada através de imunohistoquímica em cortes histológicos de 3 micras desparafinadas, submetidas a recuperação antigénica e incubadas com um anticorpo individual dirigido contra à proteína celular específica S-100 $\beta$  (policlonal; proveniência: Leica; diluição: 1/400). [19 - 22]

Todas as amostras foram avaliadas por um patologista com experiência na área. O índice de marcação para S-100 calculou-se como a percentagem de células positivas em pelo menos 500 células nas áreas de maior imunomarcação, analisadas em microscópio óptico com ampliação de 400x. Em todos os casos, calculou-se também a percentagem de CFE com a ajuda de um *software* processador de imagem de análises imunohistoquímico (*Image J 1.49. National Institutes of Health, United States*). (Figuras 1 - 5)



### **Imunofluorescência**

Também para identificar e visualizar as CFE, algumas glândulas de ratinhos WT foram incubadas numa solução de bloqueio e permeabilização (3% BSA [Albumina Sérica Bovina], 2% soro de cabra, 0.1% Polisorbato e 0.1% sódio azide, em 1× PBS) por 1h à TA com agitação. As incubações com anticorpos primários foram realizadas durante a noite a 4 °C e foi utilizada uma diluição de anticorpo primário de 1:500. *(Figura 6)*

### **Enquadramento estatístico**

Foi feita uma análise estatística e comparativa básica apropriada à distribuição dos dados. Para isto utilizaram-se testes estatísticos de ANOVA de um fator paramétrico e não paramétrico (Kruskal-Wallis). Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo, recorrendo-se também a comparações múltiplas não paramétricas (Tukey-Kramer-Nemenyi, Conover's e Dunn's) entre os diferentes grupos.

## RESULTADOS

Após a análise das hipófises, foram obtidos os dados apresentados nas *Tabelas 1, 2 e 3*, que representam a percentagem de CFE em cada glândula hipofisária avaliada.

Nos ratinhos WT, *Tabela 1*, houve uma prevalência relativa de CFE a variar entre os 3% e os 60%. Os ratinhos OB, *Tabela 2*, têm uma distribuição de CFE parecida, variando entre 10% e 54%. Já o grupo dos ratinhos HFD, *Tabela 3*, variou apenas entre os 85% e os 93%.

*Tabela 1 - Percentagem de CFE em ratinhos WT - Percentagem de CFE em relação à totalidade de tecido observado na amostra da hipófise de cada ratinho WT*

| WT 1 | WT 2 | WT 3 | WT 4 | WT 5 | WT 6 | WT 7 | WT 8 | WT 9 | WT 10 | WT 11 | WT 12 | WT 13 | WT 14 | WT 15 | WT 16 | WT 17 | WT 18 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 17%  | 15%  | 35%  | 11%  | 25%  | 20%  | 3%   | 18%  | 20%  | 12%   | 17%   | 9%    | 60%   | 24%   | 46%   | 13%   | 16%   | 26%   |

*Tabela 2 - Percentagem de CFE em ratinhos OB - Percentagem de CFE em relação à totalidade de tecido observado na amostra da hipófise de cada ratinho OB*

| OB1 | OB2 | OB3 | OB4 | OB5 | OB6 | OB7 | OB8 | OB9 | OB10 | OB11 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| 22% | 25% | 54% | 10% | 17% | 16% | 12% | 26% | 25% | 19%  | 29%  |

*Tabela 3 - Percentagem de CFE em ratinhos HFD - Percentagem de CFE em relação à totalidade de tecido observado na amostra da hipófise de cada ratinho HFD*

| HFD1 | HFD2 | HFD3 | HFD4 |
|------|------|------|------|
| 89%  | 93%  | 85%  | 93%  |

Como se observa na *Tabela 4*, conseguiu-se obter uma média de 22% de CFE em ratinhos WT, 23% de CFE em ratinhos OB e 90% de CFE em ratinhos HFD. Nenhum dos dados obtidos foi considerado estatisticamente como um *outlier*, tendo-se obtido uma dispersão de dados que poderá significar uma tendência para que a percentagem de CFE seja superior aquando de uma dieta rica em ácidos gordos.

*Tabela 4 - Análise descritiva dos dados obtidos - Estatística qualitativa de cada grupo de ratinhos incluindo Extremos, Quartis, Amplitude Interquartil, Limite dos Ouliers Superior e Inferior e Média*

|     | Mínimo | 1º Quartil | 3º Quartil | Máximo | IQR | Outliers Limite Inferior | Outliers Limite Superior | Média |
|-----|--------|------------|------------|--------|-----|--------------------------|--------------------------|-------|
| WT  | 3%     | 13,50%     | 24,75%     | 60%    | 11% | -3%                      | 77%                      | 22%   |
| OB  | 10%    | 16,50%     | 25,50%     | 54%    | 9%  | 3%                       | 68%                      | 23%   |
| HFD | 85%    | 88%        | 93%        | 93%    | 5%  | 81%                      | 101%                     | 90%   |

Para além do que foi já descrito, visualizando os dados no gráfico de dispersão (*Gráfico 1*) constata-se que os dados referentes ao grupo HFD são sempre superiores aos dados dos outros dois grupos, que, por sua vez, se distribuem de forma muito semelhante. Esta diferença visualiza-se melhor quando se analisam os *boxplots* (*Gráfico 2*). Nestes verifica-se uma total sobreposição dos *boxplots* referentes aos grupos WT e OB, não havendo qualquer sobreposição destes ao *boxplot* do grupo HFD. Tendo por base estes dados descritivos, e ainda os valores das respetivas médias (22% [WT], 23% [OB] e 90% [HFD]) e desvios padrão (0.14% [WT], 0.12% [OB] e 0.04% [HFD]), os dados parecem apontar no sentido da hipótese de que as médias das observações dos grupos são significativamente diferentes, mais particularmente entre o grupo HFD e os restantes.

Gráfico 1 - Dispersão da percentagem de CFE em cada ratinho - Representação gráfica da percentagem de CFE nas hipófises de cada ratinho (WT - Verde; OB - Amarelo e HFD - Azul)

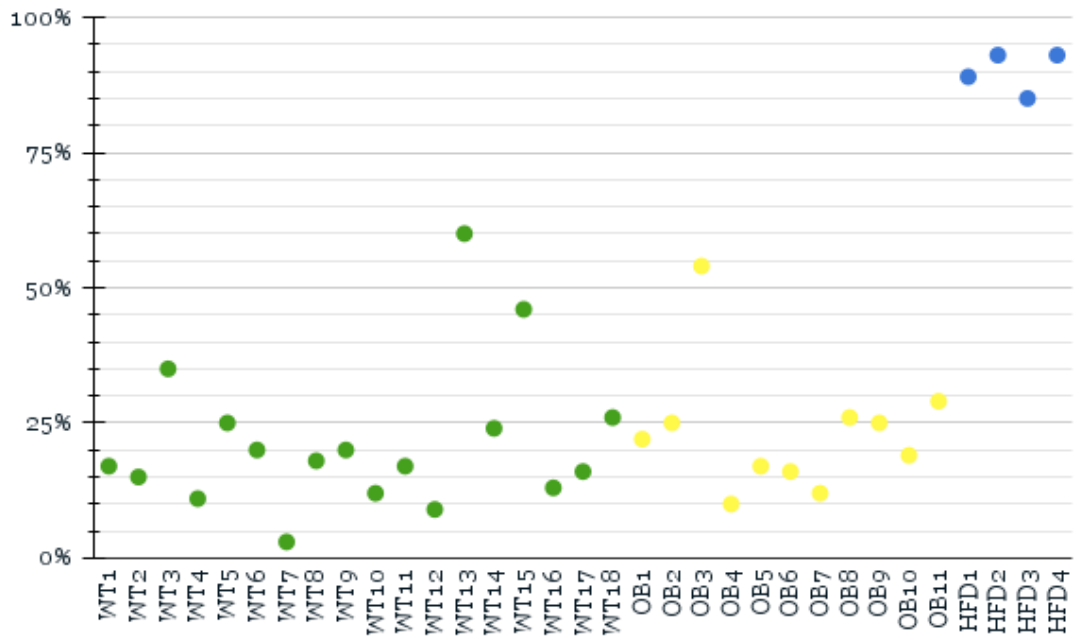
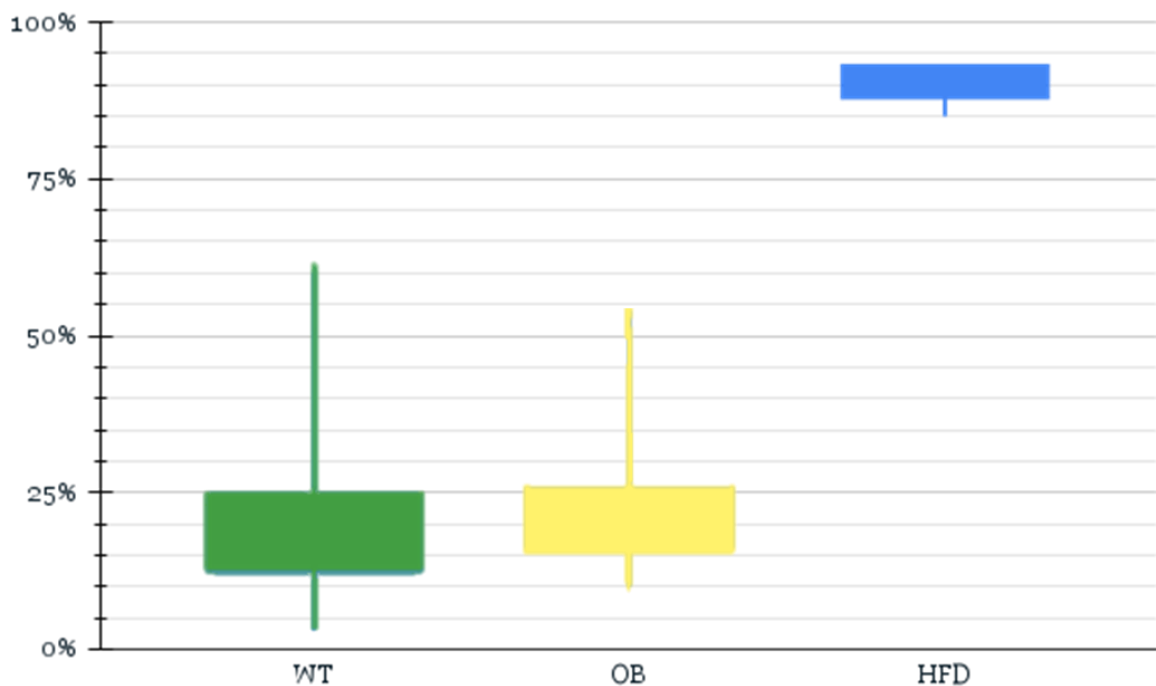


Gráfico 2 - Boxplots distribuição da percentagem de CFE nos diferentes grupos de ratinhos - Representação gráfica da distribuição da variação dos dados numéricos obtidos por meio de quartis



Fazendo recurso dos testes estatísticos de ANOVA de um fator paramétrico e não paramétrico (Kruskal-Wallis) verificamos que a hipótese de igualdade de médias/medianas é rejeitada por ambos ao apresentarem *p-value* <0.05 (<<0.001 e 0.005, respetivamente), havendo diferenças significativas entre os grupos de observações. Como os pressupostos de homogeneidade de variâncias e de normalidade não foram verificados e para avaliar melhor as diferenças entre grupos, recorreu-se a comparações múltiplas não paramétricas (Tukey-Kramer-Nemenyi, Conover's e Dunn's – Tabelas 5, 6 e 7, respetivamente) tendo-se verificado sempre a existência de dois grupos homogêneos: um formado pelos grupos de observações WT e OB e um outro formado pelas observações HFD ( $p < 0.05$ ).

*Tabela 7 - Tukey-Kramer-Nemenyi – Comparação múltipla não paramétrica entre os diferentes grupos de ratinhos ( $p < 0.05$ )*

|    | HFD    | OB     |
|----|--------|--------|
| OB | 0,0215 | -      |
| WT | 0,0032 | 0,7906 |

*Tabela 6 - Conover's - Comparação múltipla não paramétrica entre os diferentes grupos de ratinhos ( $p < 0.05$ )*

|    | HFD    | OB     |
|----|--------|--------|
| OB | 0,0099 | -      |
| WT | 0,0015 | 0,7206 |

*Tabela 5 - Dunn's - Comparação múltipla não paramétrica entre os diferentes grupos de ratinhos ( $p < 0.05$ )*

|    | HFD    | OB     |
|----|--------|--------|
| OB | 0,0156 | -      |
| WT | 0,0033 | 0,5133 |

## DISCUSSÃO

Como já foi dito anteriormente, denota-se uma tendência para que a percentagem de CFE em ratinhos HFD seja superior à dos ratinhos WT e OB. Isto poderá significar duas coisas distintas, visto que estamos a analisar percentagens: um aumento do número das CFE nos ratinhos HFD; ou que nestes ratinhos há uma diminuição das outras populações celulares, fazendo, conseqüentemente, aumentar a prevalência relativa das CFE nas hipófises destes ratinhos.

Quanto aos ratinhos WT e OB não parece haver uma diferença significativa entre os dois grupos de amostras, pelo que se poderá inferir que as CFE não são afetadas pela obesidade geneticamente induzida.

À luz dos conhecimentos atuais, podemos tentar explicitar os resultados obtidos através de uma panóplia de vertentes.

Sabe-se, hoje, que *in vitro* a via de sinalização *Hedgehog* leva a que as CFE estimulem a produção e libertação de GH pela hipófise anterior, mas a produção de CXCL12 pelas CFE pode ter o mesmo efeito. [23, 24] Estabelecendo as CFE uma rede de comunicação entre si e com as células produtoras de hormonas, isto poderá corresponder *in vivo* a um mecanismo fisiológico de reação ao aumento da ingestão de ácidos gordos, patente nos ratinhos HFD, influenciando a expressão de CFE. [25, 26]

No entanto, estudos recentes demonstram que as células S-100 positivas na hipófise anterior podem não ser apenas as CFE, podendo inclusive marcar *stem/progenitor cells* hipofisárias. [27, 28] Sendo que anteriormente se considerava a hipótese de que as próprias CFE poderiam ser elas próprias um tipo de *pluripotent adult stem cell*. [29-31] Questão que ainda se mantém em aberto. [32]

É também sugerido, por Higuchi, M., *et al* (2014), que estas células S-100 positivas terão a capacidade, ainda que infreqüentemente, para se tornarem células produtoras de hormonas, ou ainda o facto de se reconhecer nas células *folículo-estreladas-like* um estágio intermédio na diferenciação para células produtoras de hormonas. [33 - 35] Através da expressão de SOX2 das células progenitoras, pode influenciar-se a variação na prevalência de CFE. [36] Daí que o aumento das CFE nos ratinhos HFD possa dever-

se a esta resposta fisiológica de diferenciação celular na tentativa de adaptação a uma dieta rica em ácidos gordos.

Por outro lado, a pluralidade de células que apresentaram marcação S-100 positiva poderão influenciar os resultados, no sentido de que as diferenças observadas se podem dever não a alterações nas CFE, mas sim nas outras populações de células S-100 positivas.

Para esta exclusão, em estudos futuros, talvez devesse ser usado outro marcador específico para as CFE, ou um painel de marcadores que tornariam a marcação mais específica. Estes poderiam incluir, entre outros, a *Claudin-9*, marcador das *Tight Junctions* das CFE, a Aldolase C ou a própria IL-6, estimulável pela Adenosina, produzidas pelas CFE. [37-40]

As CFE são também consideradas a maior fonte intrahipofisária de citocinas e fatores de crescimento. [41] Aventa-se, por isso, a necessidade de, existindo vários subtipos de CFE, ser necessário caracterizá-los individualmente e arranjar marcadores específicos que permitam o seu estudo. [42, 43] Assim como a caracterização destas consoante a idade do indivíduo. [44, 45]

## **CONCLUSÃO**

No vasto mundo que consegue ser um pequeno órgão como a hipófise, ainda são muitas as questões a clarificar relativamente às CFE. Pretendemos com este trabalho abrir caminho ao que poderá ser seguido em investigações posteriores.

Apesar da discrepância entre o número de amostras dentro de cada grupo, que carecerá de confirmação em estudos com uma amostra mais significativa, poderemos intuir que uma dieta rica em ácidos gordos levará a um aumento da prevalência relativa de CFE em ratinhos, ou, pelo menos, a um aumento das populações celulares S-100 positivas, cujos mecanismos fisiológicos, quer da origem das alterações, quer das consequências das mesmas deverão ser estudados posteriormente.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Doutor Francisco Tortosa. Um grande bem-haja pelo acompanhamento, apoio e oportunidade que me deu de realizar este trabalho, mesmo em circunstâncias tão adversas e atípicas.

Uma palavra de agradecimento também a todos os que dedicaram algum tempo a este trabalho, colaborando de qualquer forma. Ressalvo em especial o Mestre Gonçalo Borrecho, do Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, a Doutora Noélia Martínez-Sánchez, do *Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism*, ao meu amigo Tiago Costa e à, sempre especial, Sofia Matias. Todos eles uma ajuda preciosa para levar este trabalho a bom porto.

Por último, como não podia deixar de ser, aos meus pais, irmã e, novamente, à Sofia, porque sem eles tudo seria mais difícil, por poder contar com todos eles em qualquer ocasião. Muito Obrigada!

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M. R., Stalla, G. K., & Arzt, E. (2012). Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiological reviews*.
2. Kioussi, C., Carriere, C., & Rosenfeld, M. G. (1999). A model for the development of the hypothalamic–pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mechanisms of development*, 81(1-2), 23-35.
3. Mihai, R. (2014). Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands. *Surgery (Oxford)*, 32(10), 504-512.
4. Yeung, C. M., Chan, C. B., Leung, P. S., & Cheng, C. H. (2006). Cells of the anterior pituitary. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(9), 1441-1449.
5. Amar, A. P., & Weiss, M. H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery Clinics*, 14(1), 11-23.
6. Inoue, k., Couch, e. F., Takano, K., & Ogawa, S. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Archives of histology and cytology*, 62(3), 205-218.
7. Allaerts, W., & Vankelecom, H. (2005). History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *European Journal of Endocrinology*, 153(1), 1-12.
8. Perryman, E. K. (1989). Folliculo-stellate cells of the pituitary gland. *Bioscience*, 39(2), 81-88.
9. Le Tissier, P. R., Hodson, D. J., Lafont, C., Fontanaud, P., Schaeffer, M., & Mollard, P. (2012). Anterior pituitary cell networks. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(3), 252-266.
10. Le Tissier, P. R., & Mollard, P. (2021). Renewing an old interest: Pituitary folliculostellate cells. *Journal of neuroendocrinology*, 33(11), e13053.
11. Pires, M., & Tortosa, F. (2016). Update on pituitary folliculo-stellate cells. *Int. Arch. Endocrinol. Clin. Res*, 2(006).
12. Baes, M., Allaerts, W., & Deneff, C. (1987). Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology*, 120(2), 685-691.
13. Marin, F., Stefanescu, L., & Kovacs, K. (1991). Folliculostellate cells of the pituitary. *Endocrine pathology*, 2(4), 180-192.

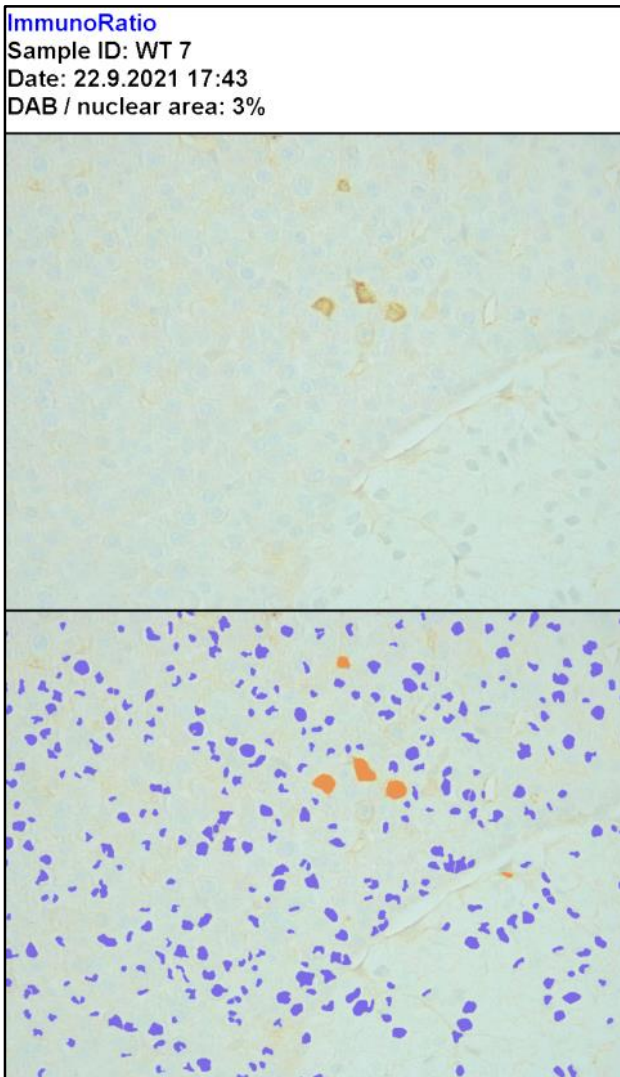
14. Allaerts, W., Carmeliet, P., & Deneef, C. (1990). New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 71(2), 73-81.
15. Yamashita, M., Qian, Z. R., Sano, T., Horvath, E., & Kovacs, K. (2005). Immunohistochemical study on so-called follicular cells and folliculostellate cells in the human adenohypophysis. *Pathology international*, 55(5), 244-247.
16. Stojilkovic, S. S. (2001). A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(9), 378-380.
17. Horiguchi, K., Yako, H., Yoshida, S., Fujiwara, K., Tsukada, T., Kanno, N. & Kato, Y. (2016). S100 $\beta$ -positive cells of mesenchymal origin reside in the anterior lobe of the embryonic pituitary gland. *PLoS One*, 11(10), e0163981.
18. Elena, P. (2020). Identification and clinical significance of folliculo-stellate cells in normal hypophysis and adenomas. *The Moldovan Medical Journal*, 63(2), 63-65.
19. Höfler, H., Walter, G. F., & Denk, H. (1984). Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas. *Acta neuropathologica*, 65(1), 35-40.
20. Girod, C., Trouillas, J., & Dubois, M. P. (1985). Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell and tissue research*, 241(3), 505-511.
21. Nakajima, T., Yamaguchi, H., & Takahashi, K. (1980). S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain research*, 191(2), 523-531.
22. Cocchia, D., & Miani, N. (1980). Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *Journal of neurocytology*, 9(6), 771-782.
23. Botermann, D. S., Brandes, N., Frommhold, A., Heß, I., Wolff, A., Zibat, A., & Uhmann, A. (2021). Hedgehog signaling in endocrine and folliculo-stellate cells of the adult pituitary. *Journal of Endocrinology*, 248(3), 303-316.
24. Horiguchi, K., Ilmiawati, C., Fujiwara, K., Tsukada, T., Kikuchi, M., & Yashiro, T. (2012). Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in folliculostellate (FS) cells of the rat anterior pituitary gland: the CXCL12/CXCR4 axis induces interconnection of FS cells. *Endocrinology*, 153(4), 1717-1724.

25. Shirasawa, N., Mabuchi, Y., Sakuma, E., Horiuchi, O., Yashiro, T., Kikuchi, M., & Soji, T. (2004). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: X. Immunohistochemistry of S-100 and connexin 43 of folliculostellate cells in the rat anterior pituitary gland. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 278(1), 462-473.
26. Fauquier, T., Guérineau, N. C., McKinney, R. A., Bauer, K., & Mollard, P. (2001). Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8891-8896.
27. Kato, Y., Yoshida, S., & Kato, T. (2021). New insights into the role and origin of pituitary S100 $\beta$ -positive cells. *Cell and tissue research*, 386(2), 227-237.
28. Lloyd, R. V., & Mailloux, J. (1988). Analysis of S-100 protein positive folliculostellate cells in rat pituitary tissues. *The American journal of pathology*, 133(2), 338.
29. Horvath, E., & Kovacs, K. (2002). Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell?. *Ultrastructural pathology*, 26(4), 219-228.
30. Inoue, K., Mogi, C., Ogawa, S., Tomida, M., & Miyai, S. (2002). Are folliculostellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells?. *Archives of physiology and biochemistry*, 110(1-2), 50-53.
31. Deneff, C. (2008). Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *Journal of neuroendocrinology*, 20(1), 1-70.
32. Devnath, S., & Inoue, K. (2008). An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 687-691.
33. Higuchi, M., Kanno, N., Yoshida, S., Ueharu, H., Chen, M., Yako, H., Shibuya, S., Sekita, M., Tsuda, M., Mitsuishi, H., Nishimura, N., Kato, T., & Kato, Y. (2014). GFP-expressing S100 $\beta$ -positive cells of the rat anterior pituitary differentiate into hormone-producing cells. *Cell and tissue research*, 357(3), 767-779.
34. Vankelecom, H., & Chen, J. (2014). Pituitary stem cells: where do we stand?. *Molecular and cellular endocrinology*, 385(1-2), 2-17.

35. Osuna, M., Sonobe, Y., Itakura, E., Devnath, S., Kato, T., Kato, Y., & Inoue, K. (2012). Differentiation capacity of native pituitary folliculostellate cells and brain astrocytes. *Journal of endocrinology*, 213(3), 231.
36. Fauquier, T., Rizzoti, K., Dattani, M., Lovell-Badge, R., & Robinson, I. C. (2008). SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2907-2912.
37. Higashi, A. Y., Higashi, T., Furuse, K., Ozeki, K., Furuse, M., & Chiba, H. (2021). Claudin-9 constitutes tight junctions of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
38. Fujiwara, K., Tsukada, T., Horiguchi, K., Fujiwara, Y., Takemoto, K., Nio-Kobayashi, J., Ohno, N., & Inoue, K. (2020). Aldolase C is a novel molecular marker for folliculo-stellate cells in rodent pituitary. *Cell & Tissue Research*, 381(2), 273-284.
39. Rees, D. A., Lewis, B. M., Lewis, M. D., Francis, K., Scanlon, M. F., & Ham, J. (2003). Adenosine-induced IL-6 expression in pituitary folliculostellate cells is mediated via A2b adenosine receptors coupled to PKC and p38 MAPK. *British journal of pharmacology*, 140(4), 764.
40. Vennekens, A., Laporte, E., Hermans, F., Cox, B., Modave, E., Janiszewski, A., Nys, C., Kobayashi, H., Malengier-Devlies, B., Chappell, J., Matthys, P., Garcia M.I., Pasque, V., Lambrechts, D., & Vankelecom, H. (2021). Interleukin-6 is an activator of pituitary stem cells upon local damage, a competence quenched in the aging gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(25).
41. Vlotides, G., Chen, Y. H., Eigler, T., Ren, S. G., & Melmed, S. (2009). Fibroblast growth factor-2 autocrine regulation in pituitary folliculostellate Tt/GF cells. *Endocrinology*, 150(7), 3252-3258.
42. Morris, J., & Christian, H. (2011). Folliculo-stellate cells: paracrine communicators in the anterior pituitary. *The Open Neuroendocrinology Journal*, 4(1).
43. Allaerts, W., Jeucken, P. H., Debets, R., Hoefakker, S., Claassen, E., & Drexhage, H. A. (1997). Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *Journal of neuroendocrinology*, 9(1), 43-53.

44. Laporte, E., Vennekens, A., & Vankelecom, H. (2021). Pituitary remodeling throughout life: Are resident stem cells involved? *Frontiers in Endocrinology*, 11, 604519.
45. Soji, T., Mabuchi, Y., Kurono, C., & Herbert, D. C. (1997). Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microscopy research and technique*, 39(2), 138-149.

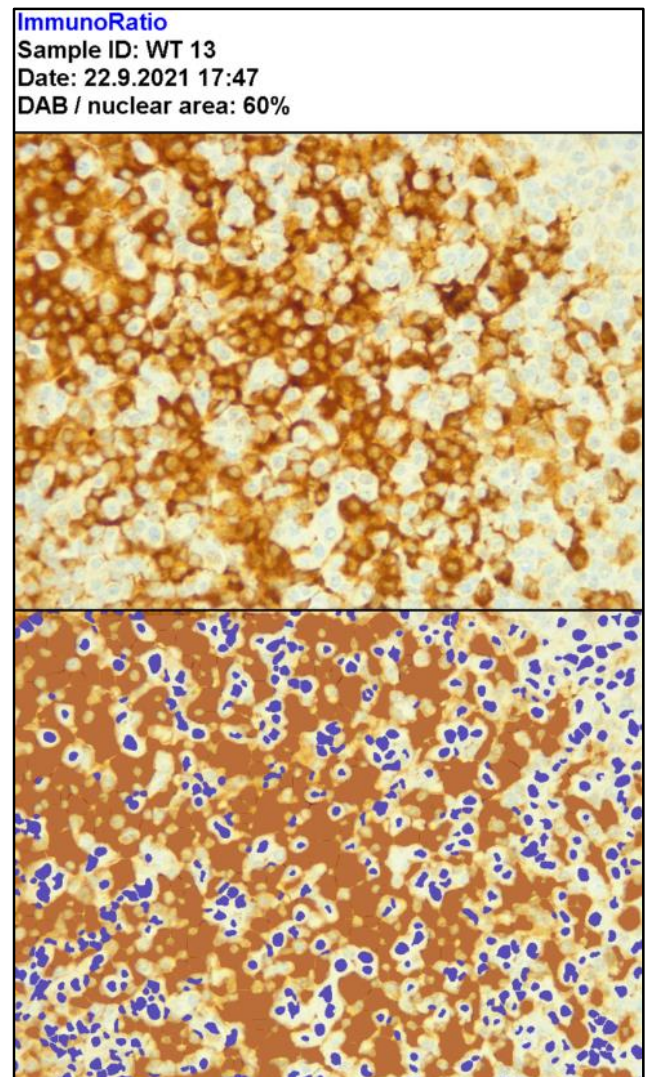
## ANEXOS



*Figura 1 - Marcação por imunohistoquímica de células S-100 positivas no ratinho WT7 - Imagens microscópicas da hipófise de um ratinho revelando a prevalência de 3% de CFE:*

*a) A técnica imunohistoquímica (usando um anticorpo contra a proteína S-100);*

*b) Com um programa processador de imagem, evidencia-se a proporcionalidade destas células (a castanho) relativamente às restantes células (núcleos com cor azul) (Image J, ImmunoRatio plugin).*

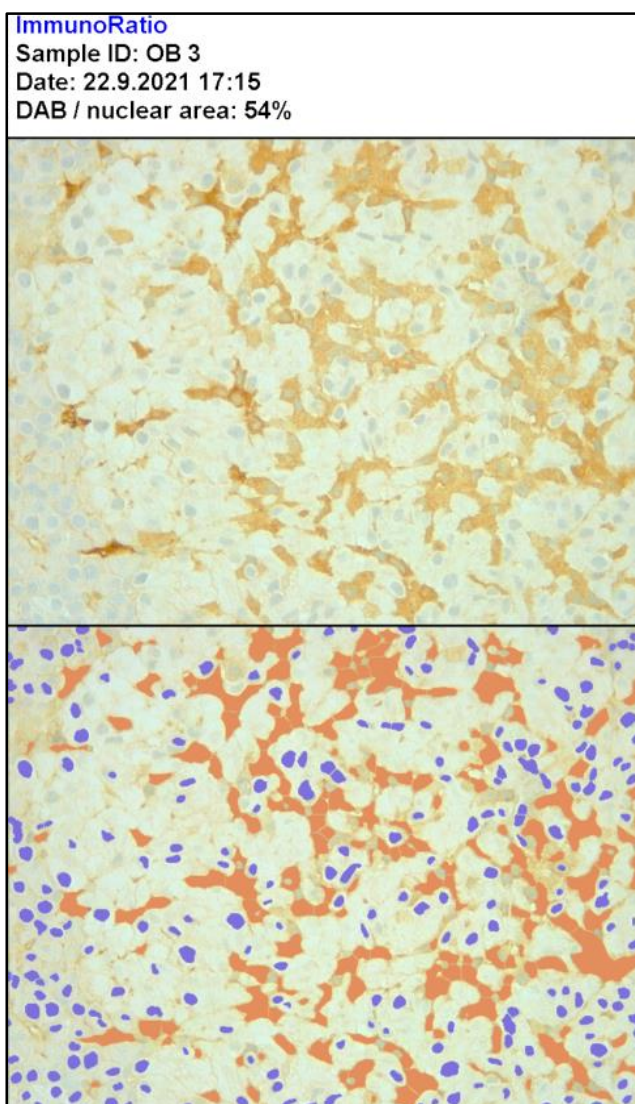


*Figura 2 - Marcação por imunohistoquímica de células S-100 positivas no ratinho WT13 - Imagens microscópicas da hipófise de um ratinho revelando a prevalência de 60% de CFE:*

*a) A técnica imunohistoquímica (usando um anticorpo contra a proteína S-100);*

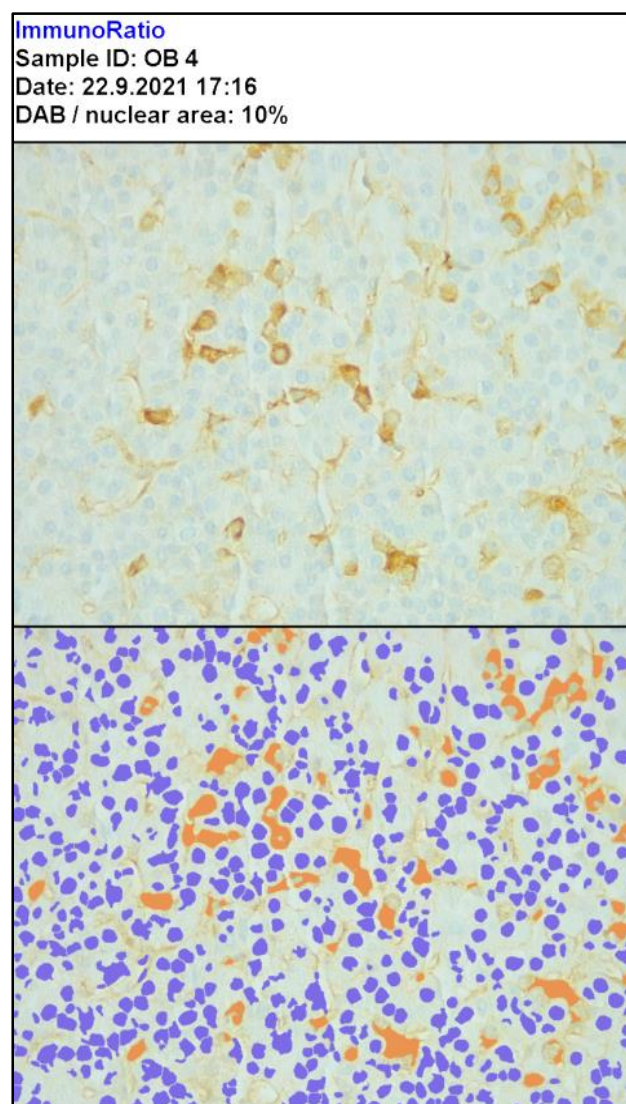
*b) Com um programa processador de imagem, evidencia-se a proporcionalidade destas células relativamente às restantes células (Image J, ImmunoRatio plugin).*





*Figura 3 - Marcação por imunohistoquímica de células S-100 positivas no ratinho OB3 - Imagens microscópicas da hipófise de um ratinho revelando a prevalência de 54% de CFE:*

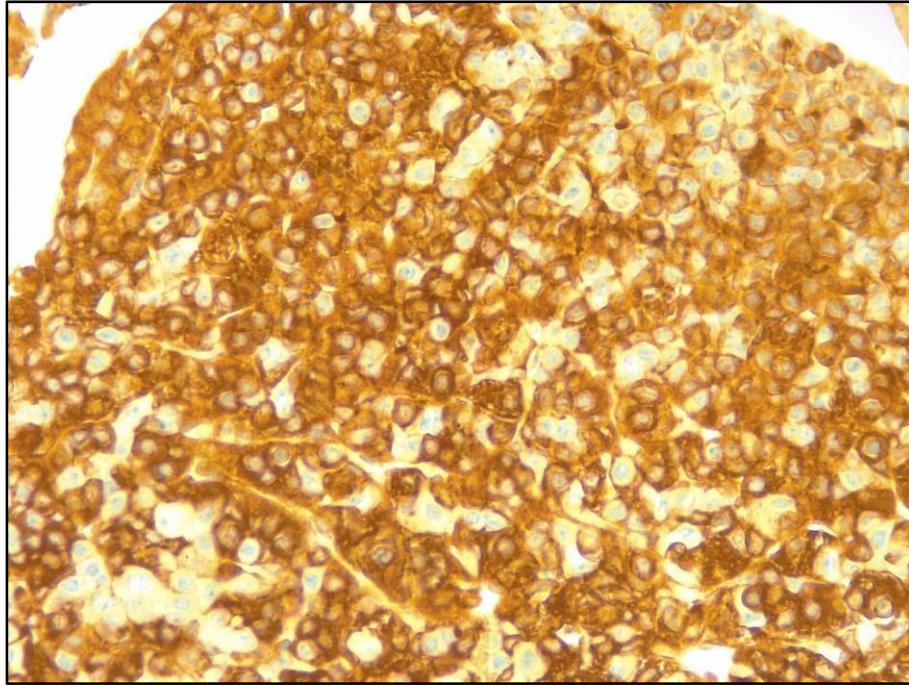
- a) A técnica imunohistoquímica (usando um anticorpo contra a proteína S-100);*
- b) Com um programa processador de imagem, evidencia-se a proporcionalidade destas células relativamente às restantes células (Image J, ImmunoRatio plugin).*



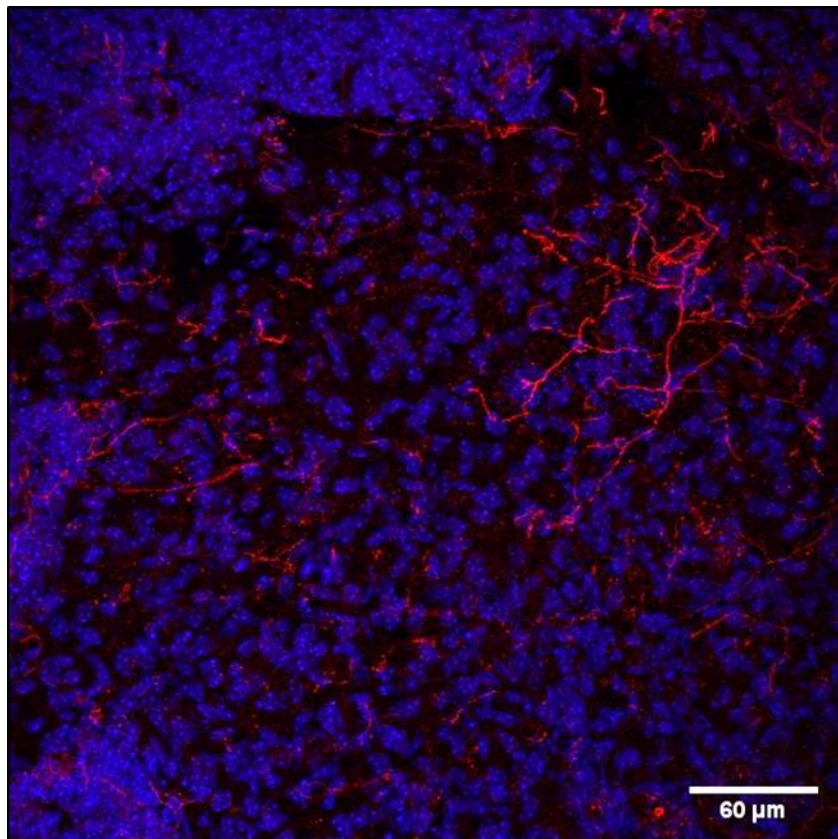
*Figura 4 - Marcação por imunohistoquímica de células S-100 positivas no ratinho OB4 - Imagens microscópicas da hipófise de um ratinho revelando a prevalência de 10% de CFE:*

- a) A técnica imunohistoquímica (usando um anticorpo contra a proteína S-100);*
- b) Com um programa processador de imagem, evidencia-se a proporcionalidade destas células relativamente às restantes células (Image J, ImmunoRatio plugin).*





*Figura 5 - Marcação por imunohistoquímica de células S-100 positivas no ratinho HFD4 – Imagem microscópica da hipófise de um ratinho revelando a prevalência de 93% de CFE (técnica imunohistoquímica usando um anticorpo contra a proteína S-100).*



*Figura 6 - Células folículo-estreladas imunorreativas para a proteína S-100 - Imagem microscópica obtida por imunofluorescência indireta da hipófise de um ratinho WT.*