

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

**TUMOROGÉNESIS HIPOFISARIA:
FACTORES DE CRECIMIENTO Y ANGIOGÉNICOS EN MODELOS
EXPERIMENTALES Y ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS**

TESIS DOCTORAL

Bioq. Carolina Cristina

Directora: Dra. Damasia Becú-Villalobos

Asesor Académico: Dr. Gustavo Rinaldi

Laboratorio de Regulación Hipofisaria
Instituto de Biología y Medicina Experimental
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Vuelta de Obligado 2490. Buenos Aires

2007

INTRODUCCIÓN GENERAL	6
ADENOMAS HIPOFISARIOS.....	6
TUMORES HIPOFISARIOS. CLASIFICACIÓN.....	6
<i>Prolactinomas.....</i>	7
<i>Adenomas hipofisarios secretores de hormona de crecimiento (GH) o Somatotropinomas.....</i>	8
<i>Tumores de corticotropos secretores de la hormona adenocorticotrofa (ACTH) y otros péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC).....</i>	9
<i>Adenomas no funcionantes y adenomas secretores de gonadotropinas (LH y FSH).....</i>	9
<i>Adenomas de tirotropos.....</i>	10
MECANISMOS PATOGENICOS EN ADENOMAS HIPOFISARIOS.....	10
PROLACTINOMAS	13
<i>Diagnóstico de laboratorio.....</i>	13
<i>Diagnóstico por imágenes.....</i>	14
<i>Tratamiento médico.....</i>	15
<i>Tratamiento quirúrgico.....</i>	16
POSIBLES MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS EN LOS LACTOTROPOS.....	17
MODELOS EXPERIMENTALES DE PROLACTINOMAS	20
<i>Ratones knockout para el receptor dopaminérgico D2 (RD2).....</i>	20
<i>Administración farmacológica de estrógenos en forma crónica en ratas:.....</i>	22
<i>Ratas seniles.....</i>	23
<i>Otros modelos experimentales de prolactinomas.....</i>	24
INESTABILIDAD CROMOSÓMICA, GEN TRANSFORMANTE TUMORAL HIPOFISARIO (PTTG)	24
VASCULATURA DE LA HIPÓFISIS NORMAL	25
ANGIOGÉNESIS.....	26
<i>Angiogénesis en adenomas hipofisarios.....</i>	27
<i>Factores involucrados en la angiogénesis.....</i>	28
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular.....	29
VEGF en hipófisis.....	31
Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2).....	31
<i>Antiangiogénesis.....</i>	32
INTERACCIONES AUTOCRINAS Y PARACRINAS EN HIPÓFISIS Y ADENOMAS HIPOFISARIOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	38
<i>Animales.....</i>	38
<i>Drogas.....</i>	38
<i>Experimentos in vivo.....</i>	38
- <i>Tratamiento con antagonistas dopaminérgicos.....</i>	38
- <i>Tratamiento con agonistas dopaminérgicos.....</i>	39
- <i>Tratamiento con estradiol.....</i>	39
<i>Obtención de células adenohipofisarias dispersas.....</i>	39
<i>Cultivo primario de células adenohipofisarias.....</i>	40
<i>Radioinmunoensayo (RIA).....</i>	41
RIA de Prolactina.....	41
RIA de VEGF.....	42
<i>Western Blot.....</i>	43
<i>Extracción de ARN de ratón.....</i>	45
<i>Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....</i>	45
<i>Estudios de proliferación.....</i>	48
Medición de la incorporación de ³ [H]-Timidina.....	48
Medición de la proliferación con MTS.....	48
<i>Cultivo de células endoteliales y ensayo de proliferación.....</i>	49
<i>Inmunohitoquímica (IHQ) para FGF-R, S-100 y vWF.....</i>	50

<i>IHQ de fluorescencia simple para PRL y para FGF-2</i>	51
<i>IHQ doble de fluorescencia para VEGF o FGF-R y hormonas hipofisarias. Microscopía confocal</i>	52
<i>Transplantes subcutáneos de hipófisis de ratón</i>	53
<i>Tratamiento con VEGF-Trap local en hipófisis transplantadas</i>	54
<i>IHQ de mPRL y vWF en los tejidos transplantados</i>	54
<i>ELISA para la detección de FGF-2</i>	55
<i>Estadística</i>	55
1. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)	57
INTRODUCCIÓN.....	57
RESULTADOS.....	60
VEGF EN HIPÓFISIS.....	60
<i>Contenido hipofisario de VEGF en hembras WT y KO para RD2</i>	60
<i>Contenido celular y liberación de VEGF in vitro</i>	61
<i>Peliosis en hipófisis de hembras KO para RD2</i>	62
<i>Efecto de los estrógenos sobre la expresión de VEGF</i>	63
<i>Otros efectos de los estrógenos en el modelo experimental</i>	65
<i>Efecto del sistema dopaminérgico sobre el VEGF hipofisario</i>	66
<i>Proliferación de células adenohipofisarias</i>	68
<i>Proliferación basal</i>	68
<i>Proliferación inducida por VEGF</i>	73
<i>Efecto de VEGF sobre la secreción de PRL in vitro</i>	74
<i>Localización de VEGF en las hipófisis hiperplásicas</i>	75
<i>Células foliculo estrelladas en hipófisis de animales KO y WT para RD2</i>	76
ACCIONES ANGIOGÉNICAS DE VEGF EN HIPÓFISIS.....	78
<i>Proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)</i>	78
<i>Características de los vasos sanguíneos en hipófisis de hembras WT y KO para RD2</i>	79
<i>Avances en una terapia antiangiogénica en hipófisis ectópicas</i>	80
DISCUSIÓN.....	85
2. GEN TRANSFORMANTE TUMORAL HIPOFISARIO (PTTG)	91
INTRODUCCIÓN.....	91
MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
RESULTADOS.....	97
<i>Características de la hiperplasia hipofisaria de lactotropos en los tres modelos experimentales</i>	97
<i>Pacientes con prolactinomas sensibles y resistentes a agonistas dopaminérgicos</i>	99
<i>PTTG en la hiperplasia de ratones hembra KO para RD2</i>	99
<i>PTTG en la hiperplasia de ratas senescentes</i>	101
<i>PTTG en la hiperplasia de ratas tratadas con estrógenos</i>	102
<i>Pttg en prolactinomas humanos</i>	103
<i>Niveles estrogénicos y del receptor de estrógenos α en modelos animales de prolactinomas</i>	104
<i>Niveles del receptor de estrógenos α en prolactinomas humanos</i>	105
DISCUSIÓN.....	107
3. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2)	114
INTRODUCCIÓN.....	114
RESULTADOS.....	116
<i>Acciones de FGF2 in vitro</i>	116

- Secreción de PRL en cultivo de células adenohipofisarias.....	116
- Proliferación de células adenohipofisarias.....	117
<i>Concentración hipofisaria de FGF2.....</i>	<i>118</i>
<i>Localización de FGF2 en hipófisis de animales KO y WT para RD2.....</i>	<i>119</i>
<i>Niveles de FGFR1 hipofisarios.....</i>	<i>120</i>
<i>Fosforilación por FGF2 de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs).....</i>	<i>123</i>
<i>Efecto del medio condicionado (CM) de cultivos hipofisarios sobre la proliferación de células endoteliales HUVEC. Bloqueo con antiFGF2.....</i>	<i>124</i>
DISCUSIÓN.....	127
4. ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS	133
INTRODUCCIÓN.....	133
OBJETIVOS.....	134
MATERIALES Y MÉTODOS.....	135
<i>Pacientes.....</i>	<i>135</i>
Definición de pacientes resistentes a agonistas dopaminérgicos.....	135
<i>Obtención de las muestras.....</i>	<i>136</i>
<i>Western blot.....</i>	<i>137</i>
<i>Inmunohistoquímica.....</i>	<i>137</i>
<i>Análisis estadístico.....</i>	<i>138</i>
RESULTADOS	139
<i>Características de los pacientes.....</i>	<i>139</i>
<i>Caracterización histológica de los prolactinomas resistentes a dopaminérgicos.....</i>	<i>139</i>
<i>Factores angiogénicos.....</i>	<i>140</i>
Expresión de VEGF en tumores hipofisarios humanos.....	140
Localización de VEGF en los tejidos hipofisarios tumorales.....	143
Expresión del Factor de Crecimiento Fibroblástico-2 (FGF2) en cortes histológicos de muestras de tumores hipofisarios.....	144
<i>Marcadores endoteliales.....</i>	<i>147</i>
Expresión de CD31 en tumores hipofisarios humanos.....	147
Relación entre los niveles de expresión de VEGF y CD31 en muestras de adenomas hipofisarios humanos.....	148
<i>Proliferación.....</i>	<i>149</i>
Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).....	149
Correlación entre la proliferación celular en los tumores hipofisarios y el marcador de células endoteliales CD31.....	151
Correlación entre VEGF y PCNA en las muestras de tumores humanos.....	152
DISCUSIÓN.....	153
DISCUSIÓN GENERAL.....	159
BIBLIOGRAFÍA.....	166

A mi familia

A mis amigos de bioquímica

A mis amigos de la vida

A mis amigos del laboratorio

Y a vos, negro. Una vez más. La mejor

Los resultados de la presente tesis fueron publicados en los trabajos que se citan a continuación:

Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, Gongora A, Rubinstein M, Low MJ and Becu-Villalobos D. Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* 146: 2952-2962, 2005.

Cristina C, García-Tornadú I, Diaz-Torga G, Rubinstein M, Low MJ and Becu-Villalobos D. The dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Front Horm Res* 35: 50-63, 2006.

Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Perez-Millan MI, Passos VQ, Gianella-Neto D, Bronstein MD and Becu-Villalobos D. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer* 6: 4, 2007.

Cristina C, Díaz-Torga G, Góngora A, Guida MC, Perez-Millán MI, Baldi, A and Becu-Villalobos D. Fibroblast Growth Factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice *Am. J. Physiol (Endoc.Metab.)* Aceptado 2007 (E-00260-2007).

C.Suárez, G.Díaz-Torga, A.González-Iglesias, C.Cristina, D. Becu-Villalobos. Upregulation of Angiotensin II type 2-receptor expression in estrogen-induced pituitary hyperplasia. *Am. J. Physiol (Endoc.Metab.)* 286(5):E786-94: 2004.

Suárez C, García Tornadú I, Cristina C, Vela J, González Iglesias A, Libertun C, Díaz-Torga G and Becu-Villalobos D. Angiotensin and calcium signaling in the pituitary and hypothalamus. *Cell Mol Neurobiol* 22 (3): 315-333:2002

INTRODUCCIÓN GENERAL

ADENOMAS HIPOFISARIOS

Los adenomas hipofisarios son los neoplasmas intracraneales primarios más frecuentes. Corresponden aproximadamente al 15% de todos los tumores del cerebro y del sistema nervioso central (SNC) con un pico de incidencia más temprano en mujeres (20-45 años) que en hombres (35-60 años). No es frecuente el desarrollo de estos tumores durante la niñez.

La mayoría de los tumores hipofisarios crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos porque no son metastásicos y permanecen dentro de la silla turca aunque también pueden crecer en forma expansiva hacia los tejidos vecinos. Estos tumores invasivos no se consideran malignos, incluso cuando hay invasión de duramadre. Se definen como verdaderos carcinomas sólo cuando hay presencia de metástasis craneoespinal y/o sistémica, y éstas son raras con una incidencia de menos del 0,5% de los tumores hipofisarios sintomáticos (Seilicovich *et al.* 2005) .

Tumores hipofisarios. Clasificación

Los tumores hipofisarios se clasifican según su tamaño en microadenomas (< 10mm) sin cambios en la silla turca (grado 0) o cambios menores en la silla (grado I), y macroadenomas (> 10mm) con agrandamiento difuso de la silla (grado II) o con destrucción focal (grado III) o extensiva (grado IV) de la silla.

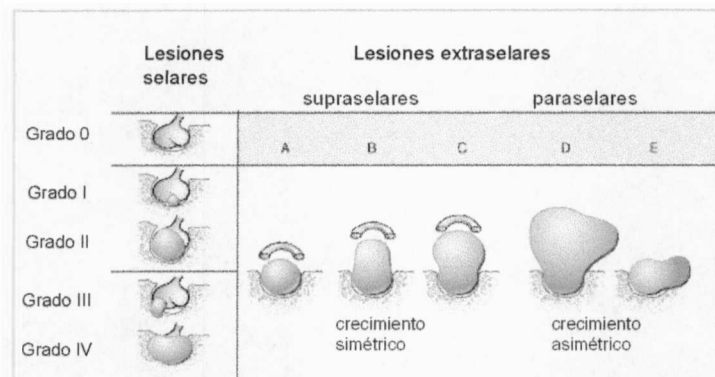


Figura 1: Clasificación de los tumores hipofisarios de (Hardy *et al.* 1979)

Los pacientes con macroadenomas recurren a la consulta médica debido a efectos de compresión como dolores de cabeza y/o falla visual progresiva mientras que los casos de microadenomas son identificados generalmente durante la investigación de síndromes clínicos endócrinos o en forma incidental durante diagnóstico por imagen del cerebro por otras causas. Además, en un 25% de las autopsias se descubren pequeños adenomas subclínicos.

Los tumores hipofisarios se clasifican además según la hormona que producen y se describen como funcionantes si sobreproducen alguna hormona de la hipófisis anterior, o no funcionantes, si no existe síndrome clínico (endócrino) aparente.

Dentro de los distintos tipos de adenomas hipofisarios podemos encontrar:

Prolactinomas

Son los tumores hipofisarios más frecuentes, aunque si se examina la estadística en muestras quirúrgicas este subtipo de adenoma es mucho menos prevalente debido al exitoso tratamiento primario de los prolactinomas con agonistas dopaminérgicos. Se ha reportado que el 35% de los tumores hipofisarios en mujeres producen prolactina (PRL) y que un 6% producen PRL junto

con otra hormona hipofisaria. La secreción excesiva de PRL causa oligomenorrea o amenorrea, y galactorrea, y éstos son los síntomas generales por los que los prolactinomas son detectados precozmente en las mujeres.

En los hombres en cambio, la galactorrea es rara y los síntomas de hipogonadismo tales como impotencia y falta de libido llevan a la consulta médica en forma bastante tardía.

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más asociados a MEN-1 (Neoplasia endócrina múltiple-1)

Adenomas hipofisarios secretores de hormona de crecimiento (GH) o

Somatotropinomas

Corresponden aproximadamente al 10-20 % de los tumores hipofisarios y son los causantes del síndrome clínico de acromegalia. El exceso de GH resulta en el crecimiento exacerbado de muchos tejidos a través de la inducción del factor de crecimiento insulina similar-I (IGF-I). El cambio en la velocidad de crecimiento de los tejidos blandos ocurre muy lentamente y el diagnóstico se retrasa por varios años. Es así que los tumores son comúnmente grandes al momento en que son diagnosticados y ya han producido efectos por compresión como disminución de la visión.

Alrededor del 30% de los pacientes con adenomas hipofisarios secretores de GH tienen hiperprolactinemia por cosecreción de GH y PRL, sin embargo la hiperprolactinemia puede ser secundaria a la compresión de los vasos portales por efecto de masa del tumor, que impide la llegada de dopamina (factor inhibitorio de prolactina) a los lactotrofos en la adenohipófisis y la consiguiente mayor liberación de PRL.

Tumores de corticotropos secretores de la hormona adenocorticotrofa (ACTH) y otros péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC)

Causan el síndrome clínico de la enfermedad de Cushing, con hiperplasia de adrenales dependiente de ACTH y altos niveles circulantes de glucocorticoides. El síndrome de Cushing se refiere al estado de hipercortisolismo independientemente de su etiología. La enfermedad de Cushing es el estado de hipercortisolismo causado por exceso de secreción de ACTH. Los tumores de corticotropos representan aproximadamente el 5-15% de los adenomas hipofisarios y se observan principalmente en mujeres.

Aproximadamente un 90% de los tumores secretores de ACTH son microadenomas. De hecho se ha reportado que la resonancia magnética por imágenes (RMI) no detecta un 40% de los pacientes con enfermedad de Cushing activa.

La enfermedad de Cushing es causa del 65-70% de los síndromes de Cushing. La exposición crónica al cortisol endógeno resulta en obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, osteoporosis y cambios en estados de ánimo como depresión, manías, ansiedad, disfunciones cognitivas.

Adenomas no funcionantes y adenomas secretores de gonadotrofinas (LH y FSH)

Los adenomas no funcionantes son el segundo tipo más común de tumores hipofisarios (alrededor del 30 % de los adenomas) y además el subtipo más común de macroadenomas. Los pacientes se presentan en general con signos de hipopituitarismo y con alteraciones del campo visual por efecto de la masa tumoral, que a veces comprime el tallo hipofisario e impide que llegue dopamina a los lactotrofos generando una hiperprolactinemia leve.

Muchos de estos tumores expresan la subunidad alfa de las gonadotropinas (Black *et al.* 1987) pero no muestran evidencias de síndromes clínicos. Otros en cambio producen LH y FSH activas, que provocan desórdenes menstruales en las mujeres. Sin embargo, 5-10% de todos los adenomas hipofisarios son en verdad no funcionantes y se los llama adenomas de células nulas. Estos son en general diagnosticados tardíamente por sus efectos mecánicos que causan dolores de cabeza, síntomas visuales y neurológicos.

Adenomas de tirotrópos

Son raros, representan el 0.5-2% de los neoplasmas de hipófisis y más del 70% de éstos son macroadenomas. Su incidencia es mayor en mujeres que en hombres. Muestran síntomas de hipertiroidismo pero con TSH alta (Seilicovich *et al.* 2005).

tipo de tumor	hormona que secreta	manifestaciones clínicas
Prolactinoma	PRL	amonorrea, galactorrea, esterilidad
Somatotropinoma	GH (GH + PRL)	acromegalia
Corticotropinoma	ACTH	Síndrome de Cushing
Adenoma de gonadotropos	LH, FSH, subu. Alfa	irreg menstruales, hipopituitarismo, ef mecánicos
Tirotropinomas	TSH	Hipertiroidismo
Adenoma no funcionante		hipopituitarismo. ef. Mecánicos

Tabla 1: Clasificación de los tumores hipofisarios según el tipo de secreción hormonal.

Modificado de (Seilicovich *et al.* 2005)

Mecanismos patogénicos en adenomas hipofisarios

Ha existido siempre controversia en relación a los mecanismos de la tumorigénesis hipofisaria.

Las dos teorías principales confrontan a la estimulación hormonal contra un defecto hipofisario

intrínseco. Un esquema integrado concilia ambas teorías de tumorigénesis aplicando la teoría de varios pasos en la carcinogénesis. Según ella, el evento iniciador sería una alteración genética que transforma a una única célula mientras que las hormonas y factores de crecimiento participarían en la promoción de la proliferación celular.

La mayoría de los adenomas hipofisarios humanos son de origen monoclonal, lo que es una evidencia de que la alteración molecular conduce a transformación celular como evento inicial del proceso. Sin embargo, los oncogenes involucrados en la carcinogénesis de otros sistemas no estarían participando en el desarrollo de estos tumores; varios estudios excluyen la participación de oncogenes como *ras*, *c-myc*, *c-myb* y *c-fos*, aunque alteraciones en los mismos han llegado a asociarse con los tumores de hipófisis más agresivos e invasivos (Melmed 2003).

Por otra parte, los factores de crecimiento y sus receptores, así como las hormonas tróficas hipotalámicas, implicados en la regulación del crecimiento y función de las células hipofisarias proveen mecanismos alternativos ya que las células en proliferación tendrán un mayor riesgo de sufrir alteraciones genéticas durante la mitosis, y, las manifestaciones de las alteraciones genéticas serían precipitadas por los estímulos de crecimiento (Asa & Ezzat 1998).

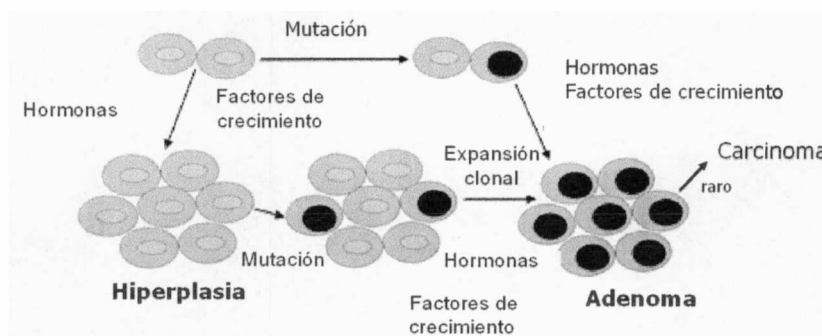


Figura 2: Modelo de la tumorigénesis hipofisaria en varios pasos. Tomado de (Asa & Ezzat 1998).

Además de la mencionada naturaleza clonal de los adenomas hipofisarios que apoya a los defectos somáticos intrínsecos como principal etiología de estos tumores, el hecho de que se encuentren adenomas bien circunscriptos, rodeados por tejido normal no hiperplásico refuerza dicha teoría (Melmed 2003).

Por otra parte existen evidencias que apoyan la etiología hormonal:

1. el desarrollo de adenomas hipofisarios en casos de estimulación hipotalámica excesiva.
2. respuesta de las hormonas hipofisarias a la estimulación de péptidos exógenos.
3. pérdida del control inhibitorio por sus hormonas blanco como es el caso de la falta de respuesta a dopamina, y desarrollo de adenomas.
4. evidencias de producción de hormonas hipotalámicas dentro de la hipófisis lo que sugiere un rol para la estimulación local.

No obstante, también hay argumentos que van en contra de dicha etiología hormonal (Ezzat 2001):

1. la rareza de existencia de cambios hiperplásicos asociados a los adenomas de hipófisis.
2. la ausencia de aparición de cambios adenomatosos verdaderos incluso después de una estimulación hormonal hipotalámica sostenida.
3. la relativamente baja frecuencia de recurrencia después de la resección exitosa del adenoma.

PROLACTINOMAS

En el marco de nuestro estudio experimental detallaremos las características de los prolactinomas. Estos adenomas hipofisarios productores de PRL son los más frecuentes dentro de los adenomas secretantes (Kovacs & Horvath 1987) y como el resto de los adenomas hipofisarios tienen también un origen monoclonal (Herman *et al.* 1990) .

Los prolactinomas muestran en general diversas presentaciones iniciales en cuanto a apariencia radiológica y comportamiento (Gurlek *et al.* 2007) y sus manifestaciones clínicas dependientes de la hiperprolactinemia favorecen una detección temprana e inequívoca del tipo de tumor, especialmente en las mujeres en período fértil. En este grupo son más frecuentes los microprolactinomas mientras que en los hombres y en mujeres post menopáusicas predominan los macroprolactinomas (Colao *et al.* 2003). El riesgo existente para la progresión de micro a macroadenoma se estima en un 4-7%, hecho que sugiere que los macroprolactinomas deben ser una entidad diferente respecto a los microprolactinomas (Schlechte *et al.* 1989) (Weiss *et al.* 1983).

Diagnóstico de laboratorio

Por lo general los microprolactinomas cursan con niveles de PRL sérica entre 50 y 300 ng/ml, y los macroprolactinomas con más de 200 ng/ml. La mayoría de los trabajos sugieren que los niveles de prolactina correlacionan con el tamaño tumoral y niveles altos preoperatorios de esta hormona indican la presencia de un prolactinoma invasivo (Gurlek *et al.* 2007). Otros tumores como los adenomas no funcionantes y los craneofaringiomas pueden tener también una hiperprolactinemia asociada, pero ésta raramente excede los 100 ng/ml.

Diagnóstico por imágenes

La resonancia magnética nuclear, (RMN o RMI), es una técnica muy poderosa tanto para el diagnóstico como para el seguimiento del tratamiento de los adenomas hipofisarios. Tiene ventajas sobre la tomografía axial computada, TAC, ya que permite delinear más claramente los contornos de un macroadenoma, sobre todo en su expansión paraselar, permite diferenciar un contenido quístico o hemorrágico del tumor y determinar la relación del mismo con el quiasma óptico, estructura muy bien visualizada con esta técnica. Sin embargo, como las estructuras óseas no son bien visualizadas por la RMN, las erosiones selares son mejor caracterizadas por la TAC y aún por la radiografía (Rx) simple de silla turca. De esta manera, la combinación de la RMN-Rx de cráneo constituye actualmente la mejor estrategia para la confirmación y diagnóstico diferencial de adenoma hipofisario. Se reserva la TAC para pacientes obesos, claustrofóbicos y portadores de clips metálicos o marcapasos cardíacos (Bronstein & Guitelman 2004).

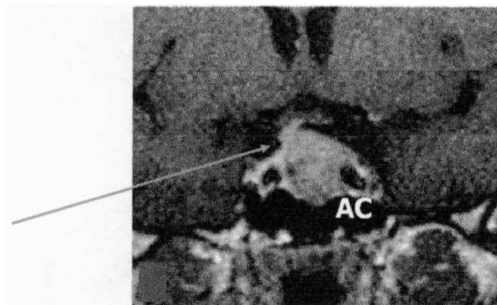


Figura 3: RMN de la región selar. Se observa una lesión hipofisaria de características hiperdensas (flecha) con compromiso de las arterias carótidas (AC)

Tratamiento médico

La dopamina es el principal factor inhibitorio de la síntesis y secreción de prolactina, así como de la proliferación de lactotrofos (Ben-Jonathan & Hnasko 2001). Cualquier variable química o funcional que interfiera con la acción de la dopamina sobre los receptores dopaminérgicos localizados en la hipófisis producirá un aumento en la secreción de prolactina, y proliferación o hiperplasia de lactotrofos. Los prolactinomas son particulares en el sentido de que conservan la capacidad de respuesta a la acción inhibitoria de la dopamina, por lo que los agonistas dopaminérgicos provocan en general rápida reducción del tamaño tumoral con liberación de los síntomas de compresión (Bevan *et al.* 1992).

Como se mencionó anteriormente, entre otras de sus acciones, la hiperprolactinemia afecta la reproducción, por lo que el abordaje terapéutico del prolactinoma tiene como objetivo revertir dichas manifestaciones, como así también las de tipo neurológico y/u oftalmológico provocadas por la expansión tumoral cuando existieran. El tratamiento de de los prolactinomas con agonistas dopaminérgicos está actualmente considerado como de primera línea. Las principales drogas que han sido utilizadas son la Bromocriptina, Cabergolina y Quinagolida. Éstas actúan directamente sobre el receptor de dopamina tanto del lactotrofo normal como tumoral determinando la inhibición de la síntesis y secreción de prolactina y del crecimiento de los lactotrofos con la consiguiente reducción del tamaño tumoral.

La Bromocriptina fue la primera droga utilizada clínicamente en prolactinomas y sobre la cual la literatura es más rica en datos, mostrando una normalización de la PRL sérica y mejoría de la galactorrea en el 64 y 100% de los casos respectivamente, con recuperación de los ciclos menstruales en el 57-100% de los casos (Molitch 1999) Es importante resaltar que un gran porcentaje de las pacientes que no logran normalizar los niveles de PRL sí recuperan sus ciclos. Es posible que la Bromocriptina altere la proporción entre las diferentes formas moleculares de

PRL (little, big y big-big) aumentando las de mayor peso molecular que tienen menor actividad biológica. Así, muchos pacientes presentan recuperación clínica sin normalización de laboratorio pudiendo ser tratados con dosis menores, y logrando una mejor tolerancia a la droga y un menor costo del tratamiento a largo plazo.

Pergolida tiene acción más prolongada que bromocriptina pero la experiencia con esta droga es limitada ya que no ha sido aprobada aún por la FDA para el tratamiento de los prolactinomas.

Quinagolida es un agonista no ergot del receptor de dopamina, ha sido estudiado en Estados Unidos y en Europa; en general los trabajos refieren tratamiento previo con Bromocriptina. Está disponible sólo en Europa.

Por otro lado, hay muchos datos usando Cabergolina como primer tratamiento. Tanto en los estudios multicéntricos europeos como en los franceses, los resultados en cuanto a la normalización de los niveles séricos de PRL fueron siempre superiores a los de Bromocriptina.

(Webster *et al.* 1994)

Tratamiento quirúrgico

La cirugía hipofisaria transeptoefenoidal ha tenido un gran desarrollo con la introducción del microscopio quirúrgico (Tyrrell *et al.* 1999) , lo que permitió la extirpación selectiva de los adenomas hipofisarios con conservación de la hipófisis normal y con baja incidencia de complicaciones. Esta modalidad quirúrgica permite la normalización endócrina con frecuente preservación y hasta mejoría del resto de los ejes hipofisarios luego de la descompresión tumoral y la reducción o eliminación del efecto de masa en los macroprolactinomas expansivos resolviendo la sintomatología neurológica y oftalmológica. Es de suma utilidad en los casos de intolerancia persistente o resistencia a los agonistas dopaminérgicos, y crecimiento tumoral o

pérdida visual durante el tratamiento médico. La vía transcraneana es solamente utilizada para tumores de localización extraselar y con expansión fuera de la línea media.



Figura 4: Cirugía hipofisaria por vía transeptoefenoidal realizada con microscopio quirúrgico.

Posibles mecanismos de tumorigénesis en los lactotrofos

Son múltiples los factores que participarían en la tumorigénesis de lactotrofos. Y el fenotipo final del tumor dependerá de la relación entre dichos factores. La información que brindan los distintos modelos experimentales usados en el estudio de adenomas hipofisarios ha enriquecido nuestro conocimiento sobre la generación, regulación y progresión de los prolactinomas. Dentro de los factores intervinientes podemos citar:

1) Receptor de Dopamina: Los lactotrofos, a diferencia de los otros tipos celulares endócrinos de la hipófisis, presentan una alta actividad espontánea de secreción de prolactina. Por este motivo, la secreción de prolactina está bajo un control tónico predominantemente inhibitorio cuyo principal factor es la dopamina. La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico capaz de inhibir la secreción de prolactina tanto *in vivo* como *in vitro* (Ben-Jonathan & Hnasko 2001).

Se ha observado una alta concentración de dopamina en la eminencia media y en la sangre portal hipofisaria.

Existen dos familias de receptores dopaminérgicos, los D1 (que comprenden al D1 y D5), estimuladores de la adenilato ciclasa, y los D2 (D2, D3 y D4), que inhiben a dicha enzima. Todos son miembros de la familia de receptores de dopamina con siete pasos transmembrana (Missale *et al.* 1998) (Civelli *et al.* 1993). El principal receptor en hipófisis es el D2 (RD2) (Caccavelli *et al.* 1992)

Los ratos knockout (KO) para el RD2 desarrollan hiperplasia hipofisaria seguida de la formación de tumores de lactotrofos (Kelly *et al.* 1997) confirmando el rol crítico de la dopamina y el RD2 sobre este tipo celular en relación a la secreción de PRL y a su proliferación. No se han identificado mutaciones en el RD2 en adenomas hipofisarios humanos de lactotrofos y somatotrofos (Friedman *et al.* 1994). Sin embargo en prolactinomas resistentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos hay una disfunción en los RD2 (Caccavelli *et al.* 1994b; Pellegrini *et al.* 1989; Caccavelli *et al.* 1996).

2) Prolactina: La PRL ejerce un control negativo sobre su propia secreción vía el receptor de PRL (PRLR) a nivel hipotalámico e hipofisario. En el hipotálamo altera la expresión y actividad de la enzima tirosina hidroxilasa, limitante de la velocidad en la síntesis de Dopamina (Arbogast &

Voogt 1991). En la hipófisis la PRL tiene acciones directas inhibitorias sobre la proliferación de los lactotropos y/o podría limitar los efectos de los factores de crecimiento producidos por células vecinas que en forma paracrina influyen el crecimiento de los lactotropos. Estudios en ratones KO para el PRLR muestran que esta hormona inhibe su propia liberación actuando no solamente a nivel de las neuronas TIDA, sino también a nivel de la hipófisis en forma independiente de dopamina. Estos animales desarrollan prolactinomas más grandes que los ratones KO para el RD2 y los ratones doble KO para PRLR y RD2 tienen prolactinomas aún mayores (Schuff *et al.* 2002).

3) Estrógenos: Se consideran los factores liberadores de PRL más importantes. Son potentes estimuladores de las funciones del lactotrofo. A nivel hipofisario: aumentan la mitosis de lactotropos, favorecen la conversión de somatomamotropos a lactotropos puros, aumentan la síntesis de prolactina por activación génica, provocan hipertrofia de este tipo celular, aumentan los receptores hipofisarios de diferentes factores liberadores hipotalámicos como TRH y disminuyen receptores de dopamina hipofisarios (Gudelsky *et al.* 1981)

Los niveles estrogénicos elevados son responsables de los aumentos de PRL sérica y de la hiperplasia de lactotropos durante el embarazo. Sin embargo, los anticonceptivos orales no aumentan el riesgo de prolactinomas y no se asocian a un mayor crecimiento tumoral (Corenblum & Donovan 1993) (Wingrave *et al.* 1980) aunque algunos estudios muestran que pueden causar hiperprolactinemia en el 12-30% de los casos de las mujeres tratadas, con escasa influencia de la dosis de estrógenos empleada (Reyniak *et al.* 1980) (Luciano *et al.* 1985)

4) Otros factores: también se ha descrito que participan en la generación de prolactinomas experimentales el factor de crecimiento neural (Borrelli *et al.* 1992) (Fiorentini *et al.* 2002; Missale *et al.* 1996), galanina (Cai *et al.* 1999) (Hyde *et al.* 1998), factor de crecimiento transformante α y β (McAndrew *et al.* 1995; Ben-Jonathan & Liu 1992; Pastorcic *et al.* 1995), y el oncogen transformante tumoral de la hipófisis (pttg) (Yu & Melmed 2004).

MODELOS EXPERIMENTALES DE PROLACTINOMAS

Ratones knockout para el receptor dopaminérgico D2 (RD2)

Estos ratones fueron generados por los Dres. Malcolm Low en Portland, Oregon, USA y Marcelo Rubinstein (INGEBI CONICET) en Buenos Aires (Kelly *et al.* 1997) por delección del exón 7 completo y la mitad 5' del exón 8 del gen del receptor dopaminérgico D2 murino mediante recombinación homóloga. Dichos exones codifican para los últimos 2 dominios transmembrana del receptor D2, el tercer loop extracelular y la cola carboxi-terminal intracitoplasmática. La zona delecionada fue reemplazada por un cassette que confiere resistencia a neomicina y esta secuencia es a la vez utilizada para la genotipificación de los ratones por PCR a partir de DNA genómico.

Demostramos en el laboratorio que los ratones knockout (KO) de ambos sexos tienen mayores niveles de PRL sérica que sus pares wildtype ya en la sexta semana de vida, y que en las hembras la prolactinemia siempre es mayor que en los machos (Figura 5).

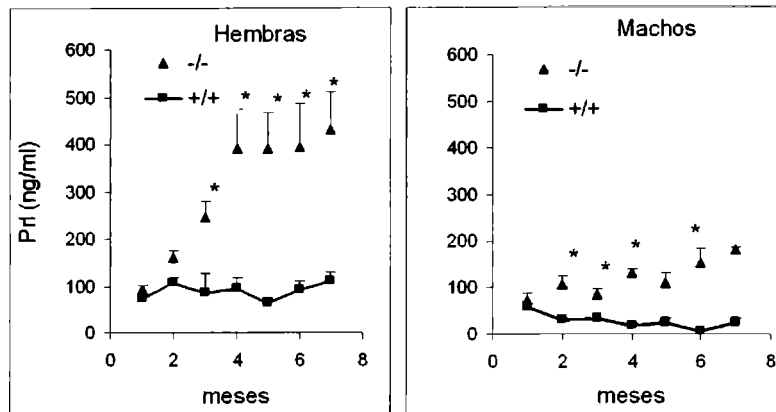


Figura 5: Niveles de prolactina sérica medidos por RIA en ratones hembra y macho, KO (-/-) y wildtype (WT, +/+), a lo largo del desarrollo. * $p < 0,05$ respecto a WT de la misma edad y sexo. (Díaz-Torga *et al.* 2002)

A los 8 meses las hembras KO desarrollan hiperplasia hipofisaria de lactotropos con un aumento del peso de la hipófisis de 2-3 veces respecto a las hembras WT y una disminución en el número de los demás tipos celulares de la glándula. Son frecuentes las zonas con peliosis o glóbulos rojos extravasados en cavidades no circunscriptas por células endoteliales (Kelly *et al.* 1997). A esta edad no se ven signos de transformación neoplásica, manteniéndose intacta la arquitectura determinada por la red de fibras de reticulina.

A los 17-18 meses las hembras KO para RD2 desarrollan verdaderos adenomas hipofisarios evidenciados por la presencia de nódulos multifocales, agrandamiento de la glándula con aumento del peso de unas 30 veces respecto a las hembras wt y destrucción de las fibras de reticulina, característica patognomónica de adenoma. A esta edad los machos presentan pequeños nódulos multifocales también con ruptura de la red de reticulina indicando desarrollo de múltiples adenomas (Asa *et al.* 1999).

Administración farmacológica de estrógenos en forma crónica en ratas:

Este modelo experimental consiste en la aplicación de un pellet subcutáneo de estradiol o del estrógeno sintético, dietilestilbestrol (DES), que induce en alrededor de 6-8 semanas un prolactinoma. El modelo fue ampliamente desarrollado en varias cepas de rata (Meyer & Clifton 1956) (Wiklund *et al.* 1981; Xu *et al.* 2000), siendo la más utilizada la Fischer 344 (F344) por su especial sensibilidad a los estrógenos (De Nicola *et al.* 1978) (Phelps & Hymer 1983).

El tratamiento estrogénico crónico *in vivo* induce en F344 en primer lugar una hiperplasia, una hipertrofia y una desgranulación de los lactotrofos, acompañada de hiperprolactinemia y pérdida de otros tipos celulares hipofisarios (Clifton & Meyer 1956) (De Nicola *et al.* 1978). Estudios bioquímicos señalan que alrededor de la sexta semana, esta hiperplasia deriva en un adenoma de lactotrofos o prolactinoma (Piroli *et al.* 1994). En esta etapa se produce la ruptura de la estructura de acinos celulares típica de la glándula, la desorganización de la red de reticulina, la aparición de lagunas sanguíneas y un marcado aumento de la angiogénesis local (Elias & Weiner 1984). Bajo una exposición estrogénica más prolongada, el adenoma puede llegar a convertirse en un adenocarcinoma (Satoh *et al.* 1997).

El crecimiento continuo de este tipo de tumores, al menos en las primeras etapas, es dependiente de la presencia estrogénica (Xu *et al.* 2000), mientras que la aplicación de dopamina o sus agonistas pueden bloquear hasta cierto punto este efecto y producir la regresión del tumor (MacLeod & Lehmeier 1973), (Thorner *et al.* 1980). Este modelo tumorigénico presenta dimorfismo sexual en cuanto a la sensibilidad a la acción esteroidea, que es mucho mayor en hembras (Piroli *et al.* 2000). Tal es así que la masa tumoral alcanza en hembras el doble de tamaño que en machos (Wiklund *et al.* 1981).

La diferente sensibilidad a los esteroides que existe entre sexos y entre cepas de animales estaría relacionada con la diferente proporción de los distintos tipos celulares y con la diferente expresión de factores de crecimiento y receptores estrogénicos (Schechter & Weiner 1991).

La cepa Sprague Dawley (SD) es menos sensible a los estrógenos que la Fischer 344 (F344), sin embargo se ha demostrado que a partir de la cuarta semana de tratamiento crónico con estos esteroides en las ratas SD se produce una hiperplasia e hipertrofia de lactotropos (Holtzman *et al.* 1979), (Diaz-Torga *et al.* 1998; Suarez *et al.* 2002).

Por su parte, Sarkar y col. demostraron que las células folículo estrelladas (FS) hipofisarias son las que determinan la susceptibilidad de los lactotropos a la acción mitogénica de los estrógenos (Oomizu *et al.* 2004). En ausencia del esteroide la cepa F344 tiene un mayor número de células FS hipofisarias que la cepa SD, mientras que en presencia del mismo, si bien no se altera el número de células FS en ninguna de las cepas, las células FS de las F344 producen una mayor cantidad de factores de crecimiento tales como el Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF2), capaces de aumentar la proliferación de los lactotropos (Chaturvedi & Sarkar 2005).

Ratas seniles

Las ratas seniles hembras tienen alta incidencia de tumores hipofisarios secretores de prolactina (Goya *et al.* 1990). Estos se presentan como microadenomas cromofóbicos en un background difuso de hiperplasia de lactotropos. (Console *et al.* 1997) Los niveles estrogénicos en estas ratas no se encuentran incrementados en forma significativa pero sin embargo se produce un aumento importante de tamaño en la glándula hipofisaria (Herenu *et al.* 2006).

Por otra parte, con la edad se produce un deterioro progresivo de las neuronas del sistema tuberoinfundibular y paraventricular dopaminérgico (Sanchez *et al.* 2003) lo que contribuye también al desarrollo de la hiperplasia en la hipófisis.

Otros modelos experimentales de prolactinomas

Existen otros animales transgénicos que generan prolactinomas y que han brindado información valiosa en esta patología. Por ejemplo los ratones que sobreexpresan galanina en lactotrofos (Cai *et al.* 1999), TGF alfa (McAndrew *et al.* 1995); NGF (Borrelli *et al.* 1992), un receptor truncado tipo 4 de FGF (Ezzat *et al.* 2002) o ratones knockout para el receptor de prolactina (Schuff *et al.* 2002).

INESTABILIDAD CROMOSÓMICA, GEN TRANSFORMANTE TUMORAL HIPOFISARIO (PTTG)

Aunque los tumores hipofisarios están presentes en un 10% de la población, la fisiopatología de estas lesiones no se encuentra completamente caracterizada. Son en general de naturaleza monoclonal con alteraciones en las vías de replicación pero los oncogenes y genes supresores de tumor que comúnmente se encuentran en otras enfermedades malignas (jun, fos, myc, p53) rara vez están involucrados en estos adenomas. Sin embargo, el oncogen *gsp* estaría presente en hasta un 40% de los adenomas secretores de GH dando como resultado una activación constitutiva de la subunidad alfa de la proteína Gs. Además otros oncogenes como ciclinas E y D1, y PTTG estarían involucrados en la oncogénesis de los adenomas hipofisarios (Sonabend *et al.* 2006).

PTTG actúa como una securina de mamíferos: estas proteínas mantienen las cromátides hermanas unidas durante la mitosis y, al final de la anafase la securina es degradada por un complejo que promueve la anafase, liberando así la inhibición tónica de separina, que es la que media la degradación de cohesinas (proteínas que mantienen juntas a las cromátides

hermanas). La sobreexpresión de PTTG mantiene la inhibición de separina con lo que no es posible la separación de las cromátides hermanas, produciendo inestabilidad cromosómica y aneuploidía. (Yu & Melmed 2001). Los mecanismos genéticos involucrados en la función oncogénica de PTTG no están aún claros. La inestabilidad genética podría explicar los efectos transformantes y tumorigénicos de PTTG así como también su asociación con la agresividad tumoral. Y dicha inestabilidad cromosómica de las células hipofisarias hiperplásicas generarían un ambiente adecuado para el progreso del crecimiento del tumor.

En un estudio reciente de genes asociados al comportamiento celular maligno, pttg fue identificado como uno de ellos (Ramaswamy *et al.* 2003) aunque la verdadera malignidad en los tumores hipofisarios es realmente rara.

VASCULATURA DE LA HIPÓFISIS NORMAL

La hipófisis en los mamíferos es uno de los tejidos más vascularizados. Recibe oxígeno y nutrientes a partir de las arterias hipofisarias superior e inferior que son ramas directas de la arteria carótida interna, pero en la glándula existe también un sistema de sangre venosa formado por los vasos portales hipofisarios. Estos proveen un medio de comunicación entre el hipotálamo y la adenohipófisis llevando neurotransmisores y otros péptidos hipotalámicos estimuladores e inhibidores de la secreción y proliferación de las células de la hipófisis anterior (vasos portales largos). Por su parte, la secreción adenohipofisaria alcanza el lóbulo posterior a través de los vasos portales cortos (Figura 6). Los capilares del sistema porta hipofisario son fenestrados lo que favorece el intercambio de sustancias con las células endócrinas de la glándula.

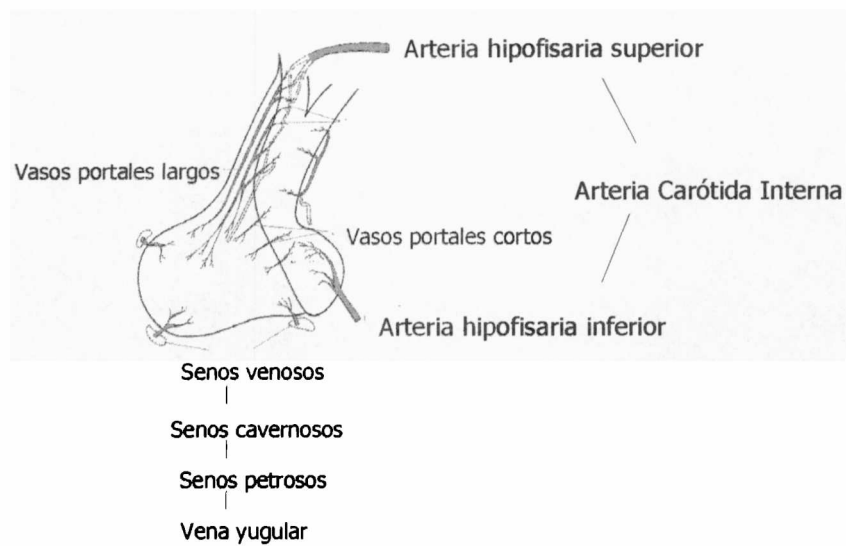


Figura 6: Vasculatura de hipófisis. Tomada de *Endocrinology: An Integrated Approach*, la glándula hipófisis p1298.

ANGIOGÉNESIS

Angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes. Este proceso requiere la división de las células endoteliales, su migración y diferenciación dando lugar a la formación del lumen de los nuevos vasos y a partir de éstos, la membrana basal. Durante el proceso también se produce la remodelación de la matriz extracelular y el reclutamiento de estructuras vecinas para formar y mantener los nuevos vasos (Folkman & Shing 1992) La angiogénesis es un proceso altamente controlado, juega un papel fundamental en situaciones fisiológicas específicas como el desarrollo embrionario pero se encuentra inhibido en los tejidos adultos normales salvo excepciones como la reparación de heridas y durante la formación del cuerpo lúteo en el sistema reproductor femenino.

En condiciones patológicas como la retinopatía diabética, la artritis reumatoidea y la enfermedad vascular oclusiva también ocurre angiogénesis (Folkman & Shing 1992) (Folkman 1995). Además, se ha probado que la generación de nuevos vasos sanguíneos es fundamental para el crecimiento tumoral y las metástasis (Folkman 1995).

Angiogénesis en adenomas hipofisarios

En 1984 Elias y Weiner propusieron que la angiogénesis era necesaria para la inducción y el crecimiento de los prolactinomas inducidos por estrógenos en ratas Fisher 344 (Elias & Weiner 1984). Por otro lado, Schechter y Gorczyca reportaron la formación de nuevas arterias extraportales en los adenomas hipofisarios (Schechter *et al.* 1988). Asimismo la tomografía computada y la resonancia magnética mostraron un nuevo aporte de sangre arterial directo en los adenomas (Bonneville *et al.* 1993). Estas evidencias llevaron a hipotetizar que un nuevo aporte directo de sangre arterial predispondría al desarrollo de tumores hipofisarios ya que esta sangre sistémica contendría escasos niveles de factores hipotalámicos, en particular de dopamina que inhibe la proliferación de lactotrofos (Schechter *et al.* 1988). Sin embargo aún no existen conclusiones definitivas sobre la naturaleza portal o arterial de los nuevos capilares formados. Varios estudios han demostrado que la angiogénesis en los tumores hipofisarios está relacionada con el comportamiento y la respuesta tumoral.

En relación a ello se han hecho las siguientes observaciones:

Los microprolactinomas son menos vascularizados que los macroprolactinomas (Turner *et al.* 2000c);

Los prolactinomas invasivos son significativamente más vascularizados que los no invasivos (Turner *et al.* 2000b);

Los macroprolactinomas y tumores secretores de ACTH con menor densidad vascular tienen mayor probabilidad de remisión por cirugía que los de alta densidad vascular (Turner *et al.* 2000b);

- ❖ Los carcinomas de hipófisis tienen una mayor vascularización que los adenomas. (Jugenburg *et al.* 1995) (Turner *et al.* 2000a) (Vidal *et al.* 2001);

- ❖ La expresión en carcinomas del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF, un potente factor angiogénico) es mayor que en los adenomas (Lloyd *et al.* 1999);

- ❖ Los niveles de ARNm para VEGF son mayores en los adenomas que en las hipófisis normales (McCabe *et al.* 2002).

Factores involucrados en la angiogénesis

Si bien el grado de vascularización alcanzado por el tejido hipofisario tumoral es controvertido, no existe duda de que ésta es esencial para la formación del adenoma.

La angiogénesis es el resultado de un desbalance entre factores pro y anti angiogénicos. Un gran número de citoquinas y factores de crecimiento modulan la proliferación de células endoteliales; entre ellos el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF-2) son los inductores de angiogénesis más potentes que se conocen (Ferrara & Davis-Smyth 1997) (Bikfalvi *et al.* 1997).

Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

Es un fuerte mitógeno de células endoteliales de la micro y macro vasculatura pero carece de tal actividad en otros tipos celulares (Ferrara & Davis-Smyth 1997). También es llamado Factor de Permeabilidad Vascular (VPF) debido a su capacidad para aumentar la permeabilidad del endotelio mediante la formación de fenestraciones (Esser *et al.* 1998). Dvorak y colaboradores propusieron que el aumento en la permeabilidad vascular es un paso crucial para la angiogénesis asociada a tumores y heridas (Dvorak *et al.* 1987).

Además, VEGF estimula la migración de las células endoteliales y funciona como un factor antiapoptótico promoviendo la supervivencia de dichas células en los nuevos vasos formados (Alon *et al.* 1995).

VEGF (o VEGF-A) es una glicoproteína dimérica de 46-48 Kda que forma parte de una familia de péptidos estructuralmente homólogos como son el Factor de Crecimiento de la Placenta (PlGF), y también VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (Ferrara & Davis-Smyth 1997). Por splicing alternativo se producen distintas isoformas de VEGF, en humanos hVEGF121, hVEGF145 y hVEGF165 son formas secretadas de VEGF mientras que hVEGF189 y hVEGF206 se encuentran asociadas a membrana (Ferrara & Davis-Smyth 1997).

VEGF tiene propiedades únicas:

1. Es esencial para la vasculogénesis y angiogénesis normales durante el desarrollo, ya que los ratones nulos para el VEGF (VEGF-A^{-/-}) y heterocigotos (VEGF-A^{+/-}) son embriones letales.
2. Aumenta la permeabilidad vascular al plasma y a las proteínas plasmáticas, una propiedad característica de la microvasculatura tumoral y un paso temprano crítico en la generación del estroma tumoral.

3. El VEGF tiene relevancia clínica evidenciada por su sobreexpresión en una gran variedad de células cancerígenas humanas.

4. Finalmente, tiene un valor potencial en cuanto a la evaluación del pronóstico de pacientes y como blanco terapéutico.

VEGF actúa a través de dos receptores tirosina quinasa de membrana: el VEGFR1 o flt-1 y el VEGFR-2 o KDR. Ambos receptores unen VEGF con alta afinidad, tienen 7 dominios tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, una porción transmembrana única y el dominio intracelular con la actividad tirosina quinasa (Ferrara & Davis-Smyth 1997) (Quinn *et al.* 1993). El VEGF es selectivo para el endotelio vascular porque sus receptores se expresan principal (aunque no exclusivamente) en las células endoteliales.

VEGFR-2 parece ser el receptor principal para VEGF en células de endotelio mientras que VEGFR-1 probablemente funcione regulando la disponibilidad de VEGF en un tejido dado (Risau 1997). Además, el PlGF, que se une con alta afinidad a Flt-1 y no a KDR carece de las propiedades mitogénicas e inductoras de permeabilidad, por lo que la interacción con KDR sería crítica en la inducción de las respuestas biológicas mediadas por VEGF (Park *et al.* 1994) .

Otro miembro de la familia de estos receptores es el VEGFR-3 (Flt-4), no une VEGF pero sí VEGF-C y VEGF-D. Durante la embriogénesis VEGFR-3 se expresa en angioblastos y vénulas y más tarde en el desarrollo su expresión queda restringida al endotelio de vasos linfáticos denotando su rol en la regulación de la linfangiogénesis.

VEGF en hipófisis

VEGF fue originalmente aislado de células folículoestrelladas provenientes de hipófisis bovina (Gospodarowicz *et al.* 1989) (Ferrara & Henzel 1989) y su presencia fue demostrada en hipófisis de varias especies y en la línea celular tumoral GH3 (Ferrara & Henzel 1989) (Jabbour *et al.* 1997) (Vidal *et al.* 2000). Aproximadamente el 90 % de los tumores hipofisarios humanos mostraron secreción de VEGF *in vitro* (Lohrer *et al.* 2001) y varios investigadores detectaron la proteína por inmunohistoquímica e hibridización *in situ* en adenomas humanos (Nishikawa *et al.* 1998) (Lloyd *et al.* 1999). Existen controversias en cuanto a la expresión de VEGF y su relación con el comportamiento tumoral. Lloyd y colaboradores (Lloyd *et al.* 1999) hallaron una menor expresión de VEGF en los adenomas hipofisarios estudiados respecto a la glándula normal, resultados que se correlacionan con la menor densidad microvascular encontrada para estos adenomas. Además determinaron una mayor expresión de VEGF para los carcinomas comparados con los adenomas. En cambio McCabe y colaboradores (McCabe *et al.* 2002) determinaron una mayor expresión del ARNm de VEGF y KDR en los adenomas respecto a las hipófisis normales.

Factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2)

FGF-2 o FGF básico es un factor mitogénico potente con acciones pleiotrópicas sobre células endoteliales y también sobre el parénquima de distintos tejidos (Okada-Ban *et al.* 2000). Fue originalmente aislado de hipófisis bovina (Gospodarowicz *et al.* 1984) siendo éste el tejido con mayor nivel de expresión en los mamíferos.

FGF-2 participa en el desarrollo de la glándula hipofisaria regulando la síntesis y secreción de PRL y TSH (Larson *et al.* 1990). Es producido principalmente por las células folículoestrelladas

(Ferrara *et al.* 1987) aunque existen trabajos que reportan también a los somatotropos y gonadotropos como fuente de FGF-2 (Marin & Boya 1995) (Schechter & Weiner 1991).

FGF-2 está involucrado en el desarrollo de la hiperplasia de lactotropos inducida por estrógenos tanto en condiciones fisiológicas como farmacológicas (Schechter & Weiner 1991) (Heaney *et al.* 1999; Heaney *et al.* 2002).

En adenomas hipofisarios humanos se encontró expresión de algunas isoformas de FGF-2 que tendrían acciones diferenciales en la generación de este tipo de tumores (Li *et al.* 1992). Además, y a diferencia de los sueros normales donde el factor es indetectable, los pacientes con tumores hipofisarios tienen niveles séricos preoperatorios de FGF-2 elevados que decaen luego de la cirugía (Ezzat *et al.* 1995).

Antiangiogénesis

El reclutamiento de células endoteliales por los tumores es un evento temprano en la angiogénesis. Por lo tanto la terapia antiangiogénica tiene el potencial de un tratamiento anticáncer. Folkman en 1971 fue el primero en sugerir la inhibición de la angiogénesis como un modo de tratamiento del cáncer (Folkman 1971). La novedad de esta terapia radicaba en el control del crecimiento tumoral bloqueando estados particulares de la angiogénesis y no en la destrucción de las células tumorales en forma directa. La búsqueda y el estudio de inhibidores de la angiogénesis han mostrado la necesidad de tener marcadores de angiogénesis del tumor (Folkman *et al.* 2001).

Existen muchos blancos posibles hacia dónde dirigir la terapia anti angiogénica pero el más importante es VEGF.

Ya han sido desarrolladas diferentes metodologías para el bloqueo de VEGF o de la acción del mismo:

Anticuerpos contra VEGF (Avastin)

Anticuerpos contra receptores de VEGF

Receptores solubles que unen VEGF en circulación

Pequeñas moléculas inhibitoras de los receptores de VEGF

Moléculas que bloquean en forma selectiva o evitan la unión de VEGF con VEGFR-2, administrables en forma oral.

Avastin es un anticuerpo recombinante contra VEGF humano que fue humanizado a partir del anticuerpo monoclonal original A4.6.1. En estudios de fase III Avastin demostró aumentar la supervivencia en el tratamiento del cáncer metastático de colon y recto (Hurwitz *et al.* 2004).

Produce la normalización de la vasculatura tumoral favoreciendo el acceso de la quimioterapia o de otras drogas anticáncer. Reduce el crecimiento de la vasculatura e inhibe la progresión del tumor conduciendo finalmente a la regresión de ambos.

Interacciones autocrinas y paracrinas en hipófisis y adenomas hipofisarios

Las células hipofisarias sintetizan y liberan numerosos factores de crecimiento y citoquinas, y también expresan sus correspondientes receptores. Esto ha llevado a la hipótesis de que la hipófisis, además de ser regulada en forma endocrina por factores hipotalámicos y hormonas periféricas circulantes, también lo es por factores producidos localmente, en forma autocrina o paracrina (Schwartz *et al.* 1998). Los factores intrahipofisarios podrían tener un rol en la fisiología de la hipófisis al modular la respuesta de sus células a la estimulación externa (Renner *et al.* 1996). En los adenomas hipofisarios se ha observado una expresión alterada de factores

de crecimiento, citoquinas y sus receptores (Ray & Melmed 1997) (Renner *et al.* 1996) y, aunque es poco probable que estas alteraciones sean la causa principal de la patogénesis de los tumores hipofisarios, tales cambios intratumorales podrían contribuir a la producción excesiva de hormonas y la pérdida de control en el crecimiento de los adenomas hipofisarios (Asa & Ezzat 1998).

OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es estudiar la génesis y regulación de los prolactinomas. Para ello nos valimos de los ratones knockout para el receptor de dopamina D2, que desarrollan una hiperplasia de lactotopos a los 8 meses y posteriormente un adenoma verdadero. Nos focalizamos en el estudio de factores de crecimiento y angiogénicos: VEGF, FGF-2 y PTTG y aplicamos también una terapia antiangiogénica en hipófisis. Se estudiaron además, los factores mencionados en adenomas hipofisarios humanos.

Objetivos particulares:

1. VEGF

Estudiar la expresión de VEGF en las hipófisis de los ratones hembra KO para el RD2.

Determinar su participación en la proliferación celular y la secreción de prolactina en hipófisis en forma comparativa en ratones WT y KO para el RD2.

Evaluar la relación posible entre el sistema dopaminérgico y el VEGF en hipófisis.

Determinar el rol de VEGF en la angiogénesis en el modelo experimental.

Analizar los efectos de una terapia antiangiogénica bloqueante del VEGF en hipófisis de ratones hembra KO transplantadas.

2. PTTG

Analizar la expresión de PTTG en tres modelos experimentales murinos de prolactinomas: ratones KO para RD2, ratas seniles y ratas tratadas con estrógenos en forma crónica.

Estudiar la relación de PTTG con el sistema dopaminérgico en los 3 modelos empleados.

Comparar la expresión de PTTG en prolactinomas humanos sensibles y resistentes a la terapia con agonistas dopaminérgicos.

Determinar en cada caso los niveles de receptores de estrógenos, la acción estrogénica a nivel hipofisario y analizar la posible relación con el PTTG hipofisario.

3. FGF-2

Estudiar la participación de FGF-2 en la proliferación celular y la secreción de PRL en las hipófisis de los ratones hembra WT y KO para RD2.

Determinar la expresión de FGF-2 hipofisario en forma comparativa en los ratones de ambos genotipos y analizar su posible acción en la hiperplasia en relación a su localización subcelular.

Evaluar la expresión del receptor de FGF-2, el FGFR1 en hipófisis en el modelo experimental.

Estudiar la activación de las MAP quinasas por FGF-2 en las hipófisis de ambos grupos de ratones en forma comparativa.

Analizar el posible rol de FGF-2 en la angiogénesis de la glándula hiperplásica.

4. ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS

Estudiar la expresión de los factores angiogénicos VEGF y FGF2 en tumores hipofisarios humanos obtenidos de cirugías, en especial en los prolactinomas resistentes a dopaminérgicos.

Evaluar índices de proliferación celular y la vascularización de los tejidos tumorales y la posible correlación con los factores angiogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Animales

Los ratones knockout para el receptor dopaminérgico D2 (RD2), designación oficial de la cepa: *B6.129S2-Drd2^{tm1low}* a cargo del Induced Mutant Resource en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME), fueron generados por mutagénesis dirigida del gen RD2 en células embrionarias (Kelly *et al.* 1997). La cepa híbrida original (129S2/Sv X C57BL/6J) con el alelo mutado para el RD2 fue retrocruzada por ocho generaciones con ratones silvestres C57BL/6J. Los ratones mutantes y los silvestres fueron en general producto de cruces entre ratones heterocigotos.

Las hembras fueron mantenidas en grupos de 4 o 5 por siempre mezclando animales de distinto genotipo. El ambiente del bioterio cuenta con aire acondicionado y un período de luz-oscuridad controlado: las luces de la sala se encienden a las 7 hs de la mañana y se apagan a las 19 hs de la tarde. Los animales tienen libre acceso a la bebida y alimento.

El genotipo de los animales fue determinado por PCR a partir de ADN genómico (Diaz-Torga *et al.* 2002). Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el comité de cuidado y uso de animales del Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Drogas

A menos que se especifique para un caso particular, todas las drogas utilizadas fueron compradas en Sigma (St. Louis, MO)

Experimentos *in vivo*

-Tratamiento con antagonistas dopaminérgicos: Ratones hembra wildtype de 8 meses de edad fueron divididos en diferentes grupos y tratados con el antagonista de receptores D2 de larga duración decanoato de haloperidol (HALOPIDOL®, Janssen-Cilag, Beerse, Belgium), en la dosis de 30 mg/Kg/semana en forma subcutánea durante tres semanas o 5 mg/Kg/día de haloperidol en ciclodextrina en forma intraperitoneal durante 14 días. Los grupos controles fueron inyectados de la misma manera con aceite de castor o solución de ciclodextrina los días correspondientes.

-Tratamiento con agonistas dopaminérgicos: Otros dos grupos de ratones hembra wildtype fueron inyectados con solución salina (controles) o con el agonista dopaminérgico cabergolina (0,5 mg/Kg, sc, Laboratorios Beta, Buenos Aires) por tres semanas, dos veces por semana.

-Tratamiento con estradiol: Otros grupos de animales, wildtype y knockout en este caso, fueron inyectados con valerato de estradiol (Progynon® Depot, Schering, Buenos Aires), 0,2 mg/Kg sc o aceite de castor para los controles, 2 inyecciones en total, 72 y 24 hs antes de obtener las muestras en el sacrificio de los animales.

Obtención de células adenohipofisarias dispersas

Animales de ambos genotipos fueron sacrificados por decapitación rápida. Las hipófisis completas fueron removidas en hielo, separadas de la neurohipófisis y ubicadas en cámaras con DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco de PH 7,5. En flujo laminar se cortaron los tejidos en fragmentos pequeños con bisturí. Posteriormente, se incubaron por 30 minutos en estufa a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ en el mismo buffer conteniendo 0.5% de tripsina. Luego fueron tratados con 1 mg/ml

de DNAsa I (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) por dos minutos más y la digestión enzimática se detuvo con el agregado de exceso de suero fetal bovino al 2,5 % y posteriores lavados con DMEM. Los fragmentos tisulares se dispersaron en células individuales por trituración suave a través de pipetas Pasteur. La suspensión resultante fue filtrada a través de una malla de nylon (160 μm) y centrifugada 10 minutos a 1000 rpm. Previo a la centrifugación, se tomó una alícuota de la suspensión celular para cuantificar el rendimiento celular del tejido, que se realizó por conteo en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Azul Tripán, y fue siempre mayor del 90%.

Cultivo primario de células adenohipofisarias

El pellet celular fue resuspendido en DMEM, suplementado con 10 % de suero de caballo, 2,5 % de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM de glutamina, y 25 ng/ml de gentamicina. Las células se sembraron en placas de cultivo estériles a una densidad de 35.000 células/pocillo para las de 96 pocillos y 250.000 o 375.000 células/pocillo para las placas de 24 pocillos según el experimento y se incubaron en estufa a 37°C con 95% de O₂ y 5% de CO₂ en presencia o ausencia de 10⁻⁶ M de estradiol. Cumplidas 96 hs. en cultivo, las células se lavaron dos veces con DMEM/F-12 (con 2,2g/l de NaHCO₃ y albúmina bovina (BSA) al 0,1%) y fueron preincubadas en este medio libre de suero durante 3 hs antes del agregado de los estímulos (10 y 30 ng/ml de VEGF, 1 y 10 ng/ml de FGF-2 que se mantuvieron por 48 hs. En cada cultivo los tratamientos se aplicaron por cuadruplicado.

Los medios condicionados fueron colectados después de las 48 hs de incubación con los estímulos. Estos fueron conservados a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Radioinmunoensayo (RIA)

Se determinaron por este método los niveles de PRL de ratón en los sueros y en los medios de cultivo de células adenohipofisarias. Se midieron además en estos medios condicionados, los niveles de VEGF secretados por las células hipofisarias.

RIA de Prolactina

Se usó un kit provisto por el Instituto Nacional de Diabetes y de Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK), Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos (NIH, USA).

Los resultados se expresaron de acuerdo a la preparación de referencia RP₃. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 7,2 y 12,8%, respectivamente.

El protocolo de rutina fue el siguiente: La curva de concentraciones del standard de referencia y la dilución de las muestras fue realizada en buffer de ensayo: buffer fosfato (PBS) con 1% de albúmina de huevo (EA). La solución de PBS fue compuesta por buffer fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0.01% azida sódica, pH final 7,4. El primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti-PRL de ratón, NHPP-NIDDK, dilución de trabajo 1:100000) y la hormona marcada (aproximadamente 10000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 24 hs. Al día siguiente, el segundo anticuerpo (suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo, dilución de trabajo 1:90) fue agregado al ensayo e incubado a 4°C por 24 hs. Luego de esta incubación se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación refrigerada (4°C, Beckman Instruments) a 3000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue aspirado y se midió la radioactividad asociada

al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador γ Hewlett Packard (eficiencia: 82%).

RIA de VEGF

Para la determinación del VEGF por RIA en medios condicionados liofilizamos la muestra para concentrarla, 800 μ l de medio condicionado original se resuspendieron en 200 μ l de PBS después de la liofilización. Desarrollamos un RIA específico de acuerdo al método descrito por Anthony y colaboradores (Anthony *et al.* 1997). Se usó VEGF recombinante humano como estándar y como trazador. Dos μ g de VEGF fueron iodados con 0,7 mCi de ^{125}I en buffer fosfato 0,5 M por el método de la cloramina T. El VEGF marcado fue separado del factor frío por exclusión molecular a través de una columna de Biogel P10 (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA).

La mezcla de reacción consistió en 200 μ l de estándar o muestra diluida en buffer de ensayo: 200 mg/l de sulfato de protamina, 4,14 g/l de fosfato monobásico de sodio, 0,05% de Tween 20, 0,01 M de EDTA y 200 μ g/ml de heparina (Gibco, Buenos Aires, Argentina), 100 μ l de trazador radiactivo y 100 μ l de anti-VEGF hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology 1:5000). Luego de una incubación de 24 hs a 4°C, se agregaron a cada tubo 500 μ l de polietilenglicol al 5% en PBS (Merk-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania), anti- IgG de conejo hecho en oveja al 1% y 0,05 % de suero normal de conejo. Los tubos se incubaron 2 hs a temperatura ambiente y luego una hora a 4 °C. Se hizo una centrifugación en frío a 2000 rpm durante 30 min, se descartaron los sobrenadantes y se midió la radiactividad del pellet en contador γ . La sensibilidad del ensayo resultó ser de 0,6 ng/tubo. El coeficiente de variación intraensayo fue del 10% y se obtuvo un paralelismo entre las diluciones seriadas de medio condicionado de

hipófisis de ratón y la curva estandar de VEGF humano. No hallamos reactividad cruzada con FGF-2 o IGF-1.

Western Blot

Preparación de las muestras Las adenohipófisis de los ratones y ratas que recibieron tratamientos *in vivo* se homogenizaron en hielo en 80 ul de buffer Tris-HCl 60 mM - EDTA 1 mM, pH 6,8 y un mezcla de inhibidores de proteasas: fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) y otra mezcla preformada de los inhibidores TPCK, TAME, ZPCK y TLCK con un homogenizador manual. El homogenato se centrifugó a 800g durante 5 min a 4°C. Una alícuota del sobrenadante se separó para la medición de proteínas por el método de Lowry y 10 ul del mismo conteniendo 30 ug de proteínas se mezclaron con 10 ul de buffer de muestra 2X (Tris-HCl 60 mM, SDS 4 %, 20 % de glicerol, azul de bromofenol al 0,02%, ditiotreititol 50 mM, pH 6,8). Las muestras se sonicaron por 20 segundos y se calentaron a 95°C 5 min antes de sembrar.

Las células hipofisarias provenientes de cultivo se lisaron en hielo en la placa con buffer de muestra 1x, se transfirieron a tubos y se procesaron de la misma manera que los homogenatos.

Separación de proteínas Se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS 6, 12 y 15% según el peso molecular de la proteína a detectar. Luego de la corrida las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Buenos Aires, Argentina) en buffer de transferencia (glicina 1,4%, Tris Base 0,3% y metanol 20%, PH 8,3).

Western Blot Las membranas obtenidas de la corrida electroforética se incubaron sucesivamente en agitación con: 1) leche en polvo descremada 5% en PBS-Tween (PBS-T) para bloquear los sitios inespecíficos durante 1h.; 2) el primer anticuerpo

(monoclonal en ratón, policlonal en conejo o en cabra) diluido en PBS-T-BSA (PBS-T con el agregado de BSA 1%) toda la noche a 4°C y 3) el segundo anticuerpo (anti-IgG policlonal de ratón, de conejo o de cabra) conjugado a la peroxidasa de rabanito y diluido en PBS-T-BSA. Luego de cada incubación se lavó 3 veces por 10 min con PBS-T. El control negativo se realizó por medio de una incubación sin primer anticuerpo para alguna de las muestras sembradas. Siempre que fue posible se sembró un control positivo de la proteína buscada, ya sea un lisado celular con alto nivel de expresión o un estándar comercial.

Los pesos moleculares se calcularon a partir de la corrida de estándares preteñidos y biotinilados. Se reveló con un kit comercial de quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent) utilizando placas de revelado AGFA.

Las intensidades de banda se cuantificaron por medio de un escáner AGFA y del programa ImageQuant.

Anticuerpos primarios monoclonales hechos en ratón anti-p-ERK1/2 1:1000 de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, anti-ACTINA 1:10.000 de Lab Vision, Fremont CA.

Anticuerpos primarios policlonales hechos en conejo anti-VEGF, 1: 800, anti-PCNA 1:1000, anti-Receptor de Estrógenos α 1:500, anti ERK 1 1:1000, anti-FGFR 1:800. Todos comprados en Santa Cruz Biotechnology, anti-PTTG de Santa Cruz o cedido por S.S. Kakar, ambos usados 1:1000,

Anticuerpos primarios policlonales hechos en cabra anti-CD31 de Santa Cruz Biotechnology.

Los valores de intensidad para cada proteína se dividieron por el valor obtenido para la intensidad de actina y dicha relación se expresó en unidades arbitrarias. Para el estudio de la activación de MAP kinasas, la intensidad de la banda de p-ERK se relativizó a la

ERK total. Entre incubaciones de una misma membrana con distintos anticuerpos primarios se realizó sobre la misma una incubación con buffer de stripping (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 100 mM, pH 6,7) durante 40 min a 50°C.

Extracción de ARN de ratón

Se extrajo la adenohipófisis de los animales en hielo y en condiciones libres de ARNasas para lo cual se la colocó en 100 μ l de Trizol hasta el momento de la extracción del ARN total. Esta extracción consistió en una homogenización del tejido con homogenizador manual, una sonicación de 10 segundos en frío y una incubación de 5 min a 30°C. Luego se agregaron 80 μ l de cloroformo, se incubó 2 min a 30°C y se centrifugó 15 min a 12.000 g para precipitar las proteínas. Se obtuvo el sobrenadante y se le agregó 200 μ l de isopropanol, se incubó 10 min a 30°C y se centrifugó 10 min a 12.000 g para precipitar al RNA. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron 400 μ l de etanol 70% para lavar el precipitado. Se centrifugó nuevamente 5 min a 7.500 g, se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire durante 15 min. Finalmente se lo resuspendió en 20 μ l (controles) o en 40 μ l (tumores) de agua con dietilpirocarbonato (DEPC), se chequeó su integridad corriendo una muestra en un gel de agarosa con formaldehído, se cuantificó por espectrofotometría al ultravioleta (Beckman Coulter) y se lo guardó a -70°C para su posterior utilización en la RT-PCR.

Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La primera etapa de esta técnica es la retrotranscripción (RT) del ARN a ADN copia (cDNA) por medio de la retrotranscriptasa M-MLV-RT. Se realizó la retrotranscripción de ARN total a ARN mensajero, para esto se incubaron 1,5 μ g de cada muestra del ARN

total extraído con la mezcla de reacción de RT (M-MLV-RT 200 unidades/muestra (Invitrogen), primers al azar 1 µg/muestra, dNTPs 1 mM, el inhibidor de RNAsas (RNAsin, Invitrogen) 5 unidades/muestra, buffer de enzima 5 µl/muestra, en un volumen final de 25 µl) por 60 min a 37°C. Finalmente se incubó 10 min a 70°C para inactivar la transcriptasa. Los controles negativos (para descartar posible contaminación con ADN genómico o ARN foráneo) consistieron en no colocar la enzima RT o no colocar la muestra de ARN en los tubos respectivamente.

La segunda etapa de la técnica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se incuban los productos de la reacción de RT en una nueva mezcla de reacción, de 30 µl finales, específica para cada ADNc. La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf según un programa de ciclado, también específico para el gen a amplificar. Los pasos comunes para las reacciones de PCR fueron: un paso inicial de calentamiento de 3 min a 95°C seguido de n ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 seg, annealing o pegado de los cebadores al molde de ADN de 60 seg y el paso de extensión a 72 °C de 50 seg. Al programa se le añadió un paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Las condiciones particulares para la amplificación de cada gen fueron las siguientes:

	VEGF	G3PDH
Secuencia de los cebadores directos (5' → 3')	GACGTCTACCAGCGAAGCTAC	CTCAGGCAAATTCAACGG
Secuencia de los cebadores inversos (5' → 3')	GGTTTGATCCGCATGATCT	CTTTCCAGAGGGGCCATCCA

Nucleótidos (directo)	130-150	195-213
Nucleótidos (inverso)	311-329	602-621
Longitud del amplicón (pb)	200	427
referencia	(Claffey <i>et al.</i> 1992)	(Sabath <i>et al.</i> 1990)
MgCl ₂ (mM)	1,5	1,5
ADNc (μl)	1,6	1,3
Taq ADN polimerasa (U)	1,5	1,0
Temp de annealing (°C)	58	55
Ciclos (nro)	32	26

Gen	secuencia del cebador directo (5'→3')	ubicación	secuencia del cebador indirecto (5'→3')	ubicación	Longitud del producto (pb)	ciclos	Temp annealing
PTTG ratón	CAGCCGTGC CTAAAGCCA GC	463-482	GATAGAAAGGGTGTC TTCAGAG	799-820	358	35	58°C

Se realizaron experimentos de prueba usando distintas concentraciones de ARN total y distinto número de ciclos en la PCR para determinar las condiciones en las cuales la reacción de PCR estuviera en su fase de lineal de amplificación.

Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa 1,8% donde el ADN amplificado fue visualizado con Bromuro de Etidio. El análisis densitométrico de las bandas se hizo a través del software Scion Image y la intensidad de las bandas de VEGF y de pttg fue normalizada con la de G3PDH.

Estudios de proliferación

Medición de la incorporación de $^3\text{[H]}$ -Timidina

El procedimiento para el cultivo primario de las células adenohipofisarias fue el mismo que ya describimos. Inmediatamente después de aplicados los estímulos, se agregaron 0,2 μCi de $^3\text{[H]}$ -Timidina/pocillo. Luego de 24 hs. de incubación, el medio se descartó y las células fueron incubadas 20 min. en solución de lisis (0,05% de tripsina, 0,02% EDTA en agua desionizada). Posteriormente, el medio fue filtrado por vacío y la fracción nuclear recogida en filtros GF/C Whatman (la cosecha se realizó en un cosechador automático para placas de 96 pocillos). Luego de 5 lavados con agua desionizada, los filtros se dejaron secar y se colocaron en viales plásticos que contenían 0,5 ml de solución de centelleo (Optiphase®). La radioactividad asociada a los filtros fue analizada en un contador Beckman de centelleo β .

Medición de la proliferación con MTS

La proliferación de las células adenohipofisarias también se determinó por un método colorimétrico a través de un kit comercial: ensayo de proliferación no radiactivo (Cell Titer 96 AQueous, Promega). Luego de 48 hs de incubación con los estímulos correspondientes, se agregaron a las placas de 96 pocillos los reactivos MTS y PMS por

media, una y dos hs. en estufa a 37 °C. Esta incubación lleva a la formación de un producto de formazán debido a la reducción del MTS por las células vivas. Dicho producto fue detectado a 490 nm en un lector de ELISA (Sensident scan, Merck)

Por este método también construimos una curva de proliferación en el tiempo en forma comparativa en los distintos genotipos. Para esto, una vez plaqueadas las células, se hicieron lecturas a 490 nm a los tiempos: 0 y 5 hs, y a las 1,2,3,4,5 y 7 días. Además, en un grupo de experimentos, el medio de cultivo fue removido y cambiado por medio fresco para poder cultivar las células por 4 días más en medio con suero.

Cultivo de células endoteliales y ensayo de proliferación

Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) fueron aisladas por digestión enzimática con colagenasa según fue descrito en (Jaffe *et al.* 1973).

Las células se cultivaron en flasks T75 en medio M199 suplementado con 20% de suero fetal bovino, factores de crecimiento: 2ng/ml de FGF-2, 10 ng/ml de VEGF y 5ng/ml de EGF y 50 ug/ml de gentamicina a 37°C en atmósfera humidificada, con 5% de CO₂ en aire. El medio de cultivo se cambió cada 72 hs y las células de cultivos confluentes se lavaron con PBS y se levantaron con tripsina al 0,05% (p/v) y EDTA 5 mM para ser subcultivadas. Los estudios de proliferación fueron hechos con HUVEC de pasajes 4 a 8.

La proliferación de las células endoteliales fue medida por la incorporación de ³[H]-Timidina de la siguiente manera: se sembraron en placas de 96 pocillos 2.500 células/pocillo/100ul y se incubaron durante 2 hs, luego se agregaron 50 ul de FGF-2 de 2ng/ml de concentración final, 10ng/ml de VEGF, 1ng/ml de EGF o 50 ul de medio condicionado proveniente de cultivo de células hipofisarias. En todos los casos se sembraron pocillos con y sin anticuerpos anti- FGF-2 o VEGF a una concentración de 2

ug/ml. Se hizo una incubación de 24 hs antes del agregado de 5uCi/ml de $^3\text{[H]}$ -Timidina. Luego de 48 hs se frenó el experimento con 50 ul de Guanidina-HCl y las células se lisaron con congelación-descongelación. El ADN se colectó en filtros GF/C Whatman a través de un cosechador de 8 canales (Cell Harvester 8, Nunc) y 1 ml de solución de centelleo (Optiphase Hifase 3). La radioactividad asociada a los filtros fue analizada en un contador Beckman de centelleo β .

Inmunohitoquímica (IHO) para FGF-R, S-100 y vWF

Para detectar la presencia de FGF-R se utilizó el anticuerpo Flg (C-15) (Santa Cruz, Biotechnology, Inc) para S-100, un marcador de células foliculo estrelladas, se usó el anticuerpo Ab2 de Lab Vision y para el Factor de von Willebrand, marcador de endotelio, el anticuerpo policlonal de conejo de R&D Systems. Las hipófisis fueron fijadas en formalina e incluidas en parafina. Se cortaron secciones del taco de parafina de 4 μm en micrótopo y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones fueron rehidratadas en alcohol, lavadas en PBS y tratadas con H_2O_2 3% en PBS durante 20 min. a temperatura ambiente para inhibir la peroxidasa endógena. Los cortes fueron preincubados con leche descremada al 5% durante 1 h para bloquear los sitios de unión inespecífica. Luego se hizo la incubación con el primer anticuerpo diluido en PBS 1:100 durante la noche a 4°C , seguidamente los cortes fueron lavados con PBS e incubados a temperatura ambiente durante 1 h. con segundo anticuerpo biotinilado anti-IgG de conejo, y luego con un complejo de avidina y biotina (ABC) preformado, por 30 min. (Vectastain ABC kit Vector Labs, Burlingame, CA) Después de los correspondientes lavados se agregó una solución de 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) 0,05% (Sigma, St. Louis, MO., U.S.A.) en buffer Tris 0,1 M, pH 7,2 conteniendo 0,01% de H_2O_2 . Se siguió

el desarrollo del color marrón al microscopio, se detuvo la reacción por inmersión en PBS, y las secciones fueron contrateñidas con verde de metilo para el caso del FGF-R o con hematoxilina para S-100 y vWF; deshidratadas y montadas con DPX (Biochemika, Fluka, Alemania). Las células inmunorreactivas fueron fotografiadas con un microscopio Zeiss Axiostar plus equipado con una cámara digital Cannon PowerShot G6. La intensidad de la marca en las células inmunorreactivas para FGF-R fue determinada con un analizador de imágenes (Optimas, Bioscan). Se realizaron cuatro cortes por hipófisis, y se analizaron 4 áreas por corte. Cada grupo de ratones constaba al menos de cuatro individuos.

IHQ de fluorescencia simple para PRL y para FGF-2.

La preparación de las muestras se hizo de la misma manera que para el FGF-R, como así también la rehidratación de los cortes. Se llevó a cabo una recuperación de antígeno con 20 µg/ml de proteinasa K por 10 min previa al bloqueo de sitios inespecíficos de unión con leche descremada al 5 %. La incubación con el primer anticuerpo (anti-FGF-2 policlonal hecho en cabra 1:100, Santa Cruz Biotechnology) se hizo durante toda la noche a 24 °C. Finalmente se incubó con segundo anticuerpo anti-cabra hecho en conejo acoplado a FITC (Zymed Laboratorios Inc. San Francisco, CA) 1:100 por 1,5 hs. Los cortes fueron contrateñidos con yoduro de propidio y montados con Vectashield (Vector Labs) que contiene un agente que impide el decaimiento de la fluorescencia.

Para estudiar la especificidad del anti-FGF-2 se hicieron controles que omitieron dicho anticuerpo y también se lo preabsorbió con exceso de antígeno antes de la incubación. En ambos casos vimos ausencia de la marca de fluorescencia. Las secciones se

analizaron en un microscopio confocal Nikon C1 Plan Apo. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm para el FITC.

La inmunorreactividad de FGF-2 en el núcleo fue determinada como índice nuclear, calculado como el porcentaje de células hipofisarias con marca nuclear para FGF-2 respecto a las células totales en cada sección.

IHQ doble de fluorescencia para VEGF o FGF-R y hormonas hipofisarias.
Microscopía confocal

Se procedió de la misma manera que para la IHQ simple para FGF-2 con excepción de que la recuperación de antígeno se hizo con 3 ciclos de 3 min en microondas a 600W en buffer citrato de Na 10 mM PH 6. Posterior al bloqueo se incubaron durante toda la noche a 4 °C los anticuerpos primarios: anti-VEGF hecho en pollo combinado con anticuerpos para las distintas hormonas hipofisarias: anti-TSH, anti-PRL, anti-GH, anti-LH y también anti-S100, todos hechos en conejo. Los anticuerpos contra las hormonas fueron del NHPP-NIDDK. La incubación con los segundos anticuerpos fue de 2 hs a temperatura ambiente con anti-conejo-FITC hecho en cabra y anti-pollo-Texas Red hecho en cabra.

Los preparados se montaron con Vectashield y se analizaron en el microscopio confocal como se hizo con FGF-2. La longitud de onda de excitación de Texas Red fue de 543 nm.

Para FGF-R, se usó el anticuerpo Flg de Santa Cruz que se reveló con el anti-conejo-FITC hecho en burro. En este caso se combinó con anti-PRL hecho en cabra (detectado con anti-cabra-Texas Red hecho en burro) o con anti-GH hecho en mono (detectado con anti-mono-Texas Red hecho en cabra).

Transplantes subcutáneos de hipófisis de ratón

Se usaron tubos de silastic Dow Corning de 1,02 y 2,16 mm de diámetros interno y externo respectivamente (Dow Corning Corporation Midland Michigan, USA) para transplantar hipófisis de ratones hembra de 8 meses KO para RD2 donantes, a hembras receptoras WT de la misma cepa y edad. En los tubos, de 5 -7 mm de diámetro se hizo una incisión de 3 a 5 mm, dejando ambos extremos abiertos. Los tubos se sumergieron en solución salina 1 h antes de la operación como mínimo.

Las hipófisis a implantar se obtuvieron por decapitación de los animales KO donantes y fueron removidas en forma rápida y en condiciones de esterilidad. Se introdujeron en los tubos de silastic manteniendo la incisión abierta mediante con una pinza estéril. Se colocó una hipófisis KO/tubo y ésta recuperó su forma una vez que el tubo recuperó volvió a su estado original.

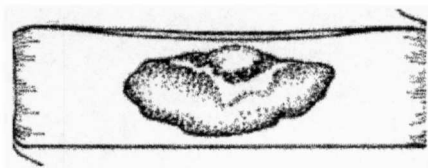


Figura 1: Tubo de silastic utilizado para el transplante de hipófisis de ratón. En la parte superior del tubo se observa la incisión por donde se introdujo la hipófisis dentro del tubo. Ambos extremos se dejaron abiertos.

El implante subcutáneo de los tubos se hizo a través de una incisión en el lomo de aproximadamente un cm bajo anestesia de 7mg/Kg de xilacina y 80 mg/Kg de Ketamina. La zona de la incisión se cosió y los animales se mantuvieron en ambiente cálido hasta su recuperación total. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en condiciones asépticas.

Tratamiento con VEGF-Trap local en hipófisis transplantadas

El VEGF-Trap (R&D Systems Minneapolis, MN) actúa como un inhibidor de VEGF.

Compuesto por la porción extracelular del VEGFR1 de ratón bloquea la acción del VEGF libre impidiendo que se una a su receptor VEGFR2.

Se inyectó este inhibidor dentro del tubo de silastic de 2 transplantes de hipófisis KO a razón de 2 ug/20 ul /inyección dos veces por semana durante 2 semanas. Los animales controles: otros 2 transplantes de hipófisis KO recibieron 20 ul del vehículo (BSA 0,1% en PBS).

IHQ de mPRL y vWF en los tejidos transplantados

Luego del tratamiento los animales fueron sacrificados y cuidadosamente se extrajeron los tubos de silastic junto con el tejido conectivo externo y las hipófisis en su interior.

El tubo de silastic se separó cuidadosamente de los tejidos y estos fueron fijados en formalina e incluidos en parafina como de rutina.

Con la técnica ya descrita se realizaron IHQ para PRL y para vWF (1:100 R&D Systems). En ambos casos se reveló con DAB y se contratiñó con hematoxilina.

Las células inmunorreactivas fueron analizadas con un microscopio Zeiss Axiostar plus equipado con una cámara digital Cannon PowerShot G6. La intensidad de la marca en las células inmunorreactivas fue determinada con un analizador de imágenes (Optimas, Bioscan).

ELISA para la detección de FGF-2

Se usó un kit de ELISA comercial: Quantikine FGF basic Immunoassay (R&D Systems) para cuantificar el contenido de FGF2 en homogenatos de hipófisis de ratón, lisados celulares y medios condicionados de cultivos de hipófisis de hembras WT y KO para RD2. Los homogenatos fueron extraídos previamente con partículas de heparina unida a sefarosa (Pharmacia Biotech, NJ) aprovechando la capacidad del FGF-2 de unirse a la heparina. En buffer Tris-HCl 10 mM se dejaron reaccionar en agitación las partículas con la muestra, previa cuantificación de las proteínas. Luego del lavado de las partículas se desprendió el FGF-2 con una solución de alta fuerza iónica.

Se siguieron las especificaciones del fabricante del kit de ELISA. La mínima dosis detectable con el kit es de 3pg/ml y no muestra reactividad cruzada con otros péptidos.

Estadística

Capítulo 1, VEGF: Los resultados se expresan como valores promedio \pm ES. La expresión de VEGF y de los receptores de estrógenos *in vivo*, y la liberación de prolactina *in vivo* e *in vitro*, fueron analizadas por ANOVA de 2 factores con medidas independientes para los efectos de genotipo y tratamiento con estrógenos. La expresión de PCNA *in vivo* e *in vitro*, la liberación de VEGF *in vitro*, la captación de Timidina y el experimento con cabergolina se analizaron con el test de Student. El VEGF y la PRL en el experimento de haloperidol se analizaron por ANOVA de un factor. El ensayo de proliferación con MTS y la liberación de PRL por VEGF, y el efecto del medio condicionado sobre la proliferación de HUVEC se estudiaron con ANOVA de 2 factores. La curva de proliferación en el tiempo se analizó por ANOVA de 2 factores con medidas repetidas. Si el P de interacción resultó significativo, los promedios individuales se compararon con el test de Tukey; si la

interacción no resultó significativa los grupos de medias se analizaron por el mismo test original. $P < 0,05$ se consideró significativo.

Capítulo 3, FGF-2: Los resultados se expresan como valores promedio \pm ES. La expresión de FGF-2, FGFR1, el índice nuclear de FGF-2 por inmunohistoquímica y la activación basal de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) se analizaron mediante el test de Student. Los ensayos de proliferación de MTS y de captación de $^3\text{[H]}$ -Timidina, la liberación de PRL *in vitro* por FGF-2 y el efecto del medio condicionado sobre la proliferación de HUVEC se analizaron por ANOVA de 2 factores para medidas independientes para los efectos de genotipo y tratamiento. La fosforilación de MAPK inducida por FGF-2 para distintos tiempos se estudió por ANOVA de 2 factores para medidas repetidas. En todos los casos, si el P de interacción dio significativo, las medias individuales se compararon con el test de Tuckey; si la interacción no resultó significativa, los grupos de medias se analizaron por el mismo test original. En los cultivos celulares el N indica el número de experimentos independientes, en cada uno se usaron al menos 5 hipófisis WT y 3 KO, y los tratamientos se aplicaron por cuadruplicado en cada experimento. $P < 0,05$ se consideró significativo.

CAPÍTULO 1

1. FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)

INTRODUCCIÓN

Como ocurre para otros tipos de tumores, el crecimiento de los adenomas hipofisarios requiere de una adecuada vascularización una vez que el tumor sobrepasa unos pocos milímetros de tamaño (Folkman & Shing 1992). Durante el desarrollo de tumores secretores de prolactina inducidos por estrógenos en ratas ocurre una marcada angiogénesis de naturaleza arterial (Elias & Weiner 1984). Más aún, el crecimiento de estos tumores puede inhibirse en forma significativa con agentes antiangiogénicos (Takechi 1994).

Como se mencionó anteriormente, VEGF es uno de los factores angiogénicos más potentes que se conoce (Ferrara & Davis-Smyth 1997). La expresión de esta glicoproteína dimérica de 43-46 KDa se encontró aumentada en muchos tumores fuertemente vascularizados como los de cerebro, colon y tracto gastro intestinal, ovario, mama y otros (Ferrara *et al.* 2003).

Estudios sobre vascularización tumoral en ratones nude indicaron que la expresión de VEGF es crítica tanto para la angiogénesis como para la tumorogénesis. (Kim *et al.* 1993) (Saleh *et al.* 1996).

Los estudios que relacionan la expresión de VEGF y tumorigénesis hipofisaria no son muchos, y algunos presentan datos contradictorios, pero en particular nada se ha estudiado de VEGF en relación a la hiperplasia hipofisaria del ratón knockout RD2.

VEGF ha sido detectado en todos los tipos de adenomas hipofisarios humanos, en especial en los de corticotropos y somatotropos (McCabe *et al.* 2002). Banerjee y colaboradores en 1997 asociaron la expresión de VEGF y KDR, su principal receptor, al desarrollo de tumores secretores de prolactina en ratas tratadas con estradiol (Banerjee *et al.* 1997), y el rol de VEGF en el desarrollo de tumores hipofisarios dependientes de estrógenos fue también avalado por el hecho de que los niveles de VEGF no se incrementan luego del tratamiento estrogénico en ratas Brown Norway resistentes a la generación de tumor (Cracchiolo *et al.* 2002).

Si bien las hembras knockout para el RD2 tienen bajos niveles de estrógenos circulantes, la pérdida del control inhibitorio dopaminérgico sobre los lactotropos podría estar brindando un ambiente permisivo para la acción de factores estimulatorios que lleven a la proliferación, angiogénesis y el desarrollo de tumores.

Elias y Weiner en 1987 determinaron que la bromocriptina (un agonista dopaminérgico) era capaz de inhibir la arteriogénesis y el desarrollo de tumores en la hipófisis anterior de ratas tratadas en forma crónica con estrógenos (Elias & Weiner 1987). De esta manera quedaba establecida una relación entre la dopamina y la generación de nuevos vasos sanguíneos en las hipófisis tumorales, aunque en ese entonces no se había dilucidado aún qué factor inducía el desarrollo de las nuevas arterias que aportaban sangre sistémica al tumor con concentraciones subfisiológicas de dopamina (Elias & Weiner 1984). No obstante se hipotetizaba que el estradiol podría estar actuando

directamente sobre la células endoteliales o indirectamente estimulando la producción de algún factor angiogénico en las células hipofisarias.

Otra asociación entre angiogénesis y dopamina surge del análisis de pacientes esquizofrénicos que están relativamente protegidos contra el desarrollo de tumores (Teunis *et al.* 2002). Teunis y colaboradores asociaron la hiperreactividad del sistema dopaminérgico con una angiogénesis y crecimiento tumoral reducidos. Los autores demostraron que las cepas de ratas con alta reactividad dopaminérgica desarrollaban tumores más pequeños y menos vascularizados que las ratas con sistema dopaminérgico poco reactivo. Dichos autores comprobaron que en las ratas del primer grupo la expresión de VEGF se encontraba disminuida y eso las hacía más resistentes a los implantes de tumores y al desarrollo de metástasis (Teunis *et al.* 2002).

Finalmente, se ha descrito que la dopamina actuando a través del RD2 tiene acciones antiangiogénicas en células endoteliales inhibiendo la actividad permeabilizante y angiogénica de VEGF como así también el desarrollo de tumores malignos (Basu *et al.* 2001).

Estos trabajos motivaron nuestro interés en el estudio de la expresión de VEGF en las hipófisis de los ratones hembra knockout para el RD2. Decidimos analizar los niveles de expresión de VEGF, su localización y regulación por estrógenos como así también los efectos de este factor sobre la secreción de prolactina y la proliferación celular en el modelo experimental de hiperplasia hipofisaria de ratones knockout para el RD2.

RESULTADOS

VEGF EN HIPÓFISIS

Contenido hipofisario de VEGF en hembras WT y KO para RD2

El primer paso fue la determinación en adenohipofisis del nivel de expresión proteica de VEGF comparativamente entre hembras WT y KO. Para ello se extrajeron las hipofisis de hembras de 8 meses de edad de ambos genotipos y se procesaron para western blot. Por esta técnica encontramos un aumento significativo en la expresión del mencionado factor angiogénico (relativizado al nivel de expresión de actina), en las hipofisis KO respecto a las WT (Figura 1.1a, $P = 0,0036$). En correlación con este resultado también hallamos niveles más altos del ARN mensajero para VEGF en las hipofisis KO, determinado por RT-PCR semicuantitativa y normalizado al contenido de G3PDH, cuando lo comparamos con el de los animales WT (Figura 1.1b, $P = 0,043$).

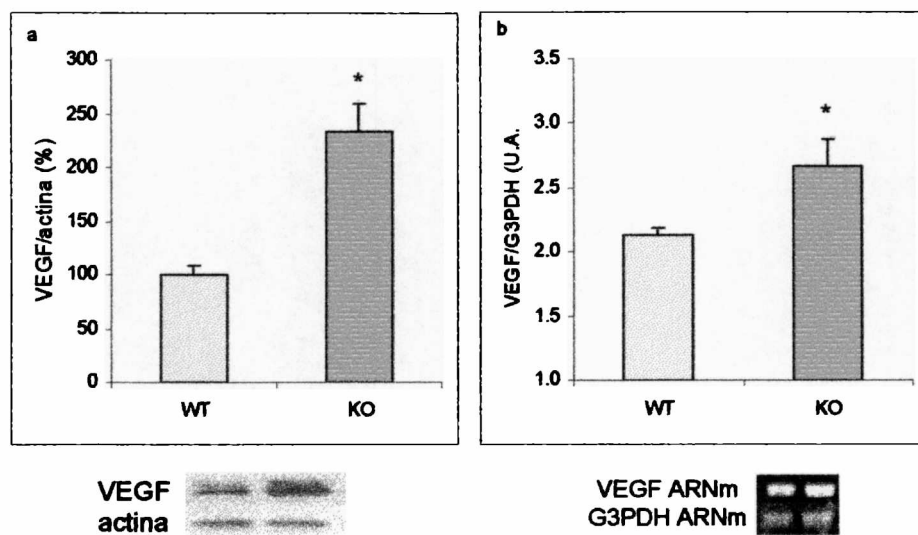


Figura 1.1: a) Contenido hipofisario de VEGF evaluado por western blot en forma comparativa en hipófisis de hembras KO y WT. La intensidad de la banda para VEGF (en unidades arbitrarias) fue relativizada a la de actina, tomando al genotipo WT como el 100%. * $P < 0.05$ vs. WT. N= 18 y 15 para WT y KO respectivamente. b) Densidad de bandas de los productos de RT-PCR para VEGF y su relativización a G3PDH para hipófisis de hembras WT y KO * $P < 0.05$ vs. WT. N= 5 y 6 para WT y KO respectivamente. Abajo: bandas de western blot representativas para VEGF (46 KDa) junto a su actina correspondiente y bandas representativas de RT-PCR junto a su G3PDH.

Contenido celular y liberación de VEGF in vitro

Se determinó por la técnica de Western blot la concentración de VEGF en cultivo primario de células adenohipofisarias. El contenido de VEGF obtenido a partir de los lisados fue normalizado con la expresión de la actina correspondiente y, al igual que en los homogenatos, nuestros resultados mostraron que dicha proteína estaba aumentada en KO respecto a WT (Figura 1.2a, $P = 0,018$). Por otra parte, en los medios condicionados de dichos cultivos analizamos la liberación de VEGF por las células hipofisarias usando un radioinmunoensayo específico para VEGF. Los resultados muestran que ambos grupos celulares secretan VEGF siendo significativamente mayor la liberación en el caso de los sobrenadantes KO (Figura 1.2b, $P = 0,043$).

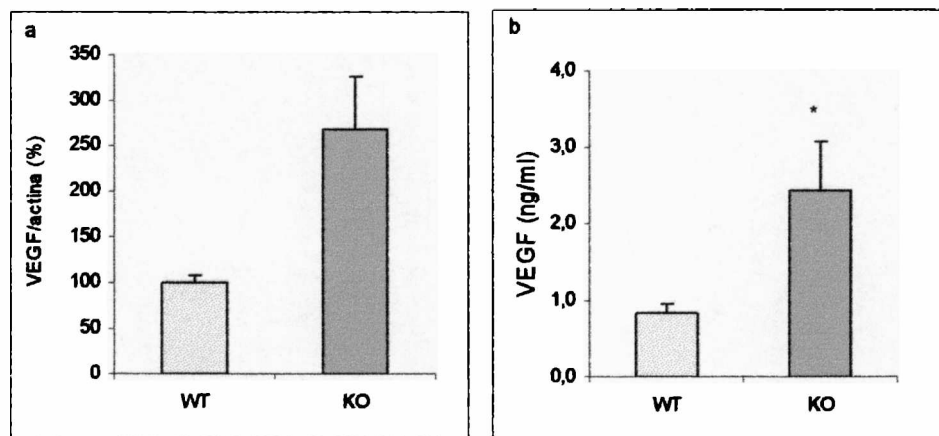


Figura 1.2: a) VEGF en células hipofisarias WT y KO en cultivo primario * $P < 0,05$ vs. WT N=4 cultivos para cada genotipo. b) VEGF liberado por células adenohipofisarias en cultivo. * $P < 0.05$ vs. WT N=6 para cada grupo.

Peliosis en hipófisis de hembras KO para RD2

En cortes histológicos de hipófisis de hembras KO de 8 meses de edad se encontraron abundantes lagunas vasculares asociadas a la hiperplasia de lactotrofos como así también zonas con glóbulos rojos extravasados no contenidos por capilares, característica vascular conocida como peliosis y fuertemente asociada a un aumento de la permeabilidad del endotelio condicionado por la acción de VEGF (Figura 1.3)

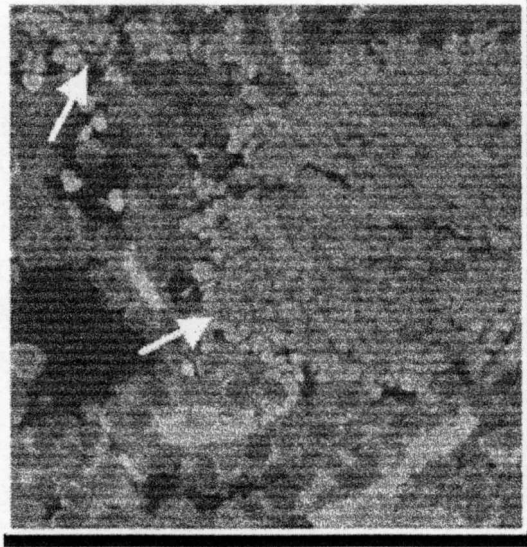


Figura 1.3: Zonas de peliosis (flechas) en tejido hipofisario de hembras knockout para el RD2

Efecto de los estrógenos sobre la expresión de VEGF

Como se mencionó anteriormente, el estradiol estimula la expresión de VEGF en los prolactinomas inducidos por dicho esteroide en ratas. Para estudiar el efecto de los estrógenos en nuestro modelo experimental realizamos un tratamiento crónico con 0,2 mg/Kg de valerato de estradiol en forma subcutánea en dos dosis: 72 y 24 hs antes de la decapitación en hembras KO y WT. Se extrajeron las hipofisis en la forma usual, se homogenizaron y procesaron para western blot o para RT-PCR según el caso. Observamos que no se modificaron los niveles de VEGF hipofisario en forma significativa en ninguno de los genotipos tanto a nivel a nivel proteico como de ARN mensajero en respuesta al esteroide (Figuras 1.4 a y b, para efecto de estrógenos en KO y WT, $P = 0,78$ y $0,27$ para la proteína y el ARN m, respectivamente).

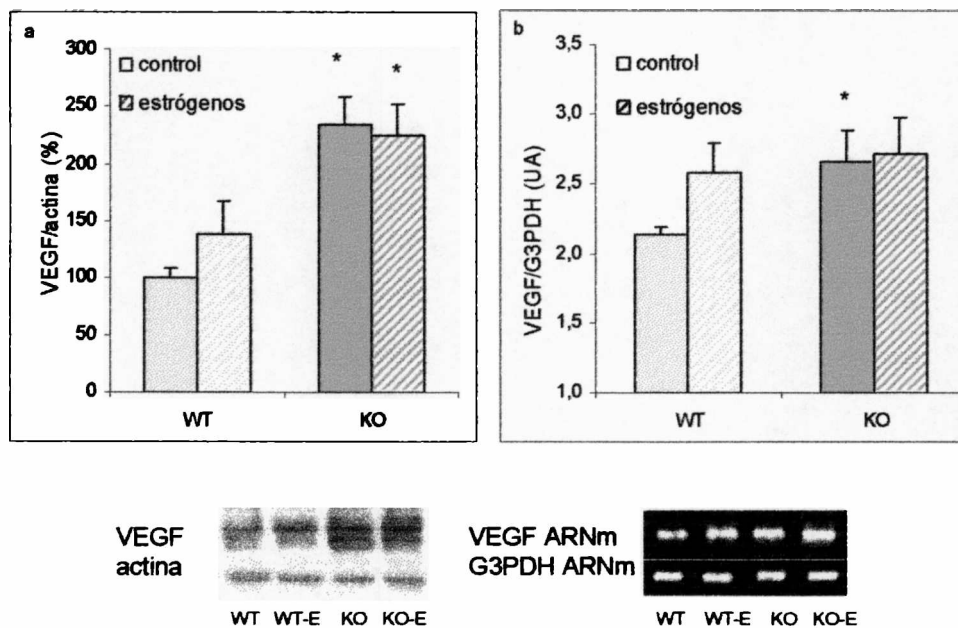


Figura 1.4: Efecto del tratamiento con valerato de estradiol in vivo a) sobre el VEGF hipofisario determinado por Western Blot y normalizado a su correspondiente nivel de actina. b) ARNm para el VEGF hipofisario evaluado por RT-PCR y normalizado al nivel de ARNm de G3PDH respectivo * $P < 0.05$ vs. WT con o sin estradiol. Debajo: bandas representativas de western blot y RT-PCR

Para evaluar si la falta de efecto del estradiol sobre VEGF se debía a una alteración en la expresión de receptores estrogénicos (RE), se estudiaron por western blot en forma comparativa los niveles de expresión del receptor alfa. Pudimos comprobar a partir de homogenatos de hipófisis de ambos grupos que los RE están aumentados en hipófisis de animales KO, y que son regulables en ambos genotipos ya que su nivel de expresión disminuye en respuesta al estradiol inyectado (Figura 1.5 c, * $P = 0,044$ y § $P = 0,0007$ para los efectos de genotipo y tratamiento estrogénico; $P = 0,21$ para la interacción).

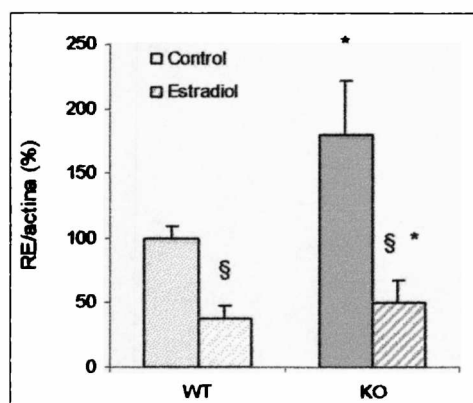


Figura 1.5: Receptor de estrógenos α (RE) determinado por western blot en homogenatos de hipófisis de hembras WT y KO para RD2 tratadas con 0,2 mg/Kg de valerato de estradiol. Los valores están normalizados con los niveles de actina en cada caso * $P < 0,05$ vs WT § $P < 0,05$ vs. Control respectivo, N = 5,7,6 y 7 para cada grupo.

Otros efectos de los estrógenos en el modelo experimental

Más aún, en contraste con otros datos reportados en la literatura, los estrógenos disminuyeron la liberación de prolactina sérica *in vivo* y su secreción *in vitro* (medida en cultivo primario de células de adenohipófisis) en ambos genotipos (Figuras 1.6 a y b, para el tratamiento con estrógenos $P = 0,0015$ y $0,00015$ y P de interacción (genotipo / estrógeno) = $0,12$ y $0,96$, para *in vivo* e *in vitro*, respectivamente).

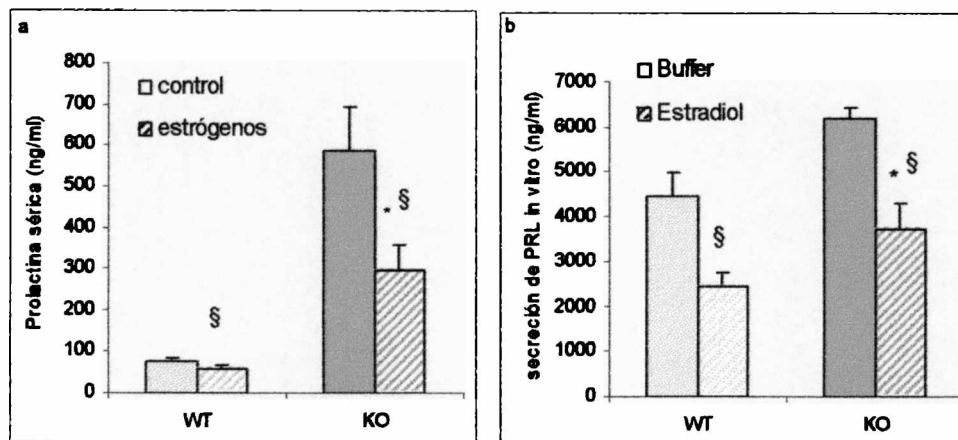


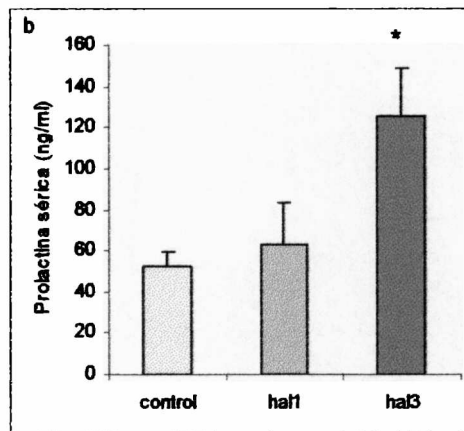
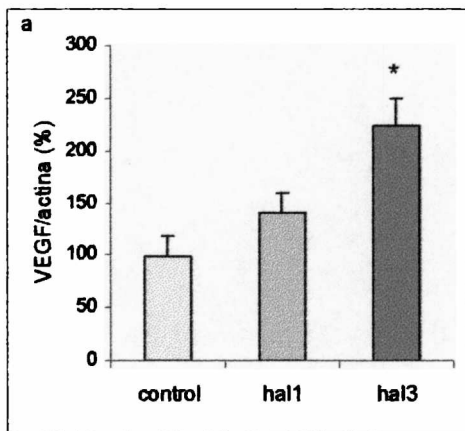
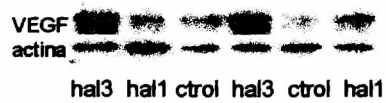
Figura 1.6: Niveles de Prolactina, en ng/ml determinados por Radioinmunoensayo en a) suero de animales tratados con 0,2 mg/Kg de valerato de estradiol o aceite y b) sobrenadantes de cultivo de células hipofisarias WT y KO tratados con 10^{-8} M de estradiol o Buffer * $P < 0.05$ vs WT con el tratamiento respectivo, § $P < 0.05$ vs. control respectivo a) $N = 29, 25, 23$ Y 22; b) $N = 4$ cultivos para cada grupo.

Efecto del sistema dopaminérgico sobre el VEGF hipofisario

Dado que los estrógenos no ejercieron influencia sobre el VEGF en el grupo de animales KO, el aumento del VEGF hipofisario observado podría estar asociado a la ausencia del RD2 y la consiguiente falta de la acción de la dopamina. Para comprobarlo inyectamos el antagonista dopaminérgico de larga duración, decanoato de haloperidol, en hembras WT durante tres semanas (hal 3, 30 mg/kg sc, una vez por semana) o haloperidol en ciclodextrina durante una semana (hal 1, 5 mg/kg intraperitoneal, todos los días). Pudimos determinar que el tratamiento más prolongado produjo un aumento

significativo de la concentración de VEGF hipofisario (Figura 1.7a, $P = 0,0029$) además del esperado incremento de la prolactina sérica (Figura 1.7b, $P = 0,0064$)

Por otra parte, el agonista dopaminérgico D2 cabergolina fue capaz de disminuir los niveles de prolactina en suero en un tratamiento de 3 semanas pero no redujo significativamente la concentración hipofisaria de VEGF en ratones hembra WT con sistema dopaminérgico intacto (Figuras 1.7d y c $P = 0,0012$ y $P = 0,57$ respectivamente).



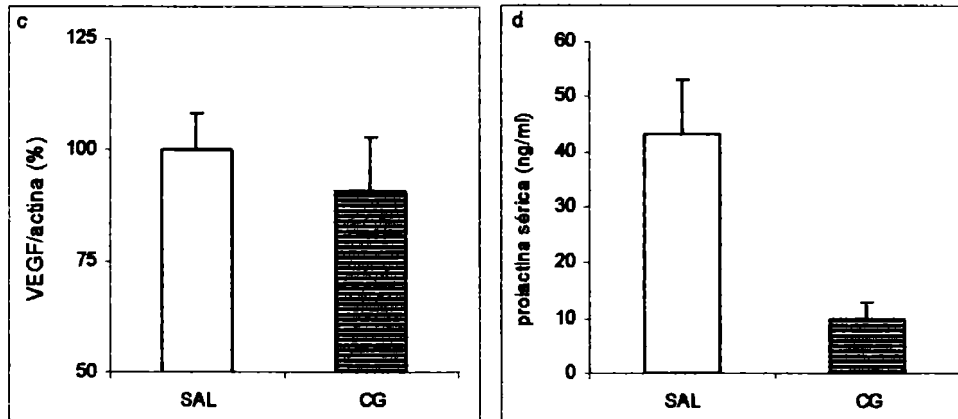


Figura 1.7: a) Efecto del tratamiento *in vivo* con haloperidol en ratones hembra WT sobre la expresión de VEGF normalizada a su actina correspondiente. b) Niveles de Prolactina sérica luego del tratamiento con haloperidol. Control: animales inyectados con vehículo (aceite), estos fueron considerados como el 100%. hal 1: tratamiento con haloperidol durante una semana, hal 3: tratamiento con haloperidol durante 3 semanas. N = 10, 7 y 6, respectivamente * P < 0,05 vs. control

Abajo: Efecto del tratamiento crónico con el agonista dopaminérgico cabergolina (CG) en hembras WT sobre c) el contenido hipofisario de VEGF y d) la prolactina sérica. N = 6 para cada grupo. * P < 0,05 vs. control (SAL)

Proliferación de células adenohipofisarias

Proliferación basal

La hiperplasia hipofisaria que desarrollan las hembras KO para el RD2 se manifiesta por un aumento en el peso de la hipófisis respecto a sus pares WT (peso en mg \pm ES: $7,03 \pm 1,39$ y $2,51 \pm 0,34$ para KO y WT respectivamente; $P = 0,011$) que se correlaciona

con un incremento en la concentración del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como pudimos determinar por western blot (Figura 1.8a, $P = 0,026$) y con el marcado aumento de la prolactina sérica (Figura 1.8b, $P = 0,0099$) junto a una desgranulación masiva de los lactotopos en las hipófisis KO respecto a las WT según se observó en inmunohistoquímica de fluorescencia para PRL(Figura 1.8c).

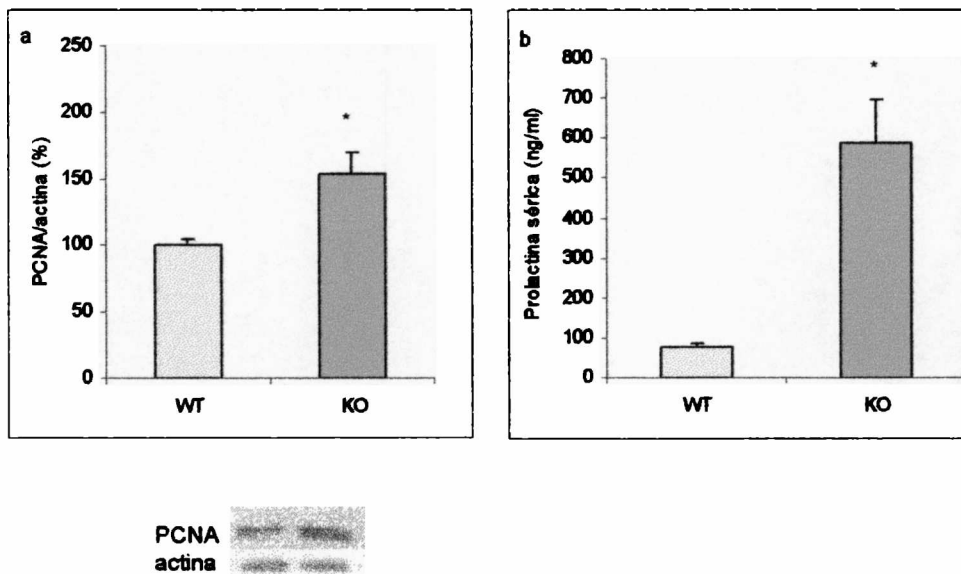
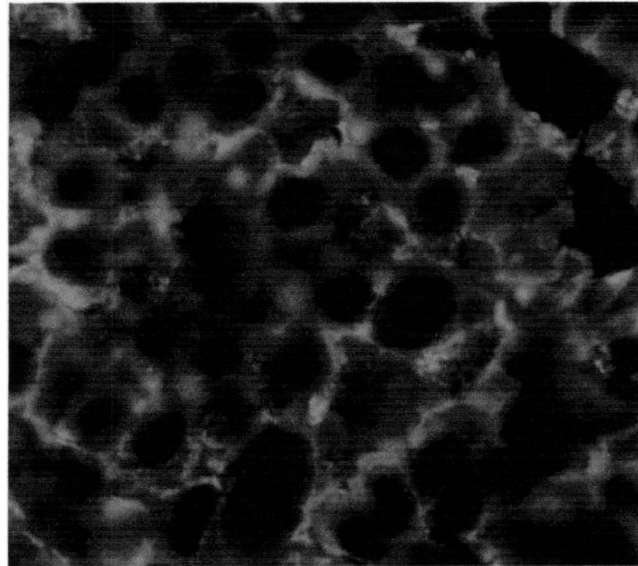
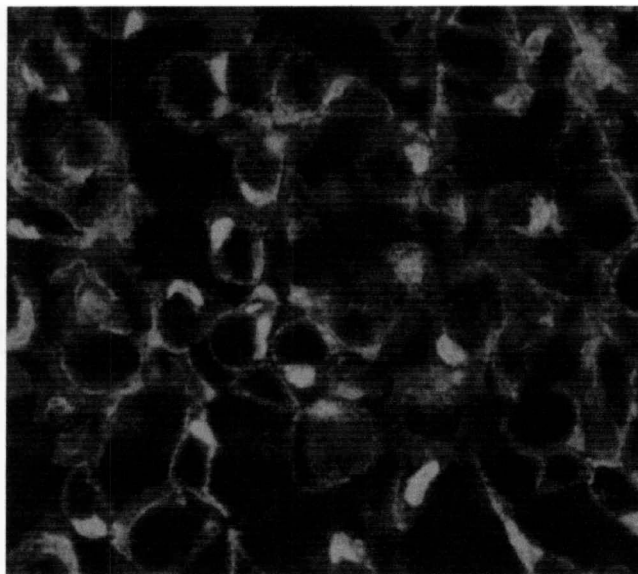


Figura 1.8: a) Niveles de PCNA determinados por western blot y normalizados con el contenido de actina en hipófisis de ratones hembra WT y KO. El promedio en el grupo WT se tomó como el 100%, N= 9 y 11 b) Niveles séricos de Prolactina en ng/ml determinados por Radioinmunoensayo en ambos grupos. * $P < 0,05$ vs. WT, N= 11 y 12.



KO



WT

Figura 1.8: c) Inmunohistoquímica representativa para PRL en cortes de hipófisis embebidas en parafina. N= 3,3 para cada genotipo.

Sin embargo *in vitro*, las células KO mostraron una menor proliferación que las WT como pudimos determinar por ensayos de proliferación con MTS e incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina cuando se realizaron cultivos primarios de células adenohipofisarias. La expresión de PCNA que medimos por Western blot también fue menor en lisados de KO provenientes de células de cultivos. (Figuras 1.9 a, b y c $P = 0,000155$; $0,039$ y $< 0,00001$ para los 3 ensayos respectivamente).

Dada la diferencia de proliferación entre genotipos, decidimos estudiar este parámetro con mayor detalle para lo cual realizamos una curva de proliferación en el tiempo empleando las mismas condiciones de cultivo que en los experimentos anteriormente mencionados: células crecidas en presencia de suero durante los primeros 5 días y depletadas del mismo durante 2 días más, y realizamos las mediciones por MTS al momento de la siembra, a las 5 hs, y a los 1, 2, 3 4, 5 y 7 días. Pudimos determinar que las células de hipófisis WT tienen una mayor velocidad de proliferación que su contraparte KO durante las primeras horas del cultivo y luego ambos grupos poseen curvas paralelas a lo largo del tiempo, indicando que sus velocidades se equiparan, manteniendo un mayor número de células en WT (Figura 1.9d; en Densidad Óptica a 490 nm: $DO \pm ES$ para WT y KO en el día 7: 0.0169 ± 0.001 y 0.068 ± 0.011 , respectivamente, $P < 0.01$). En otro grupo de experimentos, después de los primeros 5 días se hizo un cambio de medio por 4 días más también con suero y los resultados se mantuvieron.

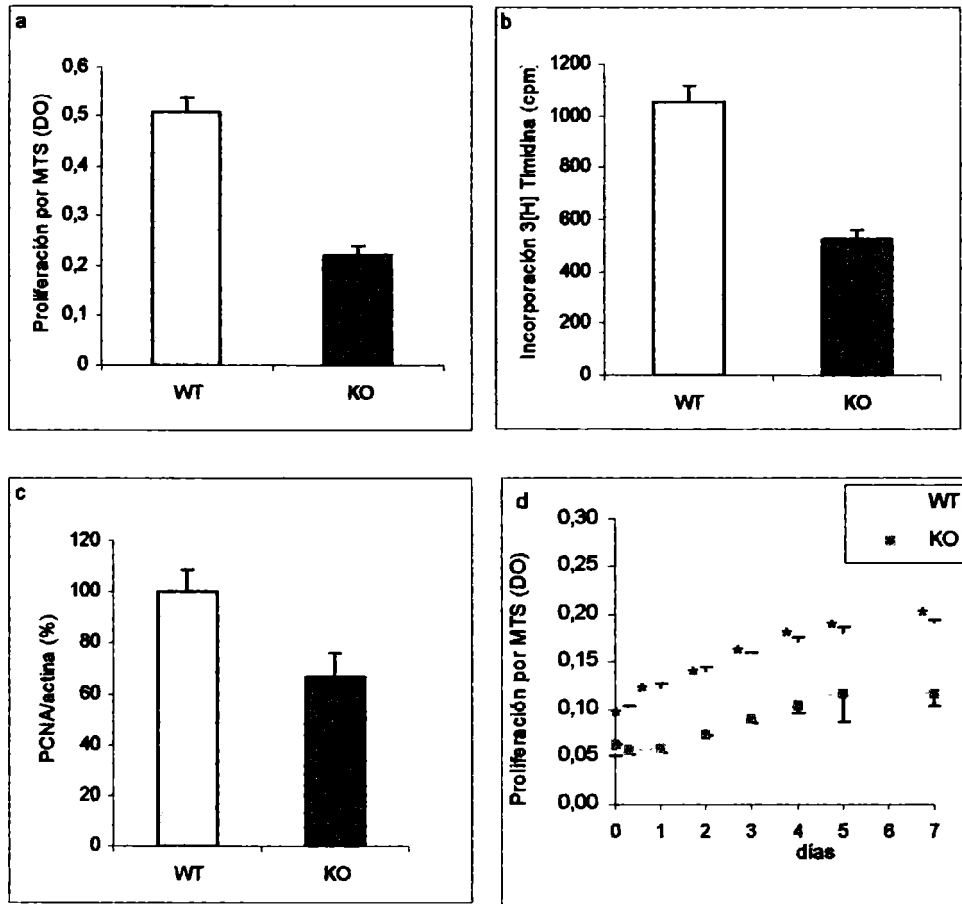


Figura 1.9: a) Ensayo de proliferación con MTS en cultivo de células adenohipofisarias WT y KO. Los resultados se expresan como densidad óptica (DO) N = 4 cultivos por genotipo, b) Incorporación de $^3\text{[H]}$ Timidina en cultivo de células adenohipofisarias (cpm) N = 9 cultivos por genotipo, c) Contenido hipofisario de PCNA en cultivo (% respecto al WT) N = 5, d) Curva de proliferación en el tiempo determinada con el ensayo de MTS sobre 35.000 células / pocillo. N = 4 cultivos por genotipo.

Proliferación inducida por VEGF

Estudiamos a continuación el efecto de VEGF sobre la proliferación de las células hipofisarias. Para ello determinamos el número de células de ambos genotipos en cultivo, en presencia y ausencia de estradiol, luego de haber sido estimuladas con 10 y 30 ng/ml de VEGF durante 48 hs. Los resultados mostraron que VEGF no modificó la proliferación en ninguno de los grupos ni en presencia o ausencia de estradiol (Figuras 1.10 a y b, $P = 0,74$ y $0,43$ para el efecto de droga en WT y KO respectivamente).

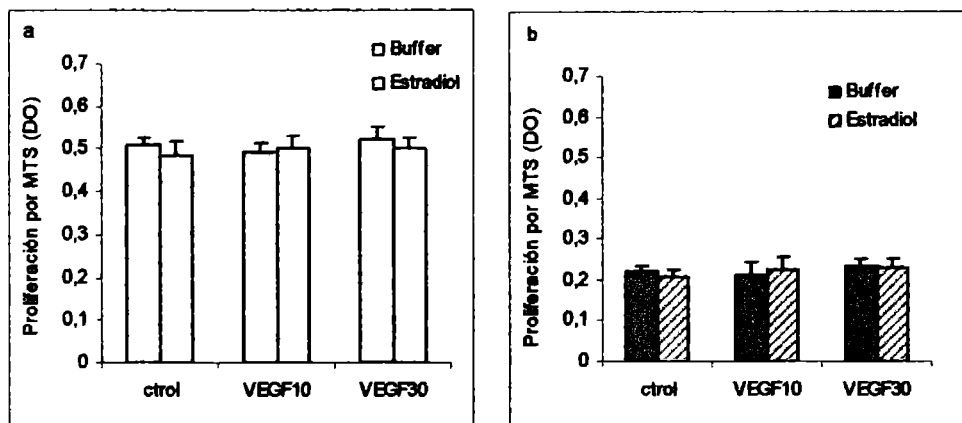


Figura 1.10: Ensayo de proliferación con MTS en células WT (a) y KO (b). Las células fueron pretratadas con buffer o estradiol 10^{-6} M por 5 días y luego del cambio de medio se dejaron crecer 48 hs más en presencia de buffer (ctrl) o con estímulo de VEGF de 10 y 30 ng/ml (VEGF10 y VEGF30) con o sin estradiol. Los resultados se expresan como DO a 490 nm. N = 4 cultivos para cada genotipo.

Efecto de VEGF sobre la secreción de PRL in vitro

Se analizó la secreción de PRL en respuesta a 10 y 30 mg/ml de VEGF en cultivo primario de células adenohipofisarias de ambos genotipos en presencia y ausencia de estradiol. El estímulo de VEGF por 48 hs en medio libre de suero no modificó la liberación de PRL en ausencia de estradiol mientras que sí lo hizo en forma significativa en presencia del esteroide en los 2 genotipos a la dosis de 10 ng/ml.

(Figuras 1.11 a y b, $P = 0,039$ y $0,027$ 10 ng/ml VEGF vs. buffer, para KO y WT respectivamente).

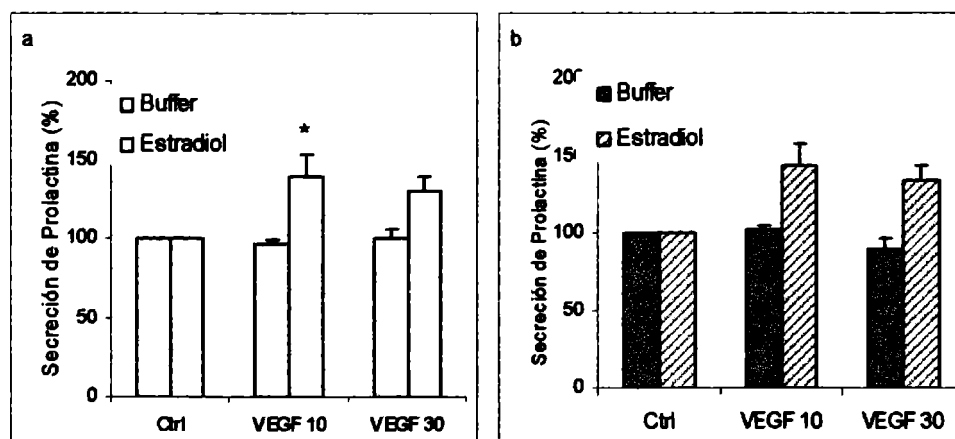


Figura 1.11: Liberación de prolactina en cultivo de células hipofisarias (a) WT y (b) KO. Las células fueron pretratadas con buffer o estradiol 10^{-8} M por 5 días y luego del cambio de medio se dejaron crecer 48 hs más en presencia de buffer (ctrl) o con estímulo de VEGF de 10 y 30 ng/ml (VEGF10 y VEGF30) con o sin estradiol. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a las células tratadas con buffer (ctrl). $N = 4$ para cada genotipo. * $P < 0,05$ vs. respectivo control.

Localización de VEGF en las hipófisis hiperplásicas

Mediante el empleo de doble Inmunohistoquímica de fluorescencia y microscopía confocal identificamos las células en las hipófisis KO productoras de VEGF. De manera interesante, VEGF colocalizó exclusivamente con la proteína S-100, marcador específico en hipófisis de células foliculo estrelladas y no lo hizo con los lactotropos, tirotropos, gonadotropos ni somatotropos. (Figura 1.12)

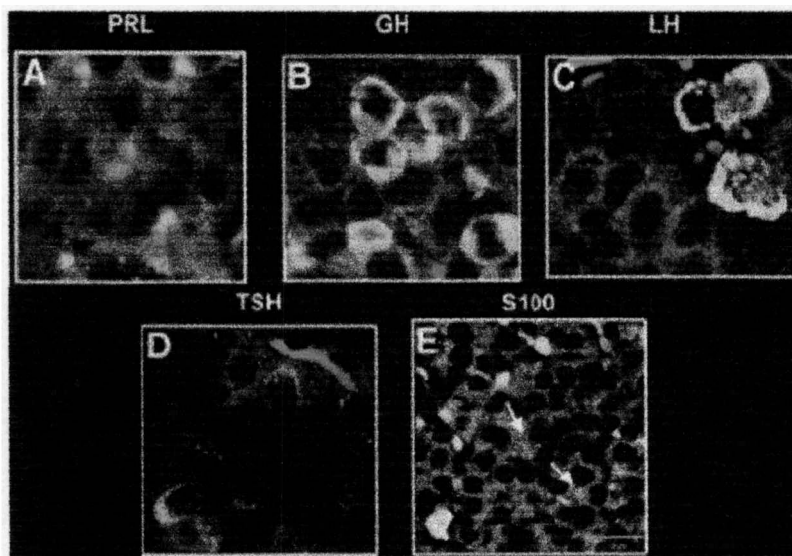


Figura 1.12: Inmunohistoquímica doble de fluorescencia con microscopía confocal en hipófisis KO. Cada imagen es representativa de al menos 3 hipófisis con 4 cortes de cada una. VEGF se ve en el canal rojo mientras que las hormonas: **A** PRL, **B** GH **C** LH **D** TSH y **E**: la proteína S-100 en el canal verde. Las flechas blancas indican las células hipofisarias con doble tinción. La magnificación es 60X con inmersión.

Células foliculo estrelladas en hipófisis de animales KO y WT para RD2

El aumento de VEGF podía deberse a un incremento en la proporción de células foliculo estrelladas en las hipófisis KO, por lo tanto determinamos por IHQ con tinción con diaminobenzidina (DAB) la expresión de S-100 en cortes histológicos de hipófisis de hembras de 8 meses de ambos genotipos. No observamos diferencias significativas en el área inmunorreactiva a S100 entre ambos genotipos, Figura 1.13 a y b

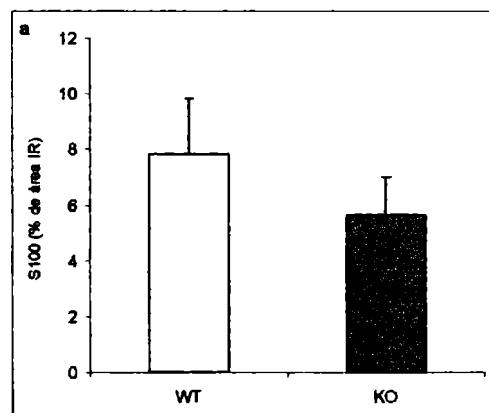
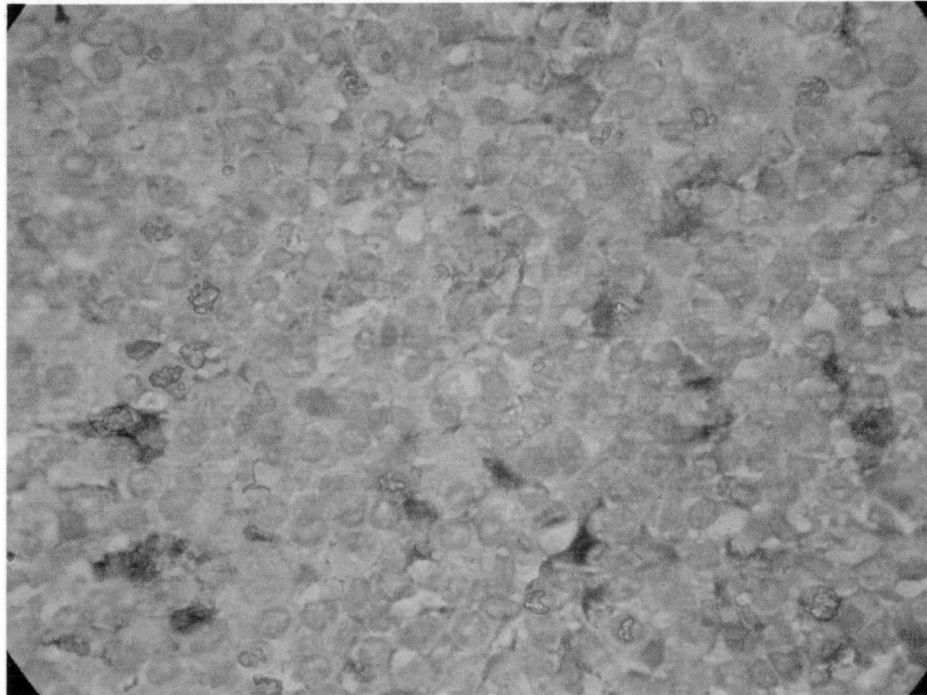
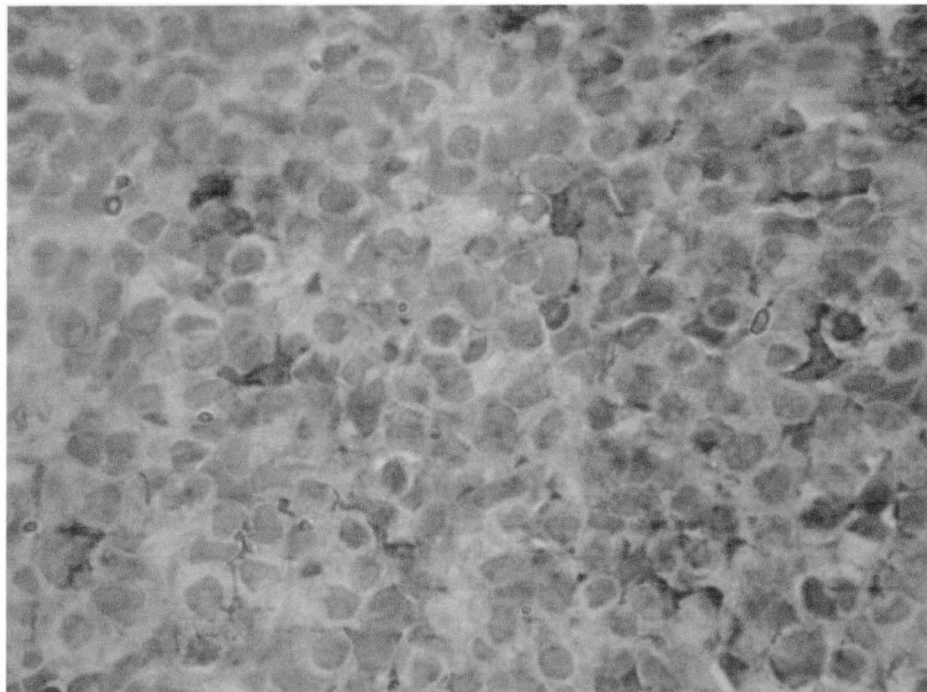


Figura 1.13: a) Cuantificación del área total con inmunorreactividad positiva para S-100 en cortes de hipófisis de hembras WT y KO para el RD2 expresado en porcentaje del área total.



KO



WT

Figura 1.13: b) Imágenes representativas de la IHQ para S-100 en KO y WT. Se reveló con DAB y se contratiñó con hematoxilina. N = 3, 3 para cada genotipo.

ACCIONES ANGIOGÉNICAS DE VEGF EN HIPÓFISIS

Proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

Las células hipofisarias liberan VEGF según pudimos determinarlo por RIA en los medios condicionados provenientes de cultivo primario (Figura 1.2b). Si bien el VEGF no modificó la proliferación de las células endocrinas como determinaríamos en 1.10 a y b, este VEGF podría estar actuando sobre el endotelio de la hipófisis estimulando la angiogénesis de la glándula. Para estudiar su capacidad angiogénica enfrentamos los medios condicionados de los cultivos primarios de células adenohipofisarias de los dos genotipos con células HUVEC y medimos la captación de [³H]-Timidina de estas células. Encontramos que los medios condicionados de los dos grupos estimularon la proliferación de las HUVEC, siendo el efecto del medio de las células KO significativamente mayor que el de las WT (Figura 1.14a $P = 0,0024$ vs células WT).

La interacción para los efectos de genotipo y pretratamiento con anti-VEGF resultó significativa ($P = 0,048$). El efecto proliferativo del medio condicionado proveniente de células KO sobre las células HUVEC fue inhibido en forma parcial con un anticuerpo antiVEGF, mientras que aplicado al medio proveniente de células WT esta inhibición no resultó significativa ($P = 0,038$ en KO y $0,23$ en WT respecto a su correspondiente buffer).

Como control positivo de proliferación y validación del anticuerpo de bloqueo usado, se estimularon las HUVEC con 3 factores angiogénicos. VEGF murino (10 ng/ml), EGF (1 ng/ml) y bFGF (2 ng/ml) los que provocaron un aumento en la captación de timidina, y

el pretratamiento con antiVEGF bloqueó la proliferación de las células sólo en el caso del estímulo de VEGF quedando demostrada la especificidad del anticuerpo (Figura 1.14.b).

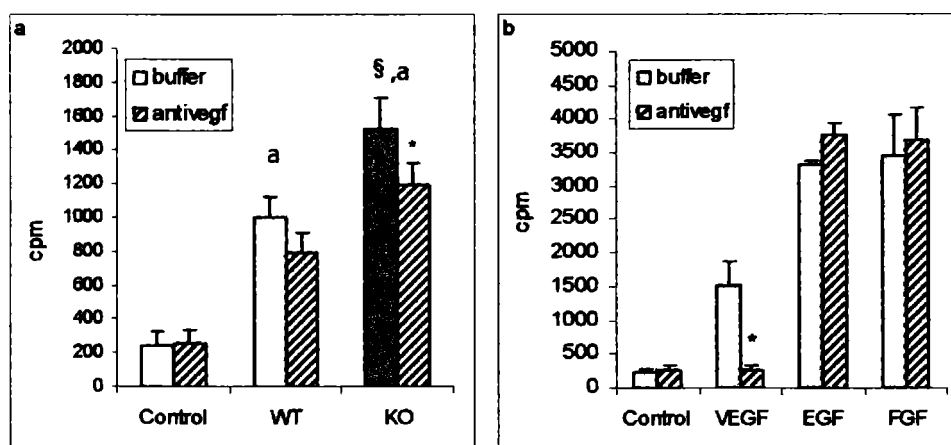


Figura 1.14: Efecto del medio condicionado obtenido de cultivo de células adenohipofisarias de hembras WT Y KO para el RD2 sobre la proliferación de células endoteliales HUVEC medida por captación de ³[H]Timidina y expresada en cpm (cuentas por minuto) a) Las HUVEC se crecieron primero hasta confluencia y luego se enfrentaron con los medios condicionados o DMEM (control) en ausencia (buffer) o presencia de antiVEGF (2,5 ug/ml) * P < 0,05 vs. buffer respectivo, § P < 0,05 vs WT Y a P < 0,05 vs control (N = 4). b) Control interno de la proliferación de HUVEC con estímulos de factores angiogénicos en ausencia y presencia del anti-VEGF.

Características de los vasos sanguíneos en hipófisis de hembras WT y KO para RD2

Para el estudio de la morfología de los vasos en hipófisis realizamos IHQ en cortes de parafina para el factor de Von Willebrand, factor de coagulación ampliamente usado

como marcador del endotelio vascular. Se reveló con DAB, obteniéndose una marca específica en endotelio que permitió diferenciar entre los vasos en las hipófisis KO, más grandes, tortuosos, y menos definidos respecto a los vasos de las hipófisis WT, pequeños y más íntegros y definidos. (Figura 1.15 a y b). Estas imágenes se correlacionan con lo ya expuesto acerca de la presencia de peliosis o zonas de extravasación de glóbulos rojos en ausencia de capilares en las hipófisis hiperplásicas (ver Figura 1.3), características que coexisten en estas hipófisis y que dan cuenta del fenotipo vascular característico que ejerce el VEGF hipofisario en este genotipo, explicado en parte por su acción de aumentar la permeabilidad de los vasos.

Avances en una terapia antiangiogénica en hipófisis ectópicas

Las terapias antiangiogénicas poseen el potencial de una terapia anticáncer, según expusimos anteriormente. Esto se debe a que la necesidad del nuevo tejido tumoral de un mayor aporte de nutrientes y oxígeno se alcanza a través del desarrollo de nuevos vasos, por lo que el bloqueo específico de los vasos intratumorales impediría que estas células crezcan en forma adecuada.

En algunos tipos de tumores, como el cáncer metastático de colon y recto, ya se ha instaurado este tipo de terapia como coadyuvante de la quimioterapia (Hurwitz *et al.* 2004).

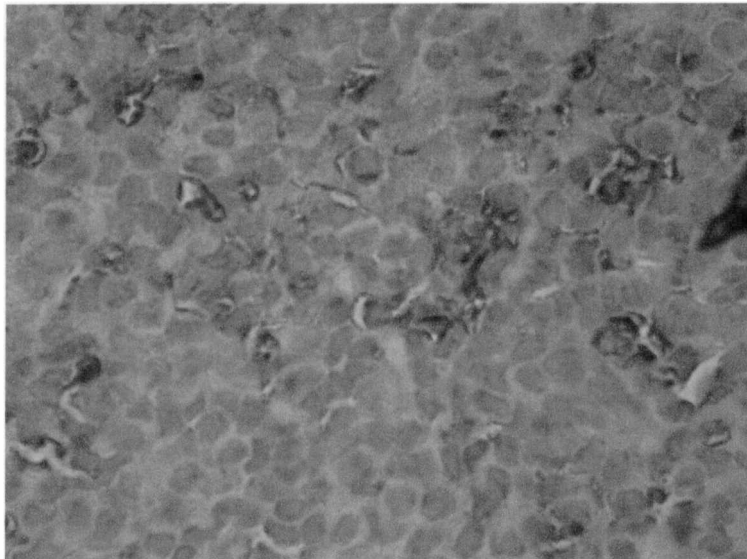
Dado el incremento de expresión de VEGF en el desarrollo de la hiperplasia de lactotrofos en las hembras KO para el RD2, decidimos llevar a cabo un protocolo de administración de VEGF-Trap, un receptor soluble de VEGF que lo captura e impide su unión al receptor de membrana.

Para hacer posible un tratamiento local transplantamos hipófisis de un animal donante KO a otro en forma subcutánea dentro de un pequeño tubo de silastic (detalles en materiales y métodos). Los animales tratados recibieron 2 μ g/20 μ l de VEGF-Trap mientras que los controles fueron inyectados con el vehículo. Los animales transplantados fueron inyectados cada 3 días durante 15 días, luego se los sacrificó y las hipófisis junto con el tejido crecido alrededor del silastic, de haberlo, fueron incluidos en parafina.

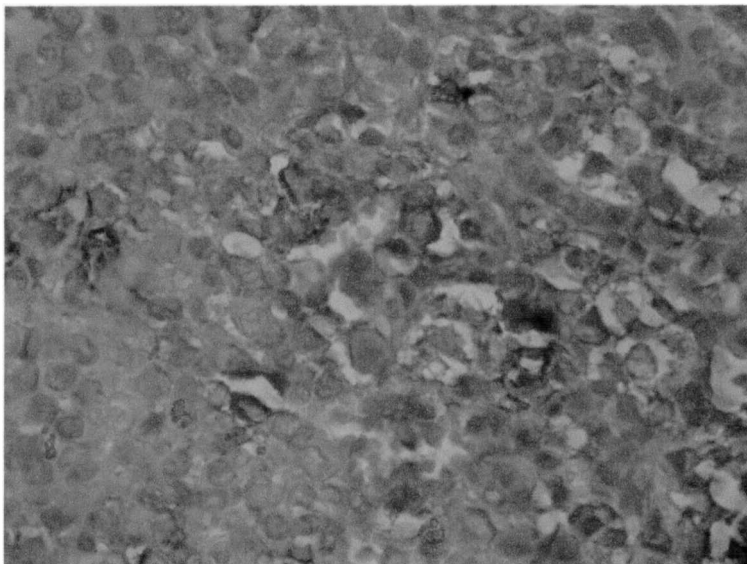
En primer lugar, observamos que los tubos subcutáneos cuyas hipófisis habían sido inyectadas con el inhibidor de VEGF estaban completamente limpios y blancos a diferencia de los inyectados con vehículo que aparecieron enrojecidos por la vascularización alcanzada como se puede ver en la Figura 1.16 a y b.

Además, al desprender la hipófisis del silastic comprobamos que los animales controles tenían un exceso de tejido crecido alrededor del tubo que no presentaban los tratados. La IHQ para PRL mostró la viabilidad del tejido y de los lactotropos en ambos grupos, y más aún, vimos presencia de células hipofisarias invadiendo el tejido fibroso circundante para el caso de los no tratados (Figura 1.16 c,d y e).

La IHQ para vWF mostró que los vasos sanguíneos de los transplantes tratados aparecieron más firmes y formados que los de los tejidos control, que presentaban vasos más tortuosos e inmaduros (Figura 1.17a y b).



a)



b)

Figura 1.15: IHQ representativa para el factor de Von Willebrand (vWF) en cortes de hipófisis de hembras WT y KO para el RD2. N = 3 y 4 para WT (a) y KO (b) respectivamente. La tinción se hizo con DAB y la contratinción con hematoxilina.

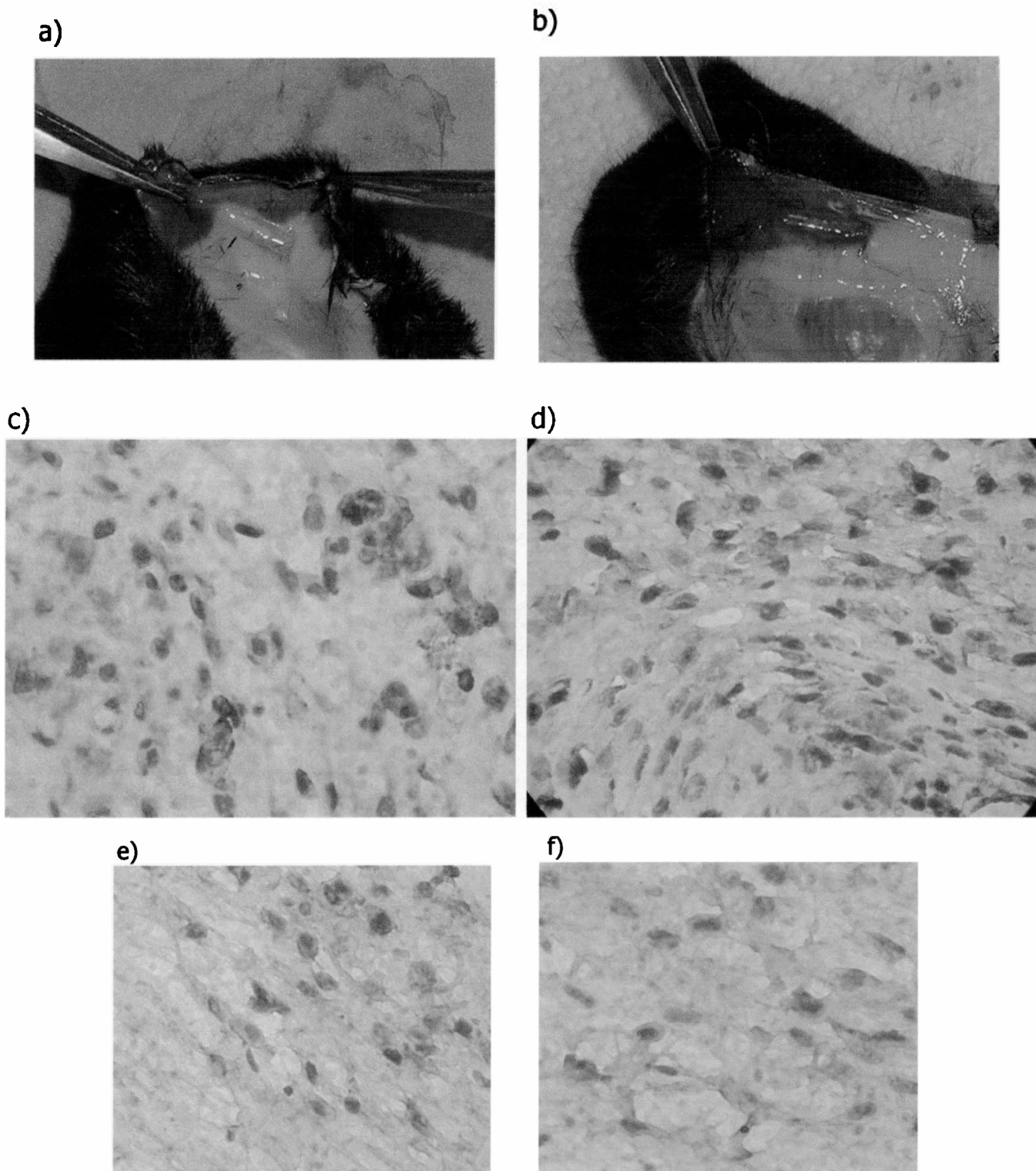
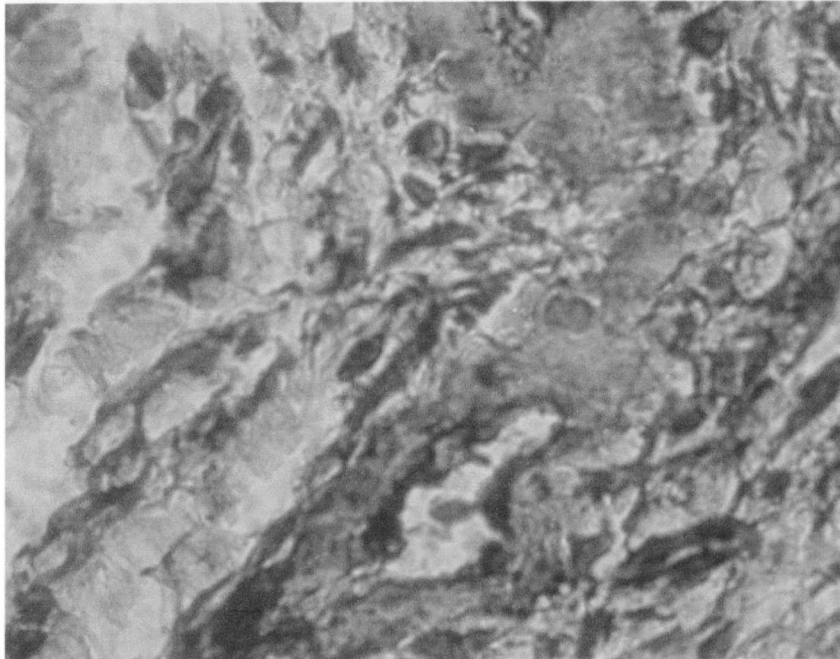
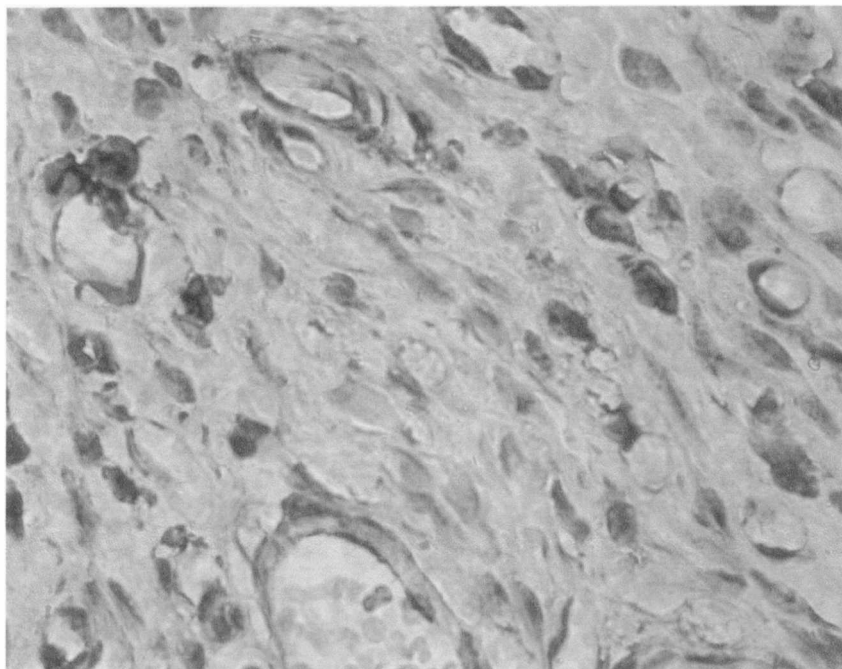


Figura 1.16: a) y b) Transplantes subcutáneos de hipófisis KO en hembras receptoras WT Inyectadas con VEGF-Trap y BSA (controles). c) y d) IHQ para prolactina en cortes de hipófisis de hembras KO transplantadas, N = 2 y 2 para VEGF-Trap y controles, respectivamente. e) Invasión del tejido desarrollado por fuera del tubo en d) con células hipofisarias positivas para PRL. f) Control negativo de la IHQ sin primer anticuerpo. La tinción se hizo con DAB y la contratinción con hematoxilina.



a)



b)

Figura 1.17: IHQ representativa para vWF en cortes de hipófisis transplantadas de hembras KO para el RD2 tratadas con BSA (a) y VEGF-Trap (b). N = 2 y 2 para BSA y VEGF-TRAP respectivamente. La tinción se hizo con DAB y la contratinción con hematoxilina.

DISCUSIÓN

VEGF es una de las citoquinas más importantes involucradas en la angiogénesis en condiciones fisiológicas y patológicas (Ferrara *et al.* 2003) . Es reconocido por su rol fundamental en el crecimiento de tumores ya que todos requieren del desarrollo de nueva vasculatura cuando su volumen sobrepasa los pocos milímetros (Folkman 1990). Por otra parte, está reportado que la dopamina ejerce un efecto antiangiogénico en el endotelio, inhibiendo las acciones permeabilizantes mediadas por VEGF al inducir la endocitosis de KDR (VEGF-R2) crítico para promover la angiogénesis (Basu *et al.* 2001). Nosotros encontramos un aumento en la expresión de VEGF en las hipófisis hiperplásicas e hipertróficas de las hembras KO para el RD2. En estudios previos en el presente modelo experimental y también en este trabajo, se observaron grandes zonas de peliosis o glóbulos rojos extravasados en ausencia de una contención de endotelio (Kelly *et al.* 1997) en las hipófisis de las hembras KO para el RD2. En forma interesante se han reportado aumentos de peliosis asociadas a alta expresión de VEGF en hepatocarcinomas (Park *et al.* 2000) , daño del bazo (Joseph *et al.* 2004) y síndrome hepático letal en ratones (Wong *et al.* 2001), éstas se han relacionado además con el aumento de permeabilidad vascular que promueve VEGF.

El aumento de VEGF en las hipófisis KO no puede deberse a una acción estrogénica como ocurre en el modelo de prolactinoma inducido por estrógenos en ratas (Ochoa *et al.* 2000) ya que en los ratones hembra KO los niveles de estrógenos se encuentran disminuidos (Kelly *et al.* 1997) (Saiardi *et al.* 1997). Y contrariamente a lo demostrado

en la línea tumoral de somatolactotropos GH3 (Ochoa *et al.* 2000), los prolactinomas inducidos por estrógenos en ratas (Banerjee *et al.* 1997) y los prolactinomas humanos (Onofri *et al.* 2004) en los que los estrógenos estimulan la producción de VEGF, en las hipófisis KO y WT para RD2 los estrógenos no ejercieron ningún efecto sobre esta proteína. Cabe destacar que los receptores de estrógenos α se encuentran sobreexpresados en hipófisis de hembras KO probablemente debido al hipoestrogenismo que presentan estos animales como consecuencia de la hiperprolactinemia crónica.

Sorprendentemente, el estradiol no aumentó los niveles de prolactina sino que por el contrario los redujo, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto está de acuerdo con los resultados de Sinha y Gilligan (Sinha & Gilligan 1982) y los de Hentges (Hentges & Low 2002) en la cepa de ratones C57BL/6. El estradiol podría estar interfiriendo con factores liberadores hipotalámicos, dando lugar a un mayor almacenamiento en los lactotropos. Nuestro hallazgo sobre la inhibición de la liberación de prolactina *in vitro* sugiere que el esteroide interfiere directamente con la función de los lactotropos. Podría alterar el clivaje proteolítico o producir alguna otra modificación postraducciona l de la prolactina que llevara a inhibir su secreción. Esta inhibición es específica de la cepa ya que las mismas dosis en la cepa 129S6 (Hentges & Low 2002) y CF1 (datos del laboratorio) sí provocaron un aumento de la prolactina sérica. En relación a estos hallazgos, se ha demostrado que la cepa de ratones C57BL/6 es algo refractaria a la tumorigénesis hipofisaria inducida por estrógenos (Shida *et al.* 1998). Estos resultados ponen de relevancia la consideración de la cepa como factor determinante en los efectos hipofisarios del estradiol.

Sin un efecto estrogénico, la falta de acción dopaminérgica sobre el receptor D2 probablemente estaba afectando la expresión de este potente factor angiogénico. En relación a ello, estaba reportada la acción antiangiogénica de la dopamina en el cáncer de estómago (Chakroborty *et al.* 2004). Demostramos que el tratamiento crónico con el antagonista del RD2, haloperidol, en ratonas WT provocó un aumento del VEGF hipofisario y de la secreción de PRL, lo que apoyaba nuestra hipótesis de la regulación de VEGF por el RD2. Por otra parte el tratamiento de otro grupo de hembras WT con el agonista dopaminérgico de larga duración más empleado, cabergolina, no llegó a reducir la concentración del VEGF hipofisario aunque sí la PRL sérica. Esto podría deberse a que en las hembras WT la dopamina hipotalámica constantemente está actuando sobre el RD2 de modo tal que una estimulación de los receptores adicional no llega a modificar los niveles de VEGF.

De manera interesante, la principal fuente de VEGF en las hipófisis hiperplásicas de las hembras KO resultaron ser las células foliculo estrelladas y no los lactotopos. En hipófisis humana normal VEGF se ha localizado en corticotropos, somatotropos y células foliculo estrelladas (Vidal *et al.* 1999; Lloyd *et al.* 2003). En hipófisis bovina y ovina se encontró VEGF en células foliculo estrelladas también (Gospodarowicz *et al.* 1989) (Jabbour *et al.* 1997), mientras que en ratas localizó en algunas células tirotropas, en los lactosomatropos tumorales GH3 y además en una línea de células foliculo estrelladas de ratón (TtT/GF) (Fan & Iseki 1998) (Lohrer *et al.* 2001; Gloddek *et al.* 1999).

Las células foliculo estrelladas representan un 5-10% de las células hipofisarias y son un componente importante en la comunicación paracrina dentro de la glándula. Originalmente fueron descritas como células no secretoras de hormonas, y se les conocen funciones de soporte, de células stem, en fagocitosis, transporte, como

moduladores paracrinos, etc. Forman folículos, y son estrelladas con largos procesos citoplasmáticos que rodean a las células secretoras de la hipófisis. En el presente trabajo demostramos que la densidad de células folículo estrelladas no varía con la generación de hiperplasia de lactotrofos, pero sí varía su capacidad de producir VEGF.

Testeamos luego si el VEGF sobreexpresado en las hipófisis de las hembras KO estaba actuando sobre la proliferación de las células endócrinas hipofisarias. Los receptores de VEGF (VEGF-R1 o Flt-1 y VEGF-R2 o KDR) se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales (Ferrara & Davis-Smyth 1997) aunque existe un reporte de la expresión de VEGF-R2 en las células endócrinas hipofisarias de rata (Vidal *et al.* 2002).

Nuestro primer hallazgo fue una menor proliferación basal *in vitro* de las células KO respecto a las WT, según pudimos determinar por 3 métodos distintos como se describió anteriormente. Este resultado no está de acuerdo con la mayor proliferación que existe *in vivo* representada por el aumento de los pesos hipofisarios (Diaz-Torga *et al.* 2002) y de la concentración de PCNA hipofisarios como demostramos en las hembras KO. Esta mayor proliferación de las hipófisis KO *in vivo* es seguramente el resultado de la acción de factores de crecimiento que tienen mayor acceso a las células debido al desarrollo de los nuevos vasos inducidos por factores angiogénicos como el VEGF. Por otra parte, la mayor proliferación *in vitro* de las células WT podría deberse a la pérdida abrupta de la inhibición dopaminérgica sobre los lactotrofos al ponerlas en cultivo. Consistente con esta interpretación, encontramos que las diferencias en la velocidad de proliferación entre genotipos se daban únicamente en las primeras horas después de sembrar las células y luego las curvas de proliferación eran paralelas.

VEGF no estimuló la proliferación de las células hipofisarias en presencia o ausencia de estradiol, resultado que está de acuerdo con el gran número de reportes que señalan

que VEGF es un mitógeno potente de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos pero que no tiene efecto mitogénico sobre otros tipos celulares (Ferrara & Davis-Smyth 1997).

VEGF sólo estimuló la secreción de PRL por las células adenohipofisarias en presencia de estrógenos en el medio de cultivo, en relación a esto es sabido que un ambiente estrogénico modifica la sensibilidad de los lactotrofos frente a estímulos e inhibidores de la secreción de PRL (Freeman *et al.* 2000). No obstante, el efecto de VEGF sobre la liberación de PRL no había sido descrito hasta el momento.

Por lo tanto, VEGF podría estar aumentando la capacidad secretoria de la glándula pero no actuaría directamente en la proliferación de las células endócrinas. En cambio, podría estar ejerciendo su efecto angiogénico y permeabilizador en las células endoteliales de la hipófisis. En relación a esta hipótesis pudimos determinar secreción de VEGF por las células hipofisarias de ambos grupos en cultivo siendo ésta mayor en las células KO y, si bien ambos medios condicionados indujeron la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana, el efecto fue abolido en forma parcial pero significativa sólo para el caso de KO, cuando los medios condicionados se inmunoneutralizaron específicamente para VEGF. Estos resultados estarían indicando que el VEGF producido por las células foliculo estrelladas de las hipófisis KO podría estar actuando en forma paracrina sobre sus células blanco, las endoteliales de los vasos hipofisarios, contribuyendo al desarrollo de la angiogénesis de la glándula y por lo tanto brindando un mayor aporte de oxígeno y nutrientes a las células hiperplásicas. En relación a esto y además de la presencia de peliosis como manifestación de la excesiva permeabilidad que otorga VEGF a los vasos, observamos una mayor tortuosidad y área vascular para el

caso de la vasculatura en las hipófisis hiperplásicas, otra característica asociada al efecto de VEGF sobre las células endoteliales.

Finalmente, el tratamiento con el inhibidor de VEGF, VEGF-Trap modificó las características de los vasos sanguíneos en hipófisis KO transplantadas subcutáneamente. Se observó una menor tortuosidad y mayor integridad de los vasos sanguíneos en las hipófisis transplantadas y tratadas en comparación con las no tratadas, indicando probablemente que el bloqueo de la acción de VEGF sobre el endotelio modificaría las características a los vasos en hipófisis KO. Estos resultados son de gran interés para dilucidar las consecuencias que tendría el bloqueo de la angiogénesis en hipófisis tumorales ya que VEGF podría convertirse en un futuro en el blanco terapéutico para aquellos adenomas de hipófisis que no responden a los tratamientos convencionales.

En conclusión, describimos un aumento de la expresión de VEGF en las hipófisis KO para RD2, aumento regulado por la falta de acción dopaminérgica. Este hallazgo es de gran importancia ya que posiciona al sistema VEGF/KDR como blanco terapéutico en los adenomas hipofisarios secretores de PRL y resistentes a agentes dopaminérgicos.

CAPÍTULO 2

2. GEN TRANSFORMANTE TUMORAL HIPOFISARIO (pttg)

INTRODUCCIÓN

Pttg fue aislado y caracterizado por PCR de display diferencial a partir de células GC y GH4, líneas provenientes de tumores hipofisarios de rata productores de GH y PRL respectivamente (Pei & Melmed 1997). PTTG se expresa en altos niveles en tejidos activos con alta tasa de proliferación como los linfopoyéticos y testículos (Heaney *et al.* 1999) y en distintos tipos de tumores humanos incluyendo los de hipófisis, tiroides, colon y mama (Zhang *et al.* 1999a; Yeates 1949) (Saez *et al.* 1999)

En tumores hipofisarios humanos se encontró que los niveles de PTTG se correlacionaban con la invasividad del tumor, lo que sugería su acción como un activador transcripcional y transformante potente. Además se demostró que PTTG estimula la producción de FGF-2 (McCabe *et al.* 2003) e induce la angiogénesis (McCabe *et al.* 2002). La estimulación de FGF-2 por PTTG teóricamente sería suficiente para explicar los casos de tumorigénesis por PTTG, sin embargo no está claro cuál es el iniciador ya que un aumento de expresión de cualquiera de estos dos factores resulta en un incremento en la expresión del otro.

En hipófisis de ratas estrogenizadas se detectó la expresión de PTTG en las alteraciones tempranas de los lactotropos, durante la conversión de células normales a hiperplásicas e hipertróficas, y también en los comienzos del establecimiento de la angiogénesis, evento fundamental en el desarrollo tumoral (Heaney *et al.* 1999).

Los ratones knockout para pttg son viables y fértiles pero desarrollan hipoplasia de testículo, bazo e hipófisis (Wang *et al.* 2001). Por otro lado, la sobreexpresión de PTTG produce transformación de células NIH 3T3 *in vitro* y el desarrollo de tumores en ratones nude inyectados con fibroblastos transfectados con pttg (Pei & Melmed 1997). Cabe destacar que los animales transgénicos con sobreexpresión de PTTG dirigida a hipófisis presentan hiperplasia focal hipofisaria (Donangelo *et al.* 2006).

La acción de securina que ejerce PTTG en los tejidos de mamíferos y explicada en detalle en la introducción general de esta tesis, requiere que la proteína sea degradada durante la mitosis para lograr una correcta separación de las cromátides hermanas (Zou *et al.* 1999). Cuando este proceso de degradación no se realiza en forma eficiente o completa, como en el caso de sobreexpresión de PTTG, se produce un intercambio de material genético inadecuado entre dichas cromátides lo que causa inestabilidad genética y predispone a eventos de tumorigénesis (Yu & Melmed 2004). De esta manera, el exceso o la disminución de PTTG conducen a alteraciones en el ciclo celular y aneuploidía (Melmed 2003).

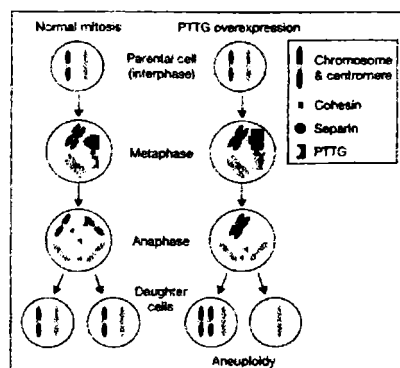


Ilustración tomada de (Yu & Melmed 2004). Mecanismo de la generación de aneuploidía en el caso de sobreexpresión de PTTG.

El aislamiento de pttg en células tumorales hipofisarias ha causado un interés considerable en el estudio del rol de PTTG en la patogénesis de los tumores hipofisarios. Se ha descrito en estos adenomas, sin discriminar el tipo de hormona que secretan, niveles de expresión mayores de PTTG respecto a los de la hipófisis normal (Hunter *et al.* 2003) (McCabe *et al.* 2002) (McCabe *et al.* 2003). Sin embargo, no queda claro el papel de PTTG en los prolactinomas; existe controversia sobre su sobreexpresión en este tipo de tumores hipofisarios (Zhang *et al.* 1999a) (Hunter *et al.* 2003), y no hay información en prolactinomas resistentes.

Por lo tanto, considerando nuestros resultados anteriores sobre factores angiogénicos y la hiperplasia hipofisaria del ratón KO para RD2, la relación de PTTG con angiogénesis y que no existen datos en la literatura sobre la relación de PTTG con el sistema dopaminérgico, decidimos estudiar los niveles de PTTG en distintos modelos de prolactinomas. Elegimos tres modelos diferentes de hiperplasia hipofisaria de lactotrofos con alteración del sistema dopaminérgico: a- ratones hembra KO para el RD2, b- ratas tratadas con estrógenos en forma crónica y c- ratas seniles (senescentes). Los tres modelos comparten la hiperprolactinemia, el desarrollo de una hiperplasia de lactotrofos y una acción dopaminérgica reducida o nula (Kelly *et al.* 1997) (Goya *et al.* 1991) (Sanchez *et al.* 2003).

También estudiamos la expresión de PTTG en prolactinomas humanos sensibles y resistentes a la terapia con agonistas dopaminérgicos. Los pacientes con prolactinomas resistentes al tratamiento farmacológico convencional deben ser sometidos a cirugía hipofisaria vía transesfenoidal o transcraneal según las características y el tamaño del tumor lo requieran. Es por eso que el estudio de los factores involucrados en la regulación de la proliferación de los lactotrofos y la angiogénesis brinda nuevos posibles

blancos terapéuticos para el tratamiento de los prolactinomas y especialmente para los que son resistentes o intolerantes a los agonistas dopaminérgicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas Seniles Se utilizaron ratas de 28-31 meses (seniles) y ratas jóvenes de 5 meses, hembras de la cepa Sprague Dawley. Las ratas seniles fueron obtenidas de la colonia gerontológica del INIBIOLP, Universidad de La Plata. Allí el tiempo de vida promedio de las hembras es de 33 meses (32 – 34 meses)

Ratas tratadas con DES Un grupo de hembras de 60 días de la cepa Sprague Dawley fue implantado en forma subcutánea con pellets de 20 mg de dietilestilbestrol (DES) lo que les generó a partir de la cuarta semana una hiperplasia hipofisaria de lactotropos. Otro grupo de ratas fue usado como control.

Pacientes con Prolactinomas sensibles y resistentes a agonistas dopaminérgicos
Se obtuvo material de cirugía hipofisaria de 20 pacientes con macroprolactinomas bajo normas éticas y con consentimiento informado del paciente. Fueron 14 mujeres y 6 hombres, con edad promedio al diagnóstico de $23,4 \pm 1,7$ y $39,5 \pm 4,4$ respectivamente. La PRL sérica de los pacientes antes de comenzar el tratamiento farmacológico resultó en promedio 2302 ng/ml con un rango entre 70 y 16.000 ng/ml. Los pacientes fueron divididos en sensibles (N = 6) y Resistentes (N = 14) a los agonistas dopaminérgicos de acuerdo a su capacidad o no de normalizar la PRL sérica. Se indicó cirugía hipofisaria, además de a los pacientes resistentes a dopamina, a los que mostraron síntomas de expansión tumoral, defectos visuales, dolores de cabeza o intolerancia al tratamiento farmacológico.

Aislamiento de ARN y reacción de RT en muestras de prolactinomas humanos: El tejido tumoral fue conservado en nitrógeno líquido hasta su utilización. Se efectuó la extracción del ARN total con Trizol, a partir de unos 100 mg de tumor homogenizados con un pulverizador de tejido (Mikro-Dismembrator, B. Braun Biotech Internacional, Melsungen, Alemania) La concentración de ARN se midió en espectrofotómetro a 260nm y la integridad del ARN se evaluó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio. Se retrotranscribió 1 ug de ARN en una mezcla de reacción de 40 ul finales con 100 U de MML V, 50 pmoles de cebadores oligodT, 0,2 mM de dNTPs y 20 U de inhibidor de ribonucleasas. La reacción se llevó a cabo a 37 °C 60 min y a 95 °C por 5 min.

PCR en tiempo real Las reacciones se prepararon de acuerdo a los protocolos estándares de único paso de RT-PCR de QuantiTect SYBR Green (Qiagen). La mezcla de reacción de 20 ul se compuso de 10 ul de de la master mix 2X provista por el fabricante, los primers específicos en concentración 1 uM, 0,2 ul de la QuantiTect RT y 80 ng de molde. Las condiciones de la reacción de RT fueron de 30 min a 50°C y 15 min a 95°C. Las características de la reacción de PCR se encuentran detalladas en la siguiente tabla:

Gen	secuencia del cebador directo (5'→3')	ubicación	secuencia del cebador indirecto (5'→3')	ubicación	Longitud del producto (pb)	ciclos	Temp annealing
PTTG1 humano	CGATGCCCCACC AGCCTTACC	195-215	CAAGCTCTCTCT CCTCGTCAAGG	489-511	317	40	57°C
ER-α humano	TCCAGCACCTG AAGTCTCT	1749-1768	TCTCCAGCAGCA GGTCATAG	1970-1989	241	40	63°C
G3PDH humano	GCCAAAAGGGTC ATCTC	271-290	GCAGGGATGATG TTCTGGAG	532-551	281	32	57°C

Análisis estadístico Los resultados están expresados en promedios \pm SEM. Se usó el test de Student y un $P < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Características de la hiperplasia hipofisaria de lactotrofos en los tres modelos experimentales

Los **ratones hembra KO para RD2** mostraron un aumento del peso hipofisario como también de la PRL sérica cuando se los comparó con sus pares WT a los 8 meses de edad. (Figuras 2.1 a y b, $P = 0,011$ para peso hipofisario y $0,010$ para PRL sérica).

Las **ratas seniles de 32 meses** de edad también presentaron un aumento significativo del peso de la hipófisis y de la PRL en suero respecto a las ratas jóvenes de 2-3 meses de vida, pero estos aumentos fueron más moderados que los observados en los ratones hembra KO para RD2 (Figuras 2.1 c y d, $P = 0,05$ para ambas determinaciones).

Y por último, **las ratas tratadas con pellets de estrógenos en forma crónica** durante 6 semanas experimentaron un crecimiento rápido de la glándula y presentaron los niveles más altos de PRL en suero (Figura 2.1 e y f, $P = 0,01$ para los 2 parámetros ensayados).

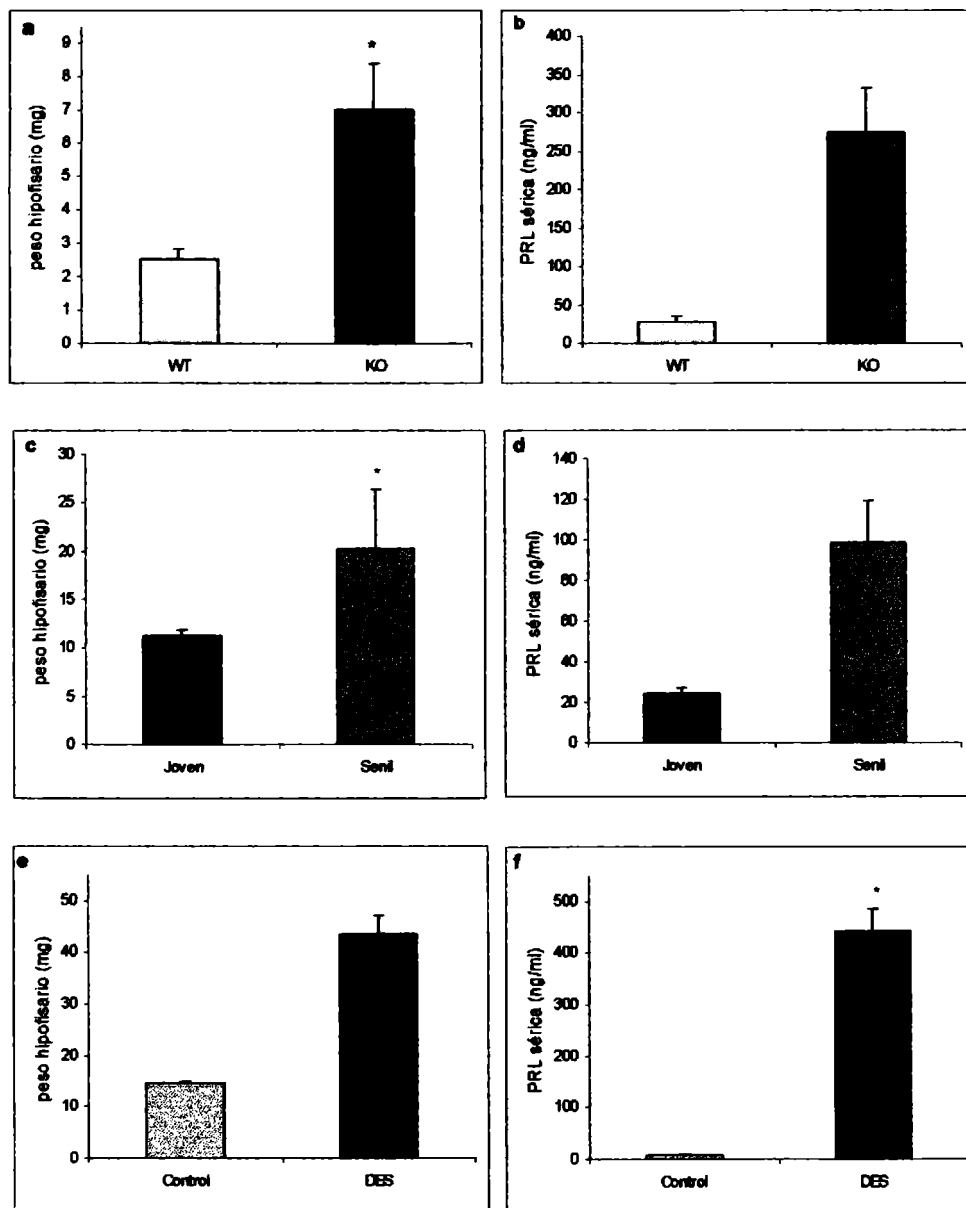


Figura 2.1: Promedio del peso hipofisario (mg) y de la PRL sérica (ng/ml) en los distintos modelos experimentales de hiperplasia de lactotropos empleados. a y b) ratones hembra WT y KO para RD2, c y d) ratas jóvenes de 3 meses y seniles de 32 meses de edad, y e y f) ratas adultas controles e implantadas con cápsulas subcutáneas de 20 mg de dietilestilbestrol (DES).

Pacientes con prolactinomas sensibles y resistentes a agonistas dopaminérgicos

Los pacientes con prolactinomas fueron clasificados, según su capacidad para normalizar los valores de PRL sérica mediante el uso de agonistas dopaminérgicos, en sensibles y resistentes a dicho tratamiento (Figura 2.2)

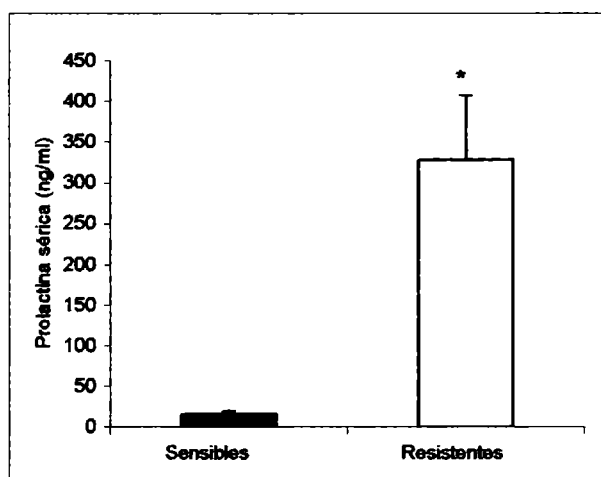


Figura 2.2: Niveles de PRL sérica en ng/ml para pacientes sensibles y resistentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos (N= 7 y 12 respectivamente). * P < 0,05.

PTTG en la hiperplasia de ratones hembra KO para RD2

Se estudió el oncogen pttg a nivel de la expresión de la proteína que codifica y del ARN mensajero en ratones hembra de 8 meses de edad. Para abordar el estudio de la proteína se realizaron homogenatos de adenohipófisis que después de la cuantificación

de las proteínas totales fueron sometidos a la técnica de western blot. Al comparar los niveles de expresión de PTTG entre genotipos encontramos una disminución de esta proteína en hipófisis KO respecto a sus pares WT (niveles relativizados a la expresión de actina, Figura 2.3a, $P = 0,00057$).

Para el análisis del ARNm se extrajo el ARN total y luego de su cuantificación se realizó una RT-PCR semicuantitativa. No encontramos por este método diferencias entre genotipos en los valores de ARNm para *pttg* relativizados a los de G3PDH (Figura 2.3b).

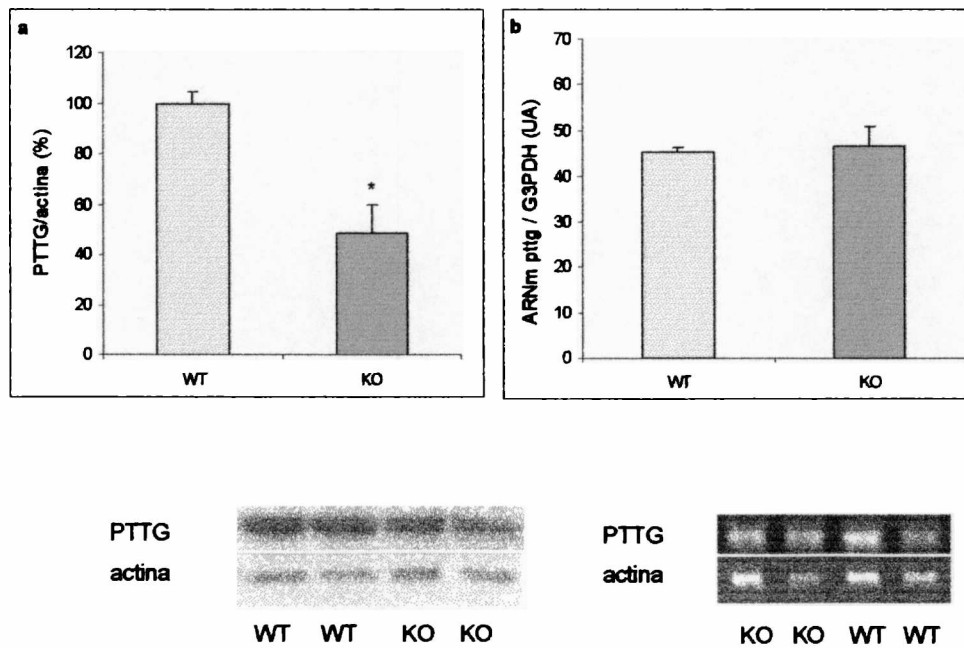


Figura 2.3: a) Contenido hipofisario de PTTG en ratones hembras WT y KO para RD2. La intensidad de la banda de PTTG para cada muestra se normalizó a la de actina correspondiente y en cada serie de experimentos el promedio de intensidades para las hipófisis WT se consideró como el 100%. * $P < 0,05$ vs. WT; $N = 12$ y 15 , respectivamente. b) Análisis de las intensidades de banda para los productos de RT-PCR para *pttg* en hipófisis de ratones KO y WT, en este caso

se hizo una normalización con el ARNm de G3PDH * $P < 0,05$ vs. +/+; N= 5 and 5. Debajo de cada gráfico: bandas representativas de western blot y RT-PCR respectivamente.

PTTG en la hiperplasia de ratas senescentes

En las ratas senescentes no observamos diferencias significativas al analizar el contenido hipofisario de PTTG por ensayos de western blot a partir de homogenatos de hipófisis y compararlos con los de ratas jóvenes (Figura 2.4)

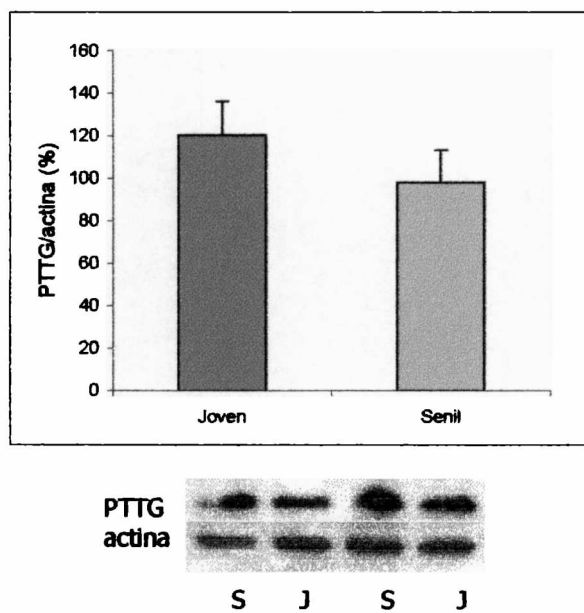


Figura 2.4: Niveles de PTTG en hipófisis, evaluados en forma comparativa en ratas jóvenes y seniles. La intensidad de la banda de PTTG expresada en unidades arbitrarias, se relativizó a la

intensidad de la banda de actina para cada muestra. Para cada experimento, el promedio de las intensidades de banda en las ratas jóvenes se consideró como el 100% * P <0,05 vs. joven; N = 5 y 5 respectivamente. Abajo: bandas obtenidas por western blot en un experimento representativo

PTTG en la hiperplasia de ratas tratadas con estrógenos

Las ratas jóvenes tratadas con estrógenos en forma crónica, por el contrario, mostraron un aumento significativo del contenido de PTTG hipofisario cuando se lo comparó con ratas controles. La expresión de PTTG en homogenatos se normalizó a la expresión de actina (Figura 2.5, P = 0,029)

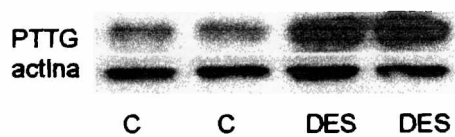
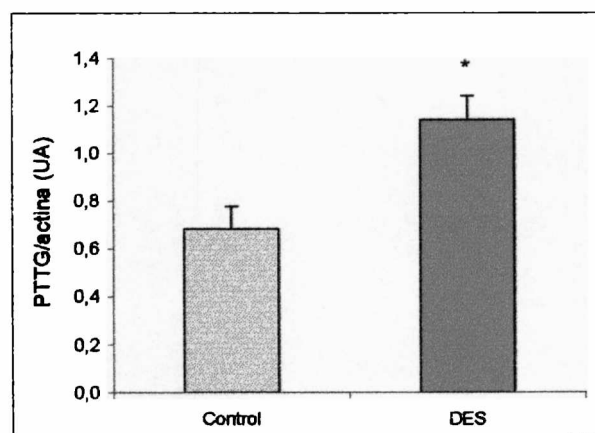


Figura 2.5: Niveles de PTTG en hipófisis evaluados en forma comparativa en ratas jóvenes controles y tratadas con estrógenos sintéticos (DES). La intensidad de la banda de PTTG, expresada en unidades arbitrarias (UA), se relativizó a la intensidad de la banda de actina para cada muestra. Para cada experimento, el promedio de las intensidades de banda en las ratas control se consideró como el 100% * P <0,05 vs. Control; N = 12 y 12 para cada grupo. Debajo: western blot representativo de PTTG y su actina correspondiente.

Pttg en prolactinomas humanos

Estudiamos los niveles de ARN mensajero para pttg en adenomas secretores de prolactina sensibles y resistentes a dopaminérgicos. Para ello parte del material obtenido mediante cirugía transesfenoidal fue sumergido en Trizol y congelado hasta el momento de la obtención de ARN, el cual a su vez fue sometido a una reacción con retrotranscriptasa. El producto de la retrotranscripción fue amplificado por Real Time PCR con primers específicos y visualizado con Syber Green. No hallamos diferencias en los niveles del mensajero para pttg (normalizados a los de GAPDH) entre los grupos de tumores estudiados (Figura 2.6).

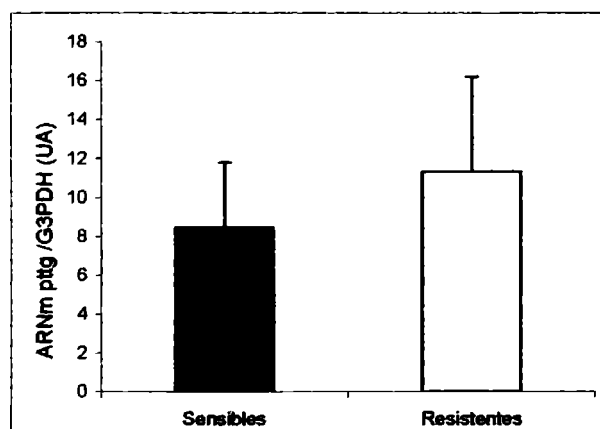


Figura 2.6: niveles de ARNm de pttg evaluados por PCR en tiempo real en muestras de prolactinomas obtenidas en cirugías de pacientes sensibles (N =8) y resistentes (N = 13) al tratamiento con agonistas dopaminérgicos. La intensidad de la banda de pttg se relativizó a la de G3PDH para cada muestra.

Niveles estrogénicos y del receptor de estrógenos α en modelos animales de prolactinomas

En las **hembras KO para RD2** los niveles séricos de estrógenos son más bajos que en sus pares WT y su acción también se ve disminuida como demuestran los escasos ciclos estrales que presentan. De acuerdo con esto, hallamos una expresión incrementada de receptores de estrógenos α en homogenatos de hipófisis en las hembras KO al estudiarlo en forma comparativa con animales WT y esto probablemente se debe a un mecanismo compensatorio por los bajos niveles séricos del esteroide (Figura 2.7a, P = 0,047).

En las **ratas seniles** de 32 meses de vida los niveles de estrógenos en suero resultaron ser levemente mayores que en las ratas jóvenes de 3 meses pero esta diferencia no llegó a ser significativa (senescentes $36,5 \pm 1,8$ pg/ml y jóvenes $28,9 \pm 2,6$ pg/ml). Por su parte la expresión de los receptores de estrógenos en las hipófisis de estos 2 grupos no mostraron diferencias (Figura 2.7b).

Por el contrario, las **ratas tratadas con DES** en forma crónica tienen niveles farmacológicamente elevados del esteroide en suero, y de acuerdo con esto,

encontramos bajos niveles de expresión de receptores para estrógenos en adenohipófisis (Figura 2.7c, $P < 0,0001$).

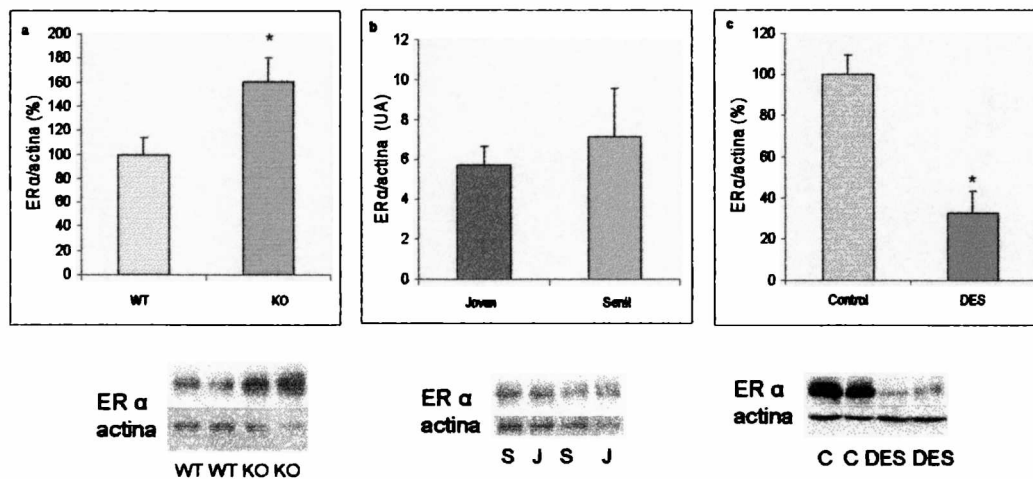


Figure 2.7: Receptor de Estrógenos α hipofisario evaluado en forma comparativa por western blot para los tres modelos experimentales de hiperplasia hipofisaria empleados. a) ratones hembra WT y KO para RD2 b) ratas hembras jóvenes y seniles y c) ratas controles y tratadas con estrógenos (DES) * $P < 0,05$ vs. su control respectivo. N= a) 10, 9; b) 6, 5; c) 7, 11 respectivamente.

Niveles del receptor de estrógenos α en prolactinomas humanos

Se determinó el nivel de ARN mensajero para los receptores de estrógenos α en los prolactinomas humanos sensibles y resistentes a agonistas dopaminérgicos, y a pesar de observar una tendencia a valores superiores en los adenomas resistentes, esta diferencia no resultó ser significativa (Figura 2.8)

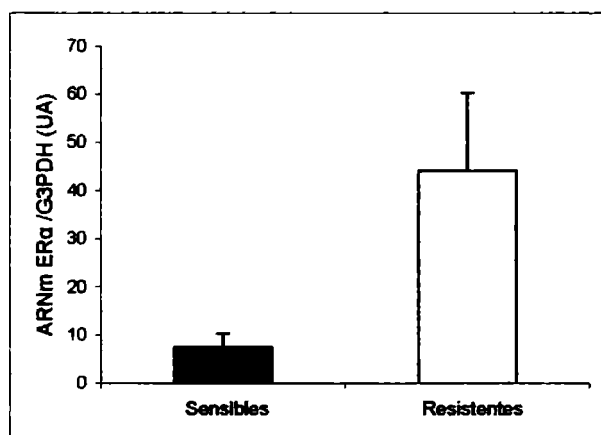


Figura 2.8: Niveles de ARNm del receptor de estrógenos α (ER α) en muestras de prolactinomas humanos sensibles y resistentes a agonistas dopaminérgicos. N = 4 y 10 respectivamente.

DISCUSIÓN

PTTG fue aislado a partir de células hipofisarias tumorales de rata secretoras de GH y PRL (Pei & Melmed 1997) y rápidamente se demostró su expresión en los adenomas hipofisarios humanos y en el modelo de prolactinomas en ratas tratadas con estrógenos en forma crónica (Heaney *et al.* 1999).

Los tumores hipofisarios humanos tienen mayores niveles de ARN mensajero para pttg que las hipófisis normales siendo los tumores secretores e invasores del hueso esfenoides o del seno esfenoidal los que expresan mayores niveles de este mensajero (Zhang *et al.* 1999a). Sin embargo McCabe y colaboradores, usando RT-PCR cuantitativa, no pudieron determinar una correlación entre el ARN mensajero y el tamaño o la invasividad del tumor (McCabe *et al.* 2003). Otros autores demostraron mayores niveles del mensajero de pttg en los somatotropinomas y adenomas no funcionantes cuando fueron comparados con los demás subtipos de tumores hipofisarios y sólo hallaron correlación entre los niveles de GH y los de PTTG entre todos los adenomas secretores de hormonas (Hunter *et al.* 2003). La expresión de PTTG ha sido ligada también a la recurrencia de los tumores hipofisarios aunque existe controversia en relación a este punto también.

Por otra parte, la expresión de PTTG para el caso de los prolactinomas y en particular para los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos no había sido estudiada en detalle.

Si bien la expresión de PTTG ha sido asociada a estadios tempranos del desarrollo de la hiperplasia hipofisaria de ratas tratadas con estrógenos (Heaney *et al.* 1999), los

resultados de esta tesis demuestran que una sobreexpresión de PTTG no es requisito para el desarrollo de hiperplasia en diferentes modelos experimentales con función dopaminérgica disminuida o nula, ni en prolactinomas humanos resistentes a la terapia con agonistas del receptor dopaminérgico comparados con prolactinomas sensibles al tratamiento.

Los ratones hembra KO para el receptor dopaminérgico D2 desarrollan hiperplasia hipofisaria de lactotropos e hiperprolactinemia como resultado de la falta de acción de la dopamina sobre este tipo celular (Kelly *et al.* 1997). El crecimiento de las hipófisis de las hembras KO no se encontró asociado a la expresión de PTTG dado que este oncogen se observó disminuido a nivel proteico en las hipófisis KO respecto a sus pares WT. Por ello podríamos inferir que la angiogénesis en las hipófisis hiperplásicas en hembras KO no estaría mediada por PTTG. En este modelo, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos necesarios para satisfacer los mayores requerimientos del tejido en proliferación dependería del VEGF, que, según pudimos demostrar, se encuentra aumentado debido a la ausencia de control inhibitorio dopaminérgico (Capítulo 1). Por su parte, los niveles de ARNm de pttg no mostraron diferencias al compararlos en las hipófisis de ambos genotipos, lo que sugiere ante los menores niveles de la proteína en el grupo KO, una regulación postraducciona de PTTG, como por ejemplo una mayor degradación de la proteína a través del sistema de la ubiquitina y proteasoma en las hipófisis de estas ratonas. De alguna manera este tipo de regulación podría ser un mecanismo de control frente al desarrollo de la hiperplasia en las hembras KO para RD2.

Por otra parte, la hiperprolactinemia crónica que impacta sobre la función gonadal sería la responsable de los escasos ciclos estrales y los bajos niveles de estrógenos circulantes

en estas hembras. El promotor de pttg en ratón contiene elementos respondedores a estrógenos aportando un potencial mecanismo para la inducción de pttg. Los bajos niveles estrogénicos en las hembras KO deben resultar insuficientes para estimular la expresión de dicho gen.

En las ratas hembras seniles es muy común la aparición de hiperplasia hipofisaria y adenomas de lactotropos. (Goya *et al.* 1991). El origen de estos tumores proviene de una pérdida progresiva de las neuronas tuberoinfundibulares y paraventriculares dopaminérgicas (Sanchez *et al.* 2003). El nivel de estrógenos circulantes en las hembras seniles no resultó ser significativamente mayor al nivel hallado en las ratas jóvenes por lo cual parecería no ser el causante directo de la hiperplasia. Sin embargo los estrógenos a lo largo de la vida estarían modificando la acción del sistema dopaminérgico, ya que si se ovariectomizan las hembras a los 4-5 meses la ocurrencia de prolactinomas en la senilidad es menor.

No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de PTTG hipofisario en las ratas senescentes respecto a las jóvenes, esto indica que PTTG no estaría participando en el desarrollo de la hiperplasia de lactotropos en estas hembras. No existen en la literatura trabajos sobre factores angiogénicos en hipófisis de ratas seniles.

La administración de estrógenos en forma crónica en ratas promueve el desarrollo de hiperplasia hipofisaria y tumores de lactotropos con aumento de la síntesis y secreción de PRL (Diaz-Torga *et al.* 1998b) (De Nicola *et al.* 1978). Las dimensiones del tumor y los niveles séricos de PRL varían según la sensibilidad a estrógenos de la cepa de rata utilizada.

Con el desarrollo de la hiperplasia se producen algunos cambios histológicos que van desde una hipertrofia de lactotropos y distorsión de las fibras de reticulina a una vacuolización acompañada de ruptura de estas fibras, más pleomorfismo nuclear característico de un verdadero adenoma (De Nicola *et al.* 1978) (Heaney *et al.* 1999).

Los estrógenos provocan daños directos en la hipófisis reduciendo la sensibilidad a la dopamina (Gudelsky *et al.* 1981) y a nivel hipotalámico afectan a las neuronas dopaminérgicas (Sarkar *et al.* 1982).

En concordancia con otros autores (Heaney *et al.* 1999), en las ratas tratadas con estrógenos encontramos un aumento en la expresión de PTTG a nivel hipofisario.

Por lo tanto, los tres modelos experimentales de hiperplasia hipofisaria comparten el aumento del tamaño hipofisario, la hiperprolactinemia y la disminución del tono dopaminérgico, pero la expresión de PTTG sigue un patrón diferente.

Por otra parte, no encontramos diferencias en la expresión de PTTG entre los prolactinomas humanos resistentes a dopamina comparados con la de aquellos tumores sensibles a la terapia. Este resultado se correlaciona con los anteriormente expuestos para los modelos experimentales, donde el tono dopaminérgico reducido a nivel hipofisario se asocia a hiperprolactinemia e hiperplasia hipofisaria pero no necesariamente a un aumento en la expresión de PTTG. Comparando entonces los resultados en los tres modelos experimentales y en humanos, el aumento en la expresión de PTTG en los prolactinomas inducidos farmacológicamente por estrógenos no se relacionaría a la disminución del tono dopaminérgico sino a la acción estrogénica a nivel hipofisario.

Medimos los receptores estrogénicos a nivel hipofisario con la intención de establecer una relación entre los niveles de estrógenos circulantes, su acción en hipófisis y la expresión de PTTG en la glándula. Es sabido que la expresión de estos receptores es dinámica y varía de acuerdo a los niveles circulantes de estradiol. Por ello, el nivel de receptores de estrógenos es sensible a los distintos estados fisiológicos en las hembras. El ligando mismo controlaría la síntesis y degradación de su receptor por mecanismos transcripcionales, post transcripcionales y traduccionales (Kaneko *et al.* 1993) (Borras *et al.* 1994). Entre todos ellos, el mecanismo de regulación más rápido es la degradación del receptor mediante la inducción del sistema del proteasoma (Alarid *et al.* 1999).

Nuestros resultados muestran que el único modelo animal de prolactinoma de los estudiados que tiene bajos niveles de receptores de estrógenos es el de las ratas tratadas farmacológicamente con estrógenos en forma crónica lo que indica una regulación negativa ejercida por el esteroide sintético administrado. Por su parte, las hipófisis de los ratones hembra KO para el RD2 mostraron una expresión aumentada de los receptores de estrógenos α cuando se compararon con su contraparte WT, correlacionando con niveles de estrógenos reducidos en suero y una reducción en la fertilidad. En las ratas seniles no se encontraron modificaciones en los niveles de receptores estrogénicos, ni en los niveles séricos de estrógenos cuando se compararon con los resultados obtenidos en ratas jóvenes. Y en los prolactinomas humanos resistentes a agonistas dopaminérgicos los niveles de receptores de estrógenos hipofisarios no difieren de los hallados en prolactinomas sensibles a la terapia.

Al evaluar en conjunto los resultados de todos los grupos observamos que PTTG se encuentra sobreexpresado únicamente cuando existe una acción estrogénica incrementada a nivel hipofisario como es el caso de las ratas bajo la acción farmacológica de los estrógenos en correlación con una reducción de sus receptores hipofisarios.

Por lo tanto nuestros resultados nos llevan a concluir que el aumento en la expresión de PTTG o de su ARNm no es una característica común en la hiperplasia de los lactotrofos en los modelos animales en los cuales el tono dopaminérgico está reducido, ni en prolactinomas humanos resistentes a agonistas dopaminérgicos al ser comparados con los tumores sensibles a la terapia. De esta manera, PTTG no se relaciona con los niveles séricos de prolactina ni con una falla del sistema dopaminérgico a nivel de la hipófisis pero sí es sensible al afecto de los estrógenos a nivel hipofisario.

Por lo tanto, si bien el PTTG se asocia a una alta tasa de proliferación para el caso del modelo de prolactinomas generados por tratamiento con estrógenos, no estaría participando en el desarrollo de los prolactinomas donde la causa es un defecto en el control inhibitorio mediado por dopamina. PTTG ha sido encontrado incrementado en otros tipos de tumores hipofisarios humanos como los somatotropinomas pero, según demostramos, no ocurre lo mismo en los prolactinomas resistentes a la terapia al ser comparados con los sensibles.

Finalmente, es probable que los distintos tipos de tumores hipofisarios se generen por diferentes mecanismos moleculares, esto hace que sea necesario determinar cuáles son los factores de crecimiento, oncogenes y factores angiogénicos asociados a cada tipo de tumor para poder delinear una terapia particular para cada caso y cada paciente en forma individual.

CAPÍTULO 3

3. FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO-2 (FGF-2)

INTRODUCCIÓN

FGF-2 pertenece a una gran familia de factores de crecimiento capaces de unirse a heparina que comprende al menos 22 miembros estructuralmente relacionados (Okada-Ban *et al.* 2000) . FGF2, con propiedades mitogénicas, actúa en una gran variedad de procesos biológicos incluyendo desarrollo de tejidos, diferenciación celular (Kardami 1990), angiogénesis (Folkman & Klagsbrun 1987) y formación de tumores (Moscatelli *et al.* 1986) entre otros.

Existen varias isoformas de FGF-2 debido al inicio de la traducción en sitios CUG alternativos. En humanos se producen cuatro isoformas de 18, 22, 22,5 y 24 KDa siendo la de 18 KDa predominantemente citoplasmática aunque también puede encontrarse en la matriz extracelular, mientras que las isoformas de alto peso molecular presentan localización nuclear (Renko *et al.* 1990; Li *et al.* 1992). Recientemente se ha reportado una nueva isoforma de 34 KDa producida por inicio de la traducción en un nuevo codón CUG (Arnaud *et al.* 1999).

A pesar de que ninguna de ellas tiene secuencia señal de secreción, se han descrito vías alternativas para la liberación de FGF-2 de la célula (Renko *et al.* 1990) .

Existen cuatro receptores transmembrana de alta afinidad para FGF (FGFR1 a FGFR4) con actividad intrínseca de tirosina quinasa (Moscatelli 1987). Estos receptores se encuentran en la membrana plasmática de muchos tipos celulares incluyendo el endotelio donde FGF2 ejerce sus funciones angiogénicas. El FGFR1 se expresa en la hipófisis humana normal como así también en los adenomas hipofisarios (Abbass *et al.*

1997) y resulta de interés su estudio en las hipófisis hiperplásicas de las hembras KO para RD2 ya que ha sido propuesto como posible marcador de tumores hipofisarios junto a PTTG (Tfelt-Hansen *et al.* 2006)

De forma interesante, se ha reportado que la dopamina actuando vía el RD2, estimula la expresión de FGF2 en algunas áreas del cerebro como corteza prefrontal e hipocampo (Fumagalli *et al.* 2003). Además, durante la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson se produce una depleción de FGF2 con retención de inmunorreactividad para FGFR1 en neuronas de la sustancia nigra (Tooyama *et al.* 1993).

El FGF2 tiene varias acciones a nivel hipofisario. Media el efecto proliferativo de los lactotrofos en la hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos en ratas, y regula la secreción de PRL y TSH en condiciones normales (Baird *et al.* 1985). En la línea celular tumoral GH3 es capaz de estimular la secreción de PRL pero no de GH (Black *et al.* 1990) .

En hipófisis, FGF2 es principalmente producido por las células folículoestrelladas(Oomizu *et al.* 2004), pero la regulación del FGF2 por RD2 en la hipófisis no ha sido reportada.

Continuando con nuestros estudios sobre la participación de factores angiogénicos en la hiperplasia de lactotrofos decidimos estudiar el FGF2 ya que su síntesis está muy relacionada a la de PTTG y VEGF, es un modulador clave de la angiogénesis, y no hay trabajos que demuestren su regulación por el RD2 en hipófisis. Por lo tanto, se evaluó la expresión de dicho factor y de su receptor FGFR1 en los ratones hembra KO y WT para RD2. Además se analizó la participación de FGF2 en la secreción de PRL, la proliferación

celular y la fosforilación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) en forma comparativa en los dos genotipos. Y, finalmente determinamos la localización subcelular de FGF2 asociada a la hiperplasia.

RESULTADOS

Acciones de FGF2 in vitro

- Secreción de PRL en cultivo de células adenohipofisarias.

Las hipófisis de ratones hembra KO y WT para RD2 de ocho meses de edad fueron disgregadas como se explicó en capítulos anteriores y las células obtenidas se sembraron a razón de 35.000 células/pocillo. Luego de 5 días de cultivo se cambió el medio y se agregó el estímulo de FGF2 en concentraciones de 1 y 10 ng/ml que se mantuvo durante 48 hs. En los sobrenadantes de cultivo de ambos grupos se midió la PRL liberada por las células por radioinmunoensayo.

Como puede observarse en la figura 3.1 las células KO secretaron mayores niveles de PRL que las células WT, tanto en condiciones basales como en presencia de FGF2, ($P = 0,0002$ y $0,0096$ para el factor genotipo y el tratamiento de 10 ng/ml de FGF2, respectivamente). Sin embargo, el aumento de secreción por FGF2 respecto al basal mostró un patrón similar para los dos genotipos (P de Interacción 0,83).

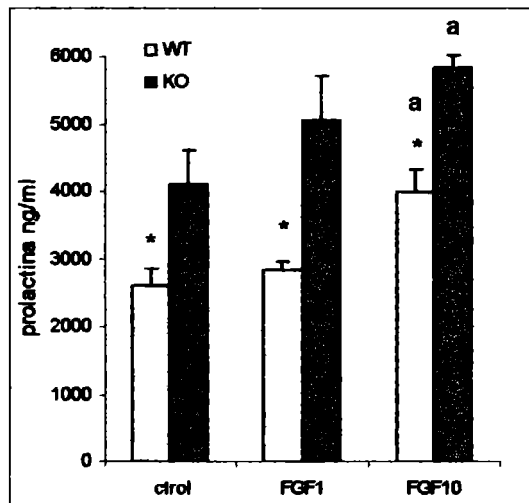


Figura 3.1: Prolactina secretada al medio de cultivo por células wildtype (WT) y knockout (KO) en condiciones basales (ctrl) o estimuladas por FGF2 (FGF1 y FGF10 corresponden a 1 y 10 ng/ml respectivamente). Los resultados están expresados en ng/ml, * $P < 0,05$ vs. KO y ^a $P < 0,05$ vs. control (ctrl) para los dos genotipos. N = 4 cultivos con muestras por cuadruplicado en cada grupo.

- Proliferación de células adenohipofisarias

Evaluamos el efecto de FGF2 sobre la proliferación en cultivo de células adenohipofisarias *in vitro* en forma comparativa en los distintos genotipos. Para ello empleamos dos técnicas, una colorimétrica como es el ensayo de proliferación con MTS (Figura 3.2a) y otra radiactiva como es la incorporación de Timidina tritiada (Figura 3.2b).

Ambos ensayos arrojaron resultados similares, un aumento de la proliferación frente a un estímulo de FGF2 de 10 ng/ml, sin diferencias de respuesta entre genotipos. Para los ensayos de MTS los resultados se muestran como % de la densidad óptica de cada

pocillo con respecto a la densidad óptica de células del mismo genotipo tratadas con buffer (Figura 3.2a, $P = 0,0061$ para 10 ng/ml de FGF2 y P de interacción = 0,82). Para captación de timidina los resultados están expresados como % del promedio de las cpm medidas para un mismo tratamiento respecto al promedio de las cpm del control respectivo ($P = 0,0042$ para el tratamiento de 10 ng/ml de FGF2 para ambos genotipos).

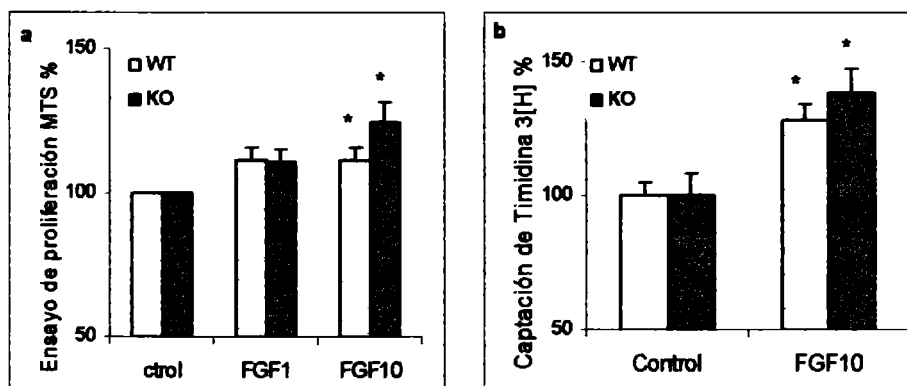


Figura 3.2: a) Ensayo de proliferación por MTS en cultivo de células adenohifisarias de ratones hembra WT y KO para RD2. Las células fueron estimuladas durante 48 hs con buffer (ctrl) o FGF2 (1 o 10 ng/ml, FGF1 y FGF10 respectivamente). * $P < 0,05$ vs. ctrl. $N = 4$ para cada grupo. b) Efecto de 10 ng/ml de FGF2 sobre la incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina en células hipofisarias en cultivo. ($N=7, 6$ para WT y KO, respectivamente). * $P < 0.05$ vs. control respectivo.

Concentración hipofisaria de FGF2

Se determinó la concentración de FGF2 en homogenatos de hipófisis de ratones hembra KO y WT mediante la técnica de ELISA. Los extractos hipofisarios fueron previamente purificados por tratamiento con Heparina-Sepharosa como se explicó anteriormente en

materiales y métodos. Comprobamos que las hipófisis KO tienen un menor contenido de FGF2 que sus pares WT (Figura 3.3a, $P=0,00011$, los valores fueron normalizados por μg de proteína).

También se midió la concentración de FGF2 en lisados de células adenohipofisarias luego de ser cultivadas durante 5 días, obteniéndose resultados similares, una menor concentración de FGF2 en células provenientes de animales KO respecto a las WT (Figura 3.3b, $P = 0,00014$, los valores también se normalizaron por μg de proteína)

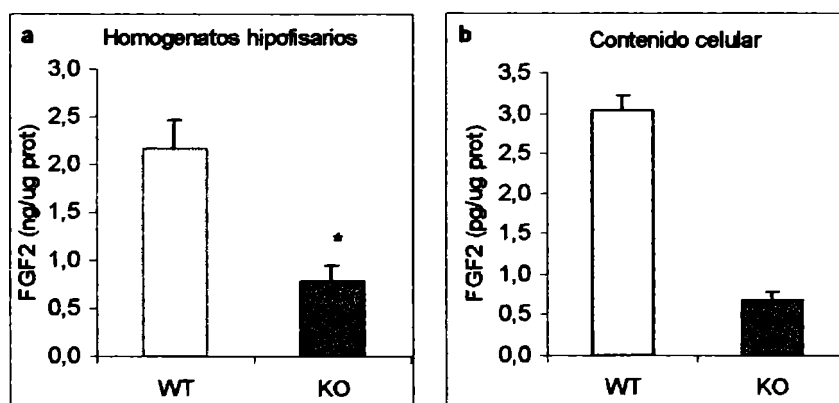


Figura 3.3: Concentración basal de FGF2 en a) homogenatos hipofisarios y b) lisados de células hipofisarias de ratones hembra WT y KO determinado por ELISA. * $P < 0,05$ vs WT; $N=9,10$ para homogenatos y $N=3,3$ para los lisados celulares.

Localización de FGF2 en hipófisis de animales KO y WT para RD2

Hipófisis de ratones hembra de ambos grupos fueron fijadas en formalina e incluidas en parafina, y a partir de secciones de $4 \mu\text{m}$ se realizaron inmunohistoquímicas de fluorescencia específicas para el factor FGF2 (Ver materiales y métodos). Como era de esperar según nuestros resultados de ELISA, observamos una menor marcación para

FGF2 en los tejidos KO respecto a los WT. Pero además, a través de esta técnica pudimos evidenciar y cuantificar una localización diferencial de la proteína en los 2 grupos de animales. FGF2 mostró una localización predominantemente nuclear en las hipófisis de las hembras KO mientras que en las WT se detectó principalmente en citoplasma. Los índices nucleares (núcleos positivos sobre núcleos totales como se explicara en más detalle previamente) fueron $32,4 \pm 5,1$ % in KO y $24,3 \pm 2,3$ % en WT, $P = 0,027$.

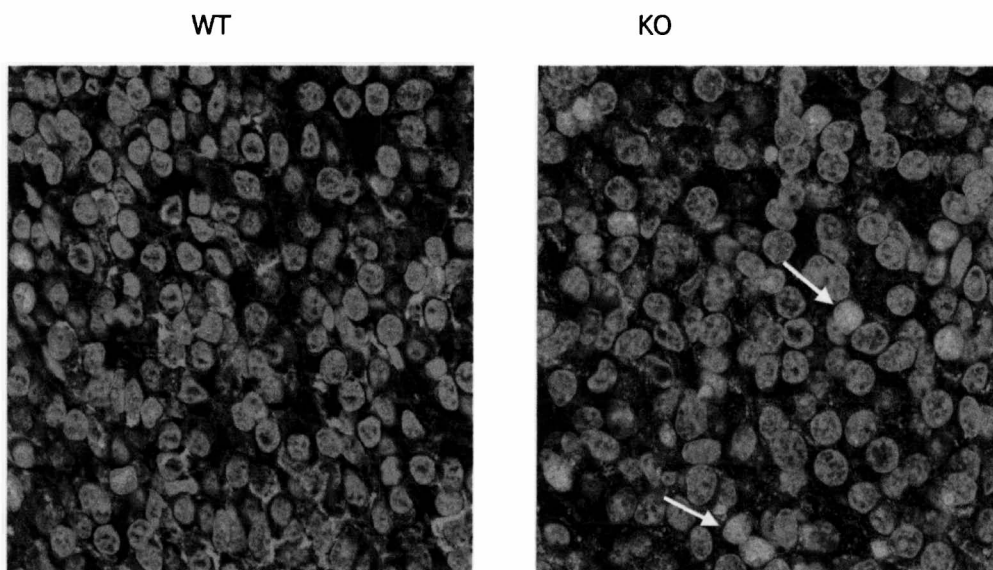


Figura 3.4: Inmunohistoquímica de fluorescencia para FGF2 en cortes de hipófisis de hembras WT y KO. Cada imagen representa el patrón promedio obtenido en al menos tres hipófisis para cada grupo. FGF2 se visualizó en el canal verde con un segundo anticuerpo acoplado a FITC mientras que en rojo se detectan los núcleos con una contratinción con yoduro de propidio.

Niveles de FGFR1 hipofisarios

Medimos por *Western Blot* en forma comparativa en ambos genotipos la expresión del FGFR1 en homogenatos de hipófisis de ratones hembra. Los niveles de receptor fueron normalizados a la expresión de actina de las muestras (Figura 3.5). Encontramos un aumento significativo en la expresión del FGFR1 en las hipófisis KO respecto a las WT ($P = 0,034$)

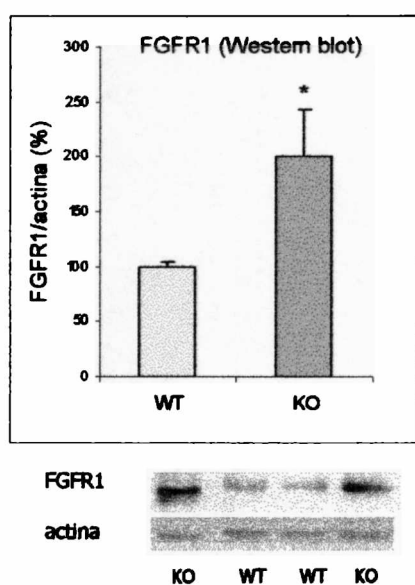


Figura 3.5: Expresión del FGFR1 hipofisario en los ratones hembra KO y WT para RD2. En cada experimento la intensidad de banda promedio para FGFR1/actina de las hipófisis WT fue considerada el 100%. * $P < 0.05$ vs. WT; $N = 9$ y 10 respectivamente. Abajo: western representativo para FGFR1 y su correspondiente actina en homogenatos de hipófisis de animales KO y WT.

Por *immunohistoquímica* determinamos que FGFR1 localiza en el citoplasma de las células de ambos genotipos y confirmamos además el aumento en la expresión del mismo en las hipófisis KO respecto a las WT (Figura 3.6).

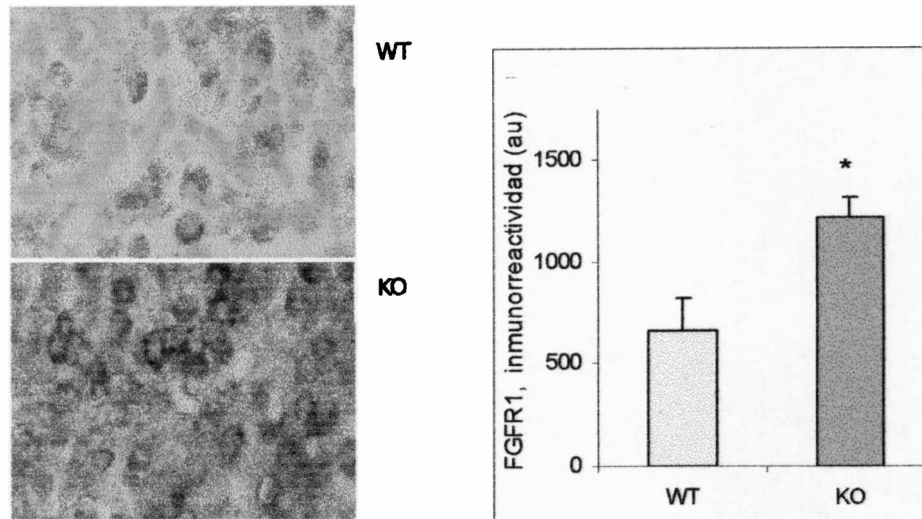


Figura 3. 6: Inmunohistoquímica representativa para FGFR1 en hipófisis de hembras WT y KO. La marca específica para FGFR1 se observa en marrón (DAB) y los núcleos se contratiñeron con verde de metilo. A la derecha, la cuantificación de la IHQ para FGFR1, donde au: unidades arbitrarias. N=3 para cada genotipo, * P<0,05 vs. WT.

Una *doble marcación* para FGFR1 y hormonas hipofisarias en cortes de hipófisis de hembras KO nos permitió determinar que la inmunorreactividad para FGFR1 localiza principalmente en los lactotropos hiperplásicos (Figura 3.7a, b y c). No obstante las fotos que se muestran, algunos somatotropos y gonadotropos aislados resultaron positivos para FGFR1 (menos del 5%).

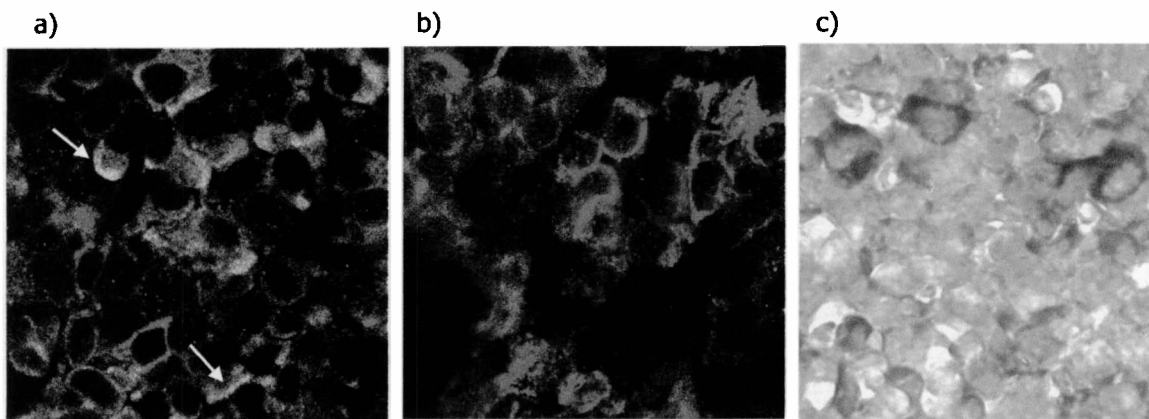


Figura 3.7: Doble inmunohistoquímica para FGFR1 y PRL (a) GH (b) y LH (c) en cortes de hipófisis de hembras KO para el RD2. En a) y b) el receptor se marcó con FITC (verde) y las hormonas con Texas Red (rojo). Las flechas señalan lactotropos que expresan FGFR1. En c) LH se marcó con SG, de color azul y el receptor con DAB, en marrón. En este caso se contratiñó con hematoxilina.

Fosforilación por FGF2 de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs)

En distintos tipos celulares FGF2 regula la proliferación por activación de la fosforilación de ERK1/2. Por este motivo evaluamos en nuestro modelo experimental la acción de

FGF2 *in vitro*, a distintos tiempos, sobre la fosforilación de ERKs en células hipofisarias de ratones hembra KO y WT.

Sorprendentemente observamos que en condiciones basales los niveles de pERK de las células KO (relativizados a los de ERK1) fueron menores que los de las células WT (Figura 3.8a P = 0,018). Pero en presencia de FGF2, el incremento en la fosforilación delta pERK/ERK1 = [(pERK/ERK1)_{FGF2t} - (pERK/ERK1)_{t0}] resultó ser significativamente mayor en las células KO para los tiempos de 5 y 10 minutos de estimulación respecto a las células WT (Figura 3.8b P ≤ 0,02).

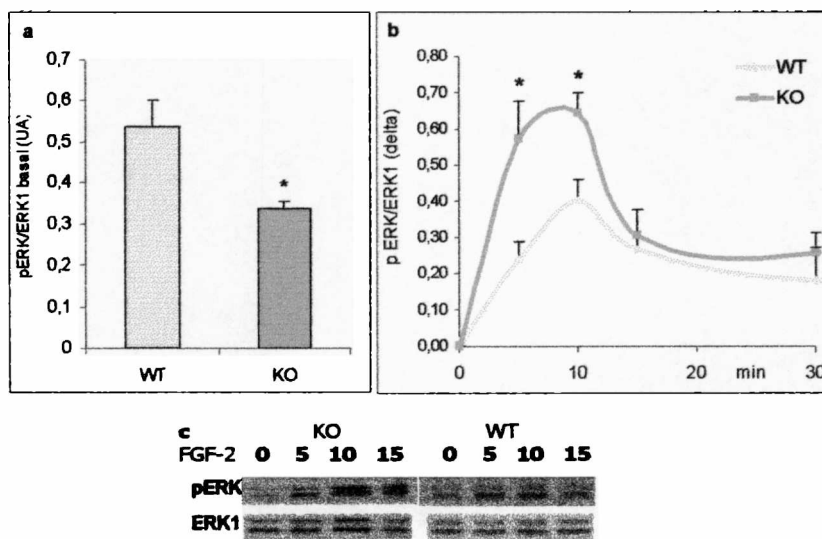


Figura 3.8: a) Fosforilación de ERK en condiciones basales relativizada a la expresión de ERK1 total en células hipofisarias en cultivo. * P<0.05 vs. WT, N= 5 para cada genotipo. b) Cinética de fosforilación de ERK en respuesta a FGF2 en células KO y WT. El estímulo de FGF2 de 50 ng/ml se mantuvo durante distintos períodos de tiempo entre 5 y 30 min * P<0,05 vs WT. N= 5 para cada grupo y tiempo. c) Western blot representativo de pERK y ERK1 en lisados de células hipofisarias de ratones hembra KO y WT para RD2.

Efecto del medio condicionado (CM) de cultivos hipofisarios sobre la proliferación de células endoteliales HUVEC. Bloqueo con antiFGF2

FGF2 es un mitógeno potente de las células endoteliales. Con el objetivo de probar la capacidad angiogénica del FGF2 hipofisario, enfrentamos los CM provenientes de cultivos de hipófisis de los dos genotipos con células HUVEC sobre las que determinamos, luego de 48 horas de incubación, la incorporación de ³[H]-timidina. Los sobrenadantes de cultivo aumentaron la síntesis de ADN en el cultivo de HUVEC (Fig. 3.9a P < 0,0001 vs. BIC: DMEM libre de suero) y este efecto fue parcialmente inhibido por un anticuerpo específico contra FGF2 en igual magnitud para los 2 genotipos. (P = 0,0319 para el efecto del pretratamiento con el antiFGF2 y P Interacción = 0,7851).

Como control del experimento se hicieron estimulaciones con FGF2, EGF y VEGF sintéticos y con ellas se demostró la especificidad del anticuerpo, que bloqueó el aumento de la proliferación inducido por FGF2 y no por VEGF o EGF sobre las células HUVEC (Fig. 3.9b). En forma similar el antiVEGF solo inhibió el efecto de VEGF y no de FGF o EGF (Figura 3.9.b)

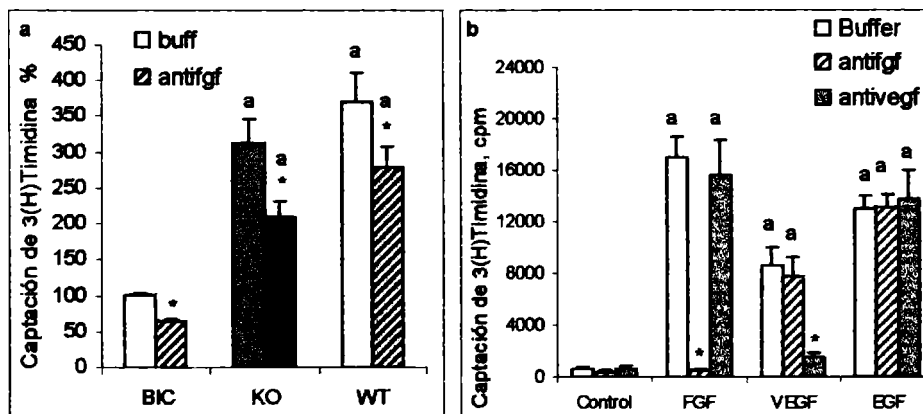


Figura 3.9: a) Las HUVEC se dejaron crecer hasta confluencia y luego se enfrentaron con CM de cultivos hipofisarios de ambos genotipos o BIC en ausencia (buffer) o presencia de a-FGF2 (200 ng/ml). La proliferación, estimada como incorporación de [³H]-timidina al ADN se expresa como porcentaje de las cpm incorporadas respecto al control de buffer. (cpm pocillo *100/cpm buffer). ^aP< 0.05 vs. BIC, * P<0.05 vs. buffer respectivo (N=4). b) Control interno de proliferación de HUVEC: VEGFmurino (10 ng/ml), FGF2 (2ng/ml), en presencia o ausencia de a-FGF2 (200 ng/ml), N = 3 cultivos con muestras por cuadruplicado.

Según se puede observar en la Figura 3.9a, la captación de timidina por las células HUVEC en ausencia de medio condicionado también se redujo en presencia de a-FGF2, lo que sugirió que el FGF2 que estaba siendo bloqueado en el ensayo con células endoteliales era producido por las mismas células HUVEC y no provenía del CM.

En efecto, el ELISA para FGF2 en CM de cultivo arrojó niveles indetectables para el factor en ambos grupos. Y además, la concentración de FGF2 en las células HUVEC no mostró diferencias en presencia de BIC o de los CM de los dos genotipos (P = 0,3925 Fig. 3.10).

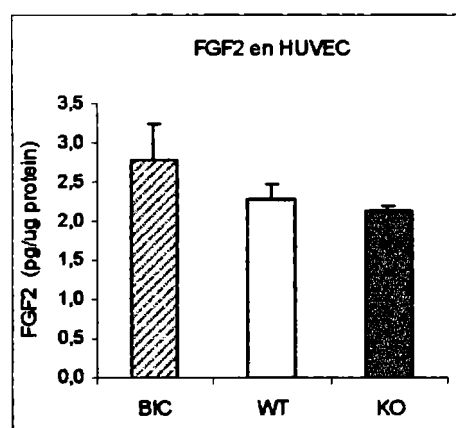


Figura 3.10: Efecto del CM de cultivo de células adenohipofisarias WT o KO, o de buffer en la expresión de FGF2 por las células HUVEC. Determinación realizada por ELISA sobre 50.000 células endoteliales/pocillo, N = 3.

DISCUSIÓN

En hipófisis FGF2 cumple funciones mitogénicas, angiogénicas y también participa en la secreción de hormonas. Se encontró que, en rata, este factor regula la secreción de PRL y TSH en condiciones normales (Baird *et al.* 1985) y en la línea celular tumoral GH3 es capaz de estimular la secreción de PRL pero no de GH (Black *et al.* 1990) .

Los adenomas hipofisarios humanos productores de PRL, GH, ACTH, LH o no secretores, liberan FGF2 *in vitro* siendo los prolactinomas los que mostraron una menor secreción (Ezzat *et al.* 1995).

Nosotros estudiamos la relación entre el RD2 hipofisario y la expresión y acción de FGF2 motivados por su funciones en la hipófisis normal y patológica y también por el hecho de que en la hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos, FGF2 ha sido relacionado a la proliferación celular y la angiogénesis (Schechter & Weiner 1991; Heaney *et al.* 1999) (Hentges *et al.* 2000)

Como pudimos determinar, el FGF2 exógeno estimula la secreción de PRL y la proliferación celular en nuestro modelo experimental de hiperplasia hipofisaria de lactotropos en ratones KO para el RD2, sin diferencias entre genotipos.

Pero, a diferencia de la hiperplasia en ratas tratadas con estrógenos donde FGF2 se encuentra aumentado (Heaney *et al.* 2002), las hembras KO mostraron una disminución en la expresión de este factor tanto en homogenatos de hipófisis como en lisados celulares en relación a sus pares WT.

Esta discordancia para los dos modelos de hiperplasia hipofisaria experimental podría estar relacionada a los bajos niveles de estrógenos que tienen las hembras KO en

relación a las WT (Kelly *et al.* 1997; Saiardi *et al.* 1997) Se ha descrito que precisamente el estradiol actuaría creando un ambiente propicio para la expresión de ciertos factores como FGF2 en las hipófisis de las ratas tratadas con dosis farmacológicas del esteroide.

Por otra parte, la ausencia del RD2 podría estar influenciando la expresión de FGF2 ya que en sistema nervioso central se observó que la activación del RD2 aumenta la expresión de este factor angiogénico en distintos sitios como corteza prefrontal, hipocampo y núcleo estriado de rata (Fumagalli *et al.* 2003).

Por otro lado, el gen transformante tumoral hipofisario (pttg) aumenta la expresión de FGF2 (Zhang *et al.* 1999b) y aumentos en la expresión de PTTG se correlacionaron con aumentos de FGF2 en modelos murinos de tumores hipofisarios y en adenomas hipofisarios humanos (Ishikawa *et al.* 2001; McCabe *et al.* 2003). A su vez, FGF2 induce también a PTTG y, aunque ambos se encontraron sobreexpresados en la hiperplasia hipofisaria generada con estrógenos (Heaney *et al.* 1999), nuestros resultados demuestran que PTTG no participa en la hiperplasia de las hembras KO para RD2 (Capítulo 2) (Cristina *et al.* 2007). De esta manera, los bajos niveles de FGF2 hallados en nuestro modelo experimental también podrían relacionarse también con la baja expresión de PTTG.

Finalmente, no debemos olvidar que FGF2 se asocia a la matriz extracelular y que durante todo proceso de tumorigénesis existe una degradación de la matriz extracelular y por lo tanto una disminución en la expresión de sus componentes y liberación de los factores asociados a dicha matriz. Es así como se ha demostrado en los ratones KO para RD2 una disminución de la expresión de laminina durante el proceso de tumorigénesis hipofisaria (Kuchenbauer *et al.* 2003). La disminución de FGF2 podría reflejar una

reducción general de la membrana basal por acción de metaloproteinasas de matriz, las que tienen una actividad elevada en los adenomas hipofisarios humanos (Paez-Pereda *et al.* 2005). Así, el FGF2 unido a la laminina y a otros componentes de la matriz extracelular podría estar siendo liberado en el proceso de remodelación de matriz, y entonces quedaría libre para participar de la angiogénesis y la tumorigénesis temprana. Es interesante destacar que por inmunohistoquímica determinamos la existencia de una localización subcelular diferencial para FGF2 entre genotipos. En las hipófisis de las hembras KO observamos un predominio de marca nuclear específica para FGF2 mientras que en las WT dicha marca resultó ser principalmente citoplasmática. Es probable que esta diferente localización celular se asocie en nuestro modelo de ratones con distintas isoformas de FGF2 como también fue reportado para el modelo hiperplasia hipofisaria en ratas tratadas con estrógenos (Mukdsi *et al.* 2006) y en células COS-1 transfectadas con una única o varias isoformas de FGF2 (Florkiewicz *et al.* 1991).

Dichos trabajos demostraron que las isoformas de alto peso molecular se localizan preferentemente en el núcleo mientras que la de 18KDa lo hacen en el citoplasma. Este hecho se relaciona directamente con la secuencia de ADN de FGF2 ya que la señal de localización nuclear se localiza río arriba del codón AUG y ésta no se encuentra en la forma de más bajo peso molecular, que, por lo tanto puede migrar al citoplasma (Bikfalvi *et al.* 1997).

En relación a nuestro trabajo, son interesantes los resultados de Marin y Boya (Marin & Boya 1995) en los que la marca para FGF2 en células de hipófisis humanas no tumorales localizó casi exclusivamente en el citoplasma y las isoformas halladas fueron las de bajo peso molecular, mientras que en los adenomas hipofisarios predominó la expresión de la isoforma de 24KDa (Li *et al.* 1992).

La diferente localización de FGF2 en las hipófisis de las hembras KO respecto a las WT probablemente se relacione con los efectos que FGF2 pudiera tener sobre la diferenciación de los lactotrofos, proliferación y/o secreción. De esta manera, a pesar de existir una menor expresión de este factor en las hipófisis KO, no descartamos que podría haber participado en el desarrollo temprano de la hiperplasia y en su mantenimiento en las hembras adultas.

Existen cuatro receptores de membrana para FGF2 (FGFR1 a FGFR4) que poseen actividad intrínseca tirosina quinasa (Moscатели 1987). Es interesante señalar que algunos adenomas hipofisarios humanos expresan isoformas anormales de los receptores con una localización citoplasmática de los mismos (Abbass *et al.* 1997). En ratas, FGFR1 ha sido relacionado a la acción de FGF2 en la hipófisis (Gonzalez *et al.* 1994). Nuestro hallazgo de una mayor expresión del FGFR1 en hipófisis KO que WT podría relacionarse con la menor expresión de FGF2 que tienen los animales KO, que no alcanzaría para disminuir la expresión de su receptor como ha sido descrito para otros sistemas (Moscатели 1994), (Choi *et al.* 2000).

Por otra parte, los mayores niveles de FGFR1 hipofisario en las hembras KO podrían explicar el aumento en la fosforilación de ERK inducida por FGF2 en este genotipo respecto a sus pares WT. Las ERKs pertenecen a una familia de serina-treonina quinasas que funcionan como integradoras de señales mitogénicas originadas en distintos receptores de membrana, en especial de receptores tirosina quinasa. La vía de las ERKs ha sido asociada a la proliferación celular inducida por FGF2 y por muchos factores de

crecimiento en distintos sistemas (Meloche *et al.* 1992), (Sulpice *et al.* 2002). Sin embargo en los lactotrofos, la estimulación del RD2 conduce a la activación de ERK 1/2 y este evento se asocia con una inhibición de la proliferación en este tipo celular tanto *in vivo* como *in vitro* (Iaccarino *et al.* 2002). En consecuencia, en las hipófisis de las hembras KO para RD2 encontramos menores niveles de fosforilación de ERKs en condiciones basales, lo cual podría asociarse a una aumentada proliferación de este tejido *in vivo*. De ser así, FGF2 debería ejercer sus acciones mitogénicas en este modelo por una vía diferente de las ERKs, ya que en nuestros experimentos *in vitro* este factor fue capaz de incrementar la fosforilación de estas quinasas como así también de estimular la proliferación de las células de los animales KO.

Además estudiamos la participación de FGF2 en la proliferación de células endoteliales proceso fundamental para la angiogénesis. Nuestros resultados en los experimentos en células HUVEC sugieren que el FGF2 hipofisario no se secretaría activamente, sin embargo podría participar en forma paracrina cuando es liberado de la matriz extracelular, afectando la proliferación, sobrevida o permeabilidad de las células del endotelio.

Por otro lado, FGF2 no ha sido relacionado a peliosis o aumento de la permeabilidad de capilares y en general da origen a vasos maduros, fuertes y bien formados (Presta *et al.* 2005). Por lo que creemos que el fenotipo vascular caracterizado por grandes lagunas de glóbulos rojos en ausencia de vasos sanguíneos observada en las hipófisis de los animales KO es fuertemente dependiente de VEGF como demostramos en el Capítulo 1 (Cristina *et al.* 2005) y menos dependiente de FGF2. Más aún, podríamos especular que

en la hiperplasia de las hembras KO no existiría la interdependencia entre VEGF y FGF2 como sí ha sido observada en otros modelos experimentales (Presta *et al.* 2005) ya que en las hipófisis de las hembras KO existen altos niveles de VEGF y bajos de FGF2.

Podemos concluir que la regulación de la localización subcelular de FGF2 en las hipófisis KO para RD2 podría resultar en un mecanismo de control de su actividad biológica y así, FGF2 a pesar de presentar una expresión disminuida podría estar actuando en la proliferación de las células en las hipófisis hiperplásicas gracias a la mayor expresión del receptor FGFR1, mostrando un rol diferente en los diferentes genotipos. Pero por otro lado, el crecimiento lento y curso benigno de los prolactinomas son consistentes con los bajos niveles de FGF2 en correlación con PTTG hallados en las hipófisis KO.

CAPÍTULO 4

4. ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS

INTRODUCCIÓN

Dentro de los adenomas hipofisarios, los prolactinomas son los más frecuentes sumando un 40% en el total de estos tumores. Como se mencionó, la mayoría de los prolactinomas son benignos y responden a la terapia con agonistas dopaminérgicos, pero existen situaciones en las que se observa resistencia a la terapia, o intolerancia a las drogas, y en consecuencia se generan tumores de gran tamaño que requieren cirugía, radioterapia o ambas.

Los esfuerzos para dilucidar la patogénesis de los prolactinomas permitirán en un futuro desarrollar terapias moleculares alternativas para estos casos de resistencia y agresividad.

La angiogénesis o desarrollo de nuevos vasos a partir de los ya existentes es un proceso fundamental para el crecimiento de los tumores en general. El VEGF es el principal mediador del proceso angiogénico en distintos tipos de tumores, sin embargo el papel de la angiogénesis, el VEGF y el FGF-2 no ha sido estudiado en profundidad en la tumorigénesis hipofisaria humana. Existe controversia en la literatura acerca del grado de vascularización que poseen estos adenomas en sí mismos y en relación a la glándula normal (de la Torre *et al.* 2004), pero no existen dudas de que la angiogénesis es fundamental para el crecimiento de los tumores hipofisarios.

Al tener la angiogénesis una relación estrecha con el comportamiento tumoral, las terapias antiangiogénicas se presentan como potenciales alternativas en el cáncer. Esta

terapia dirigida ya se encuentra implementada en el cáncer colo-rectal metastático en combinación con la quimioterapia convencional donde actualmente se obtienen resultados favorables si se comparan con la quimioterapia aislada (Bergsland 2004). En otros tipos de cáncer como el de mama y el de pulmón de células no pequeñas, el tratamiento con anti-VEGF se halla en fases de investigación clínica en estos momentos. No hay datos en la literatura de tratamientos anti angiogénicos en los adenomas hipofisarios.

OBJETIVOS

Como ya se comentó, muchas citoquinas y factores de crecimiento han sido asociados a la angiogénesis. Siguiendo nuestra línea de trabajo, el objetivo de esta parte de la tesis fue el estudio de la expresión de los dos factores angiogénicos más potentes que se conocen: el VEGF y el FGF2 en hipófisis tumorales humanas. En particular, nos interesaba determinar si su expresión era distinta en prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, tomando en consideración a) nuestros resultados en ratones con disrupción del RD2, y b) que se ha descrito que en los prolactinomas resistentes los RD2 se hayan disminuidos o disfuncionales (Caccavelli *et al.* 1994a) (Molitch 2005). También evaluamos los índices de proliferación de los tumores analizando la expresión de PCNA, y el grado de vascularización de los mismos, estudiando la expresión de CD31. Establecimos asimismo, correlaciones entre los parámetros analizados para los distintos tipos de tumores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Pacientes del Hospital de Santa Lucía que fueron derivados a neurocirugía por tumor hipofisario. Se dividieron los adenomas de acuerdo a la secreción hormonal en somatotropinomas, prolactinomas, adenomas secretores de ACTH y adenomas no funcionantes.

En especial se evaluaron los prolactinomas resistentes a tratamientos con agentes dopaminérgicos, de acuerdo a los protocolos del hospital.

Definición de pacientes resistentes a agonistas dopaminérgicos

Si bien se han adoptado varias definiciones, en general, la que tiene mayor consenso es la que contempla dos aspectos: 1) la imposibilidad de restaurar niveles normales de prolactina, y 2) la imposibilidad de conseguir una reducción mayor del 50% en el tamaño del tumor. Algunos pacientes responden a la terapia dopaminérgica con la normalización de los niveles de prolactina sin reducción sustancial del tamaño tumoral, y otros reducen el tamaño sin lograr normalizar su prolactinemia (Velkeniers & Hooghe-Peters 1998).

Tanto micro como macroadenomas se tratan con cabergolina en dosis de 0,25 a 0.5 mg por semana. Si no se logra la normalización de la prolactinemia se incrementa la dosis de cabergolina hasta una dosis máxima de 5-7 mg por semana. Se tiene en cuenta la tolerancia del paciente y la presencia de efectos adversos con el aumento de la dosis. La periodicidad de monitoreo bioquímico con PRL es bimensual hasta lograr niveles séricos normales de PRL, y cada 6 a 12 meses una vez alcanzado los mismos. Los controles de imágenes a través de Resonancia Magnética por Imágenes (RMI) son a los 3-6 meses en el caso de macroadenomas con compromiso visual y cada 12 meses en caso de

tratarse de microadenomas y/o macroadenomas sin alteración visual. Si la clínica indica que el tumor está comprimiendo áreas vitales del cerebro y/o comprometiendo al nervio óptico, o el paciente sigue sin responder a la medicación (crecimiento del tumor), se aconseja la cirugía transesfenoidal como lo sugiere la literatura (Hamilton *et al.* 2005).

En la literatura se ha visto que con relación al fracaso de normalización de la prolactinemia, se puede esperar una resistencia en un 25-50% de los pacientes tratados con bromocriptina, y 5-18% de los tratados con cabergolina. Con respecto al fracaso de obtener un 50 % de reducción del tamaño tumoral, la resistencia puede obtenerse en un tercio de los pacientes con bromocriptina y 5-10 % de los tratados con cabergolina (Molitch 2005). La experiencia clínica de los hospitales consultados indica un 15% de resistencia a los agonistas dopaminérgicos, por lo que llegan a la cirugía transesfenoidal con diagnóstico de resistencia a dopamina un pequeño porcentaje de pacientes inicialmente diagnosticados con prolactinoma. Nuestros resultados están en buena concordancia con la literatura universal.

Obtención de las muestras

Durante la cirugía transesfenoidal parte del tejido hipofisario tumoral es enviado para su estudio anatómo-patológico (como de rutina) y parte es fraccionado en buffer Tris-EDTA con inhibidores de proteasas para determinación de factores de crecimiento y/o marcadores del endotelio vascular o de proliferación por Western Blot. Otra porción se recoge en formalina para estudios de inmunohistoquímica.

El paciente es informado por el cirujano interviniente de los estudios que se realizan, firmando el respectivo consentimiento. La privacidad del paciente es siempre

preservada. El Comité de Bioética del Hospital Santa Lucía aprobó el uso del Consentimiento Informado del presente trabajo.

Western blot

Ya descrito en detalle en materiales y métodos generales. Para determinar la presencia de vasos sanguíneos dentro del tejido en crecimiento empleamos un anticuerpo específico para el marcador de endotelio: CD31 y para determinar la presencia de células en proliferación analizamos la expresión del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), ambos anticuerpos son de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA.

El Western blot de VEGF y de PCNA ya fue descrito. Para CD31 se usaron condiciones similares salvo que las muestras se resolvieron en geles de 6% debido a que es una proteína de alto peso molecular.

Inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formalina fueron procesados en forma similar a lo descrito para ratones en materiales y métodos generales. En este caso los anticuerpos empleados para IHQ fueron los siguientes:

- antiPRL humana (1:200 NHPP-NIDDK)
- antiVEGF humano (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA)
- antiFGF-2 humano (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA)
- antiVEGF humano (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA)

El protocolo empleado fue similar al de los capítulos 1 y 2. En este caso no se hicieron evaluaciones cuantitativas, sino cualitativas: intensidad y tipo de marca, localización de inmunoreactividad en forma comparativa.

Análisis estadístico

Se hicieron correlaciones de las intensidades de las bandas obtenidas en Western Blot para los distintos parámetros estudiados. Para esto se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y se aplicó un test de correlación para su análisis.

RESULTADOS

Características de los pacientes

nro caso	sexo	edad(años)	tipo de tumor	PRL (ng/ml)
1	masculino	75	PRLoma	16000
2	femenino	30	PRLoma	321
3	femenino	45	No funcionante	VNI
4	masculino	43	GHoma	10
5	femenino	43	ACTHoma	VNI
6	masculino	31	ACTHoma	VNI
7	femenino	33	GHoma	1,1
8	femenino	60	No funcionante	VNI
9	femenino	22	PRLoma	90
10	masculino	52	No funcionante	VNI
11	femenino	59	No funcionante	VNI
12	masculino	43	PRLoma	2769
13	femenino	43	No funcionante	172
14	femenino	47	No funcionante	118
15	femenino	37	No funcionante	50
16	femenino	49	No funcionante	68,5
17	masculino	72	No funcionante	24,8
18	femenino	38	No funcionante	54,1
19	femenino	42	PRLoma	63,4
20	femenino	55	No funcionante	33
21	femenino	42	No funcionante	73,5
22	femenino	59	No funcionante	17,3
23	femenino	49	No funcionante	84,6
24	femenino	45	PRLoma	143,2
25	femenino	45	GHoma	14,4
26	masculino	69	No funcionante	13,6
27	masculino	79	No funcionante	20
28	femenino	31	PRLoma	150

VNI: Valores No Informados

Los 9 prolactinomas son resistentes.

Caracterización histológica de los prolactinomas resistentes a dopaminérgicos.

A los prolactinomas resistentes se les realizaron Inmunohistoquímicas para PRL, revelando con DAB o Fluorescencia. Los pacientes han sido siempre tratados con cabergolina (CG) y de la experiencia de los neurocirujanos y los patólogos sabemos que esta droga con el tiempo vuelve fibrosos a los tumores y muchas veces en la histología

aparecen células agotadas en cuanto a su secreción aunque la reacción es distinta para cada paciente. En los casos que recibimos, encontramos situaciones en las que todas las células tumorales resultaron positivas para PRL, y/o muchas resultaron positivas y/o escasas células dieron positivo para la hormona. (Figura 4.1 a, b y c)

Factores angiogénicos

Expresión de VEGF en tumores hipofisarios humanos

Se determinó por Western Blot la expresión de VEGF en homogenatos de muestras tumorales (prolactinomas resistentes a dopaminérgicos, somatotropinomas y adenomas no funcionantes) obtenidas a partir de cirugías. El contenido de VEGF fue normalizado con el de la proteína actina para cada muestra. Todos los tumores expresaron VEGF y el nivel de expresión de esta proteína angiogénica varió en forma independiente del tipo tumoral (Figura 4.2).

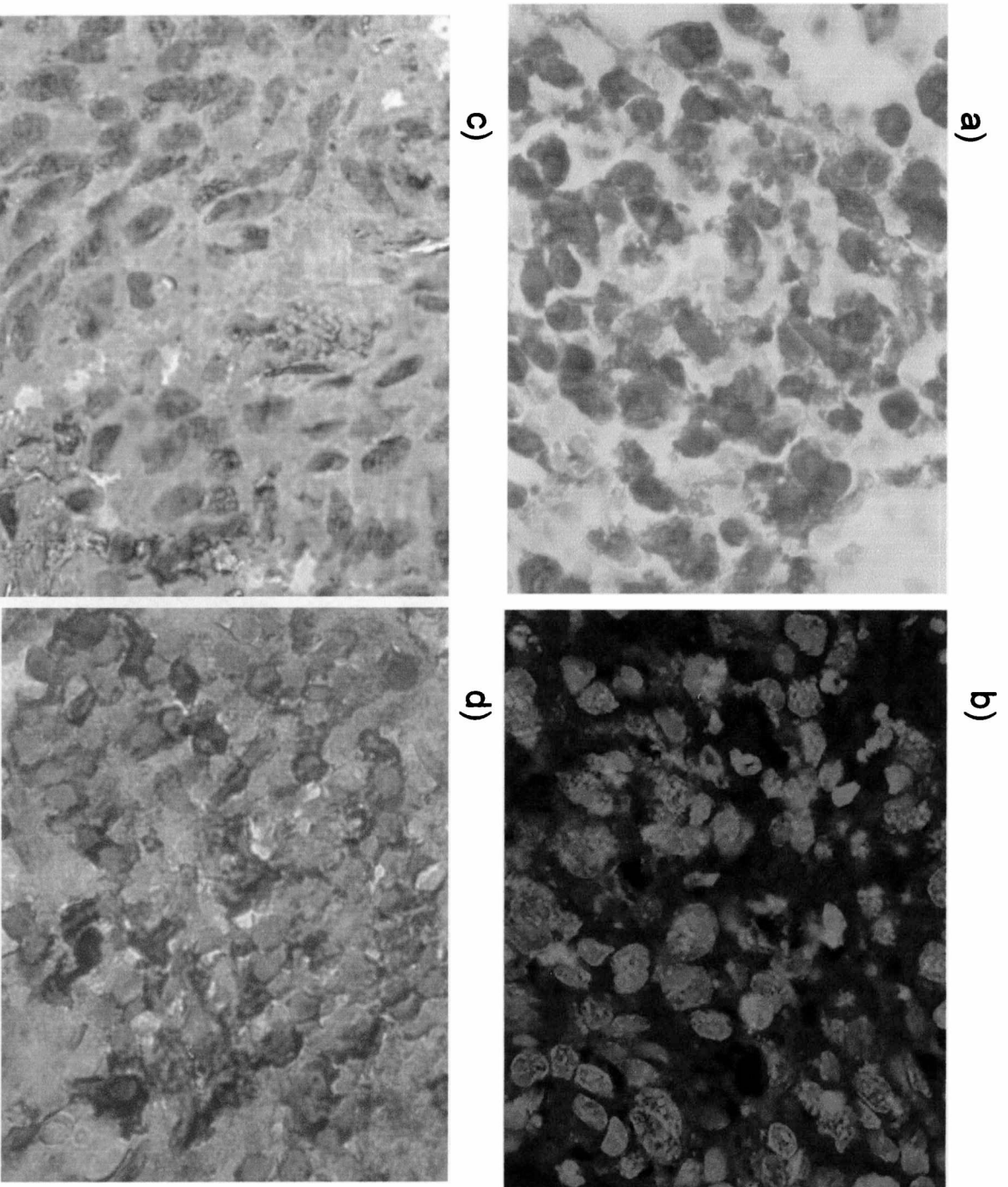


Figura 4.1: Inmunohistoquímica para PRL en los distintos casos de Prolactinomas resistentes estudiados. a) Prolactinoma, caso 1, paciente tratado con 7mg/semana de CG b) El mismo tumor, en otra zona, revelado con fluorescencia c) Prolactinoma, caso 28, tratado con 3,5 mg/semana de CG, d) Prolactinoma, caso 19, tratado con 1mg/semana CG.

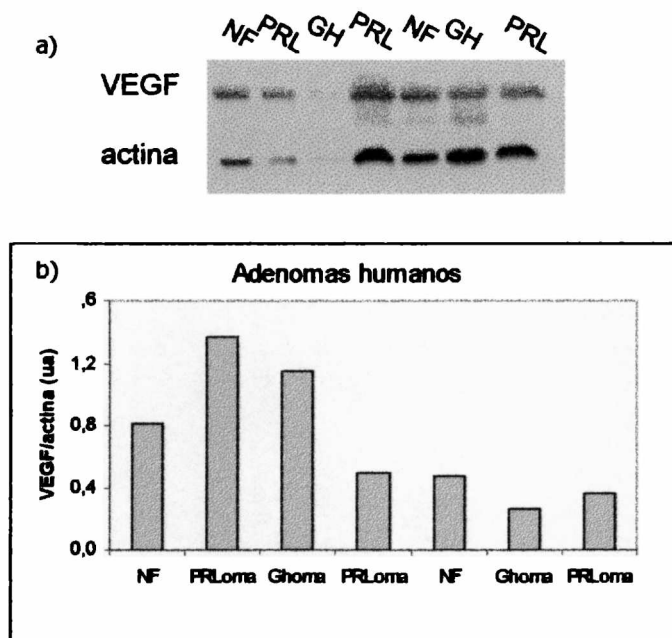


Figura 4.2: a) Western Blot representativo de VEGF con la banda de 46 KDa (arriba) y su actina correspondiente (abajo) en distintos tumores hipofisarios. NF tumor no funcionante, PRLoma prolactinoma, Ghoma somatotropinoma. b) Cuantificación de las bandas determinada por densidad óptica (DO) de VEGF / DO de actina expresado en unidades arbitrarias (ua)

Al comparar los niveles de VEGF en cada tipo de tumor, observamos una alta variabilidad entre pacientes (Figura 4.3). No obstante las diferencias en los niveles, es importante destacar que todos los tumores mostraron expresión de VEGF hecho que probablemente se relaciona con su necesidad de aporte de oxígeno y nutrientes a través de una nueva vascularización.

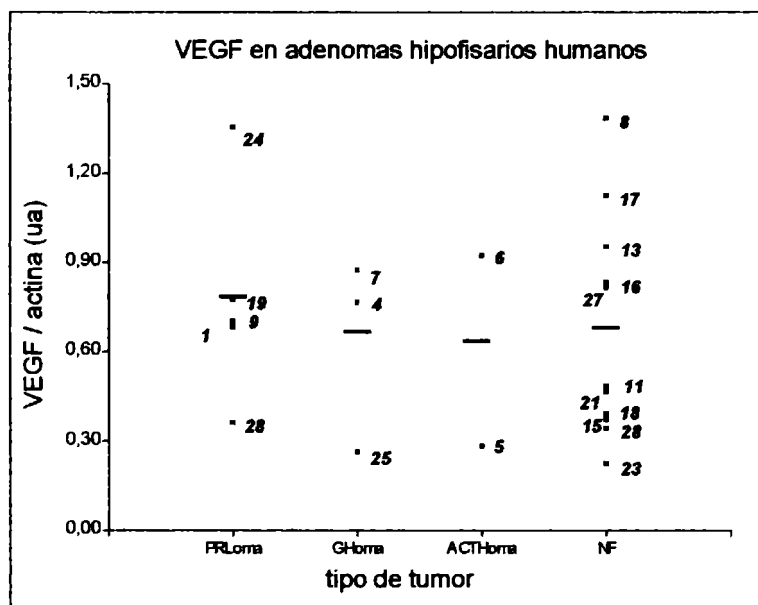


Figura 4.3: Expresión de VEGF relativizado a actina en unidades arbitrarias (ua) en los distintos tipos de adenomas hipofisarios. PRLoma N=5, GHoma N= 3, ACTHoma N= 2. NF N= 11. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (NS) entre los distintos tipos de adenomas. Los números en el gráfico corresponden al número de caso clínico y — es el valor promedio para cada tipo de tumor

Por otra parte, en nuestra muestra poblacional la expresión de VEGF no correlacionó con la edad de los pacientes ($r^2= 0.058$, NS) como ha sido descrito en la literatura (Niveiro *et al.* 2005).

Localización de VEGF en los tejidos hipofisarios tumorales

Como demostramos en capítulos anteriores no solo es importante la magnitud de la expresión, sino también su localización celular. Para ello, identificamos VEGF por

inmunohistoquímica en cortes en parafina de los prolactinomas resistentes y adenomas no funcionantes obtenidos de cirugía. La marca de VEGF encontrada en las células tumorales (ambos tipos de adenomas) resultó ser siempre citoplasmática y algunas muestras tuvieron además, tinción nuclear. Por otra parte, algunas muestras evidenciaron inmunorreactividad intensa en aisladas células tumorales (Figura 4.4a y c) mientras que otras desarrollaron una marca más generalizada en todo el tejido (Figura 4.4 e y f).

Ninguna de estas características fue más predominante que la otra en un tipo tumoral.

Expresión del Factor de Crecimiento Fibroblástico-2 (FGF2) en cortes histológicos de muestras de tumores hipofisarios

Por inmunohistoquímica determinamos la presencia de FGF-2 en el parénquima de los distintos tipos de tumores. La inmunorreactividad fue positiva en un 56% de los tumores analizados, y la proteína se localizó en el citoplasma celular en todos los casos (Figura 4.5).

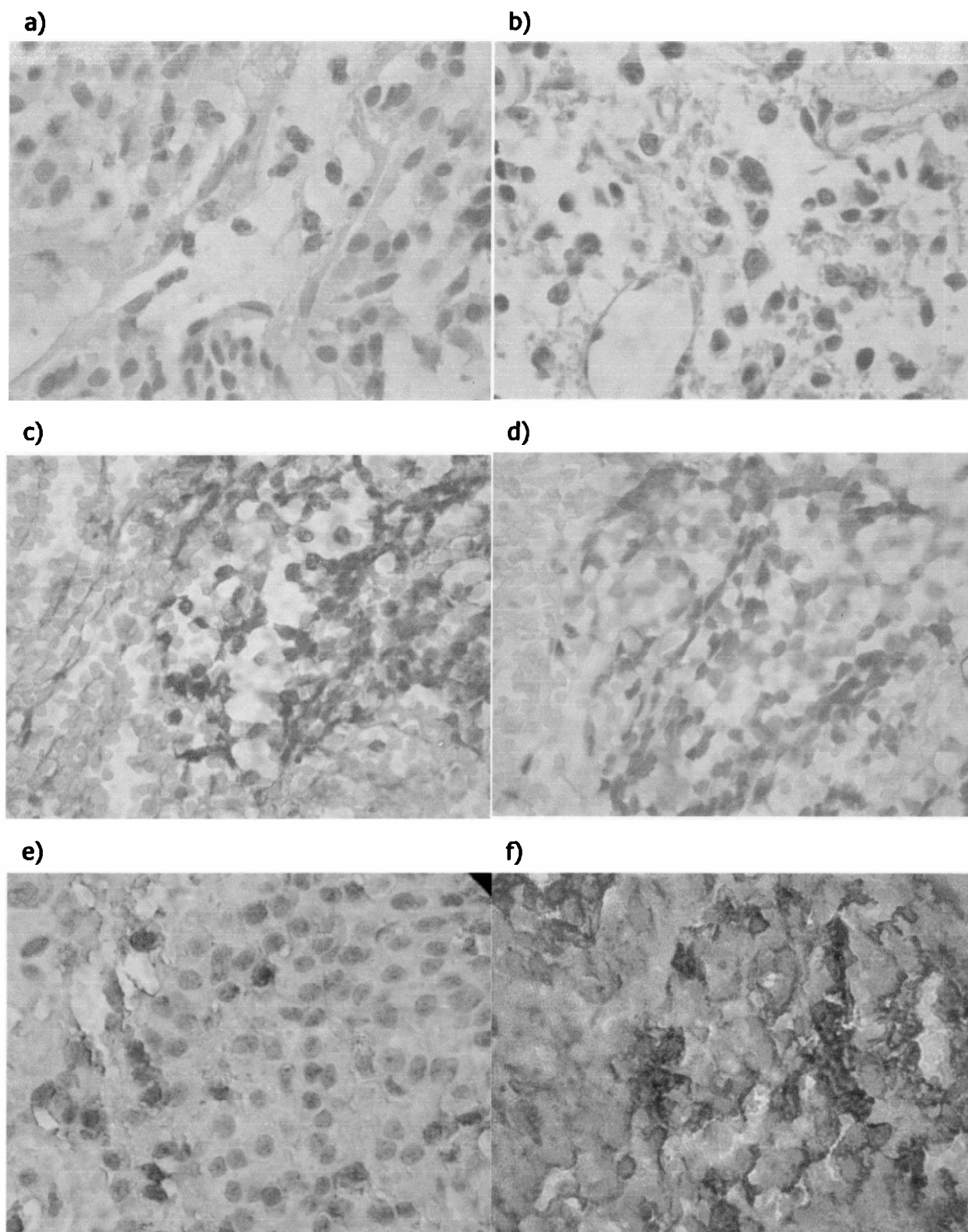
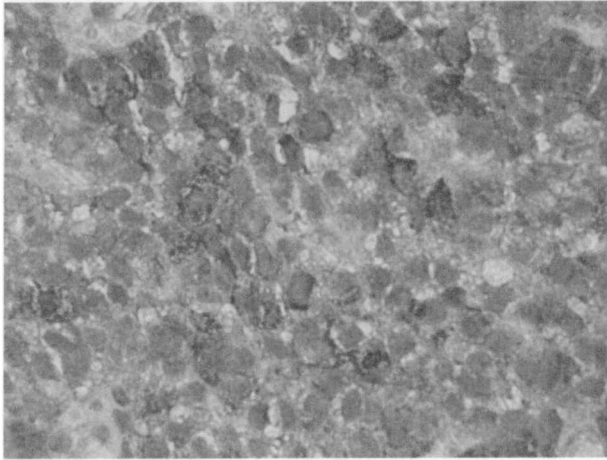
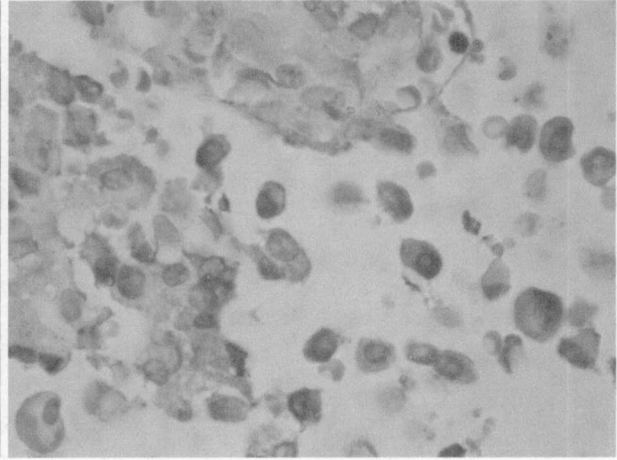


Figura 4.4: Inmunohistoquímicas representativas para VEGF en los distintos tipos de tumores de hipófisis. a) Prolactinoma, caso 1, b) Control negativo sin primer anticuerpo, caso 1 c) Adenoma No Funcionante, caso 21 d) Control negativo sin primer anticuerpo, caso 21 e) Prolactinoma, caso 28 f) Prolactinoma, caso 19.

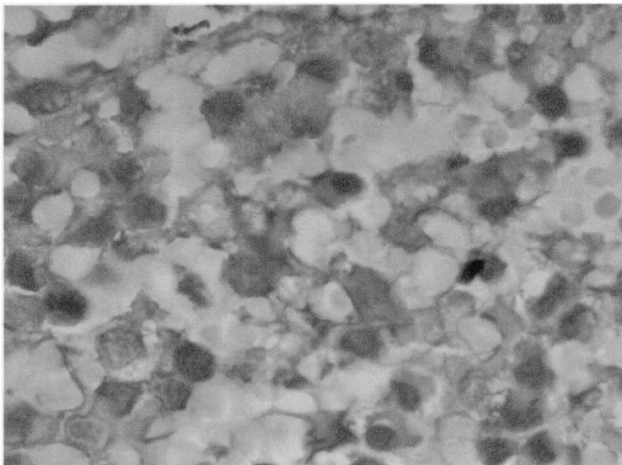
a)



b)



c)



d)

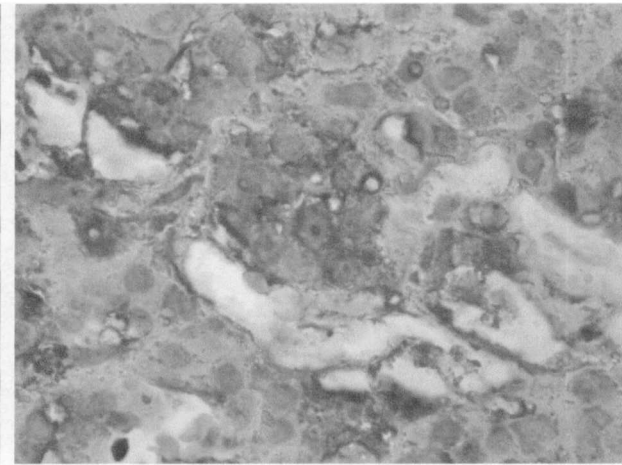


Figura 4.5: Inmunorreactividad de FGF 2 en a) Adenoma No Funcionante, caso 15. b) Somatotropinoma, caso 4 c) Prolactinoma, caso 1 d) Corticotropinoma caso 5.

Marcadores endoteliales

Expresión de CD31 en tumores hipofisarios humanos

Por Western Blot determinamos la expresión del marcador de endotelio CD31 en homogenatos de los distintos tipos de tumores hipofisarios humanos. Se sembró un lisado de células endoteliales humanas (HUVEC) como control positivo y la intensidad de banda de CD31 se relativizó a la de actina. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de la proteína CD31 entre prolactinomas y tumores no funcionantes (nos resultó imposible analizar el resto de los tipos tumorales) (Figura 4.6)

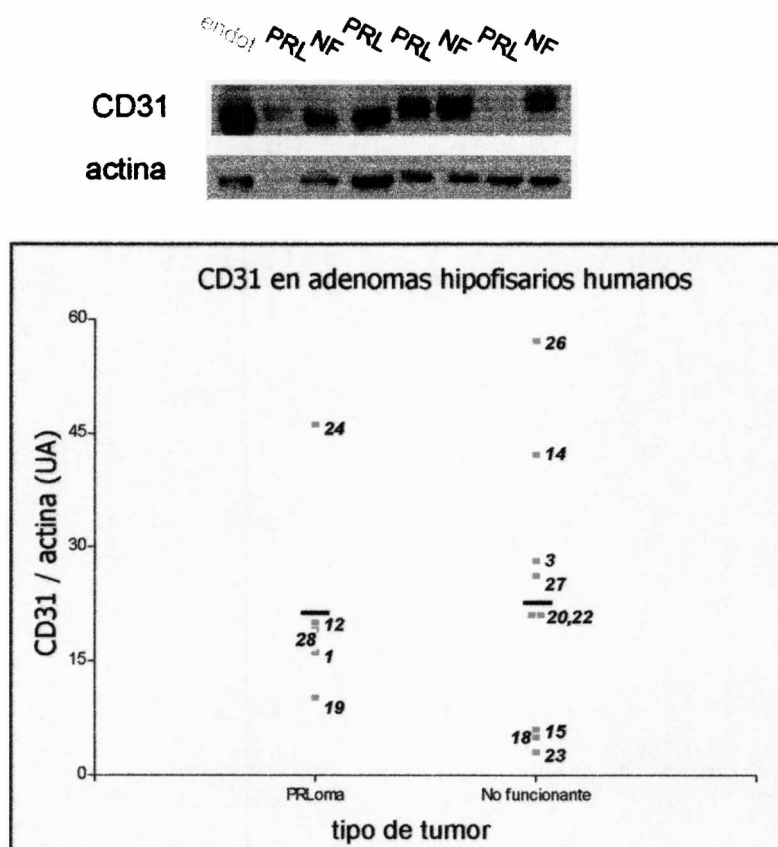


Figura 4.6 Arriba: Banda de 140 KDa para CD31 en un Western Blot representativo para Prolactinomas (PRL) y Adenomas No Funcionantes (NF), endot: células endoteliales HUVEC. Abajo: Densidad de puntos para CD31/actina en ambos tipos de tumores, PRLoma N=5, No Funcionante N=9, NS. Los números en el gráfico corresponden al número de caso clínico y — es el valor promedio para cada tipo de tumor. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA).

Relación entre los niveles de expresión de VEGF y CD31 en muestras de adenomas hipofisarios humanos

Para los pacientes en los que ambos parámetros pudieron ser determinados, se estudió la posible relación entre los mismos. Hallamos una correlación lineal positiva entre los datos que resultó ser estadísticamente significativa (N= 10, r= 0,8; P=0,01, Figura 4.7).

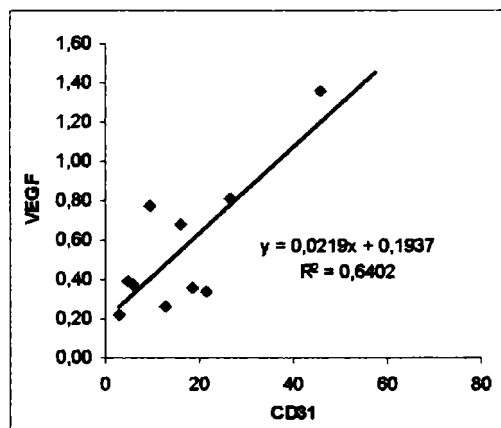
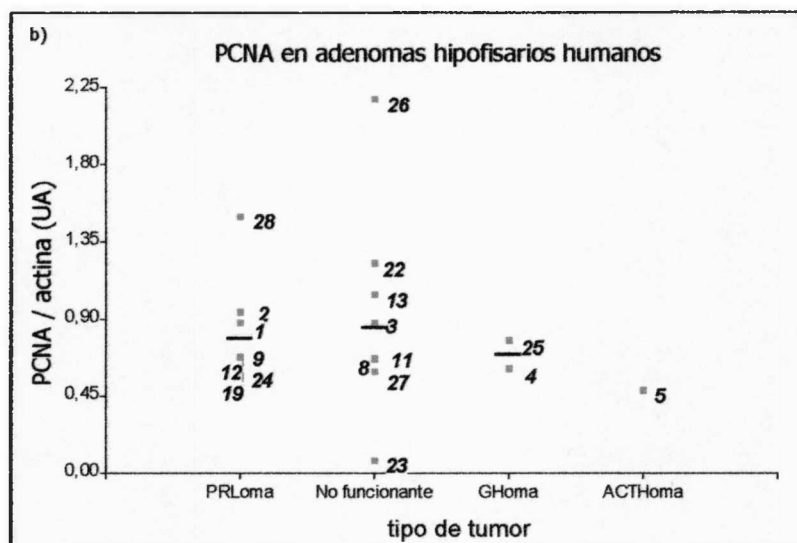
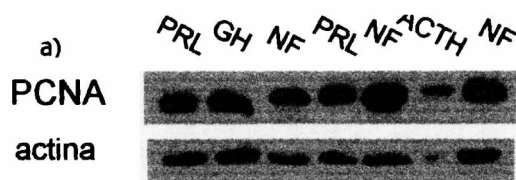


Figura 4.7: Correlación entre la expresión del factor angiogénico VEGF y el marcador de endotelio CD31 relativizados a actina en adenomas hipofisarios humanos.

Proliferación

Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

En los homogenatos de los tumores también se midió la proteína PCNA por Western Blot como una medida de la proliferación celular, y se la relativizó al contenido de actina. No se observaron diferencias entre los distintos tipos de tumores (Figura 4.8). Sin embargo, el tumor NF recidivante, único en nuestra serie, presentó los mayores niveles del marcador de proliferación celular PCNA (caso 26 en figura 4.8), hecho que se vio reflejado en el extraordinariamente alto número de núcleos positivos hallados en la IHQ para PCNA (Figura 4.9). Índice cinético celular determinado por KI-67: 9,5% (no se muestra).



Correlación entre la proliferación celular en los tumores hipofisarios y el marcador de células endoteliales CD31

Nuestros datos no mostraron la existencia de una correlación lineal entre PCNA y CD31 para las muestras estudiadas (Figura 4.10).

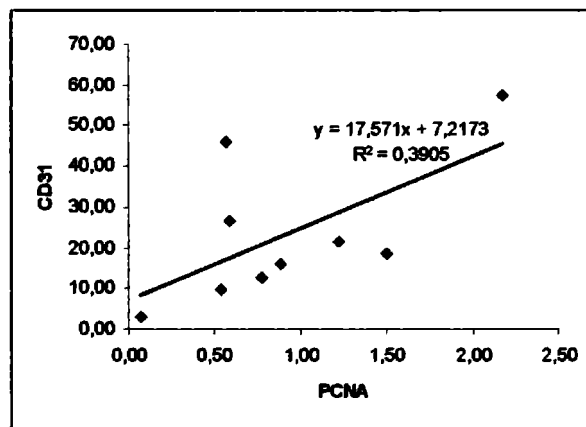


Figura 4.10: Correlación CD31 vs PCNA en los homogenatos de adenomas hipofisarios analizados por Western Blot. N = 11 . P = 0, 07

Correlación entre VEGF y PCNA en las muestras de tumores humanos

Estas proteínas no mostraron una correlación lineal en nuestro grupo de muestras. El análisis se hizo sin distinguir el tipo de tumor (Figura 4.11). El resultado obtenido no resultó sorprendente luego de analizar la correlación entre PCNA y el marcador de endotelio CD31.

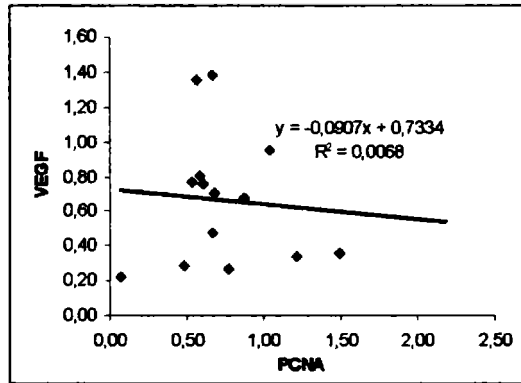


Figura 7. 11: VEGF vs PCNA en los homogenatos de adenomas hipofisarios analizados por Western Blot. N = 14. P > 0,05.

DISCUSIÓN

La importancia del estudio de la angiogénesis en los tumores endócrinos radica en la necesidad de hallar marcadores moleculares y características que predigan el comportamiento que tendrán dichos tumores y que expliquen por qué algunos se vuelven agresivos e invasivos mientras que otros permanecen adormecidos por años hasta encontrarlos en forma casual en las autopsias o en exploraciones del cerebro por otros motivos ajenos a la hipófisis.

Los adenomas hipofisarios son en su mayoría benignos, de crecimiento lento con una frecuencia de metástasis extremadamente baja. Sin embargo, su característica de escasa agresividad no excluye la participación de la angiogénesis durante su desarrollo. También en otros tumores en estadios tempranos, como las lesiones benignas o precancerosas de glándula mamaria y cérvix, se observa un incremento de la vascularización respecto a los tejidos normales, lo que demuestra que la malignidad no es un requisito determinante en la necesidad de generación de nuevos vasos.

El balance entre factores proangiogénicos (como VEGF y FGF2) e inhibidores de angiogénesis definen el proceso neto de vascularización que se dará tanto en la hipófisis normal como tumoral. El proceso involucra la interacción entre células tumorales, endoteliales, macrófagos, fibroblastos y la matriz extracelular, cada componente siendo capaz de liberar factores reguladores del mecanismo de angiogénesis.

El principal hallazgo de nuestro estudio es que el VEGF está presente en todos los tumores hipofisarios analizados, en forma independiente a su clasificación hormonal. En

este sentido, no podemos decir que el VEGF se exprese únicamente en prolactinomas resistentes. Por otro lado la expresión de FGF-2 no fue generalizada. Encontramos además, distintos niveles de expresión del marcador de endotelio CD31 que semicuantificamos por Western Blot como una medida del área vascular. Se comparó el nivel de esta proteína entre dos tipos de tumores hipofisarios: Prolactinomas y Adenomas No Funcionantes, y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Cabe destacar que fue imposible acceder a hipófisis normales para la determinación de niveles controles de factores de crecimiento, por lo que discutimos nuestros resultados en base a la comparación entre los distintos tipos de tumores, y a los aportes hechos en la bibliografía. Se observó una fuerte dispersión de los datos dentro de cada grupo lo que determinó que el análisis no se realizara en función de los valores medios obtenidos para cada tipo de tumor sino en forma global para todas las muestras tumorales. Por otro lado se observó una correlación significativa entre el CD31 y el VEGF, lo que indicaría que el VEGF está asociado con la angiogénesis tumoral en las hipófisis. Sin embargo VEGF no correlacionó con PCNA, lo que indicaría que su expresión no está asociada al grado de proliferación de los tumores.

A pesar de que VEGF ha sido descrito en hipófisis humanas normales y tumorales, los resultados obtenidos por los distintos autores resultan en general contradictorios. Algunos autores lo han asociado al comportamiento tumoral, encontrándolo elevado en macroprolactinomas y carcinomas como una medida del mayor grado de angiogénesis (Lloyd *et al.* 1999) e invasividad (Pan *et al.* 2005) (Turner 2000 J Endocrinol 161). Por otra parte, en esos mismos trabajos la expresión de VEGF resultó más elevada en las hipófisis no tumorales que en los adenomas sellares, no invasivos. Sin embargo, Atkin y colaboradores hallaron mayores niveles de ARN mensajero para VEGF en los tejidos

tumorales respecto a las hipófisis normales (J Endocr 160, 1999). Finalmente también se halló una estrecha correlación entre hemorragia intratumoral y VEGF en adenomas hipofisarios (Arita *et al.* 2004).

De lo expuesto se desprende que no hay unanimidad en cuanto a la expresión de VEGF en distintos tumores hipofisarios, y sus características. En nuestros experimentos, que si bien no incluyen tejidos controles, detectamos expresión de VEGF en cada una de las muestras de tumor independientemente del tipo de secreción hormonal del mismo. Dicha expresión localizó en el citoplasma de algunas, pero no todas, las células del tumor en los distintos cortes in situ inmunohistoquímicos y correlacionó con la expresión del marcador para endotelio CD31. El hecho de que todos los tumores hipofisarios expresen VEGF marca la importancia de este factor para el desarrollo de la masa tumoral hipofisaria. Y por otro lado, la correlación positiva con CD31 lo vincularía con el crecimiento de nuevos vasos generados dentro del tumor lo que reflejaría la necesidad de vascularizarse para crecer.

La hipófisis normal es muy vascularizada como todos los órganos endócrinos, con un endotelio de gran permeabilidad y fenestrado, condiciones fundamentales para regular en forma rápida y precisa la secreción hormonal en respuesta a pequeñas variaciones en sus factores estimuladores y/o inhibidores. VEGF se expresa en la hipófisis humana en condiciones normales y sería responsable de las características permeables de sus vasos sanguíneos aunque, como en situaciones fisiológicas no hay angiogénesis, la inhibición del proceso sería dominante de la situación con el fin de mantener un endotelio quiescente.

Si bien la hipófisis tumoral requiere de la angiogénesis para su crecimiento, el hecho de un posible bajo grado de vascularización descrito para los adenomas intraselares podría

asociarse a la naturaleza benigna de los mismos, a su velocidad de crecimiento lenta y a la baja probabilidad de metástasis que muestran estos tumores.

Sin embargo nuestros resultados, en concordancia con otros autores, sugieren que la vascularización en correlación con VEGF está presente en distintos tipos de adenomas hipofisarios, y que, por ende VEGF podría ser un blanco terapéutico alternativo, en especial en aquellos tumores altamente vascularizados. La correlación entre VEGF y hemorragia intratumoral hallada por (Arita *et al.* 2004), es reminiscente a la relación entre peliosis y expresión de VEGF que describiéramos en nuestro modelo experimental de ratones knockout para el RD2 (Capítulo 1), y estaría relacionada a la acción permeabilizante vascular del VEGF.

PCNA es una proteína nuclear no histona que sirve como cofactor de la ADN polimerasa delta durante la síntesis de ADN, se acumula en el núcleo durante el ciclo celular, en células que han pasado por G1/S. Dos estudios mostraron índices de marcación de PCNA mayores en hombres con macroprolactinomas en comparación con mujeres con el mismo tipo de tumor, pero dichos estudios no hallaron diferencias en este índice entre macroprolactinomas invasivos y no invasivos, excepto en grupo pequeño de prolactinomas invasivos resistentes a agentes dopaminérgicos. Resultados similares se encontraron con otro marcador de proliferación celular, el Ki-67, detectado con el anticuerpo monoclonal Mib-1 (Delgrange *et al.* 1997) (Ma *et al.* 2002).

PCNA no mostró correlación con el marcador de endotelio CD31 en nuestro grupo de tumores, dato que coincidió con el de otros autores al relacionar la proliferación medida por KI-67 y la micro densidad vascular (MVD) contando vasos teñidos con CD31 o CD34. Esto significaría que el grado de proliferación de un adenoma no está estrictamente limitado por su irrigación, sino que dependería también de la alteración patogénica que

lo originó. En otro tipo de tumores como el de mama y el cáncer colorrectal también ha sido descrita la ausencia de correlación entre estos dos parámetros. Turner y colaboradores identificaron sin embargo, una relación positiva entre la MVD y la proteína antiapoptótica bcl-2, sugiriendo una relación entre angiogénesis y apoptosis. En este sentido, se ha descrito que VEGF no sólo es capaz de estimular la proliferación de las células endoteliales sino también de prolongar la supervivencia de las mismas por inducción de la proteína bcl-2. Es decir que la angiogénesis parecería relacionarse más a la prolongación de la vida del tumor que a su capacidad proliferativa.

El FGF2 es un mitógeno potente de muchos tipos celulares y también un factor angiogénico. Ha sido identificado tanto en la hipófisis humana normal como tumoral (Li *et al.* 1992) (Gospodarowicz *et al.* 1984) y muchos trabajos sugieren que FGF-2 tendría un rol en la progresión de los tumores hipofisarios (Zimering *et al.* 1993)

En sueros preoperatorios de pacientes con tumores hipofisarios se detecta FGF2 que decae luego de la cirugía, mientras que en sueros de personas sanas este factor es indetectable (Ezzat *et al.* 1995).

Nosotros detectamos FGF2 en las células tumorales de cada uno de los tipos de adenomas hipofisarios lo que sugiere una participación del mismo en el desarrollo o mantenimiento del adenoma ya sea a nivel de angiogénesis y/o de proliferación. La localización fue citoplasmática, sin observarse en el núcleo como describiéramos en el modelo de ratón knockout para el RD2.

En conclusión, nuestros datos demuestran que tanto los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, como otros tipos de adenomas hipofisarios expresan VEGF. Si bien en hipófisis normales su localización es predominantemente en células foliculo

estrelladas, en los tumores las células adenomatosas también lo producen. Su expresión está en correlación con la vasculatura del tumor y no en relación directa con el índice de proliferación de los tumores, y. El FGF2, en cambio, no fue expresado por todos los adenomas. Estos resultados en su conjunto nos llevan a un mejor entendimiento del control de la angiogénesis en los tumores hipofisarios que permitiría en un futuro una comprensión cabal de los mecanismos de tumorigénesis. Esto facilitaría la toma de decisiones terapéuticas adecuadas a cada caso en particular.

DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo estudiamos la participación de factores de crecimiento en la génesis y el desarrollo de la hiperplasia de lactotrofos y tumores hipofisarios. Por un lado, profundizamos los roles del Factor de Crecimiento Fibroblástico-2 y al Gen Transformante Tumoral Hipofisario en la hiperplasia de lactotrofos de los ratones hembra knockout para el receptor dopaminérgico D2. Estos dos factores fueron descubiertos en células hipofisarias y detectados en tumores de hipófisis humanos como así también en otros modelos murinos de prolactinomas. Y, de manera paralela, estudiamos al Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular, el agente angiogénico que ha sido más relacionado con procesos tumorales en general, y adenomas hipofisarios en particular. En los tres casos, determinamos la posible asociación de la expresión o función de los factores con el sistema dopaminérgico en hipófisis, ya que la desregulación de este sistema ha sido relacionada con la generación de prolactinomas experimentales.

Finalmente, siguiendo nuestra línea de trabajo en ratones, analizamos la expresión de estos factores en adenomas hipofisarios humanos obtenidos a partir de cirugías.

Los ratones KO para el RD2 fueron generados con el propósito de estudiar los cambios asociados a la enfermedad de Parkinson en la que se produce una degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Pero no resultaron ser un buen modelo para esta enfermedad humana. Por otro lado, debido a la ausencia de RD2 funcionales en hipófisis, las

hembras desarrollaron a los 8 meses aproximadamente una hiperplasia hipofisaria de lactotrofos junto a una hiperprolactinemia crónica que comienza a evidenciarse entre el primer y segundo mes de vida (Diaz-Torga *et al.* 2002; Kelly *et al.* 1997). A los 18 meses las hembras ya tienen verdaderos adenomas de lactotrofos mientras que las hipófisis de los machos a esta edad muestran pequeños focos con microadenomas sin haber pasado por el estado de hiperplasia a edades más tempranas como ocurre en las hembras (Asa *et al.* 1999). Este modelo resulta de gran utilidad para estudiar la generación de prolactinomas, en particular de aquellos prolactinomas con deficiencia en los RD2.

En humanos los prolactinomas constituyen el subtipo de adenoma hipofisario más frecuente (Gillam *et al.* 2006). En general responden a la terapia farmacológica con agonistas dopaminérgicos pero un porcentaje de pacientes es intolerante a las drogas, resistente desde un comienzo o se vuelve resistente con el transcurso del tiempo. En estos casos, una nueva alternativa terapéutica como por ejemplo el bloqueo de factores angiogénicos resultaría alentadora dado que los prolactinomas resistentes se vuelven en su mayoría invasivos y deben ser extirpados.

Los factores de crecimiento en hipófisis cumplen funciones importantes tanto a nivel de la secreción de hormonas como de la proliferación celular actuando en forma paracrina, autocrina e intracrina (Larson *et al.* 1990) (Ferrara *et al.* 1987) (Renner *et al.* 2002). En este sentido, las células foliculo estrelladas, que son fuente de varios factores de crecimiento, participan activamente de la regulación de la función hipofisaria ya que

han sido relacionadas con la regulación del transporte de iones, la fagocitosis, con acciones tróficas, de células madre y regulación paracrina (Hentges *et al.* 2000).

Los adenomas hipofisarios humanos tienen un origen monoclonal y en ellos, al igual que en los modelos experimentales, la desregulación de factores de crecimiento estarían creando un ambiente propicio para la proliferación celular y la propagación de las mutaciones.

VEGF es una de las citoquinas más importantes involucradas en la angiogénesis en condiciones fisiológicas y patológicas (Ferrara *et al.* 2003). Es reconocido por su rol fundamental en el crecimiento de tumores ya que todos requieren del desarrollo de nueva vasculatura cuando su volumen sobrepasa los pocos milímetros. En nuestro trabajo encontramos una mayor expresión de VEGF en las hipófisis hiperplásicas de las hembras KO para el RD2 cuando se compararon con sus pares WT, junto con presencia de peliosis y vasos tortuosos y de gran diámetro con endotelio altamente permeabilizado. Este VEGF es producido por las células foliculo estrelladas en las hipófisis KO en mayores niveles que en WT (no hallamos diferencias en la inmunorreactividad para S-100 entre los grupos). Por otra parte el VEGF *in vitro* no afectó la proliferación de las células adenohipofisarias endócrinas, demostrando que los receptores para este factor (KDR) se encuentran en el endotelio de la hipófisis y por lo tanto el VEGF producido por las células foliculo estrelladas actuaría en forma paracrina sobre los vasos modificando sus propiedades de modo tal de favorecer el crecimiento celular.

Nuestros resultados del tratamiento crónico de ratones hembra WT con el antagonista dopaminérgico haloperidol demostraron que la activación del RD2 por dopamina inhibiría tónicamente la expresión de VEGF en hipófisis, como reportara también Risau para el

endotelio vascular. Es decir que el aumento en la expresión de VEGF hipofisario en los animales KO se relacionaría en forma directa con la ausencia de receptores funcionales tipo D2.

Por otra parte, FGF-2 a diferencia de VEGF, confiere otras características a los vasos, de un alto grado de madurez y escasa permeabilidad, diferentes a las halladas en las hipófisis KO. Estos datos más nuestros resultados de menor expresión de FGF2 en hipófisis de ratones KO indicarían entonces que FGF-2 no estaría afectando el fenotipo vascular en este modelo. No obstante, y a pesar de su menor concentración en las hipófisis KO, podría tener efectos sobre el crecimiento celular y la secreción de prolactina debido a la distinta localización subcelular que observamos en las hipófisis de ratones de distinto genotipo. Además, los receptores celulares para FGF-2 (FGFR1) que localizaron principalmente en los lactotropos en las hipófisis KO, se encontraron sobreexpresados en este grupo respecto al WT.

Por otro lado, y en coincidencia con estos últimos resultados describimos que la expresión de PTTG está disminuida en hipófisis de ratones KO. Es decir que de los tres factores angiogénicos, el VEGF era el único que estaba aumentado.

Por lo anteriormente expuesto, se decidió realizar un tratamiento antiangiogénico bloqueando al VEGF (VEGF-Trap) en las hipófisis KO. El experimento se realizó con hipófisis transplantadas en silastic en forma subcutánea para tener un mejor acceso al tejido y poder aplicar dosis mayores. Obtuvimos como resultado después de 12 días de tratamiento, transplantes altamente irrigados con un gran crecimiento de tejido fibroso e hipofisario por fuera del tubo en el caso de los controles inyectados con vehículo,

mientras que ninguna de estas características se observaron en los animales tratados con la terapia antiangiogénica. En cortes histológicos de las hipófisis tratadas con VEGF-Trap se vio una marcada disminución en la tortuosidad y permeabilidad como así también una mayor integridad de los vasos respecto a las hipófisis controles.

En conclusión, la ausencia de inhibición dopaminérgica en las hipófisis de las hembras KO para RD2 produce un aumento del VEGF que, al modificar las características de los vasos sanguíneos intrahipofisarios favorecería la llegada de otros factores, de crecimiento o nutrientes, induciendo el desarrollo de la hiperplasia de los lactotropos. Este hallazgo es de gran importancia ya que posiciona al sistema VEGF/KDR como posible blanco terapéutico en los adenomas hipofisarios secretores de PRL y resistentes a agentes dopaminérgicos.

Se profundizó además la existencia de una conexión entre el sistema de la dopamina a nivel hipofisario y la expresión de PTTG. Para ello hicimos uso de tres modelos de prolactinomas: las ratas jóvenes tratadas con dosis farmacológicas de estrógenos, las ratas seniles de 32 meses de edad y los ratones hembra KO para el RD2. Los tres modelos comparten el aumento en la proliferación de los lactotropos, la hiperprolactinemia y la escasa o nula acción dopaminérgica a nivel de la glándula hipofisaria. De manera interesante, encontramos que PTTG no sigue el mismo patrón en los 3 casos ya que: en las ratas con tratamiento estrogénico hallamos una sobreexpresión de PTTG al compararlas con los controles, en las ratas seniles no se observaron diferencias respecto a las jóvenes y las hembras KO tienen menores niveles de PTTG que su contraparte WT. Asimismo en nuestra muestra poblacional de

adenomas humanos, no se detectaron diferencias en los niveles de ARNm de pttg entre pacientes sensibles y resistentes a la terapia con dopaminérgicos. En cambio, si pudimos asociar los niveles de expresión de PTTG con la acción de los estrógenos a nivel hipofisario dado que sólo en las ratas tratadas con estrógenos (tienen elevados niveles de estrógenos séricos con reducción de los receptores de estrógenos en hipófisis) determinamos un aumento de PTTG. Es decir, que PTTG no es una característica necesaria para el desarrollo prolactinomas con falla en el control dopaminérgico.

Basándonos en los conocimientos generados a partir de los modelos experimentales, extendimos nuestro trabajo al estudio de los factores angiogénicos VEGF y FGF-2 en adenomas hipofisarios humanos. En nuestro grupo de 28 tumores constituido por 9 prolactinomas resistentes, 3 somatotropinomas, 2 tumores secretores de ACTH y 16 adenomas no funcionantes, observamos que la totalidad expresaba VEGF, si bien el patrón de localización era distinto; mientras que la mitad producía FGF-2. Además la expresión del marcador de endotelio CD31 mostró una correlación positiva con VEGF, hecho que vincula indefectiblemente a este factor de crecimiento vascular con la angiogénesis de la hipófisis tumoral. Por otra parte, el nivel de expresión del marcador de proliferación celular PCNA no correlacionó con CD31 ni con VEGF, por lo interpretamos que quizás la angiogénesis de estos tumores benignos no está necesariamente asociada a proliferación.

En conclusión, podemos decir que la expresión de VEGF en los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos y en los otros tipos de adenomas hipofisarios se relaciona con la angiogénesis tumoral mientras que la expresión de FGF-2 y PTTG no pudo

generalizarse de la misma manera. Tomando en consideración también nuestra experiencia en modelos animales de hiperplasia y tumores hipofisarios, creemos haber contribuido a una mejor comprensión de la patología hipofisaria en un intento de encontrar nuevas alternativas en el tratamiento para aquellos casos en los que las terapias convencionales con las que contamos hoy no resultan efectivas.

BIBLIOGRAFÍA

Abbass SA, Asa SL & Ezzat S 1997 Altered expression of fibroblast growth factor receptors in human pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 1160-1166.

Alarid ET, Bakopoulos N & Solodín N 1999 Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Molecular Endocrinology* **13** 1522-1534.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J & Keshet E 1995 Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat.Med.* **1** 1024-1028.

Anthony FW, Evans PW, Wheeler T & Wood PJ 1997 Variation in detection of VEGF in maternal serum by immunoassay and the possible influence of binding proteins. *Ann Clin Biochem* **34 (Pt 3)** 276-280.

Arbogast LA & Voogt JL 1991 Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* **128** 997-1005.

Arita K, Kurisu K, Tominaga A, Sugiyama K, Eguchi K, Hama S, Yoshioka H, Yamasaki F & Kanou Y 2004 Relationship between intratumoral hemorrhage and overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pituitary adenoma. *Hiroshima J Med.Sci.* **53** 23-27.

Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H & Prats AC 1999 A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Molecular and Cellular Biology* **19** 505-514.

Asa SL & Ezzat S 1998 The Cytogenesis and Pathogenesis of Pituitary Adenomas. *Endocrine reviews* **19** 798-827.

Asa SL, Kelly MA, Grandy DK & Low MJ 1999 Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology* **140** 5348-5355.

Baird A, Mormede P, Ying SY, Wehrenberg WB, Ueno N, Ling N & Guillemin R 1985 A nonmitogenic pituitary function of fibroblast growth factor: regulation of thyrotropin and prolactin secretion. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **82** 5545-5549.

Banerjee SK, Sarkar DK, Weston AP, De A & Campbell DR 1997 Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* **18** 1155-1161.

Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupta PS, Dvorak HF & Mukhopadhyay D 2001 The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* **7** 569-574.

Ben-Jonathan N & Hnasko R 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews* **22** 724-763.

- Ben-Jonathan N & Liu JW 1992 Pituitary lactotrophs: endocrine, paracrine, juxtacrine and autocrine interactions. *Trends of Endocrinology and Metabolism*. **3** 254-258.
- Bergsland EK 2004 Update on clinical trials targeting vascular endothelial growth factor in cancer. *Am.J.Health Syst.Pharm.* **61** S12-S20.
- Bevan JS, Webster J, Burke CW & Scanlon MF 1992 Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocrine reviews* **13** 220-240.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G & Rifkin DB 1997 Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews* **18** 26-45.
- Black EG, Logan A, Davis JR & Sheppard MC 1990 Basic fibroblast growth factor affects DNA synthesis and cell function and activates multiple signalling pathways in rat thyroid FRTL-5 and pituitary GH3 cells. *Journal of Endocrinology* **127** 39-46.
- Bonneville JF, Cattin F, Gorczyca W & Hardy J 1993 Pituitary microadenomas: early enhancement with dynamic CT—implications of arterial blood supply and potential importance. *Radiology* **187** 857-861.
- Borras M, Hardy L, Lempereur F, el Khissin AH, Legros N, Gol-Winkler R & Leclercq G 1994 Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **48** 325-336.
- Borrelli E, Sawchenko PE & Evans RM 1992 Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **89** 2764-2768.
- Bronstein MD & Guitelman M 2004 Hiperprolactinemia y prolactinomas. In *Hipófisis Fisiopatología*, pp 271-292. Ed G Stalldecker. Buenos Aires: Mediciencia, S.A.
- Caccavelli L, Cussac D, Pellegrini I, Audinot V, Jaquet P & Enjalbert A 1992 D2 dopaminergic receptors: normal and abnormal transduction mechanisms. *Hormone Research*. **38** 78-83.
- Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, Jaquet P, Kordon C & Enjalbert A 1994a Decreased Expression of the Two D2 Dopamine Receptor Isoforms in Bromocriptine-Resistant Prolactinomas. *Neuroendocrinology*. **60** 314-322.
- Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, Jaquet P, Kordon C & Enjalbert A 1994b Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology*. **60** 314-322.
- Caccavelli L, Morange-Ramos I, Kordon C, Jaquet P & Enjalbert A 1996 Alteration of G alpha subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. *J Neuroendocrinol.* **8** 737-746.
- Cai A, Hayes JD, Patel N & Hyde JF 1999 Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia. *Endocrinology* **140** 4955-4964.
- Chakroborty D, Sarkar C, Mitra RB, Banerjee S, Dasgupta PS & Basu S 2004 Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res* **10** 4349-4356.

- Chaturvedi K & Sarkar DK 2005 Mediation of basic fibroblast growth factor-induced lactotropic cell proliferation by Src-Ras-mitogen-activated protein kinase p44/42 signaling. *Endocrinology* **146** 1948-1955.
- Choi J, Ko MK & Kay EP 2000 Subcellular localization of the expressed 18 kDa FGF-2 isoform in corneal endothelial cells. *Molecular Vision* **6** 222-231.
- Civelli O, Bunzow JR & Grandy DK 1993 Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **33** 281-307.
- Claffey KP, Wilkison WO & Spiegelman BM 1992 Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* **267** 16317-16322.
- Clifton KH & Meyer RK 1956 Mechanism of anterior pituitary tumor induction by estrogen. *Anatomical Record* **125** 65-81.
- Colao A, Sarno AD, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Somma CD, Faggiano A, Biondi B & Lombardi G 2003 Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology* **148** 325-331.
- Console GM, Gomez Dummm CL, Brown OA, Ferese C & Goya RG 1997 Sexual dimorphism in the age changes of the pituitary lactotrophs in rats. *Mechanisms of Ageing and Development* **95** 157-166.
- Corenblum B & Donovan L 1993 The safety of physiological estrogen plus progestin replacement therapy and with oral contraceptive therapy in women with pathological hyperprolactinemia. *Fertil. Steril.* **59** 671-673.
- Cracchiolo D, Swick JW, McKiernan L, Sloan E, Raina S, Sloan C & Wendell DL 2002 Estrogen-dependent growth of a rat pituitary tumor involves, but does not require, a high level of vascular endothelial growth factor. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **227** 492-499.
- Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, Gongora A, Rubinstein M, Low MJ & Becu-Villalobos D 2005 Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* **146** 2952-2962.
- Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Perez-Millan MI, Passos VQ, Gianella-Neto D, Bronstein MD & Becu-Villalobos D 2007 PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol. Cancer* **6** 4.
- de la Torre NG, Wass JA & Turner HE 2004 Morphologic changes and molecular regulation of angiogenesis in pituitary adenomas. *Frontiers of Hormone Research* **32** 133-145.
- De Nicola AF, von Lawzewitsch I, Kaplan SE & Libertun C 1978 Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* **61** 753-763.
- Delgrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J & Toumniaire J 1997 Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 2102-2107.

- Diaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, Gelman D, Kelly MA, Low MJ, Rubinstein M & Becu-Villalobos D 2002 Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* **143** 1270-1279.
- Diaz-Torga G, Gonzalez IA, Achaval-Zaia R, Libertun C & Becu-Villalobos D 1998a Angiotensin II-induced Ca²⁺ mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *Am.J.Physiol* **274** E534-E540.
- Diaz-Torga GS, Gonzalez Iglesias A, Achaval-Zaia R, Libertun C & Becu-Villalobos D 1998b Angiotensin II induced calcium mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *American Journal of Physiology* **274** E534-E540.
- Donangelo I, Gutman S, Horvath E, Kovacs K, Wawrowsky K, Mount M & Melmed S 2006 Pituitary tumor transforming gene overexpression facilitates pituitary tumor development. *Endocrinology* **147** 4781-4791.
- Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J & Dvorak AM 1987 Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* **57** 673-686.
- Elias KA & Weiner RI 1984 Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **81** 4549-4553.
- Elias KA & Weiner RI 1987 Inhibition of estrogen-induced anterior pituitary enlargement and arteriogenesis by bromocriptine in Fischer 344 rats. *Endocrinology* **120** 617-621.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T & Risau W 1998 Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol.* **140** 947-959.
- Ezzat S 2001 The role of hormones, growth factors and their receptors in pituitary tumorigenesis. *Brain Pathol.* **11** 356-370.
- Ezzat S, Smyth HS, Ramyar L & Asa SL 1995 Heterogeneous in vivo and in vitro expression of basic fibroblast growth factor by human pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **80** 878-884.
- Ezzat S, Zheng L, Zhu XF, Wu GE & Asa SL 2002 Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation.* **109** 69-78.
- Fan L & Iseki S 1998 Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the endocrine glands of the rat. *Arch Histol.Cytol.* **61** 17-28.
- Ferrara N & Davis-Smyth T 1997 The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* **18** 4-25.
- Ferrara N, Gerber H & LeCouter J 2003 The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* **9** 669-676.
- Ferrara N & Henzel W 1989 Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **161** 851-858.

Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R & Gospodarowicz D 1987 Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **84** 5773-5777.

Florentini C, Guerra N, Facchetti M, Finardi A, Tiberio L, Schiaffonati L, Spano P & Missale C 2002 Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *Molecular Endocrinology* **16** 353-366.

Florkiewicz RZ, Baird A & Gonzalez AM 1991 Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization. *Growth Factors* **4** 265-275.

Folkman J 1971 Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J Med.* **285** 1182-1186.

Folkman J 1990 What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl.Cancer Inst.* **82** 4-6.

Folkman J 1995 Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1** 27-31.

Folkman J, Browder T & Palmblad J 2001 Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb.Haemost.* **86** 23-33.

Folkman J & Klagsbrun M 1987 Angiogenic factors. *Science* **235** 442-447.

Folkman J & Shing Y 1992 Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **267** 10931-10934.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* **80** 1523-1631.

Friedman E, Adams HF, Hoog A, Gejman PV, Carson E, Larsson C, De Marco L, Werner S, Fahbusch R & Nordenskjöld M 1994 Normal structural dopamine type 2 receptor gene in prolactin-secreting and other pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **78** 568-574.

Fumagalli F, Bedogni F, Maragnoli ME, Gennarelli M, Perez J, Racagni G & Riva MA 2003 Dopaminergic D2 receptor activation modulates FGF-2 gene expression in rat prefrontal cortex and hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* **74** 74-80.

Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G & Colao A 2006 Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine reviews* **27** 485-534.

Gloddek J, Pagotto U, Paez PM, Arzt E, Stalla GK & Renner U 1999 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol* **160** 483-490.

Gonzalez AM, Logan A, Ying W, Lappi DA, Berry M & Baird A 1994 Fibroblast growth factor in the hypothalamic-pituitary axis: differential expression of fibroblast growth factor-2 and a high affinity receptor. *Endocrinology* **134** 2289-2297.

Gospodarowicz D, Abraham JA & Schilling J 1989 Isolation and characterization of a vascular endothelial mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **86** 7311-7315.

Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A & Bohlen P 1984 Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin-Sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **81** 6963-6967.

Goya RG, Castro MG & Meites J 1991 Differential effect of aging on serum levels of prolactin and alpha-melanotropin in rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **196** 218-221.

Goya RG, Lu JK & Meites J 1990 Gonadal function in aging rats and its relation to pituitary and mammary pathology. *Mechanisms of Ageing and Development* **56** 77-88.

Gudelsky GA, Nansel DD & Porter JC 1981 Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. *Endocrinology* **108** 440-444.

Gurlek A, Karavitaki N, Ansoorge O & Wass JA 2007 What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics. *European Journal of Endocrinology* **156** 143-153.

Hamilton DK, Vance ML, Boulos PT & Laws ER 2005 Surgical outcomes in hyporesponsive prolactinomas: analysis of patients with resistance or intolerance to dopamine agonists. *Pituitary*, **8** 53-60.

Hardy J, Sommi M. 1979 Acromegaly. Surgical treatment by transsphenoidal microsurgical removal of the pituitary adenoma. In *Clinical management of pituitary disorders*, pp 209-217. Eds WF Collins & GT Tindall. New York: Raven Press.

Heaney AP, Fernando M & Melmed S 2002 Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *Journal of clinical investigation* **109** 277-283.

Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R & Melmed S 1999 Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nature Medicine* **5** 1317-1321.

Hentges, Boyadjieva N & Sarkar DK 2000 Transforming Growth Factor- β 3 Stimulates Lactotrope Cell Growth by Increasing Basic Fibroblast Growth Factor from Folliculo-Stellate Cells. *Endocrinology* **141** 859-867.

Hentges ST & Low MJ 2002 Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice. *Endocrinology* **143** 4536-4543.

Herenu CB, Cristina C, Rimoldi OJ, Becu-Villalobos D, Cambiaggi V, Portiansky EL & Goya RG 2006 Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Ther.*

Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K & Melmed S 1990 Clonal origin of pituitary adenomas. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **71** 1427-1433.

Holtzman S, tone J & hellabarger C 1979 Influence of diethylstilbestrol treatment on prolactin cells of female ACI and Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.* **39** 779-784.

Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, Monson JP & Burrin JM 2003 The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro

hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* **148** 203-211.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R & Kabbinavar F 2004 Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* **350** 2335-2342.

Hyde JF, Moore JPJ & Cai A 1998 Galanin in normal and hyperplastic anterior pituitary cells. From pituitary tumor cell lines to transgenic mice. *Ann NY Acad Sci* **863** 48-55.

Iaccarino C, Samad TA, Mathis C, Kercret H, Picetti R & Borrelli E 2002 Control of lactotrop proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **99** 14530-14535.

Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA & Melmed S 2001 Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 867-874.

Jabbour HN, Boddy SC & Lincoln GA 1997 Pattern and localisation of expression of vascular endothelial growth factor and its receptor fit-1 in the ovine pituitary gland: expression is independent of hypothalamic control. *Molecular and Cellular Endocrinology* **134** 91-100.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG & Minick CR 1973 Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of clinical investigation* **52** 2745-2756.

Joseph F, Younis N, Haydon G, Adams DH, Wynne S, Gillet MB, Maurice YM, Lipton ME, Berstock D & Jones IR 2004 Peliosis of the spleen with massive recurrent haemorrhagic ascites, despite splenectomy, and associated with elevated levels of vascular endothelial growth factor. *Eur J Gastroenterol.Hepatol.* **16** 1401-1406.

Jugenburg M, Kovacs K, Stefaneanu L & Scheithauer BW 1995 Vasculature in Nontumorous Hypophyses, Pituitary Adenomas, and Carcinomas: A Quantitative Morphologic Study. *Endocr.Pathol.* **6** 115-124.

Kaneko KJ, Furlow JD & Gorski J 1993 Involvement of the coding sequence for the estrogen receptor gene in autologous ligand-dependent down-regulation. *Molecular Endocrinology* **7** 879-888.

Kardami E 1990 Stimulation and inhibition of cardiac myocyte proliferation in vitro. *Mol.Cell Biochem.* **92** 129-135.

Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK & Low MJ 1997 Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* **19** 103-113.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS & Ferrara N 1993 Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362** 841-844.

Kovacs K & Horvath E 1987 Pathology of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* **16** 529-551.

Kuchenbauer F, Theodoropoulou M, Hopfner U, Stalla J, Renner U, Tonn JC, Low MJ, Arzt E, Stalla GK & Páez-Pereda M 2003 Laminin inhibits lactotroph proliferation and is reduced in early prolactinoma development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **207** 13-20.

Larson GH, Koos RD, Sortino MA & Wise PM 1990 Acute effect of basic fibroblast growth factor on secretion of prolactin as assessed by the reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* **126** 927-932.

Li Y, Koga M, Kasayama S, Matsumoto K, Arita N, Hayakawa T & Sato B 1992 Identification and characterization of high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor in human pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **75** 1436-1441.

Lloyd RV, Scheithauer BW, Kuroki T, Vidal S, Kovacs K & Stefanescu L 1999 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Endocr Pathol* **10** 229-235.

Lloyd RV, Vidal S, Horvath E, Kovacs K & Scheithauer B 2003 Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microsc. Res. Tech.* **60** 244-250.

Lohrer P, Glodde J, Hopfner U, Losa M, Uhl E, Pagotto U, Stalla GK & Renner U 2001 Vascular endothelial growth factor production and regulation in rodent and human pituitary tumor cells in vitro. *Neuroendocrinology*. **74** 95-105.

Luciano AA, Sherman BM, Chapler FK, Hauser KS & Wallace RB 1985 Hyperprolactinemia and contraception: a prospective study. *Obstet. Gynecol.* **65** 506-510.

Ma W, Ikeda H & Yoshimoto T 2002 Clinicopathologic study of 123 cases of prolactin-secreting pituitary adenomas with special reference to multihormone production and clonality of the adenomas. *Cancer* **95** 258-266.

MacLeod RM & Lehmeyer JE 1973 Suppression of pituitary tumor growth and function by ergot alkaloids. *Cancer Research* **33** 849-855.

Marin F & Boya J 1995 Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in the human pituitary gland. *Neuroendocrinology*. **62** 523-529.

McAndrew J, Paterson AJ, Asa SL, McCarthy KJ & Kudlow JE 1995 Targeting of transforming growth factor-alpha expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology* **136** 4479-4488.

McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA & Gittoes NJ 2002 Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 4238-4244.

McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, Mitchell R, Olliff J, Sheppard MC, Franklyn JA & Gittoes NJ 2003 Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clinical Endocrinology (Oxford)* **58** 141-150.

Melmed S 2003 Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *Journal of clinical investigation* **112** 1603-1618.

- Meloche S, Seuwen K, Pages G & Pouyssegur J 1992 Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Molecular Endocrinology* **6** 845-854.
- Meyer RK & Clifton KG 1956 Effect of diethylstilbestrol induced tumorigenesis on the secretory activity of the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* **58** 686-694.
- Missale C, Boroni R, Sigala S, Buriani A, Fabris M, Leon A, Del Toso R & Spano PF 1996 Nerve growth factor in the anterior pituitary: localization in lactotroph cells and cosecretion with prolactin by a dopamine-regulated mechanism. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **93** 4240-4245.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M & Caron MG 1998 Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews* **78** 189-225.
- Molitch ME 1999 Medical treatment of prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* **28** 143-69, vii.
- Molitch ME 2005 Pharmacologic resistance in prolactinoma patients. *Pituitary*. **8** 43-52.
- Moscattelli D 1987 High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *Journal of Cell Physiology* **131** 123-130.
- Moscattelli D 1994 Autocrine downregulation of fibroblast growth factor receptors in F9 teratocarcinoma cells. *J Cell Physiol* **160** 555-562.
- Moscattelli D, Presta M, Joseph-Silverstein J & Rifkin DB 1986 Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol* **129** 273-276.
- Mukdsi JH, De Paul AL, Petit JP, Guberrez S, Aoki A & Torres AI 2006 Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas. *Acta of Neuropathology* **112** 491-501.
- Nishikawa R, Cheng SY, Nagashima R, Huang HJ, Cavenee WK & Matsutani M 1998 Expression of vascular endothelial growth factor in human brain tumors. *Acta of Neuropathology* **96** 453-462.
- Niveiro M, Aranda FI, Peiro G, Alenda C & Pico A 2005 Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. *Hum.Pathol.* **36** 1090-1095.
- Ochoa AL, Mitchner NA, Paynter CD, Morris RE & Ben Jonathan N 2000 Vascular endothelial growth factor in the rat pituitary: differential distribution and regulation by estrogen. *J Endocrinol* **165** 483-492.
- Okada-Ban M, Thiery JP & Jouanneau J 2000 Fibroblast growth factor-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **32** 263-267.
- Onofri C, Carbia NA, Schaaf L, Feirer M, Lohrer P, Stummer W, Berner S, Chervin A, Goldberg V, Stalla GK, Renner U & Arzt E 2004 Estradiol stimulates vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in human lactotroph and lactosomatotroph pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **112** 18-23.

- Oomizu S, Chaturvedi K & Sarkar DK 2004 Folliculostellate cells determine the susceptibility of lactotropes to estradiol's mitogenic action. *Endocrinology* **145** 1473-1480.
- Paez-Pereda M, Kuchenbauer F, Arzt E & Stalla GK 2005 Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **38** 1487-1494.
- Pan LX, Chen ZP, Liu YS & Zhao JH 2005 Magnetic resonance imaging and biological markers in pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space. *J Neurooncol.* **74** 71-76.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA & Ferrara N 1994 Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol.Chem.* **269** 25646-25654.
- Park YN, Kim YB, Yang KM & Park C 2000 Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* **124** 1061-1065.
- Pastorcic M, De A, Boyadjieva N, Vale W & Sarkar DK 1995 Reduction in the expression and action of transforming growth factor-b1 on lactotropes during estrogen-induced tumorigenesis. *Cancer Research* **55** 4892-4898.
- Pei L & Melmed S 1997 Isolation and characterization of a pituitary tumor-specific transforming gene. *Molecular Endocrinology* **11** 433-441.
- Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynak CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P & Enjalbert A 1989 Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **69** 500-509.
- Phelps C & Hymer WC 1983 Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology.* **37** 23-31.
- Pirolì G, Lima A, Diaz-Torga G & De Nicola AF 1994 Biochemical parameters in the anterior pituitary during the course of tumorigenesis induced by diethylstilbestrol treatment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **51** 183-189.
- Pirolì G, Torres A, Pietranera L, Grillo C, Ferrini M, Lux-Lantos V, Aoki A & De Nicola A 2000 Sexual dimorphism in diethylstilbestrol-induced prolactin pituitary tumors in F344 rats. *Neuroendocrinology.* **72** 80-90.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R & Rusnati M 2005 Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Reviews* **16** 159-178.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N & Williams LT 1993 Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 7533-7537.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES & Golub TR 2003 A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics* **33** 49-54.
- Ray D & Melmed S 1997 Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocrine reviews* **18** 206-228.

- Renko M, Quarto N, Morimoto T & Rifkin DB 1990 Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *Journal of Cell Physiology* **144** 108-114.
- Renner U, Lohrer P, Schachter BS, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E & Stalla GK 2002 Transforming growth factor β stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells. *Endocrinology* **143** 3759-3765.
- Renner U, Pagotto U, Arzt E & Stalla GK 1996 Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *European Journal of Endocrinology* **135** 515-532.
- Reyniak JV, Wenof M, Aubert JM & Stangel JJ 1980 Incidence of hyperprolactinemia during oral contraceptive therapy. *Obstet. Gynecol.* **55** 8-11.
- Risau W 1997 Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386** 671-674.
- Sabath DE, Broome HE & Prystowsky MB 1990 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene* **91** 185-191.
- Saez C, Japon MA, Ramos-Morales F, Romero F, Segura DI, Tortolero M & Pintor-Toro JA 1999 hpttg is over-expressed in pituitary adenomas and other primary epithelial neoplasias. *Oncogene* **18** 5473-5476.
- Saiardi A, Bozzi Y, Baik J-H & Borrelli E 1997 Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* **19** 115-126.
- Saleh M, Stacker SA & Wilks AF 1996 Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Research* **56** 393-401.
- Sanchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG & Zuccolilli GO 2003 Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J.Comp Neurol.* **458** 319-325.
- Sarkar DK, Gottschall PE & Meites J 1982 Damage to hypothalamic dopaminergic neurons is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science* **218** 684-686.
- Satoh H, Kajimura T, Chen C, Yamada K, Furuhashi K & Nomura M 1997 Invasive pituitary tumors in female F344 rats induced by estradiol dipropionate. *Toxicol Pathol* **25** 462-469.
- Schechter J, Goldsmith P, Wilson C & Weiner R 1988 Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. *Journal of Clinical and Endocrinological Metabolism* **67** 713-719.
- Schechter J & Weiner R 1991 Changes in basic fibroblast growth factor coincident with estradiol-induced hyperplasia of the anterior pituitaries of Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Endocrinology* **129** 2400-2408.
- Schlechte J, Dolan K, Sherman B, Chapler F & Luciano A 1989 The natural history of untreated hyperprolactinemia: a prospective analysis. *Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism* **58** 412-418.
- Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL & Low MJ 2002 Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by

- dopamine-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*. **110** 973-981.
- Schwartz J, Van de Pavert S, Clarke I, Rao A, Ray D & Vrana K 1998 Paracrine interactions within the pituitary gland. *Ann NY Acad Sci* **839** 239-243.
- Seilicovich A, Pisera D, Sciascia SA, Candolfi M, Puntel M, Xiong W, Jaita G & Castro MG 2005 Gene therapy for pituitary tumors. *Curr.Gene Ther.* **5** 559-572.
- Shida N, Ikeda H, Yoshimoto T, Oshima M, Taketo MM & Miyoshi I 1998 Estrogen-induced tumorigenesis in the pituitary gland of TGF-beta(+/-) knockout mice. *Biochim.Biophys Acta* **1407** 79-83.
- Sinha YN & Gilligan TA 1982 Estrogen in high doses inhibits perphenazine-induced prolactin release. *Endocrinology* **110** 126-130.
- Sonabend AM, Musleh W & Lesniak MS 2006 Oncogenesis and mutagenesis of pituitary tumors. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* **6 Suppl 9** S3-14.
- Suarez C, Garcia-Tomadú I, Khalil W & Becu-Villalobos D 2002 Dehydroepiandrosterone treatment attenuates estrogen induced pituitary hyperplasia. *Journal of Endocrinology* **174** 447-454.
- Sulpice E, Bryckaert M, Lacour J, Contreres JO & Tobelem G 2002 Platelet factor 4 inhibits FGF2-induced endothelial cell proliferation via the extracellular signal-regulated kinase pathway but not by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Blood* **100** 3087-3094.
- Takechi A 1994 Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on vascular formation in pituitary tumors induced by estrogen in rats. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **34** 729-733.
- Teunis MA, Kavelaars A, Voest E, Bakker JM, Ellenbroek BA, Cools AR & Heijnen CJ 2002 Reduced tumor growth, experimental metastasis formation, and angiogenesis in rats with a hyperreactive dopaminergic system. *FASEB J.* **16** 1465-1467.
- Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D & Chattopadhyay N 2006 The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med.Res.* **4** 130-137.
- Thomer MO, Martin WH, Rogol AD, Morris JL, Perryman RL, Conway BP, Howards SS, Wolfman MG & MacLeod RM 1980 Rapid regression of pituitary prolactinomas during bromocriptine therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **51** 438-445.
- Tooyama I, Kawamata T, Walker D, Yamada T, Hanai K, Kimura H, Iwane M, Igarashi K, McGeer EG & McGeer PL 1993 Loss of basic fibroblast growth factor in substantia nigra neurons in Parkinson's disease. *Neurology* **43** 372-376.
- Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL & Wass JA 2000a Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85** 2931-2935.
- Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL & Wass JA 2000b Angiogenesis in pituitary adenomas - relationship to endocrine function, treatment and outcome. *Journal of Endocrinology* **165** 475-481.

- Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL & Wass JA 2000c Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85** 1159-1162.
- Tyrrell JB, Lamborn KR, Hannegan LT, Applebury CB & Wilson CB 1999 Transsphenoidal microsurgical therapy of prolactinomas: initial outcomes and long-term results. *Neurosurgery* **44** 254-261.
- Velkeniers B & Hooghe-Peters EL 1998 From prolactin cell to prolactinoma: implications of ontogenic mechanisms in diagnosis and management. *Endocr.Relat.Cancer* **5** 27-36.
- Vidal S, Kovacs K, Cohen SM, Stefanescu L, Lloyd RV & Scheithauer BW 1999 Localization of vascular endothelial growth factor in non tumorous human pituitaries. *Endocr Pathol* **10** 109-122.
- Vidal S, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW, Kuroki T & Lloyd RV 2001 Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. *Virchows Arch* **438** 595-602.
- Vidal S, Lloyd RV, Moya L, Scheithauer BW & Kovacs K 2002 Expression and distribution of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in the rat pituitary. *J.Histochem.Cytochem.* **50** 533-540.
- Vidal S, Oliveira MC, Kovacs K, Scheithauer BW & Lloyd R 2000 Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in the GH3 cell line. *Cell Tissue Res* **300** 83-88.
- Wang Z, Yu R & Melmed S 2001 Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division. *Mol.Endocrinol* **15** 1870-1879.
- Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I & Scanlon MF 1994 A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. *N.Engl.J Med.* **331** 904-909.
- Weiss MH, Teal J, Gott P, Wycoff R, Yadley R, Apuzzo ML, Giannotta SL, Kletzky O & March C 1983 Natural history of microprolactinomas: six-year follow-up. *Neurosurgery* **12** 180-183.
- Wiklund J, Wertz N & Gorski J 1981 A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. *Endocrinology* **109** 1700-1707.
- Wingrave SJ, Kay CR & Vessey MP 1980 Oral contraceptives and pituitary adenomas. *Br.Med.J* **280** 685-686.
- Wong AK, Alfert M, Castrillon DH, Shen Q, Holash J, Yancopoulos GD & Chin L 2001 Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **98** 7481-7486.
- Xu RK, Wu XM, Di AK, Xu JN, Pang CS & Pang SF 2000 Pituitary prolactin-secreting tumor formation: recent developments. *Biol Signals Recept.* **9** 1-20.
- Yeates NTM 1949 The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *Journal of Agricultural Science* **39** 1-43.
- Yu R & Melmed S 2001 Oncogene activation in pituitary tumors. *Brain Pathol.* **11** 328-341.

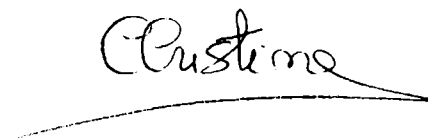
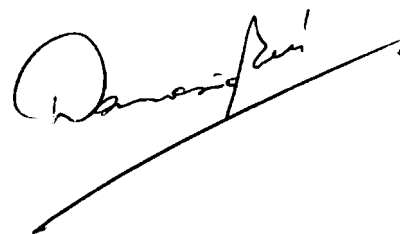
Yu R & Melmed S 2004 Pituitary tumor transforming gene: an update. *Frontiers of Hormone Research* **32** 175-185.

Zhang X, Horwitz GA, Heany AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD & Melmed S 1999a Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 761-767.

Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD & Melmed S 1999b Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* **13** 156-166.

Zimering MB, Katsumato N, Sato Y, Brandi ML, Aurbach GD, Marx SJ & Friesen HG 1993 Increased basic fibroblast growth factor in plasma from multiple endocrine neoplasia type 1: relation to pituitary tumor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **76** 1182-1187.

Zou H, McGarry TJ, Bernal T & Kirschner MW 1999 Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285** 418-422.

A handwritten signature consisting of several vertical, overlapping strokes, possibly representing the name 'Zhang'.A handwritten signature that reads 'Clustime' in a cursive script, with a long horizontal line extending to the right from the end of the word.A handwritten signature that appears to read 'Dameris' in a cursive script, with a long diagonal line extending downwards and to the right from the end of the word.