

Tesis Doctoral

Mecanismos involucrados en la regulación de la hipófisis normal e hiperplásica : angiotensina II y esteroides

Suárez, Cecilia Ana

2004

Tesis presentada para obtener el grado de de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Suárez, Cecilia Ana. (2004). Mecanismos involucrados en la regulación de la hipófisis normal e hiperplásica : angiotensina II y esteroides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3741_Suarez

Cita tipo Chicago:

Suárez, Cecilia Ana. "Mecanismos involucrados en la regulación de la hipófisis normal e hiperplásica : angiotensina II y esteroides". Tesis de . Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3741_Suarez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y BIBLIOTECA

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA
REGULACION DE LA HIPOFISIS NORMAL E
HIPERPLASICA:
ANGIOTENSINA I Y ESTEROIDES**

Tesista: Lic. Cecilia Ana Suárez

Directora: Dra. Damasia Becú de Villalobos

Codirectora: Dra. Graciela Díaz de Torga

***Tesis presentada para optar por el título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires***

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

2004

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

***MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA
REGULACION DE LA HIPOFISIS NORMAL E
HIPERPLASICA:
ANGIOTENSINA II Y ESTEROIDES***

Tesista: Lic. Cecilia Ana Suárez

Directora: Dra. Damasia Becú de Villalobos

Codirectora: Dra. Graciela Díaz de Torga

Palabras clave:

***hipófisis, prolactinoma, estrógenos, angiotensina II,
dehidroepiandrosterona***

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

***MECHANISMS INVOLVED IN
NORMAL AND HYPERPLASTIC PITUITARY
REGULATION:
ANGIOTENSIN II AND STEROIDS***

Author: Lic. Cecilia Ana Suárez

Director: Dra. Damasia Becú de Villalobos

Codirector: Dra. Graciela Díaz de Torga

Keywords:

***Pituitary, prolactinoma, estrogens, angiotensin II,
dehydroepiandrosterone***

AGRADECIMIENTOS

A mis jefas Damasia Becú-Villalobos y Graciela Díaz-Torga, qué buen equipo que formaron para mi... que bien se complementaron...

A Dam... mi referente científico. Gracias por confiar en mí cuando me aceptaste en tu lab, alla hace unos años... Gracias por tu estímulo, por tu guía, por tu humor, por tu paz interior. Siempre dispuesta a un consejo cuando se te pedía, pero también siempre dispuesta a dar la libertad necesaria para dejar crecer... un ejemplo de equilibrio, un ejemplo de docencia. Me contagiaste de tu espíritu emprendedor, amante de nuevos desafíos, del por que no? y sin embargo, sin perder la calma... no voy a olvidarme de eso. Aprendí mucho de vos, sabés? Tu palabra es... emprendimiento.

A Gra... en un párrafo no puedo resumir todo el apoyo que tuve de vos, en todo sentido (sobre todo en los momentos difíciles). Si las paredes de la Becucueva hablaran... no? Gracias por tu actitud siempre dispuesta, casi de una madre incondicional... Gracias por estar presente siempre, por escucharme tanto, por aconsejarme con el alma... Gracias por todo lo que compartiste conmigo y especialmente gracias por tu confianza y amistad. Tu palabra es... generosidad.

A mis compañeros en la Becucueva, gracias por permitirme disfrutar, literalmente, del tiempo compartido. Por formar entre todos un ambiente tan agradable donde trabajar... que importante es eso, no? Me considero toda una afortunada por eso.

A Caro... mi compañera de ruta. Comparti con vos tantas cosas, y siempre con tan buena onda... es un placer trabajar con vos. Gracias por tu energía, por tu alegría,

por tu confianza, por tu espontaneidad... Y gracias por estar siempre dispuesta a dar una mano cuando se te necesita. Tu palabra es... compañerismo.

A Jorge... Mil gracias por tu gran aporte de las corridas de calcio! Pero además gracias por tu calidez humana, por tu sensibilidad y profundidad en la manera de ver las cosas. Tu palabra es... afectividad.

A Isa... la niña grande. La benjamina, pero también con madurez y consejos de grande... gracias por la calidez y humanidad que aportas al lab. Tu palabra es... dulzura.

A Ana... vos también, Ana. Que energía, que disponibilidad al trabajo! Sos un lujo en cualquier laboratorio. Cuando llegaste, todo se nos alivió tanto... no faltaban más buffers, ni más material irradiado, ni autoclavado... y los ratones! Eso si es organización! Y encima con buena onda! Tu palabra es... eficiencia.

A Bettina... por ser un ejemplo de vida, un ejemplo de optimismo, una inyección de energía adicional en cada una de sus visitas a la Becucueva.

A Rita... a vos, que te fuiste hace poco, pero no nos olvidamos de cuando estabas! Todo un personaje. Al principio me costo, eras tan distinta a mi... pero despues aprendí a quererte también. Y ahora te extrañamos...

A Vicky... siempre tan dispuesta a escuchar y aportar con los problemas que surgieran, de cualquier índole... Gracias por tu disponibilidad... también a prestarnos cosas cuando las necesitamos!

Al resto de los Libertunes, Silvia, Lucas, Paolo, Marina y las más nuevitas, María Marta y Pato... primos hermanos nuestros, compañeros de vivencias, de encuentros, de viajes a congresos, de charlas, de festejos compartidos... gracias por la buena onda y por todo lo que vivimos juntos!

Y por supuesto, al Dr. Carlos Libertun, por haber dado origen y permitido el desarrollo de "Los Libertunes" y "Los Becucuevinos". Porque gran parte de que las cosas salgan bien, depende de su origen... sin duda él habrá sentado las bases para formar estos dos grupos con valores humanos además de científicos.

Al Dr. Eduardo Charreau, por permitirme realizar mi tesis doctoral en el IByME.

Al Dr. Enrique Segura, que con sus charlas filosófico-científicas me impulsó tanto a la investigación... Al Dr. Omar Pignataro, por su gran apoyo y optimismo, y por prestarnos su material en la medición del AMPc... Al Dr. Carlos Calvo, por ser tan gran ser humano y prestarnos tanto su PCRra...

Al CONICET, que a través de sus becas permitió la realización de esta Tesis Doctoral. Y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que se volvió varios años mi segundo hogar y formó gran parte de lo que soy...

Y a mis padres, Ana María y Francisco. A ella por todo el apoyo que me brindó... y a él por preguntarme, desde que tengo memoria, por qué? Por incitarme a buscar un por qué, desde algún lugar, hacia algún lugar. Mi primer filósofo, la primer persona que me impulsó a ir siempre por más.

Y a tantos otros que han marcado de una u otra manera mi camino hasta aquí...

*A todos ellos: **GRACIAS !!!***

Los resultados de la presente tesis doctoral fueron publicados en parte en:

- “Upregulation of angiotensin II type 2 receptor expression in estrogen induced pituitary hyperplasia”. Suárez Cecilia; Díaz-Torga Graciela; González-Iglesias Arturo; Cristina Carolina; Becú-Villalobos Damasia. **American Journal of Physiology** (Endocrinology and Metabolism). 286(5):E786-94: 2004.
- “Angiotensin II phosphorylation of extracellular signal regulated kinases in rat anterior pituitary cells”. Suárez Cecilia; Díaz-Torga Graciela; González-Iglesias Arturo; Vela Jorge; Mladovan Alejandro; Baldi Alberto; Becú-Villalobos Damasia. **American Journal of Physiology**, (Endocrinology and Metabolism). Vol 285 (3): E645-653; 2003.
- “Dehydroepiandrosterone treatment attenuates estrogen induced pituitary hyperplasia” Suárez Cecilia; García Tornadú Isabel; Khalil Wahid; Becú-Villalobos Damasia. **Journal of Endocrinology**. Vol 174 (3): 447-454; 2002.
- “Angiotensin and calcium signaling in the pituitary and hypothalamus” Suárez Cecilia; García Tornadú Isabel; Cristina Carolina; Vela Jorge; González Iglesias Arturo; Libertun Carlos; Díaz-Torga Graciela; Becú-Villalobos Damasia. **Cellular and Molecular Neurobiology**. Vol 22 (3): 315-333; 2002.
- “Calcio, angiotensina y secreción hormonal hipofisaria” Becú-Villalobos Damasia; Suárez Cecilia; González Iglesias Arturo. **Revista de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo** 38 : 36-37, 2001
- “Desensitization of angiotensin II: effect on $[Ca^{2++}]_i$, inositol triphosphate and prolactin in pituitary cells.” González Iglesias Arturo; Suárez Cecilia; Feierstein Claudia; Díaz-Torga Graciela; Becú-Villalobos Damasia. **American Journal of Physiology**. (Endocrinology and Metabolism) 280 (3):E462-E470, 2001

INDICE

- Abreviaturas	1
- Resumen	5
- Abstract	7
- Introducción General	9
1 - Eje hipotalámico - hipofisario	9
2 - Regulación hipotalámica de la hipófisis	11
3 - Regulación de la secreción de prolactina	12
4 - Regulación de la secreción de la hormona del crecimiento	20
5 - Tumores hipofisarios	22
6 - Angiogénesis y tumorigénesis	26
7 - Prolactinomas	27
8 - Modelo experimental de prolactinoma en rata	29
- Objetivos	37
- Materiales y Métodos	38
1 - Animales	38
2 - Medios de cultivo, reactivos y drogas	38
3 - Tratamientos <i>in vivo</i>	39
4 - Obtención de células adenohipofisarias dispersas	41
5 - Medición de la concentración intracelular de calcio	42
6 - Cultivo primario de células adenohipofisarias y tratamientos <i>in vitro</i>	43
7 - Marcación de hormonas con ¹²⁵ I	44
8 - Radioinmunoensayos hormonales	44
9 - Radioinmunoensayos de AMPc	46
10 - Corrida electroforética de proteínas	46
11 - Western-blots	47
12 - Extracción de RNA	48
13 - Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa	48
14 - Corrida electroforética del cDNA amplificado	50
15 - Inmunohistoquímica (IHQ) de PRL	50
16 - Análisis estadísticos	51

PARTE I: ANGIOTENSINA II

- Introducción	53
1 - Sistema renina-angiotensina	53
2 - Sistema renina-angiotensina hipofisario: efecto de los estrógenos	54
3 - Acciones proliferativas y angiogénicas de la angiotensina II	55
4 - Efectos de la angiotensina II en la hipófisis	57
- Resultados	
Capítulo 1: Alteraciones de la respuesta a angiotensina II en la hipófisis hiperplásica. Efecto de un tratamiento con progesterona	61
1.A - Principales alteraciones presentes en la hiperplasia hipofisaria	65
1.B - Expresión de los receptores de AII en adenohipófisis	68
1.C - Patrón de respuesta del calcio ante AII	68
1.D - Fosforilación de ERK1/2 en respuesta a AII	69
1.E - Secreción de PRL en respuesta a AII	69
1.F - Efectos del tratamiento con progesterona	73
Discusión	81
Capítulo 2: Vía de señalización de la angiotensina II en la adenohipófisis normal	89
2.A - AII induce fosforilación de ERK1/2 en forma tiempo y dosis-dependiente	92
2.B - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía su receptor AT1	92
2.C - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía proteína G insensible a PTX	92
2.D - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía PLC β	93
2.E - AII induce fosforilación de ERK1/2 por una vía principalmente independiente de la PKC	93
2.F - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía un aumento de calcio intracelular	94
2.G - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía la activación de una tirosín-kinasa de la familia Src	95
2.H - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía la transactivación del EGFR	95
2.I - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía la activación de MEK1/2	96
Discusión	104

PARTE II: Dehidroepiandrosterona

- Introducción	109
1 – Generalidades	109
2 - DHEA y tumores	112
3 - DHEA y enfermedades cardiovasculares	113
4 - DHEA y diabetes	113
5 - DHEA y obesidad	114
6 - DHEA y sistema neuroendócrino	115
7 - DHEA y sistema reproductivo	115
8 - DHEA e inmunidad	116
9 - DHEA y estrés	116
10 - Utilización actual de DHEA	117
- Resultados	
Capítulo 3: Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con dehidroepiandrosterona en un tumor hipofisario inducido por estrógenos	119
3.A - Efecto de la DHEA sobre el peso corporal	121
3.B - Efecto de la DHEA sobre la hiperplasia adenohipofisaria	121
3.C - Efecto de DHEA sobre los niveles de PRL sérica	121
3.D - Efecto de la DHEA sobre los niveles de GH, IGF-1 y LEP séricas	122
3.E - Efecto de la DHEA sobre el ciclo estral	123
Discusión	128
Capítulo 4: Efecto de la dehidroepiandrosterona sobre la liberación hormonal de células adenohipofisarias <i>in vitro</i> y su modulación por factores hipotalámicos	133
4.A - Efecto de DHEA y sus metabolitos sobre la liberación basal de PRL y GH <i>in vitro</i>	135
4.B - Efecto de DHEA y sus metabolitos sobre la inhibición de la liberación de PRL <i>in vitro</i> y la movilización del calcio inducidas por DA	135
4.C - Efecto de DHEA sobre la liberación de PRL y la movilización del calcio inducidas por AII	135

4.D - Efecto de la DHEA sobre la inhibición de la liberación de GH y PRL <i>in vitro</i> inducida por STT	136
4.E - Efecto de la DHEA y sus metabolitos sobre la liberación de GH, la movilización del calcio y la producción de AMPc inducidas por GHRH	136
Discusión	141
- Discusión General	146
- Bibliografía	159

ABREVIATURAS

¹²⁵ I	iodo 125
³ H	tritio
4,5-PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
5-HT	5-hidroxi-triptamina (serotonina)
α-MSH	hormona estimulante de los melanocitos
ACE	enzima convertidora de angiotensina
Ach	acetilcolina
ACTH	hormona adrenocorticotrófica
ADIOL	androstenediol
ADIONA	androstenediona
AG1478	inhibidor del EGFR
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ATP	adenosín trifosfato
AII	angiotensina 1-8
AIII	angiotensina 2-8
AIV	angiotensina 3-8
ANOVA	análisis de la varianza
AT1	receptor de angiotensina tipo 1
AT2	receptor de angiotensina tipo 2
AT4	receptor de angiotensina tipo 4
BAG	glomerulosa adrenal bovina
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic-acid-tetraacetoxymethyl-ester, quelante intracelular de calcio
BP	buffer fosfato
BS	buffer salino
BSA	seroalbúmina bovina
C	control
[Ca ²⁺] _i	concentración intracelular de calcio
CADTK	tirosín kinasa dependiente de calcio
cDNA	DNA copia
CHO	ovario de hámster chino
cpm	cuentas por minuto
CRH	hormona liberadora de ACTH
D2	receptor de DA tipo 2
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
DEPC	dietilpirocarbonato
DES	dietilestilbestrol, estrógeno sintético
DHEA	dehidroepiandrosterona
DHEA-S	dehidroepiandrosterona-sulfato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
Dup753	bloqueante del receptor AT1
E2	estradiol
EA	albúmina de huevo
EC	encefalinas
EC50	concentración efectiva 50
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor de EGF
EGTA	etilenglicol-bis(aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

ER	receptor de estrógenos
ERK	kinasa regulada por señales extracelulares
ES	error estándar
ET	endotelina
EtOH	etanol
F344	Fisher 344
FAK	kinasa de adhesión focal
FGF-1, FGF- α	factor de crecimiento fibroblástico ácido
FGF-2, FGF- β	factor de crecimiento fibroblástico básico
FSH	hormona folículo estimulante
FURA-2AM	fura-2-acetometiléster
G6PDH	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GABA	ácido γ -aminobutírico
GAL	galanina
GDP	guanosín bifostato
GH	hormona de crecimiento o somatotrofina
GH ₃	línea celular tumoral somatomamotropa
GHRH	hormona liberadora de GH
Gi	proteína G inhibitoria
GMPc	guanosin monofosfato cíclico
GnRH	hormona liberadora de FSH y LH
GPCR	receptores acoplados a proteínas G
Gs	proteína G estimulatoria
GTM	glutamato
GTP	guanosín trifosfato
HE	herbimicina-A, inhibidor de tirosín kinasas
HEK-293	línea celular derivada de riñón embrionario humano
HIV-1	virus de inmunodeficiencia humana tipo 1
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
HS	suero de caballo
HSD	deshidrogenasa de hidroxiesteroideos
icv	intracerebroventricular
IGFBP	proteína de unión a IGF en sangre
IGF-I	factor de crecimiento insulina-símil tipo 1
IGFR	receptor de IGF-1
IgG	inmunoglobulina G
IHQ	inmunohistoquímica
IP ₃	inositol trifosfato
ip	intraperitoneal
JAK-2	tirosín kinasa Janus tipo 2
kb	kilobase
Kd	constante de disociación
kD	kilodalton
KEL	keleritrina, inhibidor de la PKC
LEP	leptina
LH	hormona luteinizante
MAPK	kinasa activada por mitógenos
MEK	kinasa activadora de ERK
MEM	medio esencial mínimo
MEN	neoplasia endócrina múltiple
MIX	metilisobutilxantina
NA	noradrenalina
NaAc	acetato de sodio
NHPP	National Hormones and Pituitary Program
NIDDK	National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases

NIH	National Institute of Health
NO	óxido nítrico
NRS	suero normal de conejo
NS	No significativo
NT	neurotensina
NY	neuropéptido Y
OH-ADIOL	hidroxiandrostenediol
OH-DHEA	7 α -hydroxidehidroepiandrosterona
OH-PREG	hydroxipregnenolona
OT	oxitocina
P4	progesterona
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	buffer fosfato salino
PBS-T	buffer PBS con Tween-20 0,05%
PBS-T-BSA	buffer PBS con Tween-20 0,05% y BSA 1%
PC12W	línea celular derivada de feocromocitoma
PCNA	gen codificante del pcna
pcna	antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PD123319	antagonista no peptídico de receptores AT2
PD98059	inhibidor de la MEK
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	receptor de PDGF
pERK1/2	ERK1/2 fosforilada
PHDA	sistema dopaminérgico periventricular-hipofisario
PI3K	kinasa del 3-fosfatidilinositol
PIF	factor inhibidor de la prolactina
PKA	proteína kinasa A
PKC	proteína kinasa C
PLA-2	fosfolipasa A tipo 2
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PM	peso molecular
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato, activador o bloqueante de la PKC
POMC	pro-opiomelanocortina
PP1	inhibidor de tirosín kinasas de la familia Src
PRF	factor liberador de la prolactina
PRL	prolactina
PTTG	gen transformante de tumores hipofisarios
pttg	proteína derivada del PTTG
PTX	toxina de Pertussis, activadora de la Gi
PyK-2.	tirosín kinasa rica en prolinas tipo 2
REM	movimientos oculares rápidos
RIA	radioinmunoensayo
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _r	RNA ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
RTK	receptor tirosín kinasa
RT-PCR	retrotranscripción y PCR
sc	subcutánea
SD	Sprague Dawley
SDS	duodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SNC	sistema nervioso central

SP	sustancia P
SRA	sistema renina-angiotensina
Src	tirosín kinasa no receptora
SRE	elemento respondedor a suero
STAT	factor transductor de señales y activador de la transcripción
STT	somatostatina
T	tumor
TGF- β	factor de crecimiento transformante tipo β
THDA	sistema dopaminérgico túbero-hipofisario
TIDA	sistema dopaminérgico túbero-infundibular
TMB8	3,4,5-trimethoxybenzoic-acid-8-(diethylamino)-octyl-ester, quelante intracelular de calcio
TRH	hormona liberadora de TSH
TSH	tirotrofina
U73122	inhibidor de la PLC
VEGF	factor de crecimiento asociado al endotelio vascular
VIP	péptido intestinal vasoactivo
VP	vasopresina
VSMC	células de músculo liso vascular

RESUMEN

El eje hipotalámico-hipofisario es una estructura fundamental en el control neuroendócrino del organismo y es en la eminencia media donde se establece la principal conexión entre ambos componentes a través de la liberación de factores hipofisotropos controladores de la secreción hormonal hipofisaria. De este modo la liberación de PRL está sujeta principalmente a un control tónico de tipo inhibitorio ejercido por la DA, mientras que la secreción de la GH está controlada por la liberación cíclica de GHRH y STT. A nivel periférico, los estrógenos son los principales estimuladores de la síntesis y secreción de PRL y un tratamiento estrogénico crónico produce en la rata el desarrollo de nuestro modelo experimental: un prolactinoma o adenoma de lactotropos.

La Angiotensina II (All), además de ser una hormona involucrada en la regulación de la presión arterial sistémica, es uno de los factores que inducen endócrina y parácrinamente la secreción de PRL. Este octapéptido resulta interesante porque tiene además en diferentes tejidos efectos de tipo proliferativo y angiogénico y, en muchos casos, las acciones estimuladoras ejercidas a través del receptor AT1 son parcialmente compensadas y reguladas por efectos opuestos producidos vía AT2. El sistema renina-angiotensina (SRA) hipofisario local se encuentra ampliamente influenciado por la acción estrogénica, y nosotros ya habíamos descrito en trabajos previos una alteración de la respuesta a All en la hipófisis hiperplásica. Específicamente, se encontró alterado el patrón de movilización interna del calcio y la secreción de PRL.

Por lo tanto en la primera parte de esta tesis decidimos analizar con mayor detalle algunas de las alteraciones de la respuesta a All en los tumores hipofisarios, específicamente en relación con la participación de los subtipos de sus receptores. De este modo detectamos por Western-blot y por RT-PCR que el tratamiento estrogénico induce una sobreexpresión de AT2 y una subexpresión de AT1 en hipófisis. Por otro lado, describimos por primera vez la activación de ERK1/2 en la respuesta hipofisaria a All y definimos la vía de transducción involucrada en la glándula normal. Este proceso involucra la activación de una proteína Gq, un aumento intracelular del calcio y la transactivación del receptor de EGF vía una tirosín kinasa no receptora de la familia Src. Encontramos además que, en el caso del prolactinoma, la activación de ERK1/2 inducida por All está en parte mediada por AT2, siendo ésta la primer evidencia de la participación funcional de este receptor en la hipófisis.

La terapia farmacológica actual de los prolactinomas en muchos casos no resulta ser suficiente ni definitiva, ya que muchas veces es necesario recurrir a una combinación de cirugía y fármacos, e incluso así, el tumor suele reincidir una vez suspendida la aplicación de la droga. Por lo tanto se continúa en la búsqueda de nuevas y más eficientes alternativas para complementar la farmacoterapia tradicional. Se ha descrito que la progesterona (P4)

es capaz de antagonizar efectos estrogénicos y que la dehidroepiandrosterona (DHEA) tiene un amplio espectro de acciones antitumorales y rejuvenecedoras. Entre otras cosas, DHEA inhibiría la génesis y progresión de distintos tipos de tumores de piel, pulmón, hígado, colon, mama y próstata. Por otro lado se le ha adjudicado a este esteroide efectos benéficos sobre otras patologías asociadas al envejecimiento y el estrés, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades autoinmunes, obesidad y decaimiento cognitivo o anímico. Sin embargo, también se han descrito en algunos casos efectos deletéreos asociados a un tratamiento prolongado con dosis farmacológicas de DHEA. Entre ellos, una acción estrogénica sobre algunos tumores estrógeno-dependientes, hipertrofismo uterino y hepático, y desarrollo de ovarios poliquísticos.

Por lo tanto decidimos estudiar el efecto de la P4 y la DHEA en nuestro modelo de hiperplasia hipofisaria. Un tratamiento *in vivo* con P4 no evidenció efectos de tipo terapéutico, ya que no redujo el aumento del peso hipofisario ni la hiperprolactinemia inducida por el tratamiento crónico con estrógenos. Sin embargo, pudimos determinar que la P4, sinergizando con los estrógenos, induce la participación de AT2 en la secreción de PRL estimulada por All, lo que constituye la segunda evidencia de la participación funcional de este receptor en la hipófisis.

En cuanto al tratamiento con DHEA, demostramos por primera vez su efecto benéfico sobre el tumor hipofisario inducido por estrógenos, ya que fue capaz de revertir parcialmente los parámetros tumorales mencionados. Sin embargo, el esteroide mostró también *per se* una cierta acción hiperplásica, prolactinoliberadora y, bajo ciertas condiciones, estimuladora de la secreción de GH. En células adenohipofisarias normales en cultivo evidenciamos una acción directa de DHEA a nivel hipofisario. Si bien no se modificó la secreción basal de PRL y GH, sí se vio alterada la respuesta a reguladores hipotalámicos. Así, demostramos que DHEA en hipófisis potencia la liberación de PRL y GH en respuesta a All y a GHRH respectivamente y reduce la inhibición ejercida por la DA y la STT. Determinamos asimismo que la influencia de DHEA sobre la acción dopaminérgica estaría mediada por la movilización de calcio intracelular, mientras que la influencia sobre la acción de la GHRH estaría mediada por el AMPc.

Creemos que los resultados presentados en esta tesis contribuyen a una mayor comprensión de los mecanismos que relacionan la acción estrogénica con la actividad de componentes del SRA, lo que es importante a la hora de entender en mayor profundidad procesos tumorigénicos que implican tanto la hiperplasia como la angiogénesis. Por otro lado, aportan a la explicación de las actuales controversias existentes en relación con la acción de DHEA sobre algunos tipos de tumores, especialmente estrógeno-dependientes, y de los efectos secundarios que muchas veces presenta un tratamiento crónico con este esteroide.

ABSTRACT

The hypothalamic-pituitary axis is a fundamental structure in the neuroendocrine control of the body. The median eminence is where the main connection between both components is achieved through hypophysiotrophic factors that control the pituitary hormonal release. By this means PRL secretion is mainly regulated by an inhibitory tonic control exerted by DA and GH release is controlled by the cyclic liberation of GHRH and STT. At the peripheral level, estrogens are the main stimulators of PRL synthesis and secretion. A chronic estrogenic treatment induces in the rat the development of our experimental model: a prolactinoma or lactotrope adenoma.

Angiotensin II (All), in addition of being involved in the systemic arterial pressure regulation, is one of the endocrine and paracrine inductors of PRL secretion. This octapeptide is interesting because it also has proliferative and angiogenic effects in different tissues. Besides, it has been described in many cases that the stimulatory actions showed by All acting at the AT1 receptor subtype are partially counterbalanced and regulated by opposite effects induced via the AT2 receptor subtype. The local pituitary renin-angiotensin system (RAS) is widely influenced by the estrogenic action. Among these influences, we have previously described an alteration in the hyperplasic pituitary response to All. Specifically, there is an altered pattern of internal calcium mobilization and secretion of PRL.

In the first part of this thesis we analyze the altered response to All present in the pituitary tumor, with special relation to All receptor participation. We detected by Western-blot and RT-PCR that the estrogenic treatment induces an upregulation of AT2 and a downregulation of AT1 pituitary receptors. On the other hand, we described by the first time an ERK1/2 activation in the pituitary response to All and defined the signal transduction pathway present in the normal gland. This pathway involves the activation of a Gq protein, an intracellular calcium increment through PLC and IP3, the fosforilation of a non-receptor tyrosine kinase of the Src family and the EGF's receptor transactivation. We also found that in the pituitary hyperplasia ERK1/2 activation in response to All is partially mediated by AT2, being this the first evidence of a functional participation of the receptor in the gland.

The present pharmacological therapy of prolactinomas is in many cases incomplete and not definitive. It is often necessary to apply a combination of surgery and pharmacology, and even so the tumor may reappear once the therapeutic drug is removed. So it is still necessary to look for new and more efficient alternatives to complement the traditional pharmacotherapy.

It has been described that progesterone (P4) is able to antagonize estrogenic effects and that dehydroepiandrosterone (DHEA) has a wide range of antitumoral and youth-promoting actions. It is proposed that DHEA inhibits the genesis and promotion of different

kinds of tumors of skin, lung, liver, colon, breast and prostate. On the other side it has been ascribed to this steroid beneficial effects in the prevention and treatment of other pathologies associated to aging and stress, like cardiovascular diseases, diabetes, self-immune diseases, obesity, and cognitive impairment. Nevertheless, in some cases some deleterious effects associated to a prolonged and pharmacological treatment with DHEA have also been described. For example, an estrogenic action of DHEA observed in some estrogen-dependent tumors, uterine and hepatic hypertrophism, and development of polycystic ovaries.

In this context we decided to study the effect of P4 and DHEA in our hyperplasic pituitary model. An *in vivo* chronic treatment with P4 did not evidence therapeutic effects, as it did not reduce the pituitary weight increment or the hyperprolactinemia induced by the estrogens. Nevertheless, we could determine that P4, in a synergism with the synthetic estrogen DES, induces the participation of AT2 in the All-stimulated PRL secretion. This constitutes the second evidence of the functional participation of this receptor in the pituitary.

On the other hand, a chronic DHEA treatment was able to partially revert the tumoral parameters previously mentioned though it also showed *per se* a mild hyperplasic, hyperprolactinemic and, under certain conditions, GH secretory action. In normal adenohypophysial cells in culture, we observed a direct DHEA action at the pituitary level. Although basal PRL and GH secretion were not modified by this steroid, releasing responses to hypothalamic regulators were. We proved that DHEA increases PRL and GH pituitary release in response to All and GHRH, respectively, and reduces the inhibition induced by DA and STT. We also determined that the influence of DHEA on the dopaminergic action was mediated by and effect on the intracellular calcium mobilization, while the influence on GHRH action was mediated by the cAMP production.

We believe that the present results contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the relationship between the RAS components and the estrogen effects, which is important to achieve a more accurate description of tumorigenic processes that include hyperplasia and angiogenesis. On the other hand, they may help to explain the present controversies in relation to the action of DHEA in some kinds of tumors, specially the estrogen-dependent ones, and to the side effects which in many cases are produced by a chronic treatment with this steroid.

INTRODUCCION

GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

1 - Eje hipotalámico - hipofisario

El sistema neuroendócrino está formado principalmente por dos estructuras: el hipotálamo y la hipófisis. Por encontrarse ambas anatómicamente y fisiológicamente muy relacionadas, se las denomina eje hipotalámico-hipofisario (Page 1988). El hipotálamo es la estructura encefálica que constituye el centro neuroendócrino primario de regulación hormonal, relacionándose mediante numerosas vías nerviosas con otros centros encefálicos como el tálamo, el hipocampo, la amígdala, el septum, la formación reticular, el quiasma óptico, el bulbo olfatorio e incluso con zonas de la corteza cerebral como la corteza prefrontal y la olfatoria. Sin embargo, es especialmente a través de su íntima relación con la hipófisis que regula la homeostasis interna, el crecimiento y la reproducción, y permite por lo tanto la supervivencia de la especie.

La hipófisis es una estructura pequeña, bilobulada, descrita hace ya más de 80 años por Harvey Cushing (Cushing 1912), que se ubica sobre una depresión ósea en la base del cráneo denominada silla turca del esfenoides. Funcionalmente, es la principal reguladora de la actividad hormonal de las glándulas endócrinas periféricas. La hipófisis está integrada por dos estructuras embriológicamente distintas: la adenohipófisis y la neurohipófisis (fig 1). La adenohipófisis, originada a partir de una invaginación del techo de la boca, es de origen glandular y está compuesta por: la ***pars tuberalis***, que rodea al tallo infundibular; la ***pars distalis*** o lóbulo anterior; y la ***pars intermedia*** o lóbulo intermedio, ubicada entre la ***pars nervosa*** y la ***pars distalis***, muy desarrollada en los reptiles y ausente en el ser humano adulto.

La neurohipófisis, por el contrario, es de origen nervioso y se forma a partir de una evaginación del piso del tercer ventrículo. Sus componentes son: la ***eminencia media***, conectada directamente con el hipotálamo; el ***tallo infundibular***, que junto con la ***pars tuberalis*** forman el tallo hipofisario; y la ***pars nervosa***, lóbulo posterior o proceso infundibular. La neurohipófisis recibe inervación hipotalámica directa, mientras que la adenohipófisis se conecta con el hipotálamo a través de un sistema vascular local de vasos porta.

La eminencia media es de gran importancia para la integración de la unidad hipotálamico-adenohipofisaria. A este nivel es donde se establece la principal conexión entre ambos componentes. Fibras hipotalámicas provenientes del núcleo arcuato, el área preóptica, supraóptica y paraventricular llegan a la eminencia media estableciendo estrecho contacto con el plexo capilar de la arteria hipofisaria superior que da origen al sistema porta primario de vasos largos (fig 2). En este contacto las neuronas, en lugar de establecer sinapsis clásicas, liberan sus neurohormonas a la sangre portal. Los vasos porta largos conducen estas neurosecreciones a través del tallo hipofisario hasta los capilares fenestrados del lóbulo anterior de la adenohipófisis, los que establecen contacto íntimo con las células endócrinas (Fink 2000). Estos vasos, conteniendo la secreción final, posteriormente abandonarán la hipófisis por la vena hipofisaria anterior. El lóbulo anterior posee además una aferencia vascular adicional que proviene del lóbulo posterior a través de un sistema portasecundario de vasos cortos que se origina en el plexo capilar de la arteria hipofisaria inferior y finaliza en el de la vena hipofisaria anterior.

Aunque la hipófisis se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica (Halasz 2000), el lóbulo anterior no recibe una provisión de sangre arterial directa como lo hace el posterior. De modo que el hipotálamo controla en gran parte este tejido mediante los sistemas porta provenientes de la eminencia media y del lóbulo posterior. Tanto este lóbulo como el intermedio, por otro lado, reciben inervación hipotalámica de cuerpos neuronales ubicados en los núcleos arcuato, supraóptico, paraventricular y periventricular.

La adenohipófisis contiene cinco tipos celulares secretores altamente diferenciados: lactotropos secretores de prolactina (PRL), somatotropos secretores de la hormona del crecimiento (GH), tirotropos secretores de la hormona tirotrófica (TSH), corticotropos secretores de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y gonadotropos secretores de las hormonas luteinizante (LH) y folículoestimulante (FSH). Por otro lado, también se encuentran presentes en la hipófisis células folículo estrelladas, con funciones nutricionales y de sostén, a las que se les asignan numerosas interacciones parácrinas con el resto de las células de la glándula.

A su vez, cada tipo celular no es totalmente homogéneo, de modo que existen varios subtipos productores de la misma hormona que han sido caracterizados morfológica, bioquímica y funcionalmente (Maldonado & Aoki 1994). De este modo

hay células productoras de PRL típicas (subtipo I) y atípicas (subtipos II y III). El subtipo I presenta una alta actividad biosintética y almacenamiento de grandes gránulos secretorios. Los subtipos II y III, en cambio, contienen gránulos secretorios más pequeños. La mayoría de las células secretoras de PRL de las hembras son del subtipo I, con sólo un 10% de los otros subtipos. En el macho, por el contrario, cerca del 50% de los lactotropos son de los subtipos II y III (Haggi ES *et al.* 1986), (De Paul AL *et al.* 1997).

El desarrollo ontogénico de los distintos tipos celulares secretores adenohipofisarios se esquematiza en la fig 3. Como se observa, el establecimiento de los lactotropos es el último paso de diferenciación dentro del linaje adenohipofisario. A partir de las células madre se diferencian los corticotropos, los gonadotropos y los tirosomatolactotropos. De éstos últimos surgen los tirotropos y los somatolactotropos, los que finalmente dan origen a los somatotropos y a los lactotropos. Se considera que la diferenciación a partir de los somatolactotropos es reversible. Cada uno de estos tipos celulares expresa un conjunto único de genes específicos que incluyen hormonas, factores de crecimiento, factores de transcripción y receptores celulares, entre otros.

2 - Regulación hipotalámica de la hipófisis

La supervivencia de todo organismo depende de la eficacia de mecanismos de adaptación y regulación que le permitan mantener su medio interno constante, dentro de ciertos límites, frente a un medio ambiente variable. En los vertebrados, esta homeostasis está muy relacionada con un adecuado funcionamiento del eje hipotálamico-hipofisario, el cual coordina y acopla el sistema nervioso central con el sistema endócrino (Halasz 2000). El hipotálamo es el integrador primario de los estímulos recibidos del medio externo (fotoperíodo, temperatura, etc.) e interno (aferencias nerviosas, hormonas y condiciones fisicoquímicas sanguíneas). Para llevar a cabo su función de procesamiento de la información, el hipotálamo ejerce a través de sus distintos núcleos una compleja actividad neuronal, la cual se refleja en la notable diversidad de aferencias y eferencias que convergen en ellos (Fink 2000).

Esta rica inervación se corresponde con una miríada de neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas, algunos de ellos encontrados también en tejido no neural. Entre ellos, se encuentran la noradrenalina (NE), la acetilcolina

(Ach), la serotonina (5-HT), el glutamato (GTM), la dopamina (DA), el ácido γ -aminobutírico (GABA), las encefalinas (EC), el neuropéptido Y (NPY), la sustancia P (SP), la neurotensina (NT), la angiotensina II (AII), la galanina (GAL), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la oxitocina (OT), la vasopresina (VP), la pro-opiomelanocortina (POMC) y los factores hipofisotropos, liberadores o inhibidores de hormonas hipofisarias.

Entre los factores hipofisotropos se encuentran principalmente la DA, el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRH), la somatostatina (STT), el factor liberador de corticotrofina (CRH), el factor liberador de tirotrófina (TRH) y el factor liberador de gonadotrofinas (GnRH). Tanto los factores hipofisotropos como la OT y la VP son neurohormonas, mensajeros producidos por neuronas y liberados a la circulación sanguínea. Los primeros son liberados principalmente en la eminencia media y llegan hasta el lóbulo hipofisario anterior a través del sistema porta largo, mientras que la OT y la VP se liberan directamente en el lóbulo posterior y pasan a la circulación sistémica o llegan al lóbulo anterior por medio del sistema porta secundario. Estos factores hipotalámicos actúan sobre receptores celulares específicos en el lóbulo anterior hipofisario estimulando o inhibiendo la secreción hormonal.

Por lo tanto los estímulos provenientes del exterior y del interior del organismo son integrados y transducidos a nivel hipotalámico a través de una red de neurotransmisores y neuromoduladores que regulan la actividad de neuronas productoras de factores hipofisotropos. El efecto neto del hipotálamo sobre la hipófisis en un momento dado depende del balance entre los factores estimulatorios e inhibitorios que se liberan a la circulación portal. La mayoría de las neurohormonas son oligo o polipéptidos sintetizados en núcleos hipotalámicos específicos. En condiciones normales, la concentración de estas sustancias en sangre portal es mucho mayor que en circulación periférica.

3 - Regulación de la secreción de prolactina

La PRL humana es un péptido de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares. Es sintetizada y secretada principalmente en la adenohipófisis por los lactotropos, aunque también se produce en los somatolactotropos y en el sistema nervioso central, el sistema inmune, la glándula mamaria, el útero y la placenta. Los

genes que codifican para la PRL, la GH y el lactógeno placentario evolucionaron a partir de un gen común ancestral. La vida media de PRL en sangre es corta (5-10 min) ya que sufre una rápida degradación renal.

Los receptores de PRL se localizan principalmente en la glándula mamaria y en el ovario, pero también se encuentran en menor medida en casi todos los tejidos del organismo, lo que hace que esta hormona no posea un único órgano blanco definido. El receptor de PRL pertenece a la clase I de la superfamilia de receptores de citoquinas (Bole-Feysot *et al.* 1998) y es una proteína monomérica con un dominio extracelular, uno transmembrana y uno intracelular. Este último posee dos sitios de fosforilación y está constitutivamente asociado a la tirosín kinasa JAK-2. La unión de PRL con el receptor induce su dimerización (Sinha 1995) y la activación de las JAK-2. Estas consecuentemente se transfosforilan en sitios tirosina, fosforilan al propio receptor y a las proteínas STAT, las que entonces se dimerizan y se translocan al núcleo donde activan la transcripción de genes específicos.

La PRL es una hormona de tipo pleiotrópico, con una gran cantidad de acciones biológicas descritas (más de 300). Sus efectos endócrinos y metabólicos participan de la regulación de numerosos procesos como ser el crecimiento y desarrollo, la reproducción, la osmorregulación, la inmunomodulación y el comportamiento (Bole-Feysot *et al.* 1998), (Freeman *et al.* 2000). Respecto de sus acciones sobre el sistema reproductivo, participa de la producción de leche materna y la inducción del proceso de lactación, función esencial en todos los mamíferos. En la rata en particular, participa del mantenimiento del cuerpo lúteo y estimula en él la secreción de progesterona. Comportamentalmente, induce el apareamiento y el comportamiento maternal.

Los estímulos fisiológicos más importantes para la secreción de PRL son la succión, el coito, el estrés y el aumento de los estrógenos ováricos; aunque las características específicas de la secreción dependen fundamentalmente del estado fisiológico del animal. Sobre el lactotrofo convergen señales provenientes del cerebro (a través del hipotálamo), de las gónadas (a través de la circulación sanguínea) y de la misma hipófisis (a través de factores parácrinos, autócrinos y yuxtácrinos). Por lo tanto, podemos definir sobre la secreción de la PRL hipofisaria un control hipotalámico, uno periférico y uno intrahipofisario. En condiciones

normales el control dominante es el hipotalámico, de tipo inhibitorio. Los otros dos niveles de control son predominantemente estimulatorios.

3.A - Control hipotalámico: la dopamina

Los factores hipofisotropos liberadores de PRL hipofisaria se denominan PRFs (prolactin releasing factors), mientras que los inhibidores, PIFs (prolactin inhibitory factors). El principal control hipotalámico sobre la secreción de la PRL hipofisaria está dado por un PIF: la DA. Esta amina biógena es el principal PIF fisiológico que actúa sobre el lactotrofo manteniéndolo tónicamente inhibido. Sobre esta base tónica actúa, sin embargo, un control cíclico de tipo circadiano generado por el núcleo supraquiasmático hipotalámico. Esto hace que la concentración plasmática de PRL (prolactinemia) tenga un pico máximo al mediodía.

En los mamíferos, la PRL es la única hormona hipofisaria que se encuentra bajo un control hipotalámico predominantemente inhibitorio. La primera observación que evidenció este hecho fue obtenida por Everett y Nikitowitch-Winer, quienes demostraron que el lactotrofo era el único tipo celular que no sufría atrofia en hipófisis injertadas en la cápsula renal, donde se encuentran fuera del control central. Asimismo, observaron que la prolactinemia en estos animales se elevaba como consecuencia de un aumento en la tasa de secreción del lactotrofo, lo cual también se observó en animales a los que se les lesionaba la eminencia media ó se les transectaba el tallo hipofisario. Por lo tanto, la elevada actividad secretoria intrínseca de los lactotrofos está severamente limitada *in vivo* por un neurohormona hipotalámica inhibitoria que demostró ser la DA.

La DA es una catecolamina sintetizada por numerosas vías o sistemas dopaminérgicos diferentes, aunque sólo tres de ellos influyen en el control de la PRL hipofisaria. Los cuerpos neuronales de estos tres sistemas se encuentran en los núcleos arcuato y periventricular (Fig 4). El núcleo arcuato contiene los cuerpos del sistema túbero-infundibular dopaminérgico (TIDA), cuyos axones terminan en la eminencia media, y del sistema túbero-hipofisario dopaminérgico (THDA), con terminales en los lóbulos posterior e intermedio. El núcleo periventricular contiene los cuerpos del sistema periventricular-hipofisario dopaminérgico (PHDA), que inerva al lóbulo intermedio (Freeman *et al.* 2000).

De los tres sistemas, el fisiológicamente más relevante para la regulación de la PRL hipofisaria es el TIDA. Este sistema envía proyecciones hacia el plexo capilar de la eminencia media, permitiendo que la DA liberada llegue directamente al lóbulo anterior a través del sistema porta de vasos largos. Los sistemas THDA y PHDA, por su parte, liberan DA en los lóbulos posterior e intermedio, la cual posteriormente alcanza el lóbulo anterior por difusión o a través del sistema porta de vasos cortos. De esta forma, la DA hipotalámica llega a los lactotrofos adenohipofisarios e inhibe la liberación de PRL.

Se han descrito cinco tipos de receptores de DA (D1, D2, D3, D4 y D5) que pueden ser agrupados, de acuerdo a sus propiedades estructurales, funcionales y farmacológicas, en dos grupos: el grupo D1 (D1 y D5) y el grupo D2 (D2, D3 y D4). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana, y están acoplados a proteína G (Missale *et al.* 1998). En la hipófisis se encuentran predominantemente los receptores D2 ubicados en los lóbulos anterior e intermedio, donde inhiben respectivamente la secreción de PRL y de α -MSH.

Existen varios mecanismos de transducción de señales que median el control dopaminérgico sobre el lactotrofo. Las evidencias indican que un estímulo de DA en hipófisis, a través de su receptor D2, produce la activación de diferentes tipos de proteína G (Lledo *et al.* 1992) con la consecuente regulación de segundos mensajeros como el AMPc y el calcio. Por un lado se activaría una proteína G_i que induciría una reducción del AMPc y un aumento de la conductancia de canales de potasio. Por otro, se activaría una G_o que bloquearía canales de calcio voltaje dependientes de membrana. De esta manera, el efecto final es una hiperpolarización de membrana que inhibe la exocitosis. En correspondencia con esta acción inhibitoria de la DA sobre la secreción de PRL, la administración *in vivo* de agonistas o antagonistas del receptor D2 disminuye o aumenta la prolactinemia respectivamente (Freeman *et al.* 2000).

Se han propuesto otras neurohormonas hipotalámicas como potenciales PIFs que complementarían las acciones inhibitorias de la DA sobre la secreción de PRL. Entre ellas, podemos mencionar la STT y el GABA, actuando directamente sobre la

adenohipófisis, aunque con efectos más débiles que los de DA (Freeman *et al.* 2000).

Por otro lado, el hipotálamo es también responsable de la estimulación aguda de la secreción de PRL que se observa en ciertos contextos fisiológicos. Como ya hemos señalado, este tejido produce también neurohormonas que estimulan la liberación de PRL a nivel hipofisario (PRFs). Entre ellas, se consideran fisiológicamente relevantes la TRH, la OT y el VIP (Freeman *et al.* 2000). Sin embargo, a pesar de que estos tres factores son potentes liberadores de PRL *in vitro*, requieren frecuentemente de cierto grado de atenuación simultánea del tono dopaminérgico inhibitorio para poder tener un efecto significativo *in vivo*. El efecto de la TRH, por ejemplo, parece ser inhibido por DA. La TRH actúa a través de sus receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína Gq, cuya activación induce la producción de inosítoles fosfato dependiente de la fosfolipasa C (PLC) (Hsieh & Martin 1992), la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Drust & Martin 1984), la movilización de calcio intracelular a partir de depósitos internos y su influjo a través de canales de membrana (Gershengorn & Thaw 1985).

Sin embargo, el mecanismo hipotalámico más importante para promover cambios en la prolactinemia es la regulación del tono dopaminérgico. Se han descrito numerosos neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas que pueden modular positiva o negativamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas, especialmente las del sistema TIDA (fig 5). Entre los que inhiben la liberación de DA, aumentando la prolactinemia, se encuentran el estradiol, la serotonina, el GABA, las encefalinas (opíáceos) y el óxido nítrico. Por otro lado, entre los factores que estimulan la secreción de DA, reduciendo la prolactinemia, podemos mencionar a la neurotensina, la bombesina, la acetilcolina, el neuropéptido Y y la misma PRL.

Cabe destacar aquí que estos sistemas dopaminérgicos poseen receptores de PRL que se encuentran positivamente asociados a la liberación de DA (Arbogast & Voogt 1997), (Lerant & Freeman 1998). Esto permitiría explicar el aumento de la concentración de DA en sangre portal que se produce ante un incremento de la prolactinemia. En este sentido, este mecanismo constituiría un sistema muy importante de control por retroalimentación negativa de circuito corto que ajustaría el tono dopaminérgico en forma acorde a los niveles de PRL plasmáticos. Otros

neuromoduladores regulan la actividad neuronal dopaminérgica en forma indirecta a través de interneuronas, o interactuando a nivel de los receptores dopaminérgicos hipofisarios.

3.B - Control periférico: los estrógenos

Los esteroides sexuales ováricos (especialmente los estrógenos) son los que ejercen el control periférico más destacado. La ovariectomía ejerce un efecto dramático sobre los lactotrofos. La remoción bilateral de los ovarios produce una disminución en el número y tamaño de este tipo celular, así como una reducción de los gránulos internos de secreción. La aplicación exógena de estradiol revierte estos efectos, estimulando consecuentemente la síntesis y secreción de PRL (Chen & Meites 1970). Por otra parte, experimentos de inmunoneutralización en ratas indican que el incremento de estrógenos que se observa durante la mañana del proestro es necesario para que posteriormente se produzca el pico preovulatorio de PRL (Neill & Nagy 1994), (Neill *et al.* 1971).

Los estrógenos promueven el incremento de la prolactinemia actuando principalmente a dos niveles: a nivel hipotalámico y a nivel hipofisario. A nivel hipotalámico disminuyen la actividad de la tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de DA) (Blum *et al.* 1987) y la concentración de DA en el núcleo arcuato (Jones & Naftolin 1990), lo que se correlaciona con una menor secreción de DA en sangre portal (Cramer *et al.* 1979). Por otro lado, los estrógenos también estimulan otras vías neuroendócrinas asociadas a la liberación de PRFs.

A nivel hipofisario, los estrógenos actúan directa e indirectamente sobre el lactotrofo. Durante la preñez, los altos y persistentes niveles estrogénicos inducen proliferación de lactotrofos (Scheithauer BW *et al.* 1990), su diferenciación a partir de los somatolactotrofos y somatotrofos (Stefaneanu *et al.* 1992) y producen cambios en la proporción de los distintos subtipos de lactotrofos (Maldonado & Aoki 1994). Estos esteroides también estimulan la expresión del gen de PRL a través de elementos respondedores a estrógenos que funcionan como activadores de la transcripción (Lieberman *et al.* 1981), inducen la secreción de esta hormona por medio de la síntesis y secreción hipofisaria de VIP y GAL (Vrontakis *et al.* 1989) y modifican la sensibilidad del lactotrofo a los factores hipofisotropos (Maurer 1982).

En este sentido, los estrógenos disminuyen el número de receptores celulares a DA (Raymond *et al.* 1978) e incrementan el número de los de TRH (De Lean *et al.* 1977), (Ben-Jonathan & Liu 1992).

A pesar de que la concentración normal de DA en el sistema porta es mayor en la hembra que en el macho (Tuomisto & Mannisto 1985), los niveles de PRL circulantes son superiores en las hembras (Diaz-Torga *et al.* 1994). Se postula que esto estaría relacionado con los mayores niveles estrogénicos presentes en la hembra, que antagonizan la acción inhibitoria de DA sobre la actividad secretoria de los lactotropos (Lloyd *et al.* 1975), (Dufy *et al.* 1979).

Periféricamente también ejercen una acción a nivel hipofisario, de tipo inhibitorio, los glucocorticoides adrenales. Estos esteroides, liberados principalmente bajo condiciones de estrés, actúan directamente sobre receptores del lactotropo inhibiendo la secreción de PRL y frenando el pico agudo de esta hormona que se produce ante un estímulo estresante. En ratas, la adrenalectomía aumenta los niveles plasmáticos de PRL, lo que puede revertirse por la administración exógena de corticosteroides (Ben-David *et al.* 1971). Por otro lado, el tratamiento de ratas lactantes con el glucocorticoide sintético dexametasona elimina el aumento de PRL inducido por la succión (Bartha *et al.* 1991).

3.C - Control intrahipofisario

La hipófisis anterior funciona como una estructura única e interrelacionada más que como una colección de distintos tipos celulares agrupados independientemente. Los diversos tipos de células adenohipofisarias ejercen un control mutuo sobre su diferenciación y funcionalidad. Este control está mediado por comunicaciones parácrinas (de célula a célula) que involucran un gran número de señales locales moduladoras de la actividad secretoria de las células vecinas. Las células hipofisarias también reciben señales regulatorias de tipo autócrino (producidas por ellas mismas) (Houben *et al.* 1990), (Schwartz & Cherny 1992), (Schwartz & Perez 1994), (Ray & Melmed 1997). Adicionalmente, existen interacciones yuxtacrinas (entre células adyacentes o entre la matriz extracelular y la célula) que se producen a través de moléculas ancladas a membrana sin intervención de sustancias difusibles (Ben-Jonathan & Liu 1992). De esta manera entran en funcionamiento

niveles de regulación adicionales y complementarios al provisto por las señales endócrinas provenientes del hipotálamo y, a través de él, de sangre periférica.

Todos los tipos celulares que componen la adenohipófisis son potenciales fuentes de señales parácrino/autócrinas (Denef & Andries 1983), (Schwartz & Cherny 1992). Entre los numerosos péptidos que han sido descritos como reguladores locales del lactotrofo se encuentran la AII, el VIP, la GAL, la ET, la propia PRL y factores de crecimiento como el epidérmico (EGF), el fibroblástico tipo 2 (FGF-2 o FGF- β) y el transformante tipo β (TGF- β) (Freeman *et al.* 2000). Considerando la inhibición tónica ejercida por la DA sobre la PRL hipofisaria, no llama la atención que la mayoría de estos péptidos (salvo la misma PRL) constituyan potentes estimuladores de la secreción de esta hormona. Además, se sabe de la existencia de PRFs provenientes del lóbulo neural y/o intermedio de la hipófisis. Aunque todavía no han sido firmemente identificados, se cree que se tratarían de la OT y/o la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH).

Numerosas evidencias indican que la AII, el VIP, y la GAL son los factores de producción intrahipofisaria fisiológicamente más relevantes en el control local de la liberación de PRL. El GnRH hipotalámico es capaz de inducir en el lactotrofo hipofisario una liberación de PRL (Denef & Andries 1983). Sin embargo, un estímulo con este factor sólo tiene efecto cuando el lactotrofo es cocultivado con el gonadotrofo, indicando que el responsable directo de la liberación de PRL no es la GnRH *per se* sino algún producto derivado del gonadotrofo. Este producto es AII, un octapéptido cuya acción parácrina sobre el lactotrofo fue ampliamente descrita por nuestro laboratorio (Becu-Villalobos *et al.* 1994), (Diaz-Torga *et al.* 1994), (Diaz-Torga *et al.* 1998), (Gonzalez Iglesias *et al.* 1999), (Gonzalez-Iglesias *et al.* 2001).

Como el VIP está presente en el lactotrofo, se lo postuló inicialmente como un factor autócrino (Nagy *et al.* 1988). Actualmente, sin embargo, algunos autores sostienen que actúa en forma parácrina sintetizado por células no lactotropas (Wynick *et al.* 1993). El VIP mediaría la liberación de PRL inducida por TRH y por estímulos como la succión y el estrés (Balsa *et al.* 1998). Por otro lado, el VIP puede estimular en el lactotrofo la secreción de GAL, la cual a su vez promueve autócrinamente la liberación de PRL (Wynick *et al.* 1993), (Wynick *et al.* 1998).

La regulación yuxtacrina sobre la secreción de PRL hipofisaria no ha sido demasiado estudiada hasta el momento. Se ha reportado que células de la línea GH3 cultivadas sobre una matriz extracelular de endotelio poseen una morfología diferente, una mayor proliferación, producción de RNAm y secreción basal de PRL que las células cultivadas sin esta matriz (Elias *et al.* 1990). Aunque estas condiciones experimentales son artificiales, los resultados indican que el microambiente celular es crítico en la modulación de estos parámetros. Por otro lado, una densidad celular adecuada también sería un aspecto importante para la secreción basal de PRL por parte del lactotrofo (Ben-Jonathan & Liu 1992).

4 - Regulación de la secreción de la hormona del crecimiento

La GH es una hormona proteica secretada por los somatotropos. Al igual que en el caso de PRL, su receptor también pertenece a la superfamilia de las citoquinas y señala principalmente a través de la vía JAK/STAT, la que finaliza en la inducción de la transcripción génica. El mayor nivel de expresión del receptor de GH se encuentra en el hígado, sin embargo también se expresa en muchos otros tejidos. La GH estimula el crecimiento y el metabolismo tisular, especialmente en el músculo. Sin embargo, su principal efecto es el de inducir la síntesis y secreción hepática del factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-1), factor que media los efectos locales de GH en los diferentes tejidos. IGF-1 posee proteínas de unión en sangre (IGFBPs) que aumentan su vida media reduciendo la eliminación renal y modulan su actividad regulando la unión a receptores específicos.

La deficiencia prolongada de GH/IGF-1 en la infancia puede conducir al enanismo y a deficiencias en el desarrollo del sistema nervioso central, óseo y muscular (Laron Z. 2001). En el ser humano adulto, este déficit se manifiesta con síntomas de envejecimiento precoz como obesidad, hiperglucemia, osteoporosis y adelgazamiento de la piel (Laron Z. 2002). En los humanos con deficiencia de GH la longevidad parece no estar afectada, pero en ratones knock-out para el receptor de GH se la encontró llamativamente incrementada. Por el contrario, los altos y crónicos niveles de esta hormona han sido asociados en roedores con una muerte prematura. En la infancia la secreción de grandes cantidades de GH lleva al gigantismo, mientras que en el adulto conduce a la acromegalia y a daños renales (Okada & Kopchick 2001).

La secreción de GH está regulada a nivel hipotalámico por un factor liberador (la GHRH) y por un factor inhibitorio (la STT) sintetizados en neuronas del núcleo arcuato y del núcleo periventricular, respectivamente. Ambos son liberados a nivel de la eminencia media y llegan a la adenohipófisis a través del sistema porta de vasos largos. Del balance entre ambos factores regulatorios resulta un efecto neto sobre la secreción de GH hipofisaria. Sobre este esquema principal actúan a su vez tres sistemas regulatorios de retroalimentación: el de circuito largo, el de circuito corto y el de circuito ultracorto (Wehrenberg & Giustina 2000) (fig 6).

El sistema de retroalimentación de circuito largo es ejercido por la IGF-1 sistémica, que regula a nivel del eje hipotalámico-hipofisario la secreción de GH y GHRH en forma negativa, y la de STT en forma positiva. El sistema de circuito corto consiste en una retroalimentación de la GH hipofisaria a nivel hipotalámico inhibiendo a la GHRH y estimulando a la STT, principalmente a través de circuitos retrógrados del sistema porta no sistémicos. Finalmente, el sistema ultracorto es ejercido por la GH hipofisaria inhibiendo su propia secreción a nivel autócrino. Otro circuito ultracorto estaría dado a nivel hipotalámico por la GHRH y la STT regulándose mutuamente.

En presencia de bajos niveles de GH sanguíneos, se activa la vía estimulatoria de la GHRH, mientras que con altos niveles lo hace la vía de la STT. Otras hormonas también tienen efectos moduladores sobre la GH plasmática. En líneas generales, tanto los estrógenos como los andrógenos elevan su concentración sanguínea, aunque el efecto de los estrógenos es aún controvertido. Los glucocorticoides y las hormonas tiroideas, por otro lado, la reducen. La glucosa también disminuye los niveles circulantes de GH.

La secreción de GH es de tipo pulsátil, al igual que sus principales reguladores hipotalámicos (Müller *et al.* 1999). En el ser humano se producen picos de GH con intervalos de 3 o 4 hs. Sobre esta pulsatilidad básica existe otro patrón de secreción circadiana con niveles máximos en las primeras horas del sueño. La fase llamada de sueño paradójal o de movimiento ocular rápido (REM) sería la señal de finalización del pico secretorio de GH. El patrón de secreción resultante está también modulado por el sexo, el estado de desarrollo, nutricional, de actividad y hasta emocional del animal. De este modo, una buena nutrición, el ejercicio físico y el descanso

favorecen la liberación de GH, mientras que la obesidad, el estrés y la depresión emocional la disminuyen. La mayor secreción de GH se da en la adolescencia y decrece marcadamente con la edad.

El patrón de liberación pulsátil es importante en la determinación de los efectos de esta hormona y difiere entre ambos sexos, siendo en las hembras de mayor frecuencia y menor amplitud que en los machos (Wehrenberg & Giustina 2000). Este patrón parece estar regulado por las hormonas sexuales. La testosterona tiene efectos directos sobre los somatotropos de ratas macho *in vitro*, sensibilizándolos tanto a la GHRH como a la STT, lo que aumentaría la amplitud de los ciclos de liberación de GH. Por otro lado, en células de ratas hembra, el estradiol reduce la respuesta celular a estos reguladores hipotalámicos, lo que disminuye la amplitud de los ciclos de secreción (Hertz *et al.* 1989).

5 - Tumores hipofisarios

Los tumores hipofisarios son neoplasias de células adenohipofisarias, en general no metastásicos y de crecimiento lento. Son además las neoplasias intracraneales más frecuentes en el ser humano. La prevalencia de estos tumores en la población se estima en un 10-20%, siendo muchos de ellos microadenomas que no presentan síntomas clínicos y se descubren por resonancia magnética o luego de una autopsia. La clasificación de los tumores hipofisarios actualmente se realiza sobre la base de técnicas inmunohistoquímicas que revelan el tipo de hormona que producen y sobre los cambios morfológicos observados por microscopía electrónica. Esta clasificación en general va de acuerdo con la manifestación de los síntomas clínicos, a excepción de los adenomas silenciosos (Asa & Ezzat 1998).

De acuerdo a su tamaño, puede clasificarse a los tumores hipofisarios en micro y macroadenomas. Los microadenomas son tumores pequeños, menores a los 10 mm de diámetro, ubicados dentro del espacio glandular normal que frecuentemente no presentan síntomas clínicos. Los macroadenomas, en cambio, son mayores a los 10 mm de diámetro y pueden llegar a invadir espacios periglandulares como el parénquima cerebral, los senos paranasales o los senos cavernosos (Gspomer *et al.* 1999). Estos macroadenomas pueden presentar los síntomas típicos de la presencia de una gran masa intracranial como dolores de cabeza, perturbaciones visuales por compresión del quiasma óptico o parálisis locales por compresión de los nervios

craneales. Aunque los macroadenomas de gran tamaño suelen invadir estructuras vecinas, en general son de tipo benigno, sin producción de metástasis.

Desde el punto de vista hormonal, los tumores hipofisarios pueden ser hormonalmente activos y secretar gran cantidad de alguna hormona en exceso, presentar hipopituitarismo con déficit hormonal o ser silenciosos sin manifestación bioquímica detectable. De acuerdo al tipo de hormona que producen se pueden clasificar principalmente como prolactinomas, somatoadenomas, gonadoadenomas, corticoadenomas, tiroadenomas o adenomas de células silenciosas (Arafah & Nasrallah 2001).

Los tumores hipofisarios más frecuentes (40%) son los prolactinomas, altamente secretores de PRL y conducentes a la hiperprolactinemia. Los somatoadenomas son productores de GH y pueden producir acromegalia. Los corticoadenomas, secretores de ACTH, provocan hipercortisolismo y la enfermedad de Cushing. Los gonadoadenomas y los adenomas de células silenciosas no son hormonalmente secretores, sino que presentan síntomas mecánicos e hipopituitarismo. Los menos frecuentes son los tiroadenomas, secretores de TSH, que provocan un ligero hipertiroidismo y un hipopituitarismo.

Hasta la última década, había dos teorías dominantes acerca del origen de los tumores hipofisarios. La más comúnmente aceptada postulaba anomalías intrínsecas a la glándula, mientras que la otra proponía una causa hipotalámica para la mayoría de los casos, consistente de una estimulación continua con alguno de los factores hipofisotropos. Los últimos avances en biología molecular, utilizando métodos de inactivación del alelo X, demostraron que los tumores hipofisarios humanos son en general de origen monoclonal (Herman *et al.* 1990), (Alexander *et al.* 1990).

Estas neoplasias aparecen a partir de una mutación o mutaciones en una célula única, que sufre luego expansión clonal. Sin embargo, en la modulación del posterior desarrollo tumoral, es importante el rol de los controladores hipotalámicos, las hormonas periféricas y los diferentes factores de crecimiento de producción local. Estos moduladores están en la actualidad siendo intensamente estudiados (Melmed S. 1999), (Heaney *et al.* 1999). Finalmente, el tumor hipofisario es el resultado de un proceso de pasos múltiples que involucra a nivel celular la desregulación de la

proliferación, la diferenciación y la secreción hormonal y, a nivel tisular, la angiogénesis. En estos procesos el papel de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) es fundamental, ya que participan activamente de ellos.

Las mutaciones que dan origen al proceso tumoral pueden consistir en la activación de oncogenes, en la inactivación de genes supresores tumorales o en una combinación de ambas. La activación oncogénica es un evento dominante de modo que, en muchos casos, una única alteración alélica puede conducir a la transformación celular. Este es el caso en un 40% de los somatoadenomas humanos, en los que una mutación puntual en el gen que codifica la subunidad α de la proteína Gs conduce a una actividad GTPásica defectuosa, un aumento persistente de las concentraciones de AMPc y una excesiva secreción de GH (Farfel *et al.* 1999). Asimismo se ha asociado una mutación del receptor de GHRH con otro tipo de somatoadenomas (Adams EF *et al.* 2000).

En contraste, la inactivación de genes supresores es un evento recesivo, por lo que es necesario que ambos alelos estén afectados para que se produzcan cambios celulares. En varios tipos de tumores se ha encontrado una inactivación de genes supresores (por deleciones, mutaciones puntuales o metilación del DNA) en diferentes loci (Farrell & Clayton 1999), (Farrell *et al.* 1999). En la neoplasia endócrina múltiple tipo I (MEN-1), se ha localizado una mutación de este tipo en el cromosoma 11, mientras que en otros tumores esporádicos se detectaron afectadas diferentes áreas de los cromosomas 11, 9 y 13 (Arafah & Nasrallah 2001). La heterogeneidad de los defectos genéticos encontrados en los tumores hipofisarios se corresponde también con un proceso neoplásico de pasos múltiples.

Durante mucho tiempo se había estado buscando el/los genes responsables de la generación del tumor hipofisario. En un momento se pensó en el gen MEN-1, responsable etiológico de las neoplasias endócrinas múltiples, de tipo hereditario. Sin embargo, este gen no pudo ser asociado claramente con todos los tipos de tumores hipofisarios sino sólo con un subgrupo de tumores esporádicos (Zhuang *et al.* 1997). Posteriormente surgió el interés en un nuevo gen: el gen transformante de tumores hipofisarios (PTTG), el cual parece expresarse en la mayoría de este tipo de tumores. Este gen se aisló por primera vez a partir de líneas celulares hipofisarias de rata (Pei & Melmed 1997) y posteriormente se descubrió que poseía una gran capacidad de inducir transformación celular aún en ausencia de otros oncogenes.

El PTTG codifica para una proteína denominada pttg. Esta proteína se expresa en altos niveles en el tumor hipofisario humano y de roedores y en líneas celulares humanas de carcinoma pulmonar, melanoma, linfoma y leucemia (McCabe & Gittoes 1999), (Heaney *et al.* 1999). En el humano la pttg se expresa en bajos niveles en la mayoría de los tejidos normales. En la rata se encuentra principalmente en el hígado embrionario y en el testículo adulto, aunque también se la detecta en la hipófisis normal. En el 83% de los adenomas hipofisarios, esta proteína tiene un nivel de expresión al menos un 50 % mayor al de la hipófisis normal. La pttg *in vivo* es tumorigénica, ya que inhibe la separación de las cromátidas durante la mitosis y estimula la secreción de FGF-2 (Heaney *et al.* 1999). Se ha determinado asimismo una correlación entre su nivel de expresión y el nivel de invasividad del tumor (Zhang *et al.* 1999). Tanto *in vivo* como *in vitro*, la pttg es regulada por estrógenos. La transformación hipofisaria temprana *in vivo* coincide con una expresión máxima de pttg, junto con la expresión de FGF-2, VEGF y la producción de angiogénesis (Heaney *et al.* 1999).

Por otro lado, el antígeno nuclear de células en proliferación (pcna), también llamado proteína asociada a la polimerasa- δ , es sintetizado en las fases G1 y S del ciclo celular (Woods *et al.* 1991), por lo que ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular de proliferación celular. Este antígeno es codificado por el gen PCNA y presenta dos variantes, una forma soluble no involucrada en la replicación, y otra insoluble que se asocia a las regiones nucleares en donde se está produciendo la síntesis de DNA (Woods *et al.* 1991). El pcna está involucrado en numerosas vías metabólicas relacionadas con el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, la reparación y metilación del DNA, la remodelación de la cromatina y la regulación del ciclo celular (Maga & Hubscher 2003). Este antígeno tendría un rol coordinador sobre numerosas enzimas que reconocen estructuras específicas del DNA. A consecuencia de su interacción con el pcna, muchas de estas enzimas aumentarían su eficiencia catalítica. Por otro lado el pcna también parece capaz de facilitar la interacción entre ciertos complejos de ciclinas y sus sustratos.

El tratamiento de los tumores hipofisarios humanos tiene varios objetivos. En primer lugar, controlar el crecimiento tumoral y sus efectos mecánicos sobre las estructuras cercanas. En segundo lugar, controlar los síntomas clínicos y

bioquímicos del exceso de secreción hormonal. Finalmente, se busca preservar las funciones hipofisarias normales siempre que sea posible y revertir las defectuosas (Arafah & Nasrallah 2001). Estos objetivos se logran en muchos casos a través de tratamientos quirúrgicos, radiológicos y/o farmacológicos. Los microadenomas muchas veces pueden ser tratados sólo farmacológicamente mientras que los macroadenomas suelen requerir de cirugía complementada posteriormente con un tratamiento farmacológico y/o radiológico (Kaiser 2001).

Como comentamos anteriormente, la mayoría de los tumores hipofisarios son de origen monoclonal. Sin embargo, en el contexto de una mutación o transformación celular inicial cobra especial importancia la modulación del crecimiento tumoral ejercida por diferentes neurohormonas, hormonas y factores de crecimiento de acción local. Una descripción adecuada de la patogénesis de los tumores hipofisarios, así como una identificación de los distintos elementos involucrados tendrá seguramente un importante impacto sobre la práctica terapéutica. De esta manera, la identificación de las mutaciones hereditarias más frecuentes, de los marcadores moleculares específicos de invasividad y recurrencia tumoral y de los distintos factores regulatorios de la proliferación celular, la secreción hormonal y la angiogénesis local permitirán una intervención terapéutica más temprana y una mejor selección de los protocolos de tratamiento.

6 - Angiogénesis y tumorigénesis

Un aspecto fundamental para el crecimiento de la masa tumoral y la metástasis es la angiogénesis (neovascularización tisular). Los tumores en general no son angiogénicos desde el principio de su desarrollo sino que, en un determinado momento, cambian hacia un fenotipo de neovascularización con desarrollo de nuevos capilares sanguíneos que comienzan a rodearse de células tumorales (Weidner *et al.* 1991). Este cambio cualitativo muchas veces se produce en la transición entre la hiperplasia y la neoplasia (Folkman *et al.* 1989) y dependería del balance neto entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos locales (Bouck N. 1990).

Entre los factores angiogénicos más importantes se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Ferrara & Henzel 1989), el FGF-1, el FGF-2 y la angiogenina (Shing *et al.* 1984), (Ferrara & Henzel 1989), (Fett *et al.*

1985), (Maciag 1984). Estos factores pueden ser secretados por las células tumorales, por las células endoteliales o por los macrófagos movilizados hacia la zona. Otro de los factores angiogénicos descritos es la AII, de la cual hablaremos más profundamente en la parte I de esta tesis. Sin embargo, para que se produzca el cambio hacia el fenotipo angiogénico también es necesario que se reduzcan factores antiangiogénicos como la trombospondina, producida constitutivamente por las células normales (Rastinejad *et al.* 1989), la angiostatina (O'Reilly *et al.* 1994) y la endostatina (O'Reilly *et al.* 2004) inducidas por la propia célula tumoral.

La angiogénesis favorece la expansión de la masa tumoral no sólo al suministrar un mayor aporte sanguíneo, sino también al permitir la estimulación parácrina de las células tumorales con numerosos factores de crecimiento producidos por el nuevo endotelio en crecimiento (Hamada *et al.* 1992). Por otro lado, la angiogénesis favorece la producción de la metástasis. En la década pasada, las hipótesis que intentaban explicar la latencia tumoral y el escape a esta latencia estaban basadas principalmente en aspectos del ciclo celular, hormonales y/o inmunológicos. Sin embargo, recientemente se ha postulado que la mayoría de los patrones metastásicos podrían estar dictados por la intensidad de la angiogénesis local (Folkman J. 1995).

7 - Prolactinomas

Como ya hemos comentado, los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes. Son más comunes en la mujer que en el hombre, especialmente durante la segunda y tercer década de vida. Luego de la quinta década, la ocurrencia es similar para ambos sexos (Mindermann & Wilson 1994). En la mujer, la hiperprolactinemia (concentraciones de PRL sérica mayores a los 100 ng/ml) producida por la gran proliferación de lactotropos origina amenorrea y galactorrea, mientras que en el hombre da lugar a impotencia y a inhibición de la libido, síntomas que frecuentemente son atribuidos a otras causas y llevan a un diagnóstico más tardío que en la mujer. La persistencia temporal de la hiperprolactinemia conduce al hipogonadismo el que, tanto en la mujer como en el hombre, induce esterilidad, pérdida de densidad ósea y osteoporosis.

Cuando el microadenoma se transforma en macroadenoma, surgen grados variables de hipopituitarismo debido a una desregulación funcional de otros tipos

celulares secretores que puede estar asociada a una compresión del tallo hipofisario y de los sistemas porta, imposibilitando el aporte de los factores reguladores hipotalámicos. Cuando la masa tumoral está altamente desarrollada y comienza a ser invasiva, aparecen los síntomas ya descriptos asociados a una compresión mecánica de las áreas vecinas afectadas.

La terapia para los prolactinomas es en general farmacológica, quirúrgica o una combinación de ambas estrategias, siendo la radiológica la menos utilizada. En la mayoría de los pacientes, el tamaño tumoral y la secreción hormonal se logran reducir con la utilización de agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina o la cabergolina. Sin embargo, hasta el momento la terapia farmacológica no siempre es suficiente ni definitiva. Además de tener que recurrirse en muchos casos a la cirugía, el tumor posteriormente suele reaparecer cuando se suspende la farmacoterapia. Por lo tanto aún se continúa en la búsqueda de nuevas y más eficientes alternativas farmacológicas.

La hiperprolactinemia resultante del prolactinoma desensibiliza a las neuronas del sistema TIDA a la retroalimentación negativa inducida en condiciones normales por la PRL. Esta desensibilización reduce aún más el tono dopaminérgico sobre el prolactinoma. Con el tiempo este proceso se torna irreversible por daños neurodegenerativos en este sistema (Sarkar *et al.* 1982). La hiperprolactinemia determina también una diferenciación preferencial del somatolactotrofo hacia el lactotrofo, elevando en gran medida la presencia relativa de este tipo celular (en ratas hembra de un 40-60% se eleva a un 70-80%) y reduciendo consecuentemente la de los otros tipos (Lloyd 1983).

Los prolactinomas expresan el receptor de estrógenos (ER) en mayor medida que otros tipos de tumores hipofisarios (Zafar *et al.* 1995). Por otro lado, también son productores de aromatasa, la enzima que cataliza la transformación de andrógenos a estrógenos (Carretero *et al.* 2002). Estos últimos, como comentamos anteriormente, son capaces de inducir la proliferación y diferenciación del lactotrofo, contribuyendo al desarrollo de la hiperplasia (Blackwell RE. 1985). La preñez y la administración de algunos anticonceptivos orales aportarían un entorno de esteroides favorable al desarrollo de prolactinomas (Grossman & Besser 1985).

Además de todos los efectos estrogénicos ya descriptos, tanto a nivel hipofisario como hipotalámico, estos esteroides son también inductores de

angiogénesis (Elias & Weiner 1984). Esta acción estaría mediada por la inducción de factores angiogénicos locales como el VEGF (Ferrara *et al.* 2003) y FGF-2 (Heaney *et al.* 1999). La formación de esta nueva red vascular dotará a la adenohipófisis de un suministro de sangre sistémica directa que no tenía, ya que previamente estaba irrigada principalmente por los sistemas porta. Esto hace que, por un lado aumente el suministro nutricional y de factores de crecimiento a la masa tumoral y, por otro, disminuya aún más la concentración de DA local. En el prolactinoma inducido por estrógenos, se ha observado que éstos provocan en la adenohipófisis un marcado aumento del área, diámetro y perímetro vascular (Pawlikowski *et al.* 1996).

8 - Modelo experimental de prolactinoma en rata: administración farmacológica de estrógenos en forma crónica

Este modelo experimental que utilizamos consiste en la aplicación de un pellet subcutáneo del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), que induce en alrededor de 6-8 semanas un prolactinoma. Este 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 degranulación de los lactotropos, 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 lactotropos 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 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 DA o sus agonistas pueden bloquear hasta cierto punto este efecto y producir la regresión del tumor (MacLeod & Lehmeyer 1973), (Thomer *et al.* 1980). Este modelo tumorigénico presenta dimorfismo sexual en cuanto al desarrollo de la

masa tumoral, alcanzando en hembras el doble de tamaño que en machos (Wiklund *et al.* 1981) y en cuanto a la sensibilidad a la acción esteroidea, que es mucho mayor en hembras (Piroli *et al.* 2000).

La diferente sensibilidad a los esteroides que existe entre sexos y entre cepas de animales se cree estaría relacionada con la diferente proporción de los distintos tipos celulares y con la diferente expresión de factores de crecimiento y receptores estrogénicos. La expresión célula-específica de estos receptores en los prolactinomas se corresponde con un rol del estrógeno no sólo en la determinación del fenotipo celular y la actividad secretoria sino también en la regulación del crecimiento de este tipo de tumores. Por lo tanto consideramos que las ratas crónicamente estrogenizadas son un buen modelo tanto para el estudio de los mecanismos tumorigénicos como para el abordaje de nuevas posibilidades terapéuticas.

La cepa Sprague Dawley (SD) utilizada por nosotros no es tan sensible a los estrógenos como la F344, sin embargo se ha demostrado que a partir de la cuarta semana de tratamiento crónico con estos esteroides ya se produce una hiperplasia e hipertrofia de lactotopos (Holtzman *et al.* 1979). Por lo tanto, cabe aclarar aquí que en toda la parte experimental de esta tesis utilizaremos el término “tumor” como sinónimo de esta hiperplasia e hipertrofia celular hipofisarias.

La presente tesis doctoral se encuadra en el contexto de la modulación de la hiperplasia hipofisaria en un modelo de prolactinoma inducido experimentalmente en rata por el tratamiento estrogénico crónico. Como comentamos anteriormente, pensamos que este modelo es adecuado para abordar aspectos relacionados con la génesis, desarrollo y posible terapéutica de estos tumores. Para ello, trabajamos en la presente tesis principalmente con tres factores moduladores: la AII, la progesterona (P4) y la dehidroepiandrosterona (DHEA). La AII ha sido descripta como un secretor hormonal, factor de crecimiento y modulador de la angiogénesis, mientras que a la P4 y a la DHEA han sido asociadas con un efecto benéfico sobre el desarrollo tumoral. La DHEA, especialmente, ha sido ampliamente estudiada en los últimos años por sus postulados efectos de tipo antitumoral y rejuvenecedor. Por lo tanto decidimos en esta tesis estudiar los efectos de estos moduladores sobre la hipófisis normal e hiperplásica e incursionamos en el análisis de sus mecanismos de acción.

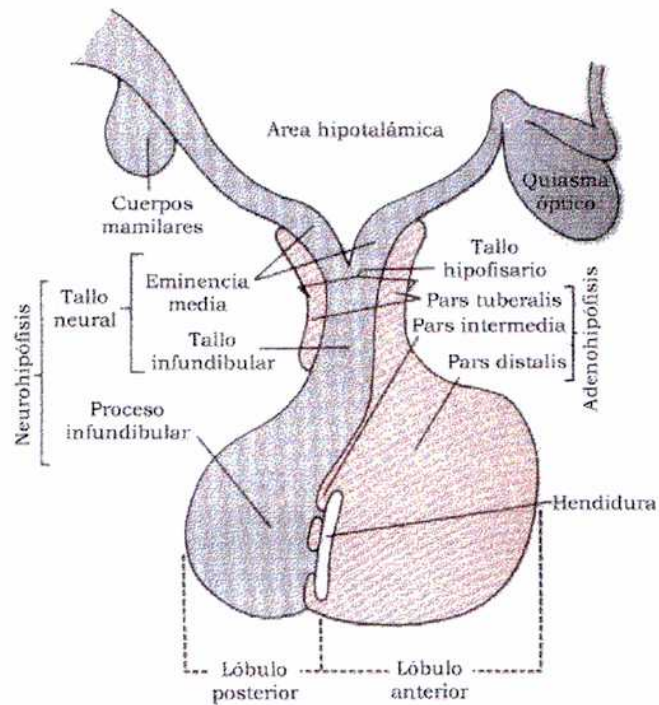


Figura 1: Esquema de los distintos componentes de la hipófisis.

La adenohipófisis está formada por la *pars tuberalis*, la *pars intermedia* y la *pars distalis*. La neurohipófisis contiene a la eminencia media, el tallo infundibular y la *pars nervosa* o proceso infundibular. Tomado de Berne, R.M. & Levy, M.N.: The Hypothalamus and the Pituitary Gland, 897-931, en: "Physiology", editado por R. Farrell (1993), Mosby Year Book, Inc. St Louis, Missouri.

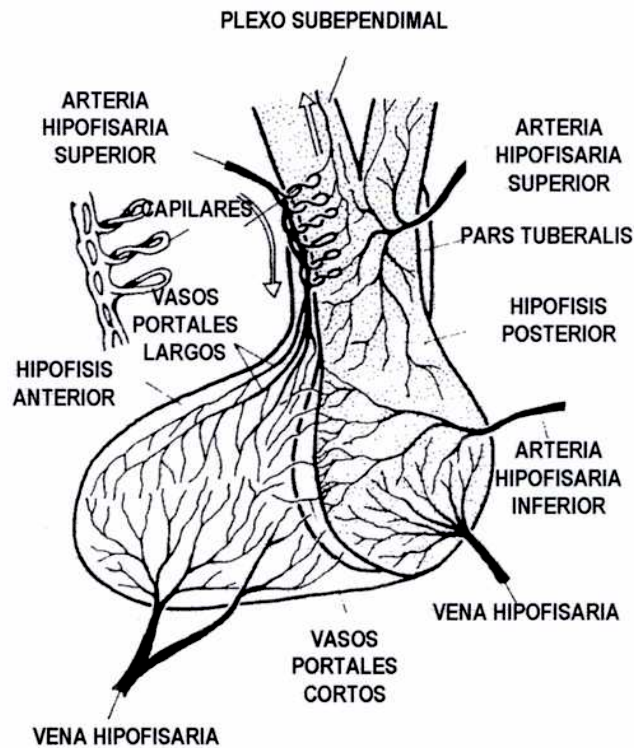


Figura 2: Irrigación hipofisaria

La arteria hipofisaria superior irriga el tallo hipofisario y genera en la eminencia media un plexo de capilares fenestrados en serpentina que dan origen al sistema porta primario o de vasos largos. Estos vasos atraviesan la pars tuberalis y finalizan en el lóbulo anterior en un nuevo plexo capilar, el cual converge posteriormente en la vena hipofisaria anterior para salir de la hipófisis. La arteria hipofisaria inferior irriga el lóbulo posterior donde crea otro plexo capilar. Allí, parte de la sangre abandona la hipófisis a través de la vena hipofisaria posterior y parte origina el sistema porta secundario o de vasos cortos, que finaliza en capilares en el lóbulo anterior. Tomado de Halász, B.: *The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology*, 3-21 en: "*Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*", editado por Conn, M. & Freeman, M.E. (2000), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

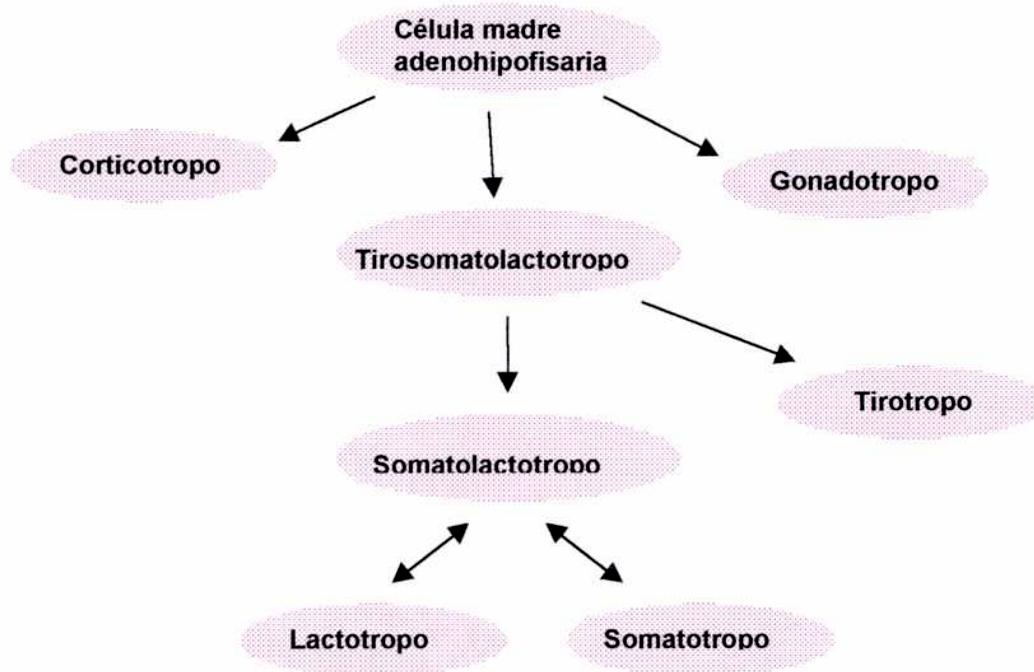


Fig 3: Esquema propuesto de la citodiferenciación adenohipofisaria:

A partir de las células madre adenohipofisarias, se diferencian los corticotropos, los gonadotropos y los tirosomatolactotropos. De estos últimos, en forma mas tardía surgen los tiotropos y los somatolactotropos, los que finalmente dan origen a los lactotropos y a los somatotropos. Adaptado de Asa, S.L. & Ezzat, S. (1998), *Endocrinology Reviews* 19 (6): 798-827.

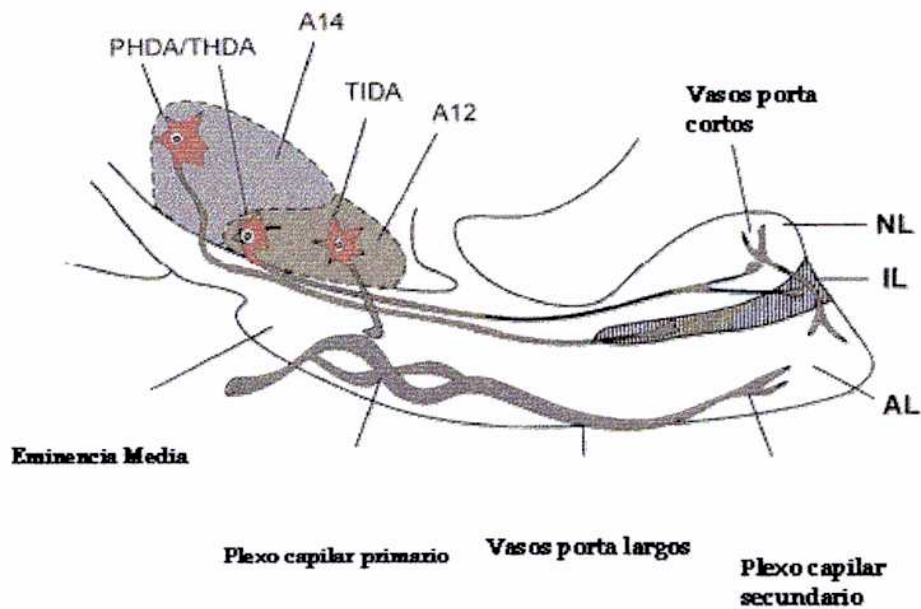


Figura 4: Inervación hipotalámica dopaminérgica sobre la hipófisis

El núcleo arcuato (A12) contiene los cuerpos neuronales de dos sistemas dopaminérgicos distintos: el túbero-infundibular dopaminérgico (TIDA), que se proyecta desde el núcleo arcuato dorsomedial hacia la eminencia media, y el túbero-hipofisario dopaminérgico (THDA), que lo hace desde el núcleo arcuato rostral hasta los lóbulos neural (NL) e intermedio (IL) de la hipófisis. El núcleo periventricular (A14) contiene los cuerpos neuronales del sistema periventricular-hipofisario dopaminérgico (PHDA), cuyos axones terminan también en el lóbulo intermedio. Las terminales del TIDA liberan DA al plexo capilar primario del sistema porta de vasos largos. Posteriormente, esta neurohormona alcanza las células adenohipofisarias a través del plexo capilar secundario. Las terminales del THDA liberan DA hacia los capilares del sistema porta de vasos cortos, que conecta el lóbulo neural con el anterior (AL). La DA liberada en el lóbulo intermedio alcanza el anterior por difusión ya que este lóbulo no se encuentra irrigado. Adaptado de Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. (2001) *Endocrinology Reviews* 22 (6): 724-763.

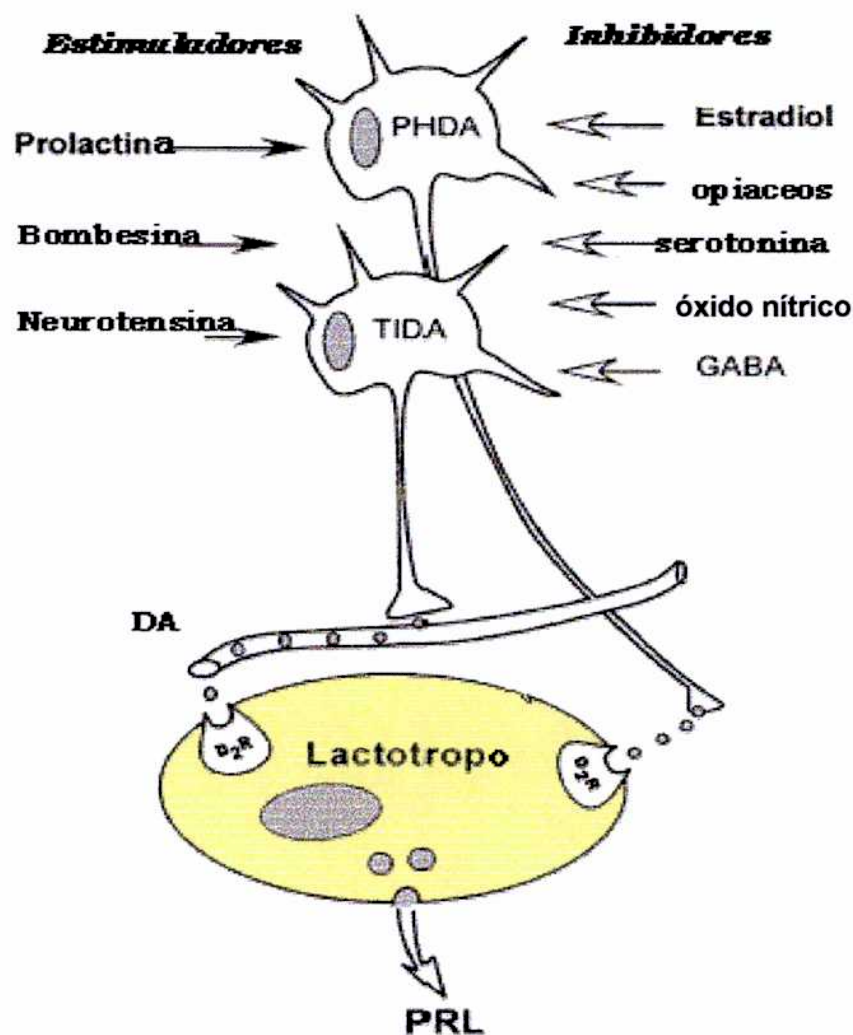


Figura 5: Efectos directos de neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas periféricas en la actividad de los sistemas TIDA y PHDA.

Los agentes estimuladores de los sistemas dopaminérgicos TIDA y PHDA (izquierda) aumentan en hipotálamo la actividad neuronal y la secreción de DA, lo que disminuye la liberación de PRL por parte del lactotroipo. Los agentes inhibitorios de estos sistemas (derecha) disminuyen la actividad y secreción dopaminérgicas, lo que produce un aumento de la secreción de PRL a nivel hipofisario. La prolactina y el estradiol funcionan como los principales estimuladores e inhibidores, respectivamente, de la secreción de DA. Esta es sólo una lista parcial de los factores regulatorios, y varios de ellos muestran un efecto dual sobre la liberación de PRL, dependiendo de su sitio de acción. Adaptado de Freeman, M.E. et al. (2000) *Physiol Rev* 80:1523:1631.

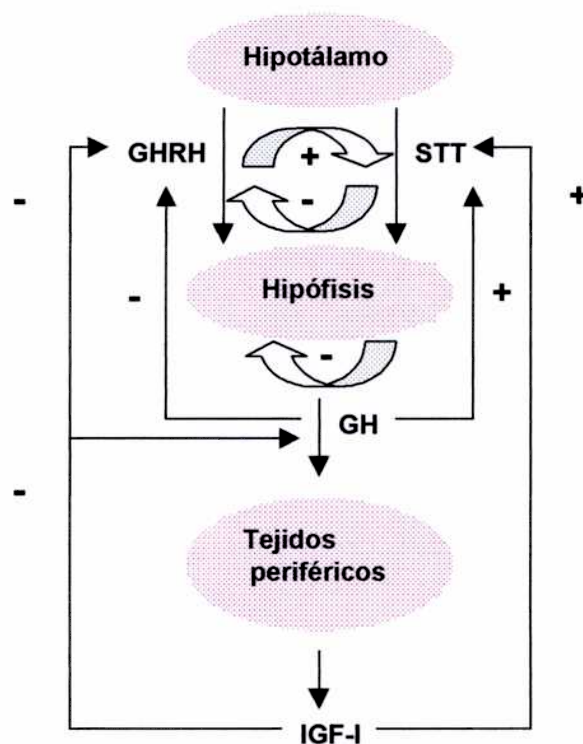


Figura 6: Circuitos regulatorios de la secreción de GH

El sistema de retroalimentación de circuito largo es ejercido por la IGF-1 sistémica, que regula a la GHRH y STT hipotalámicas (en forma negativa y positiva respectivamente) y a la GH hipofisaria en forma negativa. El sistema de retroalimentación de circuito corto consiste en la regulación negativa de la GH hipofisaria sobre la GHRH y STT hipotalámicas, en forma negativa y positiva respectivamente, a través de circuitos retrógrados del sistema porta. Finalmente, los sistemas de retroalimentación ultracorto son ejercidos por la GH hipofisaria inhibiendo su propia secreción a nivel autócrino y por la regulación recíproca entre la GHRH y la STT hipotalámicas. Adaptado de Wehrenberg, W.B.: Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion, 181-195, en: *"Neuroendocrinology in Physiology and Medicine"*, editado por Conn, M. & Freeman, M.E. (2000), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el de estudiar aspectos relacionados con la génesis, desarrollo y posible terapéutica de los tumores hipofisarios de lactotropos en un modelo de prolactinoma experimental inducido en rata por un tratamiento estrogénico crónico. Para esto, nos hemos enfocado en el análisis de algunos moduladores específicos: la angiotensina II, la progesterona y la dehidroepiandrosterona.

Los objetivos particulares de la parte I son los siguientes:

- Estudiar las alteraciones producidas en el prolactinoma respecto de la respuesta a angiotensina II y su relación con la participación diferencial de los subtipos receptores AT1 y AT2.
- Determinar la posible activación de las MAPKs ERK1/2 en la respuesta hipofisaria normal y tumoral a la angiotensina II.
- Determinar la cascada de señales conducente a la activación de ERK1/2 en respuesta a la angiotensina II en la hipófisis normal.
- Evaluar el posible rol terapéutico de un tratamiento *in vivo* con progesterona sobre un modelo de prolactinoma experimental en rata.

Los objetivos particulares de la parte II son los siguientes:

- Evaluar el posible efecto terapéutico de un tratamiento *in vivo* con dehidroepiandrosterona sobre un modelo de prolactinoma experimental en rata.
- Analizar la acción de la dehidroepiandrosterona *in vitro* sobre la liberación hipofisaria de prolactina y hormona de crecimiento, tanto basal como modulada por factores hipofisotropos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1 - Animales

Se utilizaron ratas hembra vírgenes *Rattus norvegicus* de la cepa Sprague-Dawley de dos-tres meses de edad. Los animales fueron criados en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) de acuerdo a las normas dictadas por la Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de América (NIH). Las ratas se mantuvieron a 22°C con un fotoperíodo de 12 horas (luz de 7.00 a 19.00) y ventilación permanente. Se les suministró alimento balanceado (Purina) y agua *ad libitum*.

2 - Medios de cultivo, reactivos y drogas

El DMEM, el F-12 Nutrient Mixture, la tripsina, los aminoácidos esenciales, no esenciales y vitaminas MEM, la gentamicina y el reactivo de Trizol[®] son productos de GIBCO BRL (Grand Island, NY). El suero fetal bovino, el suero de caballo y el fungizone son productos de PAA laboratory GmbH (Linz, Austria). La DNAsa es de Worthington (Lakewood, NK). El DES, OH-PREG, DHEA, OH-DHEA, ADIOL, DA, AII, EGF, PMA, BAPTA-AM, herbimicina A, PD98059, el Fura 2-AM y la MIX son de Sigma (St. Louis, MO). El caproato de hidroxiprogesterona es de Schering (Bs.As.). La STT es de UCB SA (Braine-l'Alleud, Bélgica). El DUP753 es de DuPont Merck Pharmaceutical Co. (Wilmington, DE). El PD123319 es de Parke-Davis (Ann Arbor, MI). El U73122, el TMB-8 y la forskolina son de ICN Biomedicals Inc (Aurora, Ohio). La queleritrina es de Alomone Labs. (Jerusalem, Israel). El tyrphostin AG1478 y el PP1 son de Biomol Research Lab. Inc. (Plymouth Meeting, PA). El ¹²⁵I es de NEN Life Science Products Inc. (Boston, MA).

Las hormonas purificadas para iodinación, los estándares de referencia y la GHRH, así como los primeros anticuerpos para los RIAs hormonales y para la IHQ de PRL, son del Programa Nacional de Hormonas y Pituitaria (NHPP) perteneciente al Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK) de los Estados Unidos. El AMPc iodinado, el AMPc frío para los estándares de

referencia y el anticuerpo anti-AMPc fueron suministrados gentilmente por el Dr. Omar Pignataro del IByME. La mezcla de inhibidores de proteasas (TAME, TLCK, TPCK, ZPCK y PMSF) fue amablemente donada por la Dra. Claudia Lanari del IByME. La acrilamida y la bis-N,N'-metilen-bis-acrilamida son de BioRad (Hercules, CA). Los anticuerpos para Western Blot, los marcadores de PM proteico preteñidos y el Western Blotting Luminol Reagent son de Santa Cruz Biotech. (Sta. Cruz, CA). Los marcadores de PM proteico biotinilados y los de PM de DNA son de New England Biolabs Inc. (Beverly, MA). El RNAlater es de Ambion (Woodward Austin, TX). La agarosa es de Seakem (Rockland, Maine). Los kits de la M-MLV-RT y de la Taq polimerasa son de Invitrogen Life Tech. (Carlsbad, CA). Los cebadores al azar son de Biodynamics (Bs. As.). Los cebadores específicos para AT1, AT2 y 28S fueron sintetizados por Bio-Synthesis Inc. (Lewisville, TX). Los dNTPs y el RNAsin son de Promega (Madison, WI).

3 - Tratamientos *in vivo*

- **Tratamientos con progesterona (P4):**

Grupo CONTROL: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días. A los 15 días del inicio del experimento se les administró subcutánea y semanalmente aceite de sésamo (vehículo) por 6 semanas.

Grupo TUMOR: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días implantadas, bajo anestesia con éter, con un pellet subcutáneo de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES). A los 15 días del inicio del experimento se les administró subcutánea y semanalmente aceite de sésamo por 6 semanas.

Grupo P4: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días. A los 15 días del inicio del experimento se les administró subcutánea y semanalmente caproato de hidroxiprogesterona (5mg/rata) diluída en aceite de sésamo por 6 semanas.

Grupo TUMOR + P4: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días implantadas, bajo anestesia con éter, con un pellet subcutáneo de 20 mg de DES. A los 15 días del inicio del experimento se les administró

subcutánea y semanalmente caproato de hidroxiprogesterona (5mg/rata) diluída en aceite de sésamo por 6 semanas.

A las ocho semanas del inicio del experimento, se decapitaron las ratas de todos los grupos (las controles se eligieron en diestro) y se extrajeron las adenohipófisis en hielo (eliminando el lóbulo neurointermedio) para utilizarlas posteriormente en mediciones de calcio intracelular, cultivo celular, western-blot y/o RT-PCR. Asimismo se recolectó sangre troncal para posteriores mediciones hormonales en las extracciones de suero.

- **Tratamientos con dehidroepiandrosterona (DHEA):**

Grupo CONTROL: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días.

Grupo TUMOR: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días implantadas, bajo anestesia con éter, con un pellet subcutáneo de 20 mg de DES.

Grupo DHEA: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días implantadas, bajo anestesia con éter, con dos pellets subcutáneos de 50 mg de DHEA.

Grupo TUMOR+DHEA: Ratas SD hembras vírgenes ciclantes de 120 días implantadas, bajo anestesia con éter, con un pellet subcutáneo de 20 mg de DES más dos pellets de 50 mg de DHEA.

El implante de pellets subcutáneos permite un suministro constante y continuo de la droga. Experimentos previos demostraron que un aporte más brusco de DHEA puede causar citotoxicidad, androgenicidad y resistencia insulínica, por lo que este método de liberación lenta ofrece una condición más fisiológica (McIntosh *et al.* 1999). Durante diez días consecutivos a partir de la segunda, cuarta y sexta semana del implante se tomaron muestras de fluido vaginal de cada rata para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encontraba. Luego se promedió para cada grupo experimental la cantidad de estros encontrados en cada período. Antes y después del implante (una vez a la semana hasta la finalización del tratamiento) se pesaron las ratas y se les extrajo muestras de sangre de vena yugular bajo anestesia con éter.

A las siete semanas del implante se pesaron las ratas, se las decapitó (las controles se eligieron en diestro) y se obtuvo sangre troncal. Se extrajeron y pesaron las adenohipófisis de todos los animales para realizar posteriormente mediciones de calcio intracelular, cultivo celular, western-blot o RT-PCR. Asimismo se extrajeron y pesaron las glándulas adrenales para controlar un posible efecto secundario del tratamiento con DHEA. Los pesos de ambos órganos se relativizaron al peso corporal total del animal. Se extrajo el suero de las muestras sanguíneas y se lo guardó a -20°C para cuantificar posteriormente su contenido hormonal por RIA.

4 - Obtención de células adenohipofisarias dispersas

Luego de extraer en hielo la adenohipófisis del animal, se la colocó en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) estéril pH 7,5 (aproximadamente 4 adenohipófisis normales o 2 tumorales en 1,5 ml de medio). En campana de flujo laminar se eliminaron los coágulos y se lavó 3 veces con DMEM. El tejido se cortó con bisturí en fragmentos de aproximadamente 1 mm, se pasó a un vial con 3 ml de DMEM y 0,5% de tripsina y se incubó 30 min en estufa a 37°C. Luego se agregaron 24 µg/ml de DNasa-I durante 2 min, se aspiró el medio y se reemplazó durante 1 min con 2,5 ml de buffer Krebs estéril (NaCl 0,73%, KCl 0,04%, KH₂PO₄ 0,02%, HEPES 0,24%, NaHCO₃ 0,11%, BSA 0,5%, glucosa 14 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos esenciales MEM 2% y vitaminas MEM 1%) pH 7,5 con el agregado de 500 µl de suero fetal bovino (SFB) para frenar la digestión enzimática sobre el tejido. Luego se lavó 3 veces con 1 ml de Krebs, se disgregó el tejido en 2 ml de este medio con pipeta Pasteur para obtener células en suspensión y se filtró a través de una malla de nylon (160 µm). Se centrifugó la suspensión resultante 10 min a 1.000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

Se resuspendió el precipitado en 5 ml de DMEM enriquecido (suplementado con suero de caballo (HS) 10%, SFB 2,5%, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales MEM 1%, gentamicina 25 ng/ml y fungizone 0,1%) pH 7,5. Posteriormente se tomó una alícuota de 20 µl de la suspensión celular para cuantificar el rendimiento del tejido por medio de un conteo en cámara de Neubauer. Además se determinó el porcentaje de viabilidad celular por medio del método de exclusión del Azul de Tripán. En todos los casos esta viabilidad fue mayor al 90%. Luego de la cuantificación se diluyó la suspensión celular con DMEM enriquecido de

modo de obtener la dilución adecuada para la cuantificación de la concentración intracelular de calcio o para el cultivo celular.

5 - Medición de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{++}]_i$)

El pellet de células adenohipofisarias fue resuspendido e incubado en buffer salino (BS: NaCl 140 mM, KCl 3,9 mM, $CaCl_2$ 1 mM, KH_2PO_4 0,7 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0,5 mM, Hepes 20 mM) pH 7,5 en presencia de BSA 0,1%, glucosa 10 mM y Fura-2AM 1,5 μ M. El Fura-2AM (fura2-acetometilester) es un compuesto utilizado como indicador de la $[Ca^{++}]_i$ ya que, al ser incorporado a la célula, es convertido por esterasas endógenas en Fura-2, el cual queda atrapado en el citoplasma celular y es capaz de emitir fluorescencia ante un aumento del Ca^{++} citoplasmático. La incubación de las células con este compuesto se realizó por 30 min en estufa a 37°C. Luego se eliminó el Fura-2AM residual (no incorporado) mediante un par de lavados con BS y se resuspendieron las células en BS a una concentración de 2×10^6 cél/ml. La señal de fluorescencia emitida ante los diferentes estímulos (inyectados 100X en la microcubeta que contiene la suspensión celular) fue medida segundo a segundo por medio de un espectrofluorímetro (Jasco Corp.) a 37°C, bajo agitación continua.

Este aparato trabaja excitando al fluoróforo con longitudes de onda de 340 nm y de 380 nm alternativamente, mientras que recoge lo emitido a 505 nm. A partir del cociente entre lo emitido ante ambas longitudes de excitación, y por medio del método de Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al.* 1985) se grafica la curva de la $[Ca^{++}]_i$. Este cociente aumenta a medida que lo hace la concentración intracelular de calcio. El sistema fue calibrado por medio de la determinación de la fluorescencia máxima (inducida por Tritón X-100 0,1%) y la mínima (inducida por EGTA 6 mM). Luego de la aplicación de buffer de ensayo por 2 min para determinar el nivel basal, se colocaron los distintos estímulos (AII, DA, GHRH, DHEA, DUP753, PD123319, U73122, BAPTA-AM, TMB8, EGTA) a las concentraciones y tiempos especificados en cada uno de los capítulos. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{++}]_i$ sobre los niveles basales, que se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con AII. Las desviaciones debidas a la fuga de calcio por células muertas o a la autofluorescencia se corrigieron según procedimientos ya descriptos (Grynkiewicz *et al.* 1985).

6 - Cultivo primario de células adenohipofisarias y tratamientos *in vitro*

La suspensión de células dispersas se sembró en placas de cultivo estériles de 24 (P24) o de 96 (P96) pocillos según el tipo de experimento.

- Para western-blot: se sembraron en P24 500.000 cél/ml/pocillo.
- Para RIAs hormonales: se sembraron en P96 50.000 cél/250 µl/pocillo.
- Para RIA de AMPc: se sembraron en P24 300.000 cél/ml/pocillo.

Posteriormente se incubó las células en estufa a 37°C con 95% de O₂ y 5% de CO₂ durante 3 días para permitir que se adhiriesen al soporte y se repliquen. Luego de este período se cambió el medio de cultivo por DMEM-F12 enriquecido (DMEM y F12 Nutrient Mixture en proporción 1:1, NaHCO₃ 2,2 mg/ml, BSA 0,1%, glutamina 4 mM, gentamicina 12 ng/ml y fungizone 0.05%) pH 7,5 (sin suero) y se incubó en estufa durante otras 24 hs para arrestar a las células en G₀. Luego se cambió el medio y se aplicaron los diferentes pretratamientos (DUP753, PD123319, PTX, U73122, PMA, queleritrina, BAPTA-AM, TMB8, EGTA, herbimicina-A, PP1, AG1478, PD98059) y estímulos (AII, PMA, EGF). En el caso de pretratamientos con esteroides (DES, DHEA, OH-DHEA, ADIOL), éstos se colocaron 2 días antes de la aplicación del estímulo final (AII, DA, GHRH, STT). En el caso de la cuantificación intracelular de AMPc, se agregó al medio de cultivo metilisobutilxantina (MIX) 0,1 mM durante 2 hs para evitar la degradación de este compuesto. Luego de los tiempos de incubación necesarios, se frenó la reacción colocando las placas en hielo. Como control positivo de producción de AMPc se utilizó la estimulación con forskolina. Las concentraciones y tiempos de aplicación de cada uno de los pretratamientos y estímulos se especifican en cada uno de los capítulos.

Cumplidos los tiempos de estimulación, se tomaron muestras de medio de cultivo para analizar su contenido hormonal por RIA y/o se levantaron las células en 60 µl de buffer de muestra (Tris-HCl 62 mM, glicerol 10%, SDS 2%, DTT 50 mM, azul de bromofenol 0,1%) pH 6,8 para western-blot o en 700 µl de EtOH 100% para RIA de AMPc intracelular. Las muestras resuspendidas en EtOH se sonicaron 15 seg, se desnaturalizaron a 95°C por 5 min, se centrifugaron 5 min a 1.000 rpm y se recogió el sobrenadante con el AMPc. Se evaporó el EtOH con bomba de vacío en baño termostático y se resuspendió el pellet en 120 µl de NaAc 50 mM pH 6,2. Se llevó la muestra a -20°C hasta su utilización en el RIA de AMPc.

7 - Marcación de hormonas con ^{125}I

Se iodinaron las siguientes hormonas: prolactina de rata (rPRL), hormona de crecimiento de rata (rGH), factor de crecimiento insulina-símil-1 humano (hIGF-1) y leptina humana recombinante (h-LEP). El procedimiento de marcación general fue el siguiente: A una alícuota de hormona purificada (5 $\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$ de BP 0,5 M) se le agregó 35 μl de buffer fosfato 0,5 M (BP: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,5 M, PO_4HNa_2 0,5 M) pH 7,5 más 0,8 mCi de ^{125}I apto para marcar proteínas. La introducción del iodo marcado a la molécula se realizó por medio de 11 μl de cloramina T (1 mg/ml en BP 0,05 M) actuando durante 1 min. La reacción se detuvo con 24 μl de metabisulfito de sodio (10 mg/ml en BP 0,05 M). El adecuado nivel de oxidación se comprobó agregando 100 μl de solución Rinse (sacarosa 8%, KI 1%), constatando que el color del preparado permanezca transparente.

Posteriormente se sembró la hormona marcada en una columna de Sephadex G50 (previamente bloqueada en sus sitios inespecíficos con PBS 0,01 M - EDTA 18,6% - BSA 2%) y se eluyó con BP 0,05 M. Las sucesivas fracciones se recogieron en el buffer correspondiente al tipo de hormona iodinada y se les cuantificó la marca por medio de un contador gamma Hewlett Packard (eficiencia del 82%). Se eligieron las fracciones que presentaron el pico de radioactividad asociado a la hormona marcada. Estas fracciones fueron luego testeadas por medio de ensayos de unión máxima, alicuotadas y guardadas a -20°C para ser utilizadas en RIAs posteriores.

8 - Radioinmunoensayos (RIAs) hormonales

Las hormonas (PRL, GH, IGF-1 y LEP) presentes en las muestras de suero (tratamiento *in vivo*) o liberadas al medio de cultivo (tratamiento *in vitro*) se cuantificaron por medio de RIAs utilizando kits provistos por el NIDDK.

- RIA de PRL:

Se diluyeron convenientemente las muestras y se preparó la curva de concentraciones del estándar de referencia (AFP4459B) en 200 μl de PBS-EA (buffer fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M, albúmina de huevo 1%) pH 7,5. Se agregó a las muestras y a la curva 100 μl del primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti-PRL de rata AFP131581570, dilución final 1:400.000 en PBS-EDTA-NRS 1%) y 100 μl de

PRL de rata iodizada (AFP10505B, diluída en PBS-EA de manera de tener aproximadamente 17.000 cpm/tubo). Se incubó a temperatura ambiente por 24 hs. Posteriormente se agregó el segundo anticuerpo (IgG policlonal de oveja anti-IgG de conejo, diluido 1:50 en PBS) y se incubó a 4°C por 24 hs. Finalmente se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación a 2.000 rpm durante 30 min a 4°C (Beckman Instruments). Se aspiró el sobrenadante y se cuantificó la radioactividad del precipitado (que contiene al complejo hormona-anticuerpo) en contador gamma. La unión máxima se obtuvo sin la colocación de la hormona fría y la unión mínima (inespecífico), sin el primer anticuerpo. Los resultados se expresan como ng de hormona por ml de suero. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 7,2% y 12,8% respectivamente.

- RIA de GH:

Se siguió un protocolo similar al de PRL con las siguientes modificaciones: Estándar de referencia: AFP3190B. Primer anticuerpo: IgG policlonal de conejo anti-GH de rata AFP5672099, dilución final 1:1.500.000. Hormona marcada: GH de rata (AFP5676B). Coeficientes de variación intra e interensayo: 8,3% y 13,1% respectivamente.

- RIA de IGF-1:

Se siguió un protocolo similar al de PRL con las siguientes modificaciones: Previamente al ensayo se extrajeron las muestras por el método ácido-etanólico y se crioprecipitaron para eliminar a las proteínas transportadoras de IGF-1 en sangre (IGFBPs) (Lacau-Mengido *et al.* 2000). Todas las diluciones se realizaron en buffer RIA-IGF (H₂O.NaH₂PO₄ 4,14 mg/ml, EDTA 3,72 mg/ml, sulfato de protamina 0,2 mg/ml, Tween-20 0,05%) pH 7,5. Estándar de referencia: hIGF-1-BACHEM-H5555. Primer anticuerpo: IgG policlonal de conejo anti IGF-1 humana AFP4892898, dilución final 1:150.000. Hormona marcada: IGF-1 humana recombinante, 10.000 cpm/tubo. Coeficientes de variación intra e interensayo: 8,2% y 14,1% respectivamente.

- RIA de LEP:

Se siguió un protocolo similar al de PRL con las siguientes modificaciones: Todas las diluciones se realizaron en buffer RIA-LEP (PBS 0,05 M, BSA 1%, EDTA 0,73%, Tween-20 0,01%) pH 7,5. Estándar de referencia: hLEP-398-LP. Primer anticuerpo: IgG policlonal de conejo anti LEP humana AFP6621299, dilución final 1:200.000. Hormona marcada: LEP humana recombinante. Coeficientes de variación intra e interensayo: 8,3% y 10,2% respectivamente.

9 - Radioinmunoensayo de AMPc

Se diluyeron convenientemente las muestras provenientes del lisado de células en cultivo y se preparó la curva de concentraciones del estándar de referencia en 100 μ l de NaAc 50 mM pH 6,2. Se acetilaron las muestras y la curva de referencia con el agregado de 10 μ l de una solución de anhídrido acético-trietilamina (proporción 1:2) ya que el anticuerpo reconoce el AMPc acetilado. Se agregó 100 μ l de AMPc iodinado diluído en NaAc 50 mM (de manera de obtener aproximadamente 30.000 cpm/tubo) y 100 μ l del anticuerpo (IgG anti-AMPc, dilución final 1:63.000 en NaAc 50 mM). Se incubó el ensayo a 4°C por 24 hs. Posteriormente se agregaron 50 μ l de BSA 2% en NaAc 50 mM y 2 ml de EtOH 100% frío. Se agitó con vórtex y se incubó por 10 min. Finalmente se separó el AMPc libre del unido al anticuerpo específico por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se cuantificó la radioactividad del precipitado (que contiene al complejo AMPc-anticuerpo) en contador gamma. La unión máxima se obtuvo sin la colocación del AMPc frío y la unión mínima (inespecífico), sin la colocación del anticuerpo.

10 - Corrida electroforética de proteínas

Las adenohipófisis obtenidas luego del tratamiento *in vivo* se recogieron en buffer Tris-EDTA con inhibidores de proteasas (Tris-base 60 mM, EDTA 1 mM, TAME 25 μ M, TLCK 25 μ M, TPCK 25 μ M, ZPCK 25 μ M, PMSF 500 μ M) pH 7,4. Se homogeneizó el tejido en hielo y se centrifugó en frío 5 min a 3.000 rpm. Se guardó el sobrenadante y se lo diluyó a la concentración adecuada para la siembra en buffer de muestra (ya descripto en Cultivo primario de células). Las células provenientes del tratamiento *in vivo* o *in vitro* y resuspendidas en buffer de muestra se sonicaron 10 seg para completar su homogeneización, se desnaturalizaron a 95°C por 5 min y se centrifugaron a 1.000 rpm por 1 min.

Posteriormente se sembró 20 μ l de muestra (50 μ g de proteína, cuantificada por el método de Lowry) y los marcadores de peso molecular en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12%. Se corrió electroforéticamente en buffer de corrida (glicina 1,4%, Tris-base 0,3%, SDS 0,1%) pH 8,3 a amperaje

constante (56 mA) y a un voltaje máximo de 170 V hasta que el frente llegó a la parte inferior del gel. Posteriormente se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (glicina 1,4%, Tris-base 0,3%, metanol 20%) pH 8,3 a voltaje constante (100 V) y a un amperaje máximo de 300 mA, durante 1 hr, en hielo. La membrana se lavó abundantemente en buffer PBS-T (buffer PBS con el agregado de Tween-20 0,05%) pH 7,5 y se constató la presencia de proteínas por medio de la tinción con rojo Ponceau.

11 - Western-blots

- De ERK1/2:

Las membranas obtenidas de la corrida electroforética se incubaron sucesivamente durante 1 hr en agitación con: 1) leche en polvo descremada 5% en PBS-T para bloquear los sitios inespecíficos, 2) el primer anticuerpo (monoclonal en ratón anti-ERK1/2 fosforilada en Thr202/Thr204 o anticuerpo policlonal en conejo anti-ERK1 total) diluido en PBS-T-BSA (PBS-T con el agregado de BSA 1%) y 3) el segundo anticuerpo biotinilado (anti-IgG policlonal de ratón o anti-IgG policlonal de conejo) conjugado con peroxidasa de rabanito y diluido en PBS-T-BSA. Luego de cada incubación se lavó 3 veces con 10 min de PBS-T. Finalmente 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 (corrigiendo la densidad de banda de acuerdo a la señal de fondo) y se determinó el cociente entre las intensidades de banda de las ERK fosforiladas sobre las totales (calculadas a partir de la misma membrana). El control negativo se realizó por medio de una incubación sin primer anticuerpo. Los pesos moleculares se calcularon a partir de la corrida de estándares preteñidos y biotinilados.

- De AT1 y AT2:

El procedimiento fue similar al de ERK1/2 con las siguientes modificaciones: 1) el primer anticuerpo fue anti-AT1 (policlonal en conejo) o anti-AT2 (policlonal en cabra), 2) el segundo anticuerpo fue un anti-IgG policlonal de conejo o un anti-IgG policlonal de cabra. Los resultados se expresan como % relativo al grupo control. El

control negativo se realizó por medio de una incubación sin primer anticuerpo. Los pesos moleculares se calcularon a partir de la corrida de estándares preteñidos y biotinilados.

- De PCNA y PTTG:

El procedimiento fue similar al de ERK1/2 con las siguientes modificaciones: 1) el primer anticuerpo fue anti-PCNA (policlonal en conejo) o anti-PTTG (policlonal en cabra). 2) el segundo anticuerpo fue un anti-IgG policlonal de conejo o un anti-IgG policlonal de cabra. Los resultados se expresan como % relativo al grupo control. El control negativo se realizó por medio de una incubación sin primer anticuerpo. Los pesos moleculares se calcularon a partir de la corrida de estándares preteñidos y biotinilados.

12 - Extracción de RNA

Para realizar esta técnica se tomaron todos los recaudos necesarios para lograr en lo posible condiciones libres de RNAsa. Luego de extraer en hielo la adenohipófisis del animal, se colocó la mitad de esta glándula en 500 µl de trizol (o en RNA later si no se procesaba en el momento), se homogeneizó el tejido, se sonicó 10 seg y se incubó 5 min a 30°C. Luego se agregaron 80 µl 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 µl 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 µl 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 µl (controles) o en 40 µl (tumores) de agua con dietilpircarbonato (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.

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

La primera etapa de esta técnica es la retrotranscripción (RT) del RNA a DNA copia (cDNA) por medio de la retrotranscriptasa reversa M-MLV-RT. Para esto se incubaron 2 µg de cada muestra de RNA con la solución de reacción (M-MLV-RT 200 unid/muestra, primers al azar 1 µg/muestra, dNTPs 1 mM, RNAsin 5 unid/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 75°C para finalizar la reacción. Los controles negativos (para descartar posible contaminación con DNA genómico o foráneo) consistieron en no colocar la enzima o no colocar el RNA muestra en los tubos de reacción.

La segunda etapa de la técnica es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se incubaron las muestras de cDNA en una solución de reacción específica para cada caso en un termociclador Eppendorf según un programa de ciclado, también específico. Las condiciones para cada gen fueron las siguientes:

- PCR para AT1:

Se utilizaron 100 ng de cDNA/muestra incubados con la solución de reacción (Taq polimerasa 1,5 unid/muestra, cebador directo (CAAGGCTGGCAGGCACAA) 0,5 µM, cebador inverso (GAGGCGAGACTTCATTGGGT) 0,5 µM, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1 mM, buffer de enzima 5 µl/muestra, en un volumen final de 50 µl). El programa de ciclado fue el siguiente: un inicio en caliente de 3 min a 93°C y 35 ciclos con 1 min a 93°C (separación de cadenas), 1 min a 60°C (unión de los cebadores) y 40 seg a 72°C (elongación enzimática). Finalmente, 5 min a 72°C para completar las elongaciones.

- PCR para AT2:

Se utilizó 1 µg de cDNA/muestra incubados con la solución de reacción (Taq polimerasa 2,5 unid/muestra, cebador directo (GCTGTTGTGTTGGCATTTCAT) 0,5 µM, cebador inverso (TCCAAACCATTTGCTAGGCT) 0,5 µM, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1 mM, buffer de enzima 5 µl/muestra) en un volumen final de 50 µl. El programa de ciclado fue el siguiente: un inicio en caliente de 3 min a 93°C y 40 ciclos con 1 min a 93°C, 1 min a 55°C y 40 seg a 72°C. Finalmente, 5 min a 72°C.

- PCR para 28S:

Se utilizaron 50 ng de cDNA/muestra incubados con la solución de reacción (Taq polimerasa 1,5 unid/muestra, cebador directo (GCCTAGCAGCCGACTTAGAA) 0,5 µM, cebador inverso (TTCACCGTGCCAGACTAGAG) 0,5 µM, dNTPs 0,2 mM,

MgCl₂ 2 mM, buffer de enzima 5 µl/muestra) en un volumen final de 50 µl. El programa de ciclado fue el siguiente: un comienzo en caliente de 3 min a 93°C y 30 ciclos con 1 min a 93°C, 1 min a 52°C y 40 seg a 72°C. Finalmente, 5 min a 72°C.

En todos los casos se realizaron blancos de PCR sin cDNA y sin enzima. Luego de la amplificación, las muestras se guardaron a -20°C hasta su posterior corrida electroforética.

14 - Corrida electroforética del cDNA amplificado

Se agregó (a 10 µl del producto de la PCR) 1 µl de buffer de muestra (azul de bromofenol 25%, glicerol 30%) y se sembró en un gel de agarosa 1,8% con 10 µg/ml de bromuro de etidio bañado en buffer TBE (Tris base 0,54%, ácido bórico 0,27%, EDTA 1 mM). La corrida se realizó a voltaje constante (80 V) y a un amperaje de 400 mA por 45 min. Posteriormente se observó el gel bajo luz ultravioleta en un transiluminador UVP (Ultraviolet Products) asociado al programa VisionWorks. Finalmente se cuantificaron las intensidades de banda por medio del programa ScionImage (corrigiendo la densidad de banda de acuerdo a la señal de fondo) y se determinó el cociente entre las intensidades las bandas de AT1 o AT2 sobre las del RNAr 28S correspondiente. Los pesos moleculares se calcularon a partir de la corrida de estándares.

15 - Inmunohistoquímica (IHQ) de PRL

Las adenohipófisis extraídas al finalizar los tratamientos fueron colocadas en formol 10% en PBS por 2 hs y luego deshidratadas paulatinamente a través del pasaje sucesivo por alcohol 96% (4 hs), alcohol 100% (4 hs) y xileno (3 hs). Posteriormente se incluyeron en parafina líquida por medio de un baño de 3 hs y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Se realizaron los cortes de parafina con micrótopo y se montaron en portaobjetos. Posteriormente se rehidrataron los cortes, se incubaron 15 min con H₂O₂ 3% en PBS para inhibir a la peroxidasa endógena y 30 min con BSA 2% en PBS para bloquear los sitios inespecíficos. Luego se dejaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-rPRL específico realizado en conejo (dilución final 1:1000 en PBS). Al día siguiente se incubaron con el segundo anticuerpo biotinilado (anti IgG de conejo) a temperatura ambiente durante 1 hr, con

el complejo de avidina-biotina 1:50 en PBS (que contiene a la peroxidasa) durante 30 min y finalmente se cubrieron con una solución de diaminobencidina 0,05% en PBS con 0,01% de H₂O₂ (sustratos de la peroxidasa). Cuando se completó la reacción colorimétrica se la detuvo por inmersión PBS, se contratiñó con hematoxilina y se montó con Permount.

16 - Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media +/- el error estándar (ES). Se trabajó con un nivel de significancia del 5%. En todos los ANOVAs, si la interacción resultó ser significativa se realizaron contrastes de Tukey (a posteriori) de efecto simple. Si la interacción resultó no significativa se realizaron contrastes de Tukey de efecto principal.

Cap 1: El análisis de las figuras 1.1, 1.2, 1.4, 1.5 y 1.6 se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor: el grupo experimental (control o tumor). Las figuras 1.10, 1.11, 1.12 y 1.13 se evaluaron a través de un ANOVA de 2 factores: grupo experimental (control o tumor) y tratamiento *in vivo* (vehículo o P4). Los gráficos 1.8.B y 1.8.C se analizaron en conjunto por medio de un ANOVA de 2 factores: grupo experimental (control o tumor) y tratamiento *in vitro* (buffer, DUP753, PD123319, AII, AII+DUP753 y AII+PD123319). La figura 1.9 se analizó en conjunto con la 1.16 a través de un ANOVA de 3 factores: grupo experimental (control o tumor), tratamiento *in vivo* (vehículo o P4) y tratamiento *in vitro* (buffer, DUP753, PD123319, AII, AII+DUP753 y AII+PD123319). En muchos gráficos, se omitió por comodidad la representación gráfica de los controles DUP753 y PD123319. El análisis de la movilización intracelular de calcio se realizó por medio de un test t apareado entre los picos máximos y/o entre las áreas bajo la curva de un promedio de por lo menos 6 corridas. El gráfico 1.8.A se analizó a través de un ANOVA de medidas repetidas, en donde los factores fueron el grupo experimental (control o tumor) y el tiempo (minutos).

Cap 2: El análisis de la curva temporal y de la curva dosis-respuesta de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a AII se realizó por medio de un ANOVA de medidas repetidas de 1 factor (tiempo o dosis, respectivamente). Los resultados de la activación de ERK1/2 frente al pretratamiento con los distintos inhibidores específicos se analizaron por medio de ANOVAs de 2 factores: preestímulo (buffer,

DUP753, PD123319, PTX, U73122, PMA 24 hs, queleritrina, BAPTA-AM, TMB8, EGTA 7 min, EGTA 20 min, herbimicina-A, PP1, AG1478, PD98059) y estímulo (buffer, All, PMA 10 min, EGF). El análisis de la movilización intracelular de calcio se realizó por medio de un test t entre los picos máximos (fase de espiga) o entre las áreas bajo la curva (fase de meseta) de un promedio de al menos 6 corridas.

Cap 3: La evolución de los pesos corporales, los niveles hormonales de PRL y GH y el promedio de estros a lo largo del experimento (hasta la sexta semana) se analizaron por medio de un ANOVA de medidas repetidas de 2 factores: grupo experimental (control, tumor, DHEA o tumor+DHEA) y tiempo (semanas). El peso hipofisario, el peso adrenal y los niveles hormonales al finalizar el tratamiento (séptima semana) se evaluaron a través de un ANOVA de 2 factores: el grupo experimental (control o tumor) y el tratamiento (vehículo o DHEA).

Cap 4: La figura 4.1 se analizó por medio de un ANOVA de 1 factor: tratamiento (buffer, DHEA, OH-DHEA o ADIOL). Al resto de las liberaciones hormonales *in vitro* y a la producción de AMPc se les realizó un ANOVA de 2 factores: pretratamiento (buffer, DHEA, OH-DHEA o ADIOL) y estímulo (buffer, All, DA, GHRH o STT). El análisis de la movilización intracelular de calcio se realizó por medio de un test t entre los picos máximos o entre las áreas bajo la curva de un promedio de al menos 6 corridas.

PARTE I:
ANGIOTENSINA II

PARTE I: ANGIOTENSINA II

INTRODUCCION

1 - Sistema renina-angiotensina (SRA)

El SRA se denomina de este modo en base a la enzima limitante: la renina, y al péptido funcionalmente más activo: la angiotensina II (AII). El SRA clásico es el sistémico, considerado un mecanismo hormonal y enzimático clave en la regulación de la homeostasis cardiovascular. En el SRA sistémico, el angiotensinógeno (AO) hepático es clivado en sangre periférica por la renina, enzima secretada por las células yuxtaglomerulares del riñón, dando lugar al decapeptido angiotensina I (AI, fig I.1). Este es clivado a su vez por la enzima convertidora de angiotensina (ACE), originando el octapéptido AII. La AII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) es el producto más activo del sistema aunque su vida media en sangre es corta. Otras peptidasas pueden catabolizar a AII produciendo fragmentos más cortos de menor actividad, como el heptapéptido angiotensina III (AIII), el hexapéptido angiotensina IV (AIV) y otros fragmentos menores.

Se han identificado en diversas especies, inicialmente sobre la base de diferencias farmacológicas, dos subtipos principales de receptores de AII: el AT1 y el AT2, ambos con siete dominios transmembrana, acoplados a una proteína G (GPCRs) y con poca homología entre sí (un 34%). Existen dos variantes del receptor AT1: el AT1a y el AT1b (Iwai & Inagami 1992), así como receptores de AII denominados atípicos, debido a que no son bloqueados por los antagonistas de AT1 y AT2. Dentro de éstos se han descrito a AT3 y a AT4 (Swanson *et al.* 1992), (Harding *et al.* 1994), sin embargo, la farmacología de estos receptores no ha sido aún completamente caracterizada. El AT4 une tanto AIV como AII, aunque ésta última con menor afinidad. Este receptor es expresado en cerebro (Roberts *et al.* 1995), en fibroblastos cardíacos (Neuss *et al.* 1994) y en útero humano (Ahmed *et al.* 1995). Además AII podría actuar también a través de receptores intracelulares (Eggena *et al.* 1993).

La función principal y más estudiada de AII en el SRA sistémico está relacionada con la regulación de la presión arterial y la homeostasis hidrosalina. AII produce vasoconstricción arterial (en parte por la inducción de endotelina-1 en endotelio vascular (Imai *et al.* 1992)), aumento de la volemia por secreción de

hormona antidiurética hipofisaria y aumento de la concentración salina en sangre por medio de la liberación de aldosterona adrenal. Estos efectos, junto con una acción directa a nivel central que entre otras cosas produce sensación de sed, conducen a una elevación de la presión sanguínea y están mediadas por receptores AT1.

Aunque la All sistémica no puede penetrar la barrera hematoencefálica, es capaz de actuar sobre receptores cerebrales ubicados fuera de esta barrera. Además, existe un SRA intracerebral con producción local de All que también estaría aportando a la regulación de la presión arterial local y sistémica (Culman *et al.* 1995), (Bickerton & Buckley 1961). Por otro lado se postula que All, a través de su receptor AT2, tendría una acción opuesta sobre esta variable, de tipo hipotensora, compensando y regulando de esta manera parte de las acciones mediadas por el AT1 (Munzenmaier & Greene 1996).

2 - Sistema renina-angiotensina hipofisario. Efecto de los estrógenos.

Hace aproximadamente 20 años se descubrió que, además del SRA sistémico, existían numerosos SRA locales (Danser AH. 1996), (Campbell 1987). Paulatinamente se fue encontrando los diferentes componentes del sistema en una gran variedad de órganos y tejidos. Actualmente se sabe que existen SRA locales en cerebro (Saavedra 1992), corazón (Dzau 1988), hipófisis (Saavedra 1992), riñón (Deschepper *et al.* 1986), adrenales (Deschepper *et al.* 1986), ovario (Bumpus *et al.* 1988), testículo (Millan & Aguilera 1988), placenta (Poisner & Downing 1995) y en la propia pared arterial (Inagami *et al.* 1988).

Si bien en algunos casos estos sistemas podrían estar contribuyendo, directa o indirectamente, a los efectos cardiovasculares del SRA periférico (MacFadyen 1993), (Dzau & Hirsch 1990), en muchos otros casos poseen una función tisular específica relacionada con regulaciones locales relativamente independientes del SRA sistémico (Ganong 1995), (Chen *et al.* 1982), (Saavedra 1992). En los últimos años numerosos grupos han incursionado y profundizado en el estudio de estos sistemas locales, lo que ha llevado a la descripción de nuevos efectos de All de tipo endócrino, parácrino, autócrino e incluso intracrino, en compartimentos intracelulares de células que poseen un SRA propio y completo (Lippoldt *et al.* 1995), (De Mello 1994).

Todos los componentes del SRA se encuentran en la glándula hipofisaria. El angiotensinógeno proviene del aporte sistémico pero además es producido localmente por las células folículo-estrelladas adenohipofisarias (Deschepper & Ganong 1991). Tanto la renina (Deschepper *et al.* 1986) como la ACE (Platia *et al.* 1985) y la AII (Deschepper *et al.* 1985), (Steele *et al.* 1982) fueron identificadas por inmunohistoquímica en los gonadotropos. Por otro lado, se confirmó la síntesis local de AO y renina por hibridización *in situ*, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y por cultivos celulares *in vitro*. Se determinó asimismo que la AII colocaliza con LH en los gránulos de secreción del gonadotropo.

Por lo tanto, se considera a este tipo celular como el responsable de la síntesis y secreción local de AII en hipófisis. El esquema que se propone es el siguiente: el AO sistémico o local sería endocitado por el gonadotropo para ser internamente convertido a AII, la cual sería finalmente secretada al medio extracelular (fig 1.2). Al hallarse presente la ACE también en sangre, es posible que parte de la AI sea liberada por el gonadotropo al medio extracelular y allí se produzca también su conversión a AII.

Los estrógenos pueden modular numerosos aspectos del SRA, tanto del periférico como del hipofisario. El tratamiento estrogénico ejerce una acción protectora en ratas transgénicamente hipertensas disminuyendo la presión arterial, lo que estaría mediado por una reducción en plasma de los niveles de AII y de la actividad de la ACE (Brosnihan *et al.* 1997). Sin embargo, por otro lado los estrógenos incrementan los niveles sanguíneos (Stavreus-Evers *et al.* 2001) e hipotalámicos (Greenland & Semia 2004) de AO y alteran la expresión de los receptores de AII en general. En la adenohipófisis, incrementan el RNAm de AO (Healy *et al.* 1992), disminuyen la secreción de PRL en respuesta a AII (Diaz-Torga *et al.* 1998) y reducen la expresión de AT1 (Seltzer *et al.* 1992).

3 - Acciones proliferativas y angiogénicas de la angiotensina II (AII)

Además de los efectos de AII a nivel sistémico sobre la regulación cardiovascular, este péptido es sumamente interesante debido a sus acciones a nivel local sobre el crecimiento tisular, la angiogénesis, la secreción hormonal y la facilitación sináptica. La acción proliferativa y/o hipertrófica de AII ha sido demostrada en cardiomiocitos (Sadoshima *et al.* 1993), fibroblastos cardíacos

(Sadoshima & Izumo 1993), células de músculo liso vascular (VSMC) (Weber *et al.* 1994), células adrenocorticales (Matsusaka & Ichikawa 1997) e incluso en células hipofisarias (Kunert-Radek & Pawlikowski 1992b). La capacidad de AII de estimular el crecimiento tisular la involucra en procesos neuroplásticos (Lebrun *et al.* 1995b), en el remodelado ventricular luego de un infarto de miocardio (Nio *et al.* 1995), y en la reparación vascular (Viswanathan *et al.* 1992) y dérmica (Viswanathan & Saavedra 1992) luego de heridas experimentales. Por otro lado, este tipo de acciones proliferativas e hipertróficas de AII la hacen participar también de patologías como la hipertrofia ventricular izquierda, la hipertrofia vascular, la arteriotrombosis y la nefroesclerosis (Kaschina & Unger 2003).

AII estimula en diversos tejidos la activación tirosín-kinasas del tipo receptor (RTKs como el EGFR, el IGFR o el PDGF) y del tipo no receptor (como la cSrc, JAK2, FAK, PyK2 y PI3K) (Touyz & Berry 2002). En VSMC, AII induce la vía JAK/STAT (Marrero *et al.* 1995). Las vías asociadas a tirosín-kinasas conducen, en muchos casos, a la activación de proteínas kinasas asociadas a mitógenos extracelulares (MAPKs). Existen seis subfamilias de MAPKs en mamíferos: ERK1/2, ERK3, ERK5, ERK6, JNK/SAPK y p38 (Touyz & Berry 2002). AII estimula MAPKs del tipo ERK1/2 (kinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares) vía su receptor AT1 en numerosos tipos celulares incluyendo neuronas (Huang *et al.* 1996), fibroblastos cardíacos (Murasawa *et al.* 1998b), VSMC (Eguchi *et al.* 1996), células renales (Terada *et al.* 1995), células de glomerulosa adrenal bovina (BAG) (Tian *et al.* 1998) y células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el receptor AT1 humano (Arai & Escobedo 1996). Esto resulta interesante ya que las ERK1/2 están muy asociadas con la proliferación celular a través de la activación de factores de transcripción y la expresión de protooncogenes.

Inyecciones intracerebroventriculares de AII inducen la expresión de c-jun, c-fos y krox-24 en numerosas estructuras cerebrales (Lebrun *et al.* 1995b), (Lebrun *et al.* 1995a). AII también aumenta la expresión de c-fos en cultivos celulares derivados de la astrogliá (Raizada *et al.* 1993) y en VSMC (Naftilan *et al.* 1989). c-fos, heterodimerizado con c-jun, constituye uno de los principales factores de transcripción: el AP1. Aunque en la mayoría de los casos los genes blanco de estos factores de transcripción no son aún conocidos se postula que, en el caso de los fibroblastos cardíacos, el gen blanco de c-fos es probablemente el factor de

crecimiento transformante tipo β (TGF- β), factor que contribuiría al remodelado de la matriz extracelular del miocardio durante la hipertrofia de este tejido (Sharma *et al.* 1994).

En los últimos años se ha observado que inhibidores de la ACE y antagonistas del receptor AT1 tenían efectos sobre la estructura y función vascular (Stoll *et al.* 1995a). All tiene diferentes acciones moduladoras sobre el crecimiento celular dependiendo del nivel de expresión de sus receptores. La acción proliferativa de All sobre las células endoteliales sanguíneas sería la base de su efecto angiogénico y está asociado a la expresión de genes tempranos y factores de crecimiento. Este efecto mediado por AT1 sería parcialmente compensado y regulado por las acciones antiproliferativas de All a través de AT2 (Csikos *et al.* 1997).

4 - Efectos de la Angiotensina II en la hipófisis

Como vimos anteriormente, el factor más importante en la regulación de PRL es la DA hipotalámica, que ejerce un control tónico inhibitorio. Por otro lado existe también una regulación ejercida por factores de tipo estimulador, como los estrógenos sistémicos y los PRFs hipotalámicos e hipofisarios. Entre estos últimos, consideramos a la All como un factor importante en el control endócrino y parácrino del lactotrofo.

El GnRH hipotalámico induce en el gonadotrofo la liberación de All, la cual estimula parácrinamente la secreción de PRL en el lactotrofo principalmente a través de receptores AT1 (Becu-Villalobos *et al.* 1994). La interacción funcional entre el gonadotrofo y el lactotrofo se ve favorecida por una asociación estructural íntima entre ambas células dada a través de uniones estrechas especializadas en la zona lateral de la adenohipófisis (Horvath *et al.* 1977). Por otro lado, la All producida localmente en el hipotálamo y liberada a la eminencia media puede llegar a los lactotrofos a través de sangre portal. Asimismo, All estimula la liberación hipotalámica de DA (Ganong 1989).

El efecto prolactino-liberador de All ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* (Diaz-Torga *et al.* 1994), (Dufy-Barbe *et al.* 1982), (Schramme & Denef 1983). La regulación de la secreción de PRL por All en mamíferos podría no sólo estar relacionada con funciones reproductivas, sino que también formaría parte de la

regulación hidrosalina ejercida por el SRA sistémico. Recordemos que, en la evolución filogenética, la función de PRL comenzó siendo de tipo osmorreguladora, como aún continúa siéndolo en el caso de los peces (Miguel Mancera *et al.* 2002).

Sin embargo, además del efecto prolactino-liberador de All, son interesantes sus acciones descritas sobre la proliferación celular y la angiogénesis. Se ha reportado que All, en células de tumores hipofisarios de rata cultivadas *in vitro*, induce proliferación cuantificada por incorporación de timidina tritiada (Kunert-Radek & Pawlikowski 1992a). Por otro lado, All también puede modular los cambios vasculares inducidos en la hipófisis por el tratamiento estrogénico (Pawlikowski *et al.* 1996). El aumento del área, diámetro y perímetro vascular inducido por este tratamiento puede ser revertido por el losartán, bloqueante específico de AT1 mientras que el PD123319, bloqueante específico de AT2, es menos efectivo. Esto sugiere que All, principalmente vía su receptor AT1, está involucrada en los efectos estrogénicos de tipo vascular sobre la hipófisis.

La adenohipófisis de rata expresa predominantemente la isoforma AT1b del subtipo AT1 (Kakar *et al.* 1992), (Lenkei *et al.* 1999) junto a una muy baja expresión de la isoforma AT1a y del subtipo AT2 (Shelat *et al.* 1999), (Suarez *et al.* 2004). Los receptores AT1b se encuentran principalmente en los lactotrofos y, en menor medida, en los corticotrofos y en los tirotrofos (Moreau *et al.* 1997). El nivel de expresión de los receptores de All en hipófisis varía bajo diferentes condiciones fisiológicas (Seltzer *et al.* 1992). En particular nosotros describimos en trabajos previos que la estimulación con All induce una marcada desensibilización de sus receptores hipofisarios tomando como punto final la generación de inosítoles fosfato, la movilización intracelular de calcio y la secreción de PRL (Gonzalez-Iglesias *et al.* 2001). Este mecanismo participaría de la modulación de los receptores a lo largo del ciclo estral y en algunas patologías, como el tumor hipofisario.

Como ya comentamos previamente, el proceso tumorigénico en hipófisis es un proceso de pasos múltiples que involucra la desregulación de la proliferación, la diferenciación y la secreción hormonal, así como la angiogénesis tisular. Por lo tanto, y tomando en cuenta los efectos proliferativos, angiogénicos y prolactino-liberadores de All, consideramos interesante el estudio de este péptido en el contexto de nuestro modelo experimental de prolactinoma. Para ello, en la primera parte de esta

tesis comenzamos evaluando las diferencias en la respuesta a AII entre la hipófisis normal y la tumoral (hiperplásica) en cuanto a la participación diferencial de los receptores de AII, la movilización intracelular de calcio, la activación de ERK1/2 y la secreción de PRL. Posteriormente abordamos en mayor profundidad el estudio de la vía de transducción de señales evocada por AII y conducente a la activación de ERK1/2 en la hipófisis normal, que no había sido descrita hasta el momento en la literatura. Finalmente, analizamos en nuestro modelo tumoral la posible capacidad terapéutica de la progesterona y su interrelación con los efectos de AII.

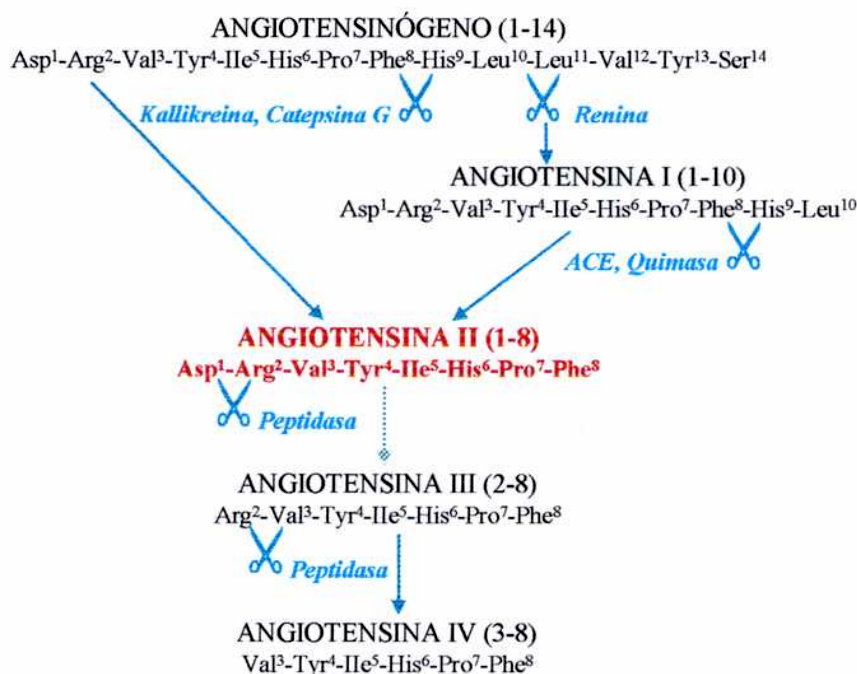


Figura I.1: Esquema de los componentes del sistema renina-angiotensina.

El angiotensinógeno, por clivaje inducido por la renina, da origen a la angiotensina I. Esta, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), produce la angiotensina II, péptido activo del sistema, la cual finalmente es clivada por peptidasas originando fragmentos más pequeños como la angiotensina III y la angiotensina IV.

GONADOTROPO

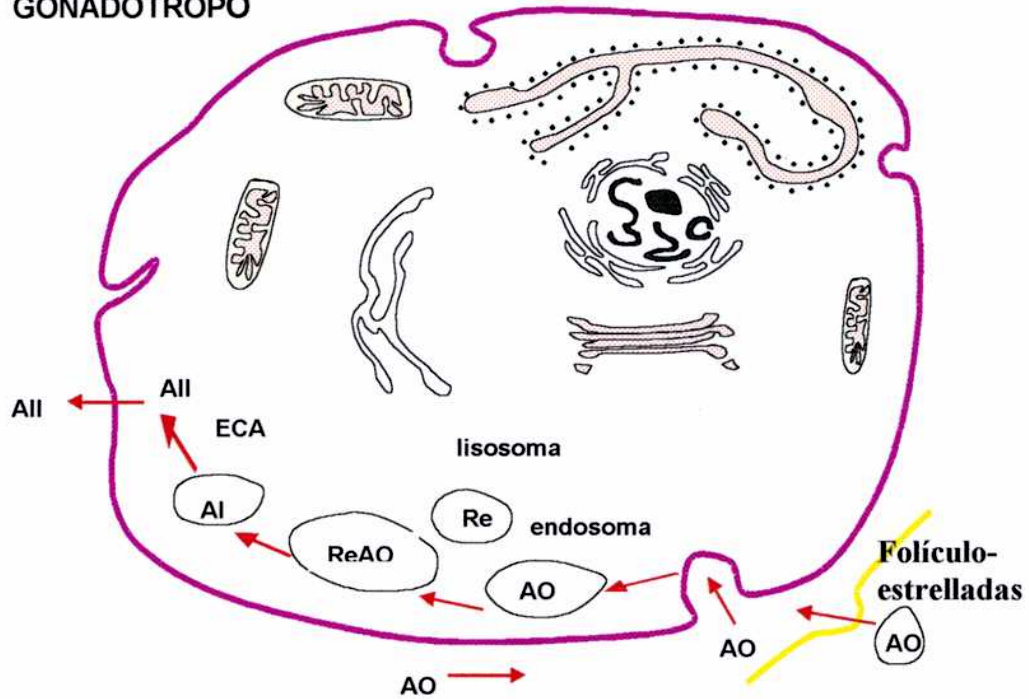


Figura I.2: Mecanismo de producción local de AII en la adenohipófisis

El angiotensinógeno (AO) secretado por las células foliculo-estrelladas o proveniente de sangre sistémica es endocitado por el gonadotrofo para ser internamente convertido a AI por acción de la renina (Re) y posteriormente a AII a través de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La AII sería finalmente secretada al medio extracelular. Adaptado de Ganong et al (1995), *Neurosci Biobehav Rev* 19: 241-250.

CAPITULO 1

***Alteraciones de la respuesta a angiotensina II en la hipófisis
hiperplásica.***

Efecto de un tratamiento con progesterona

CAPITULO 1:

Alteraciones de la respuesta a angiotensina II en la hipófisis hiperplásica.

Efecto de un tratamiento con progesterona

Como ya se comentó anteriormente, la Angiotensina II (Ang II) es un regulador fundamental de la presión sanguínea y la homeostasis hidrosalina, aunque está también involucrada en otras funciones biológicas importantes como el crecimiento tisular, la angiogénesis, la secreción hormonal y la activación neuronal. Todos los componentes del Sistema Renal-Angiotensina (SRA) se encuentran presentes en la hipófisis. En esta glándula, la Ang II es sintetizada localmente en el gonadotropo y estimula parácrinamente en el lactotrofo la secreción de PRL (Díaz-Torga *et al.* 1994).

En nuestro modelo experimental, la administración crónica de estrógenos induce una hiperplasia e hipertrofia de lactotrofos, asociada a una hiperprolactinemia. A su vez, como mencionamos previamente, los estrógenos ejercen efectos sobre el SRA, como el de elevar la concentración local de Ang II y regular la expresión de sus receptores. Hemos observado en trabajos previos de nuestro laboratorio que, en este modelo de hiperplasia hipofisaria, la respuesta a Ang II *in vitro* se ve profundamente alterada (Suárez *et al.* 2002). Específicamente, describimos una alteración en el patrón de movilización interna del calcio y en la secreción de PRL (Díaz-Torga *et al.* 1998).

Por lo tanto decidimos estudiar con más detalle las alteraciones de la respuesta a Ang II en nuestro modelo de hiperplasia hipofisaria. Nos interesaba en particular evaluar la posible participación del receptor AT₂ en esta respuesta, ya que no existían hasta el momento datos bibliográficos acerca de la expresión, función o regulación de este subtipo de receptor de Ang II en la hipófisis. A modo introductorio y complementario caracterizamos algunas de las manifestaciones generales que se producen de este tipo de tumor, como ser la alteración del peso corporal, el peso hipofisario, los niveles de PRL sérica e hipofisaria y la expresión de las proteínas pcna y pttg en esta glándula.

Existen dos subtipos principales de receptores de Ang II: el AT₁ y el AT₂. Las mayoría de las funciones biológicas de Ang II descritas en la literatura son mediadas por el receptor AT₁. Este subtipo se encuentra expresado en numerosos tejidos,

como cerebro, corazón, hipotálamo, hipófisis, pulmón, hígado, intestino, riñón, adrenal, miometio, ovario y vasos sanguíneos (Timmermans *et al.* 1993), (Clauser *et al.* 1996). La adenohipófisis de rata expresa predominantemente la isoforma AT1b en el lactotrofo.

Por otro lado, el receptor AT2 (Koike *et al.* 1995) ha sido hasta el momento mucho menos estudiado que el AT1. Específicamente, su función y regulación estrogénica en la hipófisis no han sido descritas. Sin embargo el estudio de este receptor es interesante debido a que en diferentes tejidos actúa como modulador de programas biológicos complejos involucrados en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, la protección y regeneración de tejidos, así como en la apoptosis (Unger 1999). En general, los efectos mediados por AT2 sobre el crecimiento celular son opuestos a los mediados por AT1 (Horiuchi *et al.* 1999), (Stoll *et al.* 1995a). Se han asociado al AT2 efectos de Ang II relacionados con la inhibición de la proliferación celular en células endoteliales coronarias (Stoll *et al.* 1995b), la apoptosis de células epiteliales renales (Hauser & Oberbauer 2002) y de granulosa ovárica (Tanaka *et al.* 1995), la diferenciación morfológica hacia neuronas maduras en células PC12W (Zhao *et al.* 2003), la vasodilatación arterial (Masaki *et al.* 1998) y la antiangiogénesis (Munzenmaier & Greene 1996), (Benndorf *et al.* 2003).

El receptor AT2 se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos fetales mientras que su expresión cae dramáticamente luego del nacimiento (Grady *et al.* 1991), (de Gasparo *et al.* 2000), (Timmermans *et al.* 1993). En el animal adulto se lo puede encontrar en cerebro, corazón, páncreas, riñón, adrenales, miometrio, ovario y en los vasos sanguíneos (Nahmias & Strosberg 1995). Sin embargo, el AT2 puede re-expresarse en el adulto ante ciertas condiciones patológicas como el infarto cardíaco (Nio *et al.* 1995) (Tsutsumi *et al.* 1998), la atresia ovárica (Tanaka *et al.* 1995) y en ciertos traumatismos renales (Ruiz-Ortega *et al.* 2003) y de piel (Viswanathan & Saavedra 1992).

En numerosos estudios, incluyendo experimentos de knock-out génico, se ha observado que las vías de señalización intracelular de ambos subtipos de receptores de Ang II son diferentes y que el subtipo AT2 tiene efectos opuestos a los mediados por el AT1 (Horiuchi *et al.* 1999), lo que sugiere que funcionaría como un control contrapuesto a los efectos de tipo estimulatorio de Ang II vía AT1. Esta oposición se observaría especialmente en cuanto a la proliferación celular, la angiogénesis y la regulación de la presión arterial. Las diferentes propiedades de desensibilización de

ambos subtipos de receptores pueden contribuir a los efectos selectivos de AII en tejidos en los que se expresan tanto AT1 como AT2. Al respecto, hemos descrito la desensibilización del AT1 ante una exposición prolongada a AII (Gonzalez-Iglesias *et al.* 2001), lo cual constituye un posible mecanismo por el cual esta hormona puede limitar su señalización vía AT1 y favorecer la mediada por AT2.

Debido a que AII se une a ambos receptores con una afinidad similar, la reacción celular a este péptido será altamente dependiente del nivel de expresión relativa y/o del nivel de respuesta de cada receptor, como se describe en otros sistemas. En cuanto a su señalización, se describió que el receptor AT2 es capaz de estimular tres sistemas interesantes (Nouet & Nahmias 2000): la vía conducente a la activación de tirosín fosfatasas, que puede estar relacionada con una inhibición de la proliferación a través de la inactivación de kinasas del tipo ERK1/2; la vía del NO-GMPc, relacionada con la vasodilatación; y la vía de la fosfolipasa A2, relacionada con la esteroidogénesis.

Habíamos observado en trabajos previos que en el prolactinoma inducido por estrógenos se veían alteradas algunas respuestas hipofisarias a AII, como la movilización intracelular del calcio y la secreción de PRL, por lo que decidimos analizar la expresión diferencial de los subtipos de receptores de AII en la hipófisis y su relación con estas respuestas a AII tanto en la glándula normal como en la hiperplásica. Por otro lado aún no se había estudiado la posible activación de ERK1/2 por AII en hipófisis. Como ya comentamos en algunos tejidos AII, a través de los receptores AT1, induce la activación de la vía de las MAPKs, las cuales a su vez en muchos casos conducen a la activación protooncogénica. Esta activación, junto con la producción de numerosos factores de crecimiento y citoquinas, podría estar participando de los efectos proliferativos y angiogénicos del octapéptido.

El rol de la progesterona en la regulación de los numerosos aspectos de la fisiología reproductiva es complejo debido a que sus efectos se modifican cualitativa y cuantitativamente de acuerdo al medio ambiente hormonal endógeno (Brann *et al.* 1988). Se ha descrito en útero (Hsueh *et al.* 1975) y en tejido mamario normal y neoplásico (Chang *et al.* 1995) que este esteroide es capaz de inhibir los efectos proliferativos de los estrógenos. En hipófisis, se sabe que puede modular acciones estrogénicas antagonizando la inducción de la expresión génica y la secreción de PRL inducidas por el estradiol (Cho *et al.* 1993). Por lo tanto en la última parte de

este capítulo analizamos la posible capacidad de la P4 de contrarrestar la acción estrogénica en nuestro modelo de hiperplasia hipofisaria en especial en relación con las respuestas alteradas a AII.

Resultados

1.A - Principales alteraciones presentes en la hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos

Luego de un tratamiento crónico con el estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), el peso corporal de la rata disminuyó mientras que el peso hipofisario aumentó en forma significativa correlacionando con la presencia de una hiperplasia ($p=0,004$ y $p=0,000027$ respectivamente para control vs tumor, fig 1.1.A y B). Por otro lado, en las ratas con tumor hipofisario el nivel de PRL sérica (prolactinemia) aumentó ($p=0,00017$, fig 1.2.A), la secreción basal de PRL *in vitro* disminuyó ($p=0,013$, fig 1.2.B), mientras que la IHQ de esta hormona en la adenohipófisis mostró una hipertrofia de lactotropos y una disminución en el contenido de vesículas secretorias (fig 1.3). Estos resultados estarían indicando una mayor degranulación del lactotrofo tumoral.

La expresión proteica de los marcadores moleculares pcna y pttg se encontró significativamente incrementada en la hipófisis hiperplásica ($p=0,011$ y $p=0,0014$ respectivamente, fig 1.4.A y B), lo que nos corrobora la existencia de una gran proliferación celular y de un tumor hipofisario, respectivamente. El pcna se detectó como una banda de 36 kD mientras que el pttg como una de 25 kD.

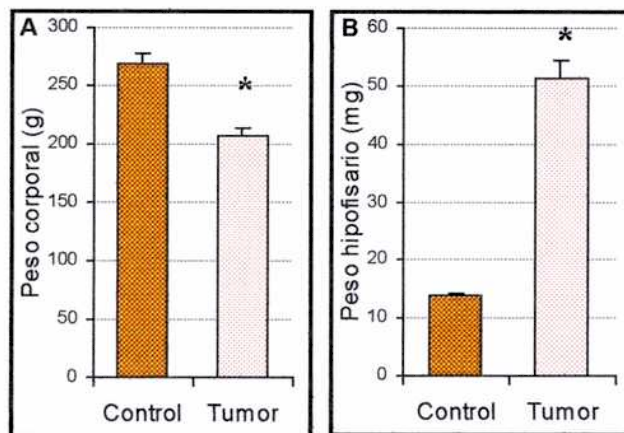


Figura 1.1: Peso corporal (A) y peso hipofisario (B) en ratas hembra en diestro (control) o tratadas con DES (tumor). El tratamiento con DES consta de la colocación de un pellet subcutáneo de 20 mg de DES que se deja durante 8 semanas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=15

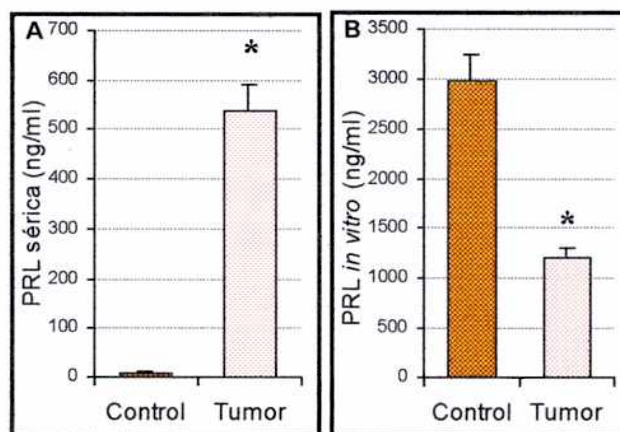


Figura 1.2: Niveles de PRL sérica (A) y secreción basal de PRL hipofisaria (B) en ratas hembra en diestro (control) o tratadas con DES durante 8 semanas (tumor). Los niveles hormonales se cuantificaron por RIA. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=15

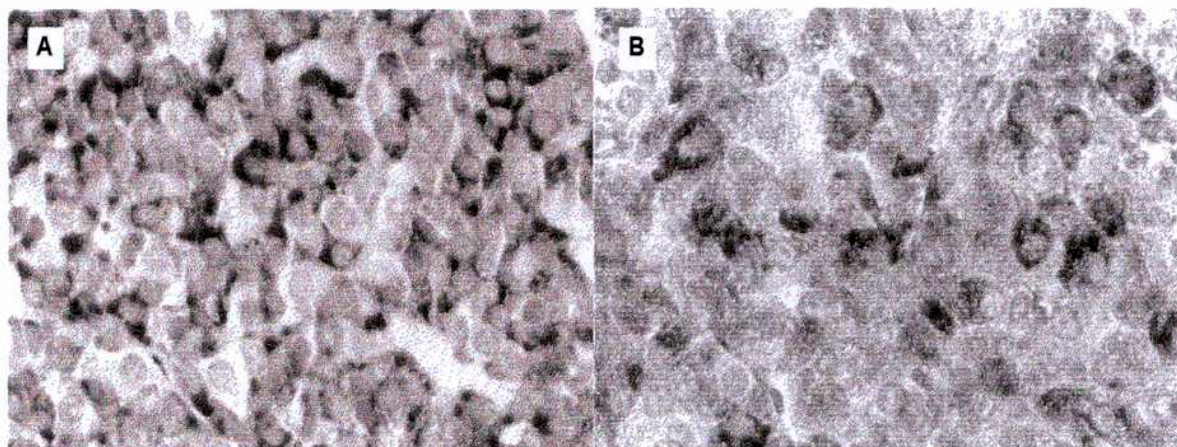


Figura 1.3: Inmunohistoquímica representativa de PRL en cortes histológicos de adenohipófisis de ratas hembra en diestro (A) o tratadas con DES durante 8 semanas (B).

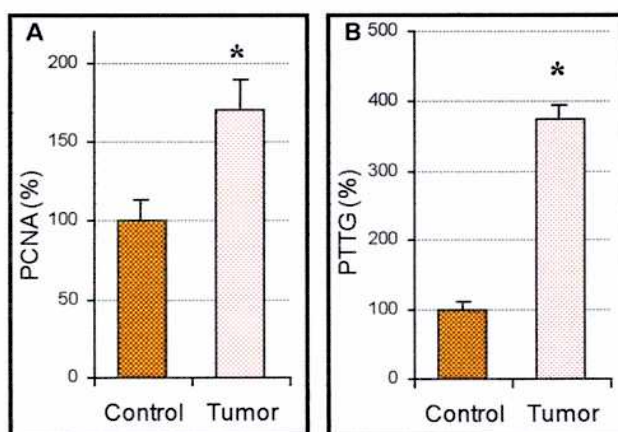


Figura 1.4: Niveles de PCNA (A) y PTTG (B) medidos por Western blot en adenohipófisis de ratas hembra en diestro (control) o tratadas con DES durante 8 semanas (tumor). Los resultados se expresan como % respecto del control y se representan como la media $\pm$ ES.

* $p < 0,05$ respecto del control. N=5

1.B - Expresión de los receptores de All en adenohipófisis

Los resultados obtenidos mediante la técnica de Western Blot muestran que el nivel de expresión proteica del receptor AT1 (detectado en una banda de 46 kD) disminuyó significativamente en las hipófisis de ratas con hiperplasia hipofisaria con respecto al nivel de las controles ($p=0,00012$, fig 1.5.A). En correlación con estos resultados, la cantidad de RNAm para AT1 medida por RT-PCR semicuantitativa disminuyó significativamente en las ratas que fueron tratadas con el estrógeno sintético en comparación con sus pares no tratadas ($p=0,00026$, fig 1.5.B).

El receptor AT2 mostró un patrón opuesto al de AT1, ya que su nivel de expresión proteica (detectado por su anticuerpo específico en una banda de 41 kD) se encontró significativamente aumentada en el caso de las hipófisis hiperplásicas con respecto a las controles ($p=0,00012$, fig 1.6.A). La RT-PCR corroboró estos resultados al indicar un nivel de RNAm para AT2 significativamente mayor en las ratas con implantes de DES ($p=0,018$, fig 1.6.B).

1.C - Patrón de respuesta del calcio. Participación de los receptores de All.

Como primer paso en la respuesta a All analizamos la movilización del calcio intracelular. En una suspensión de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembra en diestro, un estímulo de 10 nM de All (colocado al minuto 4 de medición) indujo casi inmediatamente (a los 4 $\pm$ 2 seg) un aumento del calcio intracelular en forma de espiga transiente que llegó a los 12 seg a un pico máximo (que representa un aumento del 44,5 % con respecto al nivel basal, desde 257,5 $\pm$ 5,5 nM hasta 372,1 $\pm$ 11,5 nM) y retornó posteriormente a los niveles basales a los 50 $\pm$ 3 seg de iniciado el estímulo (fig 1.7.A). Un tratamiento *in vivo* crónico con DES prácticamente eliminó la fase de espiga inducida por All mientras que en su lugar se produjo a los 21 $\pm$ 2 seg de la estimulación un aumento en forma de meseta de un 20,2 % con respecto a los niveles basales (desde 302,5 $\pm$ 9 nM hasta 363,5 $\pm$ 12,4 nM) que se mantuvo por al menos 3 min (fig 1.7.B).

A pesar de la marcada diferencia existente en el patrón de la movilización intracelular del Ca^{++} en respuesta a All entre la hipófisis normal y la hiperplásica, en ambos casos la respuesta fue bloqueada por un pretratamiento con 1 μM del antagonista específico del receptor AT1, el DUP753 (colocado en el minuto 3 de

medición), mientras que la misma dosis del antagonista específico del receptor AT2, el PD123319, no tuvo efecto. Estos resultados estarían indicando que, en ambos grupos, el receptor participante en el patrón de movilización de calcio ante AII en la hipófisis es el AT1.

1.D - Fosforilación de ERK1/2. Participación de los receptores de AII.

Como segundo paso evaluamos la activación de ERK1/2 en respuesta a AII. No se detectaron diferencias significativas en la fosforilación basal de ERK1/2 *in vitro* entre las células provenientes de hipófisis normales y las provenientes de hipófisis tumorales ($p=0,99$ para tumor vs control al tiempo 0, fig 1.8.A). En ambos grupos experimentales AII indujo una fosforilación significativa de ERK1/2, sin embargo, la inducción máxima alcanzada por las células tumorales es un 68% menor a la alcanzada por las células controles y es más tardía, se produce a los 10 min en vez de a los 5 min de la estimulación con AII 100 nM.

En las células normales, la fosforilación inducida por AII fue abolida por una preincubación de 30 min con el antagonista AT1 (10 μ M) mientras que no fue alterada por la misma concentración del antagonista AT2 ($p=0,00017$ y $p=0,99$ para AII+DUP y AII+PD vs AII respectivamente, fig 1.8.B). En cambio, en las células hiperplásicas, tanto el DUP753 como el PD123319 fueron capaces de inhibir esta fosforilación, aunque este último sólo en forma parcial ($p=0,00014$ y $p=0,04$ para AII+antagonista vs AII respectivamente, fig 1.8.C). La aplicación de DUP753 o PD123319 no alteró los niveles basales (datos no presentados). Estos resultados sugieren que, mientras que en la hipófisis normal la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII está mediada principalmente por el receptor AT1, en el caso de la hipófisis hiperplásica estarían involucrados ambos subtipos de receptores.

1.E - Secreción de PRL. Participación de los receptores de AII.

Finalmente analizamos la secreción de PRL en respuesta a AII en cultivo primario de células adenohipofisarias. Un estímulo de 30 min con AII 10 nM indujo en células controles un aumento significativo en la liberación de PRL respecto del basal ($p=0,00012$, fig 1.9.A). Un preestímulo (también de 30 min) con el antagonista AT1 1 μ M fue capaz de bloquear la acción de AII ($p=0,0002$ para AII+DUP vs AII),

mientras que el antagonista AT2 en esta misma concentración no tuvo efecto ($p=0,99$ para All+PD vs All).

En las células tumorales la estimulación de All sobre la liberación *in vitro* de PRL también fue significativa ($p=0,0056$ vs basal, fig 1.9.B) aunque levemente menor que en el caso de las células controles (24,4% para controles vs un 16,8% para tumores). El comportamiento de las células hiperplásicas frente al tratamiento con los antagonistas de los receptores de All fue similar al de las controles. Esto estaría indicando que en ambos grupos All está estimulando la secreción de PRL vía su receptor AT1. Ni el DUP753 ni el PD123319 modificaron la liberación de PRL *per se* en ningún grupo experimental (datos no presentados).

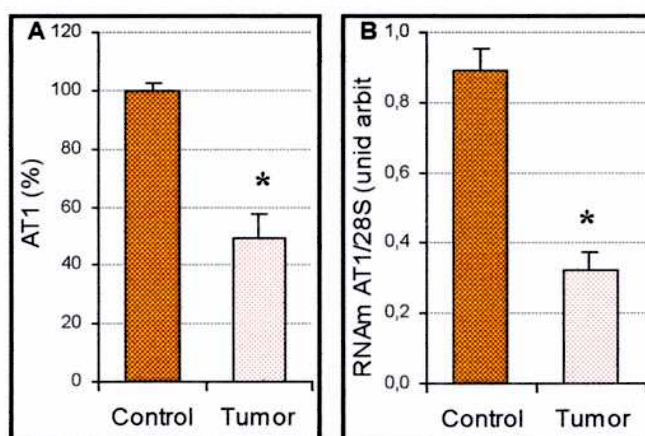


Figura 1.5: Niveles de AT1 medidos por Western blot (A) o por RT-PCR (B) en adenohipófisis de ratas hembra en diestro (control) o tratadas con DES durante 8 sem (tumor). Los resultados se expresan en % respecto del control (A) o se relativizan al RNAr 28S (B) y se representan como la media $\pm$ ES. * $p<0,05$ respecto del control. N=11 (A) y N=9 (B).

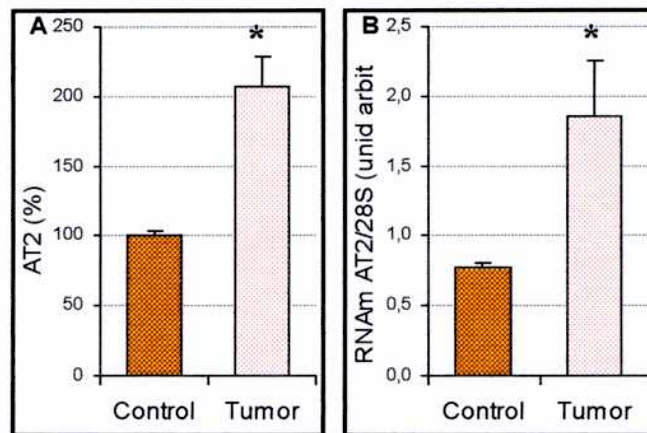


Figura 1.6: Niveles de AT2 medidos por Western blot (A) o por RT-PCR (B) en adenohipófisis de ratas hembra en diestro (control) o tratadas con DES durante 8 sem (tumor). Los resultados se expresan como % respecto del control (A) o se relativizan al RNAr 28S (B) y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=11 (A) y N=8 (B).

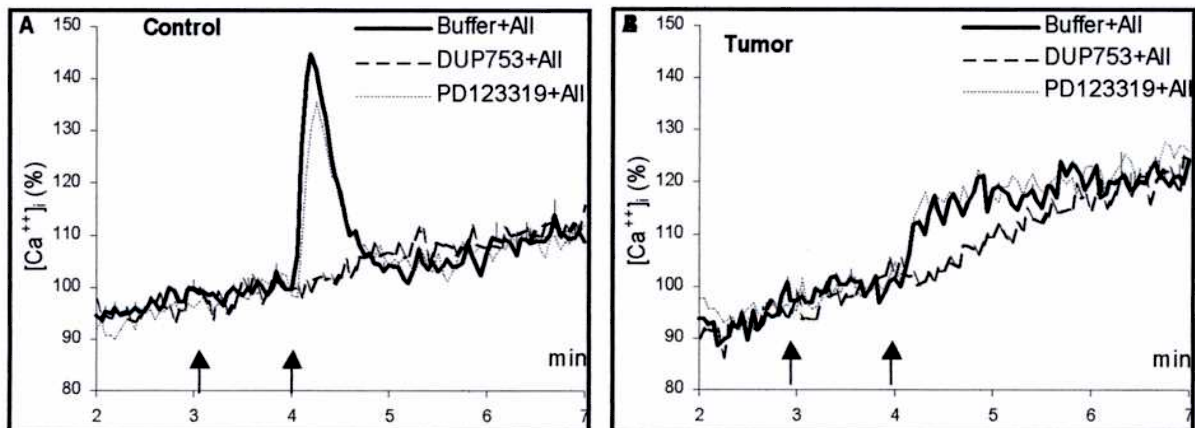


Figura 1.7: Movilización del calcio intracelular en una suspensión de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembra en diestro (control, A) o tratadas con DES durante 8 sem (tumor, B). Las células fueron preestimuladas durante 1 min con buffer, DUP753, o PD123319 y luego estimuladas con All. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{++}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con All. Primer flecha: buffer o antagonista 1 μ M. Segunda flecha: All 10 nM. N=6.

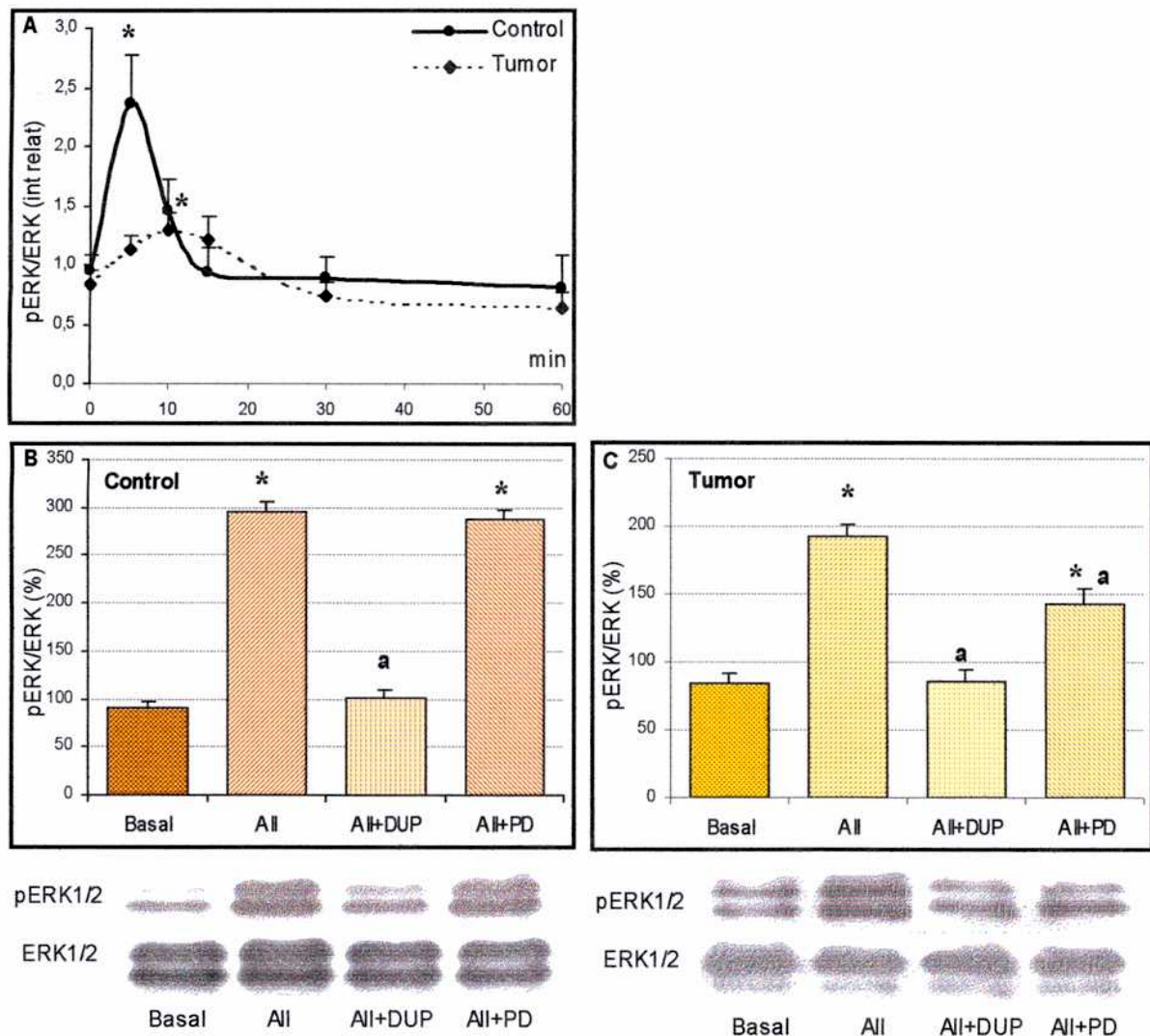


Figura 1.8: **A:** Curva temporal de la fosforilación de ERK1/2 mediada por AII (Western blot). Células adenohipofisarias en cultivo provenientes de ratas hembra en diestro (control) o tratadas con DES durante 8 sem (tumor) fueron estimuladas con AII 100 nM por distintos tiempos (tiempo 0: sin estimulación). * $p < 0,05$ respecto del tiempo 0 respectivo. $N=7$. **B y C:** Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo provenientes de ratas hembra en diestro (control, B) o tratadas con DES durante 8 sem (tumor, C). Las células fueron preestimuladas durante 30 min con buffer, DUP753 o PD123319 (ambos 10 μ M) y luego estimuladas durante 5 min con AII 100 nM. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del basal. a : $p < 0,05$ respecto de AII. $N=6$. Abajo: Western blot representativo con bandas de 42 y 44 kD.

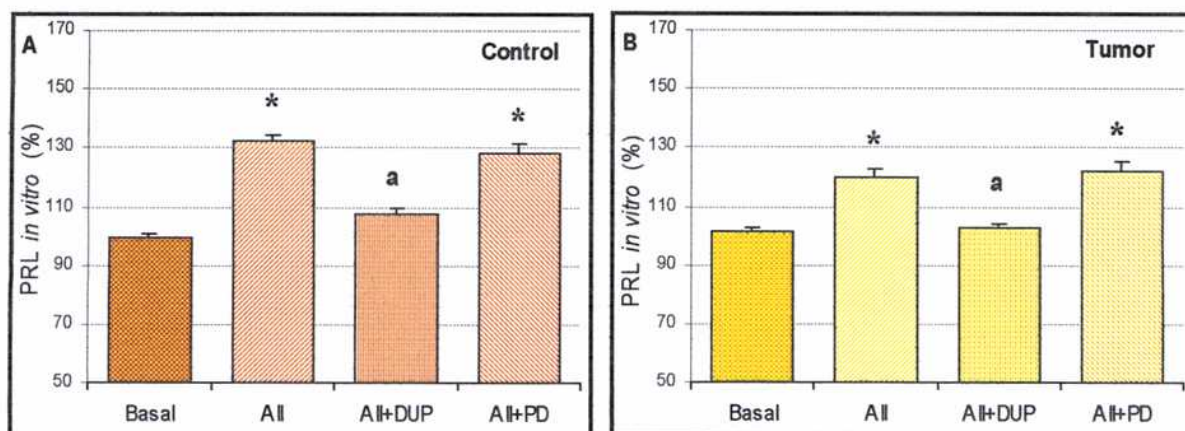


Figura 1.9: Niveles de PRL liberados por células adenohipofisarias en cultivo provenientes de ratas hembra en diestro (control, **A**) o tratadas con DES durante 8 sem (tumor, **B**) y medidos por RIA. Las células fueron preestimuladas durante 30 min con buffer, DUP753 o PD123319 (1 μ M) y luego estimuladas otros 30 min con AII 10 nM. Los resultados se expresan como % del basal y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del basal. a: $p < 0,05$ respecto de AII. N=6.

1.F - Efectos del tratamiento con progesterona.

Habiendo descripto las principales alteraciones de la respuesta a AII que se producen en la hipófisis hiperplásica, quisimos analizar la posible capacidad de la progesterona de revertir los efectos estrogénicos (tanto *in vivo* como *in vitro*) en especial en relación con la respuesta alterada al octapéptido. Para esto realizamos un cotratamiento *in vivo* con caproato de hidroxiprogesterona (5 mg/rata) administrada semanal y subcutáneamente durante las últimas 6 semanas del experimento (ver Mat y Mét) de manera de tener ahora cuatro grupos experimentales: control (C), progesterona (P4), tumor (T) y tumor+progesterona (T+P4). Al final del tratamiento de 8 sem reevaluamos algunos de los parámetros analizados anteriormente.

Peso hipofisario: El tratamiento crónico *in vivo* con P4 no fue capaz de revertir el aumento del peso hipofisario inducido por los estrógenos sintéticos ($p=0,99$ T+P4 vs T, fig 1.10), mientras que la P4 por sí misma no tuvo efecto significativo alguno sobre este parámetro.

Prolactinemia: El tratamiento con P4 no revirtió la hiperprolactinemia inducida por el DES (fig 1.11.A). La P4 tampoco tuvo un efecto *per se* sobre este parámetro.

Liberación basal de PRL *in vitro*: El tratamiento *in vivo* con P4 aumentó significativamente el nivel de PRL basal liberada *in vitro* durante 30 min al medio de cultivo ($p=0,00012$ P4 vs C, fig 1.11.B) aunque no fue capaz de revertir la baja liberación producida por las células provenientes del tratamiento con DES ($p=0,99$ T+P4 vs T).

Expresión de los receptores de AII: El tratamiento con P4 no modificó el efecto del DES sobre la disminución de la expresión proteica del receptor AT1 ($p=0,15$ T+P4 vs T, fig 1.12.A) ni sobre la expresión de su RNAm ($p=0,59$, fig 1.12.B). Tampoco modificó la inducción del receptor AT2 ni de su RNAm en respuesta al DES ($p=0,1$ y $p=0,5$ para T+P4 vs T respectivamente, fig 1.13.A y B). Por otro lado, la P4 *per se* no tuvo efecto significativo sobre la expresión de la proteína ni el RNAm de ninguno de los receptores.

Movilización del calcio intracelular en respuesta a AII: El tratamiento *in vivo* con P4 no eliminó la espiga de movilización de calcio intracelular en respuesta a AII 10 nM en la suspensión de células controles (fig 1.14.A). Cuando se preestimuló durante 1 min con los antagonistas de los receptores de AII (1 μ M), la respuesta del grupo P4 fue similar a la de los controles (fig 1.14.B y C). Por otra parte, el tratamiento *in vivo* de los tumores con P4 no modificó el patrón de movilización del calcio típico del tumor (fig 1.15.A) ni la respuesta de este grupo ante un pretratamiento con DUP753 o con PD123319 (fig 1.15.B y C). Estos resultados estarían indicando que, en todos los grupos, el receptor involucrado en la respuesta del calcio a AII es el AT1, ya que su antagonista específico es el único que logra eliminar la respuesta del calcio a AII.

Liberación de PRL en respuesta a AII: Cuando se estimuló un cultivo primario de células adenohipofisarias durante 30 min con AII 10 nM, se produjo un aumento significativo en la liberación de PRL en todos los grupos experimentales (fig 1.9.A y B, fig 1.16.A y B), aunque éste fue marcadamente mayor en el caso del grupo tumor+P4 ($p=0,00013$ respecto del grupo control). Cuando las células de los grupos

P4 y tumor+P4 fueron preestimuladas durante 30 min con el antagonista del receptor AT1 $1 \mu\text{M}$ se observó una reversión significativa en la estimulación de la secreción de PRL inducida por AII indicando que en estos grupos (al igual que en los grupos control y tumor) el receptor AT1 está participando de la respuesta secretoria. Sin embargo, cuando se preestimuló con el antagonista AT2, en el grupo tumor+P4 también se produjo una reversión significativa de la respuesta a AII ($p=0,00012$ para PD+AII vs AII). Las células a las que se les aplicó sólo DUP753 o PD123319 no presentaron diferencias significativas respecto del basal (datos no presentados). Por lo tanto podemos inferir de estos resultados que el receptor AT1 es el principal involucrado en la respuesta de secreción de PRL ante AII, aunque en las ratas con tumor hipofisario tratadas con P4 el subtipo AT2 también se encontraría involucrado en esta respuesta.

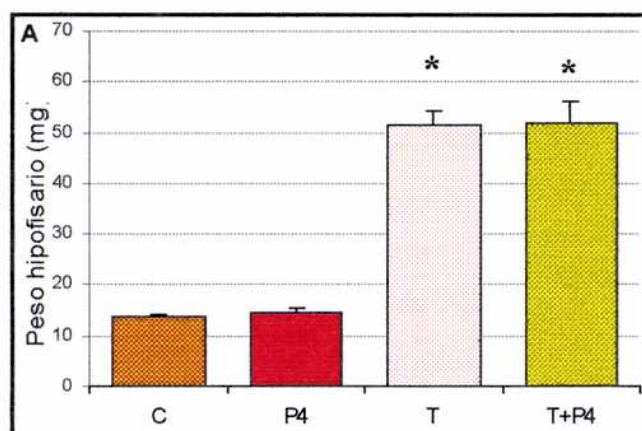


Figura 1.10: Peso hipofisario de ratas hembra en diestro (C), tratadas con P4 (P4), DES (T), o DES más P4 (T+P4). El tratamiento con P4 consta de una inyección semanal subcutánea de caproato de hidroxiprogesterona (5 mg/rata) durante las últimas 6 semanas de tratamiento con DES. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES. * $p<0,05$ respecto del control. N=15.

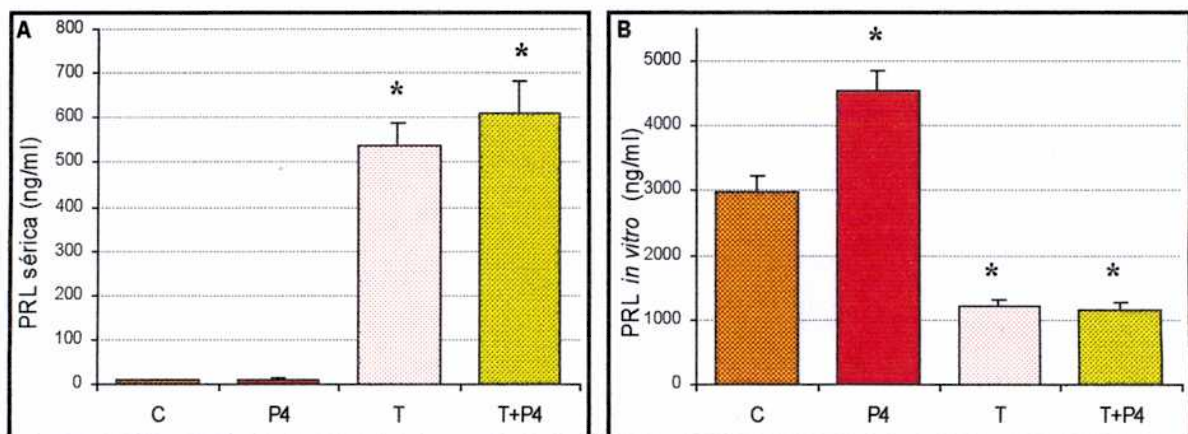


Figura 1.11: Niveles de PRL sérica (A) o liberada durante 30 min de incubación por células adenohipofisarias en cultivo (B) medidos por RIA en ratas hembra en diestro (C), tratadas con P4 (P4), DES (T), o DES más P4 (T+P4). Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=15 (A) y N=8 (B).

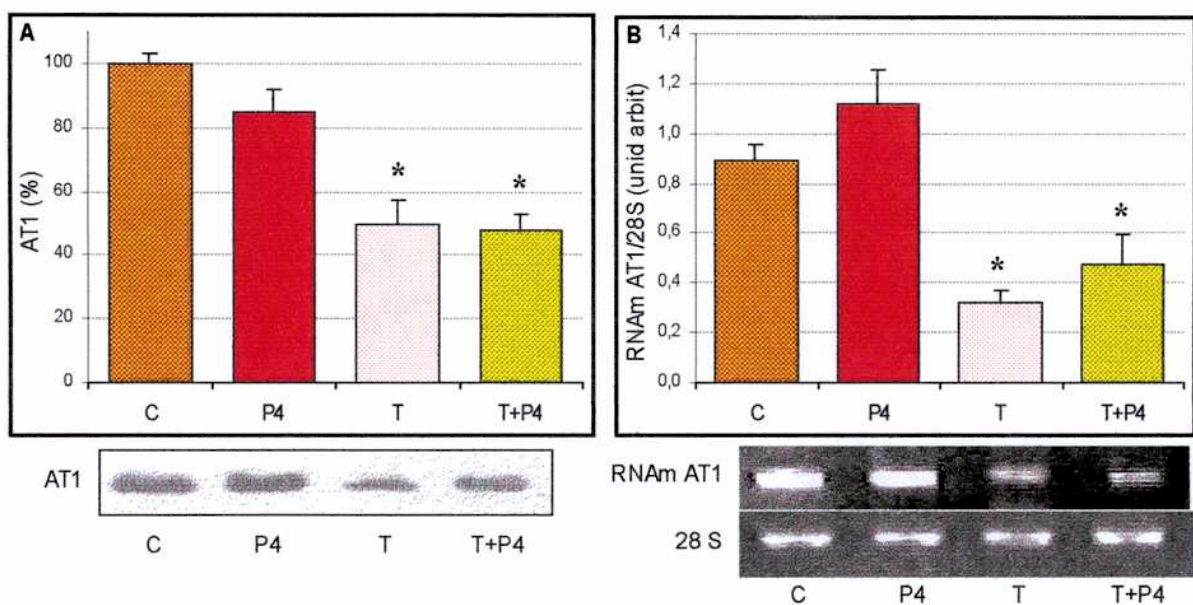


Figura 1.12: Niveles de AT1 medidos por Western blot (A) o por RT-PCR (B) en adenohipófisis de ratas hembra en diestro (C), tratadas con P4 (P4), DES (T), o DES más P4 (T+P4). Los resultados se expresan como % respecto del control (A) o se relativizan al RNAr 28S (B) y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=11 (A) o N=9 (B). Abajo: Western blot representativo con bandas de 46 kD (A) y RT-PCR representativa con bandas de 355 pb para AT1 y 350 pb para 28S (B).

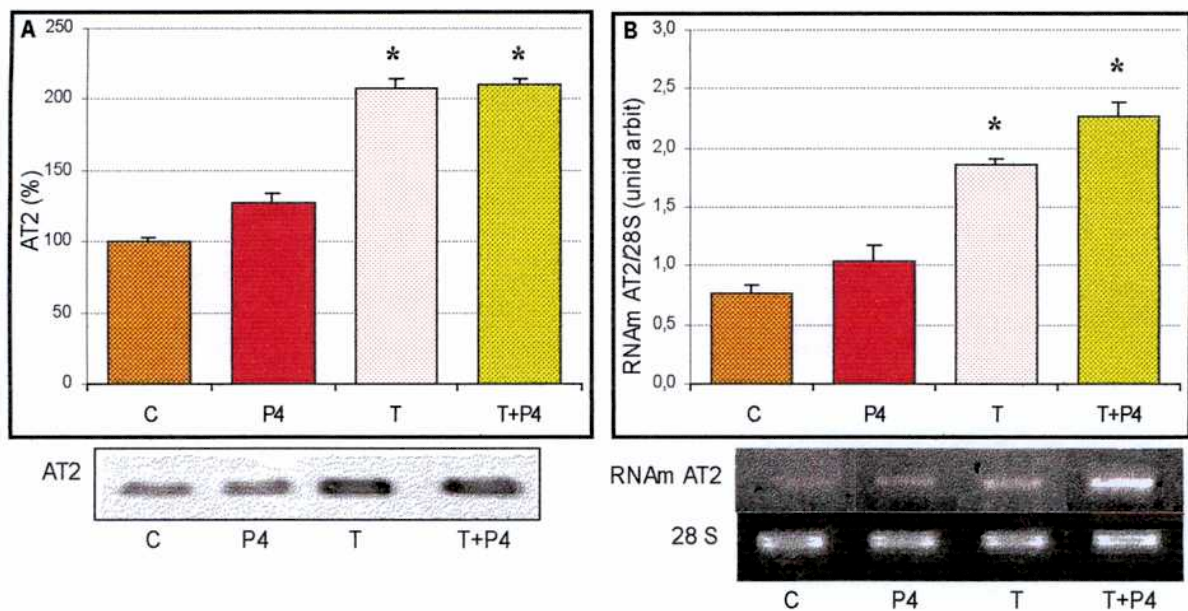


Figura 1.13: Niveles de AT2 medidos por Western blot (A) o por RT-PCR (B) en adenohipófisis de ratas hembra en diestro (C), tratadas con P4 (P4), DES (T), o DES más P4 (T+P4). Los resultados se expresan en % respecto del control (A) o se relativizan respecto del RNAr 28S (B) y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=11 (A) o N=8 (B). Abajo: Western blot representativo con bandas de 41 kD (A) y RT-PCR representativa con bandas de 360 pb para AT2 y 350 pb para 28S (B).

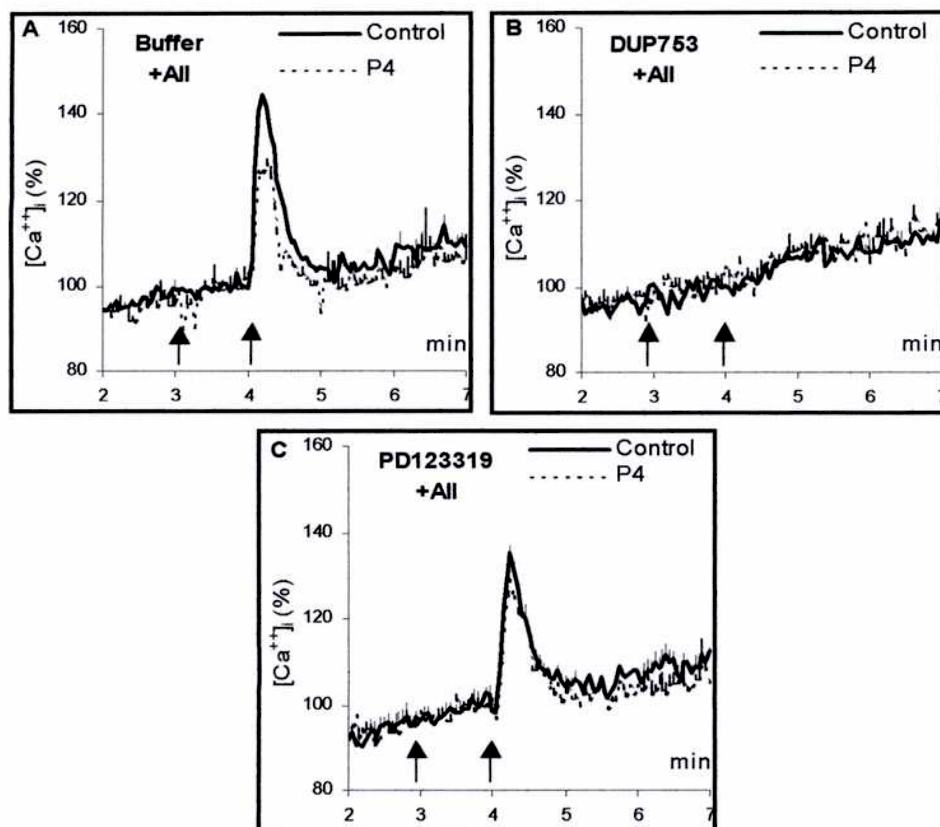


Figura 1.14: Movilización del calcio intracelular en una suspensión de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembra en diestro (control) o tratadas *in vivo* con P4 (P4). Las células fueron preestimuladas durante 1 min con buffer (A), DUP753 (B) o PD123319 (C) y luego estimuladas con All. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{++}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con All. Primer flecha: buffer o antagonista 1 μ M. Segunda flecha: All 10 nM. N=5.

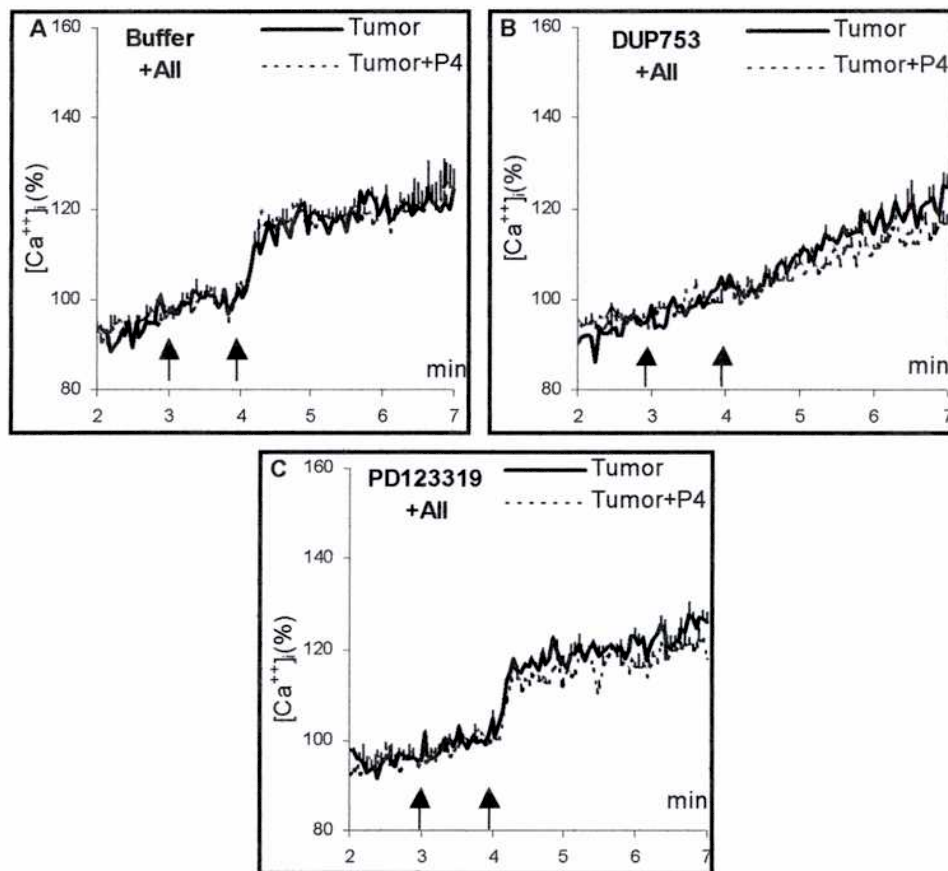


Figura 1.15: Movilización del calcio intracelular en una suspensión de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembra tratadas *in vivo* con DES (tumor) o DES más P4 (tumor+P4). Las células fueron pretratadas durante 1 min con buffer (A), DUP753 (B) o PD123319 (C) y luego estimuladas con All. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{++}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con All. Primer flecha: buffer o antagonista 1 μ M. Segunda flecha: All 10 nM. N=5.

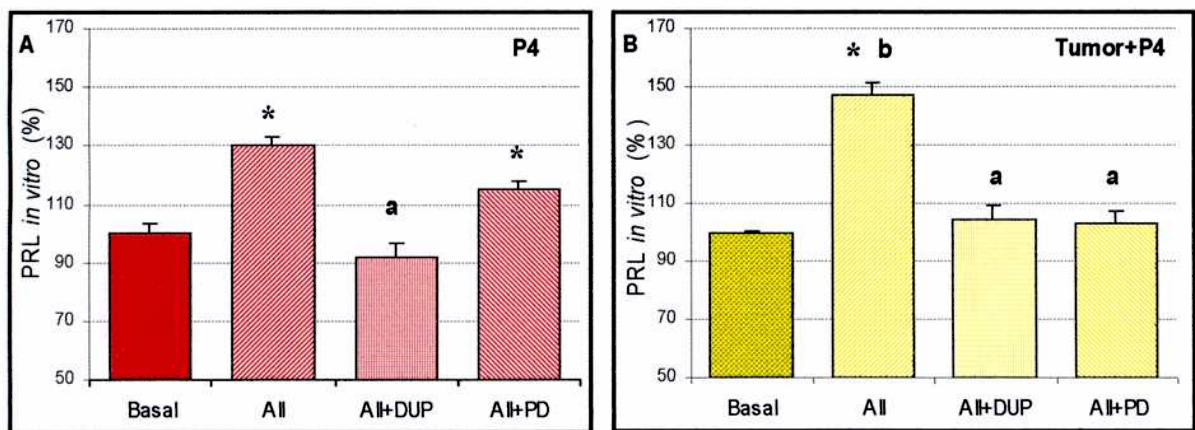


Figura 1.16: Niveles de PRL liberados por células adenohipofisarias en cultivo provenientes de ratas hembra tratadas con P4 (P4, **A**) o DES más P4 (Tumor+P4, **B**) y medidos por RIA. Las células fueron preestimuladas durante 30 min con buffer, DUP753 o PD123319 (1 μ M) y luego estimuladas con All 10 nM. Los resultados se expresan como % respecto del basal y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del basal. a: $p < 0,05$ respecto de All. b: $p < 0,05$ respecto de la estimulación con All en la figura 1.9.A. N=6.

Discusión

En trabajos previos hemos descripto que un tratamiento crónico *in vivo* con estrógenos altera la respuesta hipofisaria a All *in vitro* (Diaz-Torga *et al.* 1998), (Gonzalez Iglesias *et al.* 1999). El objetivo de este trabajo fue el de determinar en primer lugar a qué nivel los efectos del estrógeno afectan la respuesta hipofisaria a All y en segundo lugar la posible reversión de estos efectos por la progesterona. Para ello comenzamos caracterizando en forma general este tipo de tumor hipofisario y continuamos con el estudio de la expresión de los receptores AT1 y AT2 y su relación con la respuesta intracelular de calcio, la fosforilación de ERK1/2 y la secreción de PRL en respuesta a All.

Ya ha sido documentado que los estrógenos pueden reducir y la testosterona puede incrementar el peso corporal (Shulman *et al.* 1987). En el presente trabajo las ratas tratadas con DES durante 8 sem disminuyeron significativamente su peso corporal respecto al de las controles. Este tratamiento, por otro lado, elevó significativamente el peso hipofisario y la PRL sérica, consistentemente con la presencia de una hiperplasia de lactotopos. Se ha descripto que la P4 es capaz de inhibir los efectos proliferativos de los estrógenos. Sin embargo, un cotratamiento con P4 durante el desarrollo de la hiperplasia no logró revertir en nuestro modelo el aumento del peso hipofisario inducido por los estrógenos. En cambio, en ratas hembra F344 ovariectomizadas, la P4 produce una reversión del 25% de la hiperplasia hipofisaria (Piroli *et al.* 1996). Esta divergencia puede estar relacionada con diferencias en la sensibilidad a los estrógenos y/o a la progesterona entre ambas cepas de ratas (Ying *et al.* 1996).

La secuencia primaria del receptor AT1 clonado predice un peso molecular de 41 kD para la proteína deglicosilada, con un peso mayor si la glicosilación se produce en uno o más de los cinco sitios potencialmente disponibles (Inagami *et al.* 1994). Nuestros experimentos de Western blot mostraron una banda principal de 46 kDa para AT1 aunque en algunos casos se observó también otra banda de 28 kDa, probablemente reflejo de cierto nivel de degradación de la proteína durante el proceso de extracción. Este valor de 46 kD se encuentra dentro del rango de los citados por otros grupos utilizando anticuerpos similares o diferentes en diversos

tejidos (Wintour *et al.* 1999), (Ewert *et al.* 2003), (Miyata *et al.* 1999), (Leri *et al.* 2000), (Harrison-Bernard *et al.* 1999), (Sharma *et al.* 1998). La variedad de tamaños descritos para AT1 puede deberse al tipo y nivel de glicosilación de la proteína, así como a los productos de degradación presentes en las muestras y a las condiciones bajo las cuales se corre la electroforesis. En el caso del receptor AT2 observamos una única banda de 41 kD, peso que concuerda con su tamaño teórico y con el descrito para esta proteína en diferentes tejidos (Leri *et al.* 2000), (Ewert *et al.* 2003), (Ozono *et al.* 1997), (Sharma *et al.* 1998), (Nora *et al.* 1998).

Nuestros experimentos de Western blot y RT-PCR semicuantitativa nos revelaron que, en el contexto de una exposición *in vivo* crónica al DES, se produce una reducción en los niveles hipofisarios del receptor AT1 y un aumento del AT2. Trabajos anteriores describen también una disminución por estrógenos de la expresión de AT1 adenohipofisaria, cuantificada por hibridización *in situ* (Seltzer *et al.* 1992). La expresión de estos receptores fluctúa naturalmente a lo largo del ciclo estral de la rata con una unión específica máxima durante el metaestro y una mínima en el proestro, cuando la concentración estrogénica es máxima. La aplicación de estrógenos en ratas ovariectomizadas también reduce la expresión adenohipofisaria de AT1.

Con respecto a AT2, se sabe que su nivel de expresión en hipófisis es bajo (Shelat *et al.* 1999). Posiblemente debido a esto nosotros necesitamos un templado 10 veces más concentrado y mayor cantidad de ciclos para su detección por RT-PCR. Sin embargo sorprendentemente encontramos que, en el caso de los tumores, esta expresión se ve significativamente incrementada. Se había observado anteriormente una sobreexpresión de AT2 inducida por estrógenos en miometrio humano (Mancina *et al.* 1996) y en riñón (Armando *et al.* 2002a) así como una estimulada por Ang II en vasos arteriales mesentéricos (Bonnet *et al.* 2001), pero se carecía totalmente de datos relativos a la hipófisis.

Es interesante la regulación inversa observada en cuanto a la expresión de ambos subtipos de receptores. El hecho de que exista este tipo de regulación inversa puede tener que ver con un entrecruzamiento entre ambas vías de señalización, lo cual ya fue sugerido por otros autores. Por medio de este mecanismo, la sobreexpresión de AT2 sería capaz de inhibir la expresión de AT1 en

aorta (Tanaka *et al.* 1999), VSMC (Jin *et al.* 2002) e hipotálamo (Armando *et al.* 2002b). Sin embargo, al parecer la dirección final tomada por la respuesta a All dependería del tipo celular del que se trate y del medio ambiente hormonal al cual esté expuesto (Su *et al.* 2002).

El tratamiento estrogénico crónico induce la síntesis hipofisaria de All al incrementar el aporte sistémico e hipotalámico de AO. En presencia de altas concentraciones locales de All se describió que los receptores AT1 pueden sufrir regulación negativa y/o desensibilización homóloga con un nivel de sensibilidad muy alta en comparación con el de los AT2 (Gonzalez-Iglesias *et al.* 2001). En células HEK-293 de riñón embrionario humano que expresan establemente los receptores de All, luego de un estímulo con esta hormona se produce la internalización del subtipo AT1 en vesículas intracelulares mientras que no sucede lo mismo con el AT2 (Hein *et al.* 1997). En la adrenal fetal ovina, All reduce los niveles del RNAm de AT1 pero no los de AT2 (Wintour *et al.* 1999). Una regulación negativa de AT1 similar se observa en VSMC (Brue *et al.* 1992), en células ováricas de la granulosa (Pucell *et al.* 1991) y en otros tejidos.

Por lo tanto, la reducción en los niveles hipofisarios de AT1 luego de un tratamiento estrogénico puede deberse al marcado aumento del contenido de All local, que conduce a su vez a una regulación negativa del subreceptor. Alternativamente, la expresión de AT1 también podría estar reprimiéndose a través de la sobreexpresión de AT2 inducida por la All y los estrógenos. El hecho de que los estrógenos puedan ejercer una regulación dual sobre ambos subtipos de receptores de All enfatiza la importancia de comprender la naturaleza compleja y multifacética de la acción estrogénica sobre los procesos tumorigénicos, la fisiología cardiovascular y la reproducción.

Ya habíamos descripto en publicaciones previas que el tratamiento estrogénico también altera el patrón de movilización intracelular del calcio inducido por All, de forma que se elimina en el perfil de respuesta la fase de espiga inicial característica y se produce sólo una fase de meseta (Gonzalez Iglesias *et al.* 1999). La fase de espiga depende de la liberación de calcio a partir de depósitos internos modulables por IP₃, mientras que la fase de meseta lo hace principalmente del aporte extracelular a través de canales voltaje dependientes. En el presente trabajo encontramos que, si bien el tratamiento estrogénico altera el perfil de la respuesta

del calcio, no se modifica el subtipo de receptor de AII involucrado (el AT1), ya que el AT2 no estaría participando.

En este trabajo nosotros encontramos una fosforilación de ERK1/2 en respuesta a AII en la hipófisis. Si bien la fosforilación de estas kinasas por AII ya ha sido descripta previamente en diferentes tipos celulares, hasta el momento no se había estudiado en la hipófisis. Por otro lado, observamos que esta respuesta también se encuentra alterada en el caso de la hipófisis tumoral. Era de esperarse que la alteración en la expresión relativa de los receptores de AII modificaran la fosforilación de ERK1/2 en respuesta al octapéptido. Consistentemente encontramos que, en células hiperplásicas, la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII se encuentra significativamente disminuída. Se ha observado en VSMC que los estrógenos reducen la activación de ERK1/2 mediada por AII a través de la inducción de fosfatasas por mecanismos tanto genómicos como no genómicos (Takeda-Matsubara *et al.* 2002). No sabemos aún cuál sería el proceso involucrado en nuestro caso.

Por otro lado podemos inferir en base a nuestros resultados que, en el tumor hipofisario, parte de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a AII es dependiente de AT2. Esto podría estar relacionado con la mayor expresión de este receptor que se produce en la hipófisis hiperplásica y sería la primer evidencia de que AII puede actuar en esta glándula a través de él. Por otro lado, la respuesta inducida por AT2 sería independiente de la movilización intracelular de calcio, ya que esta movilización es insensible a bloqueantes específicos de este subtipo. Los resultados mencionados estarían indicando por primera vez que en la hipófisis hiperplásica se estarían activando dos vías al menos parcialmente independientes conducentes a un mismo punto final en común: la fosforilación de ERK1/2. Una vía estaría mediada por AT1 y la otra por AT2. Con respecto a la fosforilación basal de ERK1/2, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

El prolactinoma cursa con una hiperprolactinemia. Está descripto que los estrógenos inducen tanto la síntesis como la secreción de PRL. Por otro lado, nuestros resultados de IHQ adenohipofisaria muestran una disminución intracelular de las vesículas secretorias de PRL, lo que estaría indicando que lo que se produce en el lactotrofo tumoral es una secreción hormonal más constitutiva y menos

regulada, con una mayor tasa exocitótica y consecuentemente una mayor degranulación celular. En los cultivos celulares *in vitro*, fuera ya de la influencia estrogénica, esta degranulación posiblemente sea la responsable de la menor secreción basal de PRL en el tumor.

En trabajos previos hemos descrito una menor secreción de PRL en respuesta a All por parte de la célula tumoral (Diaz-Torga *et al.* 1998), la cual se debería a dos razones principales: a una merma en la expresión de los receptores AT1 y a una alteración en la respuesta interna del calcio. En el presente trabajo la disminución en la secreción de PRL en respuesta a All de la célula tumoral no llegó a ser significativa, aunque se observó una tendencia en este sentido. Esto posiblemente sea debido a que en este modelo el análisis de varianza es más complejo, al involucrar a cuatro grupos experimentales (C, T, P4 y T+P4) en vez de dos (C y T).

En otros modelos experimentales el tratamiento con P4 es capaz de antagonizar en hipófisis algunos efectos estrogénicos. En nuestro modelo, en cambio, el tratamiento con este esteroide no logró revertir la hiperplasia hipofisaria ni la hiperprolactinemia inducidas por el DES. El tratamiento con P4, sin embargo, presentó otro tipo de efectos. En ratas hembra en diestro normales este esteroide indujo un aumento significativo en la liberación basal de PRL *in vitro*, lo que coincide con lo hallado en trabajos previos y se deba probablemente a un aumento del AMPc intracelular (Tsai *et al.* 1996). Esto no fue observado en las células provenientes del tumor, lo que es posible que esté relacionado con la mayor degranulación del lactotrofo tumoral.

Por otro lado, en ratas con tumor hipofisario la P4 produjo un incremento en la liberación de PRL inducida por All *in vitro*. Es interesante que la P4 combinada con el estradiol haya incrementado esta secreción. Se sabe que, en algunos casos, la P4 necesita de un cierto nivel basal de exposición estrogénica para ejercer su acción debido en parte a que la expresión de su receptor está bajo la influencia de los estrógenos (Brann *et al.* 1988). Se ha descrito asimismo que la combinación de los estrógenos con la P4 favorece la liberación hipotalámica de TRH y el aumento de PRL sanguínea (Huang *et al.* 1995).

El receptor de AII descrito hasta el momento como involucrado en la respuesta de liberación de PRL es el AT1 (Becu-Villalobos *et al.* 1994). Sin embargo, nosotros observamos en el grupo de ratas con tumor hipofisario tratadas con P4 que el receptor AT2 también está participando de la respuesta. Esta es la segunda evidencia de que AII puede actuar a nivel hipofisario a través de este receptor. El efecto parece requerir la exposición combinada a los estrógenos y a la P4, ya que el antagonista AT2 no fue efectivo en células provenientes de ratas tratadas sólo con estrógenos o sólo con P4.

No encontramos diferencias significativas en la expresión de los subtipos de receptores de AII entre hipófisis de los grupos tumor y tumor+P4 que puedan explicar la acción diferencial del antagonista AT2 en ambos grupos. Sin embargo, podría haber diferencias en cuanto a la cantidad o funcionalidad de los receptores efectivamente presentes en membrana. Por otro lado, es posible que se produzca un sinergismo entre los estrógenos y la P4 de modo que los primeros induzcan la expresión de los receptores de P4 y los AT2, mientras que la P4 a su vez produzca algún factor que esté activando una vía de liberación de PRL mediada por AT2. En este caso, como sucede con la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a AII, la respuesta mediada por AT2 parecería ser independiente de la movilización intracelular de calcio.

Por lo expuesto podemos decir que en nuestro modelo el receptor AT2, aumentado en la hiperplasia, participaría junto con el AT1 en la activación de ERK1/2 y en la liberación de PRL inducidas por AII. Sin embargo, en este último caso el cotratamiento con P4 sería necesario para que esta participación logre evidenciarse.

En la mayoría de los tejidos los efectos del receptor AT2 se contraponen a los mediados por el AT1. Sin embargo también se ha descrito que AII puede tener acciones similares actuando a través de ambos tipos de receptores, como parece suceder en nuestro caso. Por ejemplo, en cardiomiocitos de rata, AII induce apoptosis estimulando tanto al subtipo AT1 como al AT2 (Goldenberg *et al.* 2001) y en células de epitelio glomerular ambos receptores participan de respuestas fisiológicas a AII similares (Sharma *et al.* 2001).

Aunque nosotros no estudiamos en detalle el tipo celular específico en el que se expresa el receptor AT2 en la adenohipófisis, la cooperación observada entre los

dos subtipos en cuanto a la secreción de PRL inducida por AII sugiere que ambos se coexpresan en el lactotrofo. Esta hipótesis permite la posibilidad de que AT1 y AT2 estén formando heterodímeros. De hecho, la heterodimerización de AT1 con AT2 (AbdAlla *et al.* 2001) o con el receptor de bradikinina (AbdAlla *et al.* 2000) ha demostrado recientemente agonizar o antagonizar los efectos de AII mediados por AT1. Sin embargo, también es posible que los estrógenos y/o la P4, o el proceso hiperplásico mismo, puedan determinar un patrón de expresión diferencial para ambos subtipos de receptores que sea específico del tipo celular. Serían necesarios más estudios para llegar a aclarar adecuadamente este punto.

Resumiendo, consideramos que el trabajo de este capítulo revela algunas de las alteraciones más importantes que se producen en la hipófisis hiperplásica en cuanto a la respuesta a AII y analiza el posible rol terapéutico de la P4. Describimos por primera vez aspectos de la función y regulación de los receptores AT2 en la adenohipófisis, lo que pone en evidencia puntos interesantes relacionados con la biología de los subtipos de receptores de AII. Estos resultados son de importancia si consideramos el reciente desarrollo de tratamientos antihipertensivos que utilizan antagonistas específicos del receptor AT1 que promueven un aumento significativo en los niveles de AII sistémicos. Esta elevación, por su parte, podría estar activando respuestas biológicas desconocidas a través del subtipo AT2.

Por otro lado, en este capítulo también detectamos por primera vez la activación de las MAPKs ERK1/2 en la hipófisis inducida por un estímulo de AII. Como esto no había sido anteriormente descrito en la hipófisis, decidimos caracterizar la cascada de señales conducente a la fosforilación de estas MAPKs, lo que será objeto del siguiente capítulo. Finalmente, pudimos concluir que la P4 no mostró en nuestro modelo efectos terapéuticos significativos en cuanto a la posible reversión de las alteraciones tumorales estudiadas, por lo tanto decidimos analizar en la segunda parte de esta tesis la acción de otro esteroide con postuladas acciones benéficas: la dehidroepiandrosterona.

El estudio de la acción estrogénica sobre la actividad de los componentes del SRA es importante a la hora de comprender en mayor profundidad algunos procesos tumorigénicos que implican tanto la hiperplasia como la angiogénesis. Nuestros resultados pueden ser de importancia clínica en la evaluación de los posibles efectos

secundarios de las terapias de reemplazo hormonal basadas en los estrógenos combinados o no con la progesterona, así como en relación con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis, la hipertensión e incluso el ataque cardíaco congestivo, en donde la interrelación entre los estrógenos y el SRA es fundamental.

Gran parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en *Am.J.Physiol.(Endocrinol.Metab.)* (2004) 286(5): E786-94.

CAPITULO 2

***Vía de señalización de la angiotensina II en la adenohipófisis
normal***

CAPITULO 2:

Vía de señalización de la angiotensina II en la adenohipófisis normal

Como ya hemos comentado anteriormente, además de los efectos de AII a nivel sistémico sobre la regulación cardiovascular, este péptido es sumamente interesante debido a sus acciones a nivel local sobre el crecimiento tisular, la angiogénesis, la secreción hormonal y la facilitación sináptica. La acción proliferativa de AII ha sido demostrada en fibroblastos cardíacos, VSMC y células adrenocorticales. La capacidad de AII de estimular el crecimiento tisular la involucra en la remodelación postinfarto y en patologías como la hipertrofia ventricular izquierda, nefroesclerosis, hipertrofia vascular y arteriotrombosis. Por otro lado, la acción proliferativa de AII sobre las células endoteliales sanguíneas sería la base de su efecto angiogénico. Dentro de este contexto, la activación de ERK1/2 mediada por AII cobra especial importancia ya que estas kinasas suelen estar involucradas en procesos proliferativos. Por lo tanto, luego de haber determinado la presencia de esta activación mediada por AII en hipófisis, nos interesó caracterizar la cascada de señales que participa del proceso.

AII ejerce sus efectos actuando directamente a través de sus receptores o indirectamente a través de la liberación de otros factores y de entrecruzamientos intracelulares con otras vías de transducción de señales pertenecientes a otros agentes vasoactivos, factores de crecimiento y citoquinas. AT1 señala principalmente a través de proteínas G y fosfolipasas (PLC, PLD y PLA2) pero también a través de tirosín-kinasas (Src, JAK2, FAK, PyK2, PI3K y RTKs) (Touyz & Berry 2002).

Con respecto a la vía más directa de señalización, se ha descrito el acople del receptor AT1 tanto con la proteína Gq como con la Gi (Enjalbert *et al.* 1986), (Ohnishi *et al.* 1992) en diferentes tejidos. En la hipófisis de rata, específicamente, los receptores AT1b están acoplados a la proteína Gq₁₁. La unión del ligando con el receptor induce el intercambio de GDP por GTP en la proteína G y su disociación en la subunidad α por un lado y la $\beta\gamma$ por el otro. La subunidad α entonces activa a la fosfolipasa C- β (PLC- β), lo que induce la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) a partir del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) de membrana (Suarez *et al.* 2002).

Posteriormente se produce un aumento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{++}]_i$) de forma bifásica, con una primer fase en forma de espiga transiente y una segunda en forma de meseta, de mayor duración. El aumento del calcio se debe tanto a su liberación inducida por el IP3 en el retículo sarcoplásmico (especialmente en la fase de espiga) como a una entrada desde el exterior celular a través de canales de calcio voltaje dependientes (en la fase de meseta) (Gonzalez Iglesias *et al.* 1999). A su vez, este aumento del calcio es el principal inductor de la liberación de PRL por parte del lactotrofo (Diaz-Torga *et al.* 1998).

Las ERK1/2 (ERK1 o p44 y ERK2 o P42), específicamente, pertenecen a la familia de serina-treonina kinasas activadas por fosforilación en tirosina y treonina y funcionan como integradoras de señales mitogénicas originadas principalmente en receptores tirosín-kinasas (RTKs) pero también GPCRs. La cascada proveniente de RTKs ha sido ampliamente caracterizada en numerosos tejidos (McCormick 1993) y responde a distintos tipos de factores de crecimiento, como el EGF. Un RTK activado induce, a través de las proteínas adaptadoras Grb2 y SOS, la activación de la proteína RAS de membrana, la cual intercambia GMP por GTP. Esta proteína entonces interactúa con RAF, activándola, y luego se silencia hidrolizando el GTP. RAF activada fosforila a MEK1/2, kinasa de fosforilación dual que a su vez fosforila a ERK1/2. Las ERK1/2 fosforiladas (pERK1 y pERK2) y por lo tanto activadas, fosforilan a su vez a otras kinasas y factores de crecimiento induciendo la transcripción de genes tempranos.

Sin embargo, la vía de activación de ERK1/2 a partir de los GPCRs recién está comenzando a ser develada y estaría más asociada a mecanismos de transactivación que a vías más directas. AII estimula, vía AT1 (un GPCR), a ERK1/2 en neuronas (Huang *et al.* 1996), fibroblastos cardíacos (Murasawa *et al.* 1998a), VSMC (Eguchi *et al.* 1998), células hepáticas (Shah & Catt 2002), células de la glomerulosa adrenal (Tian *et al.* 1998) y en otros tipos celulares; pero hasta el momento no había sido documentada la activación de ERK1/2 por AII en células hipofisarias. En el capítulo anterior, determinamos esta activación tanto en la hipófisis normal como en la hiperplásica, observando asimismo una alteración en este último caso.

Dentro del contexto de la acción proliferativa y angiogénica de AII en diferentes tejidos, la activación de ERK1/2 mediada por AII en hipófisis cobra especial

importancia. Por lo tanto el objetivo de este capítulo fue el de estudiar la cascada de transducción de señales involucrada en células adenohipofisarias de rata. Se utilizó para esto una serie de inhibidores específicos de modo de ir determinando los distintos eslabones involucrados en esta vía en cultivos celulares *in vitro* estimulados por AII.

Resultados

2.A - All induce fosforilación de ERK1/2 en forma tiempo y dosis-dependiente

En cultivos primarios de células adenohipofisarias, un estímulo de All 100 nM fue capaz de inducir una fosforilación de ERK1/2 de tipo transiente con un pico máximo a los 5 min de acción ($p=0,009$ vs 0 min, fig 2.1). Posteriormente, alrededor de los 15 min la respuesta retornó a su nivel basal. Esta fosforilación fue dependiente de la concentración. Ante un pulso de All de 5 min, una curva dosis-respuesta evidenció un máximo a los 10-100 nM de este agonista ($p=0,00055$ vs vehículo) y una concentración efectiva 50 (EC50) de 1,6 nM (fig 2.2). Estos experimentos de Western blot indicaron una dosis y un tiempo de acción óptimos de 100 nM y 5 min respectivamente para la estimulación de la fosforilación de ERK1/2 por All, por lo que se utilizaron estas condiciones en los subsiguientes ensayos.

2.B - All induce fosforilación de ERK1/2 vía su receptor AT1

Como se describió en el capítulo 1, la fosforilación de ERK1/2 inducida por All en la hipófisis está mediada, en células normales, principalmente por el receptor AT1 (fig 1.8.B).

2.C - All induce fosforilación de ERK1/2 vía una proteína G insensible a la toxina de pertussis (PTX)

Los receptores de tipo AT1 pueden acoplarse a proteínas G del tipo Gq o Gi, las que activan a la PLC β o inhiben a la adenilato ciclasa, respectivamente. Para determinar qué proteína G está involucrada en la activación de ERK1/2 por All en hipófisis, se pretrataron células en cultivo con 150 ng/ml de PTX (inhibidor de la Gi) durante 24 hs antes de estimular con All. Este pretratamiento no alteró la respuesta inducida por el octapéptido [$p=0,77$ para la interacción entre los factores preestímulo (PTX-buffer) y estímulo (All-buffer); y $p=0,00076$ para el efecto estímulo, fig 2.3], lo que descarta que la proteína G involucrada sea la Gi y sugiere en su lugar a la Gq. La diferencia entre los preestímulos no es significativa ($p=0,22$).

2.D - AII induce fosforilación de ERK1/2 vía fosfolipasa C β (PLC β)

Con el objeto de evaluar la participación de la PLC β , se pretrató con el inhibidor específico de esta enzima, el U73122 10 μ M, durante 30 min antes de la estimulación con AII. Este pretratamiento redujo en forma significativa la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII ($p=0,0013$ para AII vs control y $p=0,16$ para AII+U73122 vs U73122, fig 2.4.A).

Por otro lado, cuando se analizó la movilización intracelular de Ca $^{++}$ por espectrofluorometría, se observó que la aplicación de un estímulo de AII 1×10^{-8} M indujo un aumento significativo, rápido y transiente en la [Ca $^{++}$] $_i$ (sobre un basal promedio de $154,4 \pm 7,6$ nM), mientras que un tratamiento previo de 7 min con U73122 10 μ M produjo una elevación de la [Ca $^{++}$] $_i$ *per se* (con un máximo a los 45 seg de la aplicación) y posteriormente eliminó el pico característico de AII (fig 2.4.B). El U73122 también fue capaz de bloquear el aumento en la [Ca $^{++}$] $_i$ inducido por 25 mM de KCl utilizado como control positivo de aumento del Ca $^{++}$ por despolarización de la membrana celular.

2.E - AII induce la fosforilación de ERK1/2 por una vía principalmente independiente de la PKC

Como se comentó anteriormente, la PLC induce la producción de DAG e IP $_3$, los que son capaces de activar a la proteína kinasa C (PKC) y de liberar calcio de depósitos intracelulares, respectivamente. Para evaluar si alguna de las dos vías estaba involucrada en la activación de ERK1/2 en nuestro sistema, comenzamos estudiando la posible participación de la PKC. Para esto, se depletaron las células de esta kinasa por medio de un pretratamiento de 24 hs con el éster de forbol phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 1 μ M.

El pretratamiento prolongado con PMA no alteró la fosforilación inducida por la estimulación con AII ($p=0,99$ para AII+PMA24 vs AII, fig 2.5) sugiriendo que, en este tejido, la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII sigue una vía principalmente independiente de la PKC. Como control, tenemos que un estímulo de 10 min con PMA 1 μ M fue capaz de inducir fosforilación de ERK1/2 ($p=0,002$ para control vs PMA10), efecto que fue significativamente inhibido luego del pretratamiento

prolongado con este mismo compuesto ($p=0,00074$ para PMA10+PMA24 vs PMA10). Esto confirmó por un lado que las ERK en este tejido pueden ser fosforiladas por PKC y, por otro, que el pretratamiento prolongado con PMA produjo efectivamente la depleción de esta kinasa.

La participación de la PKC también fue evaluada utilizando un inhibidor específico, la queleritrina. Un pretratamiento de 30 min con $1 \mu\text{M}$ de este compuesto tampoco modificó la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII ($p=0,35$ para la interacción entre los factores preestímulo (QUEL-buffer) y estímulo (AII-buffer) y $p=0,000022$ para el efecto estímulo, fig 2.6), confirmando de esta manera la casi completa independencia de la PKC para esta fosforilación específica.

2.F - AII induce la fosforilación de ERK1/2 vía un aumento de calcio intracelular

Para determinar si la activación de ERK1/2 por AII en adenohipófisis dependía de un aumento del calcio intracelular, pretratamos las células con dos quelantes del calcio intracelular, el 1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic-acid-tetraacetoxymethyl-ester (BAPTA-AM) y el 3,4,5-trimethoxybenzoic-acid-8-(diethylamino)-octyl-ester (TMB8). Un preestímulo de 30 min con BAPTA-AM $10 \mu\text{M}$ o con TMB8 $100 \mu\text{M}$ redujo significativamente la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII ($p=0,019$ y $p=0,00043$ para AII+BAPTA-AM y AII+TMB8 vs AII respectivamente, fig 2.7.A). Por otro lado, ambos quelantes intracelulares (en un pretratamiento de 10 min) fueron también capaces de reducir la espiga temprana de aumento del calcio intracelular que se produce en respuesta a una estimulación con AII (fig 2.7.B y C), lo que estaría indicando que el aumento del calcio intracelular es importante en la respuesta de las ERK1/2 a AII.

En contraste, cuando se pretrató el cultivo celular por un tiempo corto (7 min) con el quelante ethylen-glycol-tetraacetic-acid (EGTA, 5 mM) para disminuir solamente el Ca^{++} proveniente del medio extracelular, no se inhibió la fosforilación de ERK1/2 ($p=0,99$ para AII+EG7 vs AII, fig 2.8.A). Un pretratamiento de 1 min con este quelante no eliminó (aunque sí redujo) la espiga del aumento de calcio intracelular inducida por AII mientras que disminuyó su concentración basal (fig 2.8.B). En contraste, un pretratamiento más largo con EGTA 5 mM (20 min para el cultivo y 7 min para la suspensión celular), con el objeto de eliminar tanto el calcio proveniente de los depósitos internos como el proveniente del exterior celular, redujo

significativamente la fosforilación de ERK1/2 ($p=0,041$ para AII+EG20 vs AII) y eliminó la espiga de calcio inducida por AII (fig 2.8.C). Estos resultados señalarían que la fosforilación de ERK1/2 que se produce en respuesta a AII depende de un aumento del Ca^{++} intracelular especialmente proveniente de los depósitos internos.

2.G - AII induce la fosforilación de ERK1/2 vía la activación de una tirosín-kinasa de la familia Src

En distintos tejidos, se ha asociado la elevación del calcio intracelular con la activación de tirosín kinasas, que en muchos casos activan la vía conducente a la fosforilación de ERK1/2. Con el objeto de detectar la posible activación de tirosín kinasas por AII en adenohipófisis, pretratamos las células durante 24 hs con el inhibidor de tirosín kinasas herbimicina-A $1 \mu M$. Este pretratamiento redujo parcialmente la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII ($p=0,0081$ para AII+HE vs AII, fig 2.9).

La activación de la vía de las MAPKs puede darse a través de RTKs o a través de tirosín kinasas no receptoras. Para determinar la posible participación de tirosín kinasas no receptoras de la familia Src, utilizamos un inhibidor más específico de kinasas de esta familia, el PP1. Un pretratamiento de 30 min con PP1 $10 \mu M$ logró la completa inhibición de la fosforilación de ERK1/2 ($p=0,0008$ para AII+PP1 vs AII), sugiriendo que la activación de una tirosín kinasa de la familia Src posee un importante rol en esta acción de AII sobre la hipófisis.

2.H - AII induce la fosforilación de ERK1/2 vía la transactivación del EGFR

Ha sido descripto anteriormente la transactivación del EGFR por AII en otros tejidos. Para determinar si el EGFR está involucrado en la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII en adenohipófisis, pretratamos las células durante 30 min con un inhibidor específico del este receptor, el AG1478 (200 nM). Esta droga logró reducir parcialmente la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII ($p=0,0055$ para AII+AG vs AII, fig 2.10), lo que estaría indicando la parcial dependencia de la transactivación del EGFR. Por otro lado este inhibidor fue capaz de bloquear totalmente la fosforilación de ERK1/2 inducida por 5 min de EGF 10 ng/ml (datos no presentados).

2.1 - All induce la fosforilación de ERK1/2 vía la activación de su kinasa específica, la MEK1/2

Finalmente, con el objeto de confirmar la participación de la kinasa directa de ERK1/2, la MEK1/2, en la fosforilación inducida por All en hipófisis, se pretrató las células durante 1 hr con el inhibidor específico de MEK1/2, el PD98059 (50 μ M). Este pretratamiento logró abolir la fosforilación inducida por All ($p= 0,00061$ para All+PD9 vs All, fig 2.11), así como la inducida por el EGF.

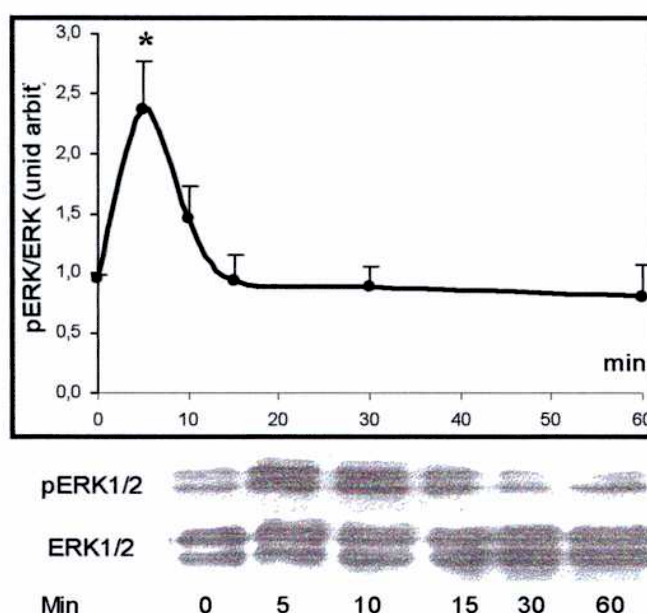


Figura 2.1: Curva temporal de la estimulación de ERK1/2 por All. Células adenohipofisarias en cultivo fueron estimuladas por All 100 nM durante diferentes tiempos. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p<0,05$ respecto del tiempo 0. N=7. Abajo: Western blot representativo con bandas de 42 y 44 kD.

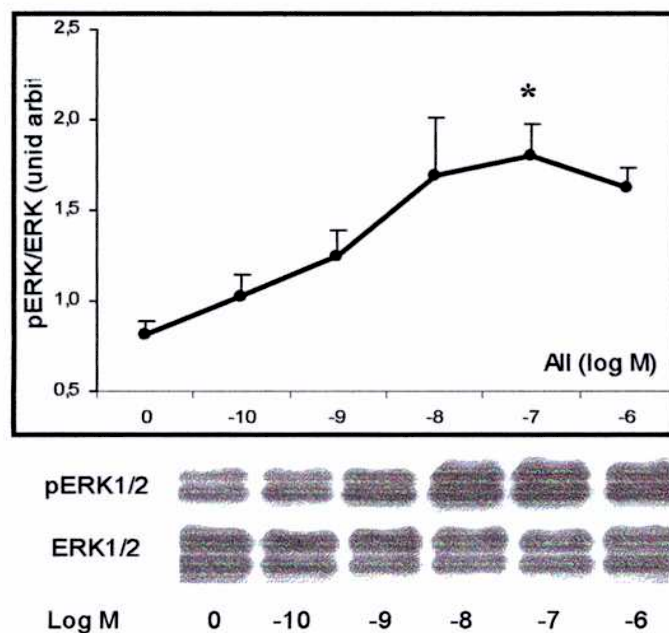


Figura 2.2: Curva dosis respuesta de la fosforilación de ERK por AII. Células adenohipofisarias en cultivo fueron estimuladas por diferentes dosis de AII durante 5 min. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del vehículo. N=6. Abajo: Western blot representativo con bandas de 42 y 44 kD.

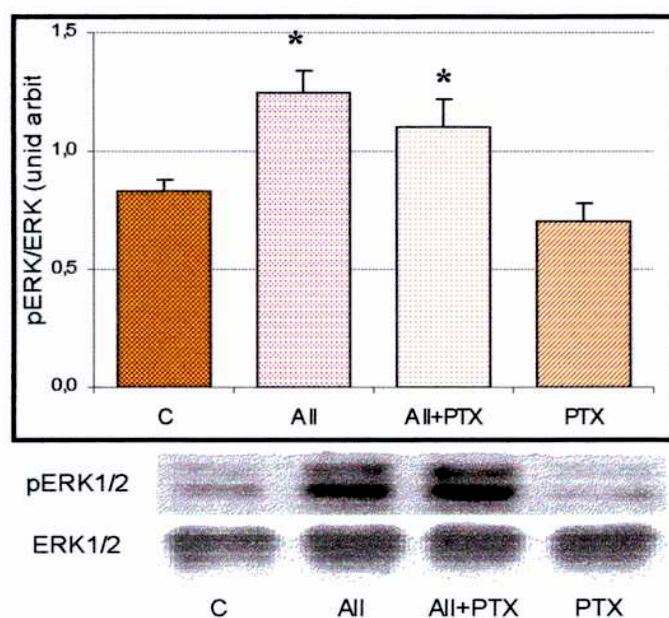


Figura 2.3: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 24 hs con buffer o 150 ng/ml de PTX y luego estimuladas 5 min con buffer o AII 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del preestímulo respectivo. N=6. Abajo: Western blot representativo.

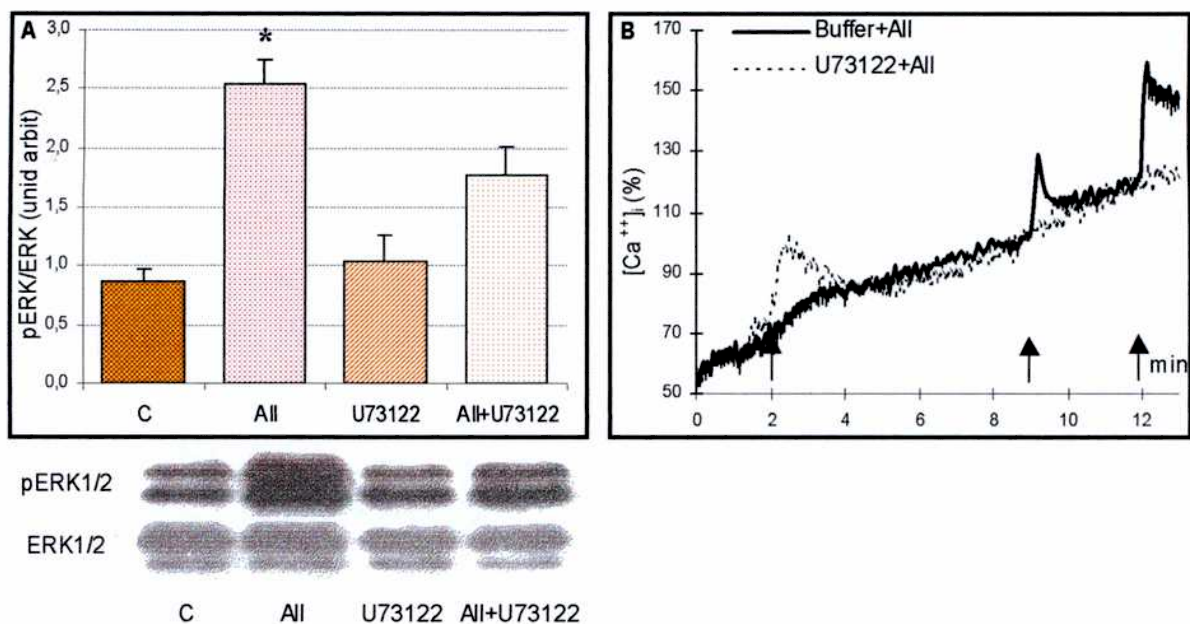


Figura 2.4.A: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 30 min con buffer o U73122 10 μ M y luego estimuladas 5 min con buffer o All 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=4. Abajo: Western blot representativo. **B:** Movilización del calcio intracelular en una suspensión de células estimuladas con buffer+All o con U73122+All. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con All. Primer flecha: buffer o U73122 10 μ M. Segunda flecha: All 10 nM. Tercer flecha: KCl 25 mM. N=7

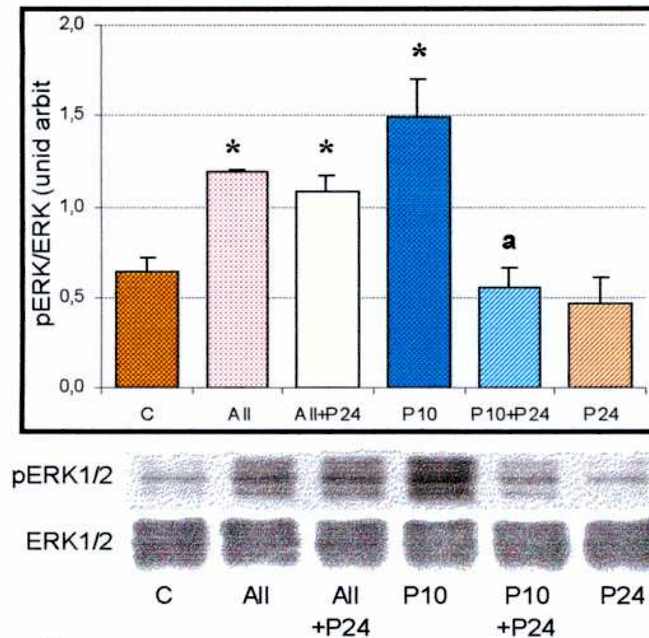


Figura 2.5: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 24 hs con PMA 1 μ M (P24) y luego estimuladas 5 min con buffer o AII 100 nM o 10 min con PMA 1 μ M (P10). C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de P10. N=4. Abajo: Western blot representativo.

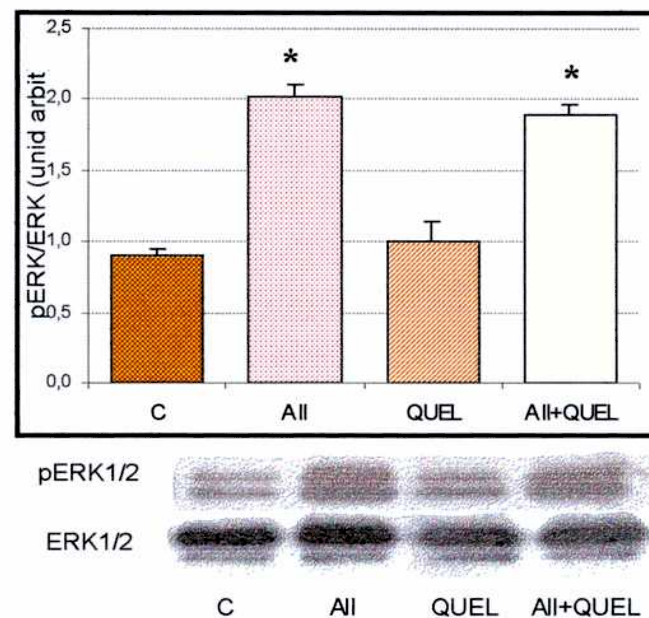


Figura 2.6: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 30 min con buffer o queleritrina 1 μ M (QUEL) y luego estimuladas 5 min con buffer o AII 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del preestímulo respectivo. N=3. Abajo: Western blot representativo.

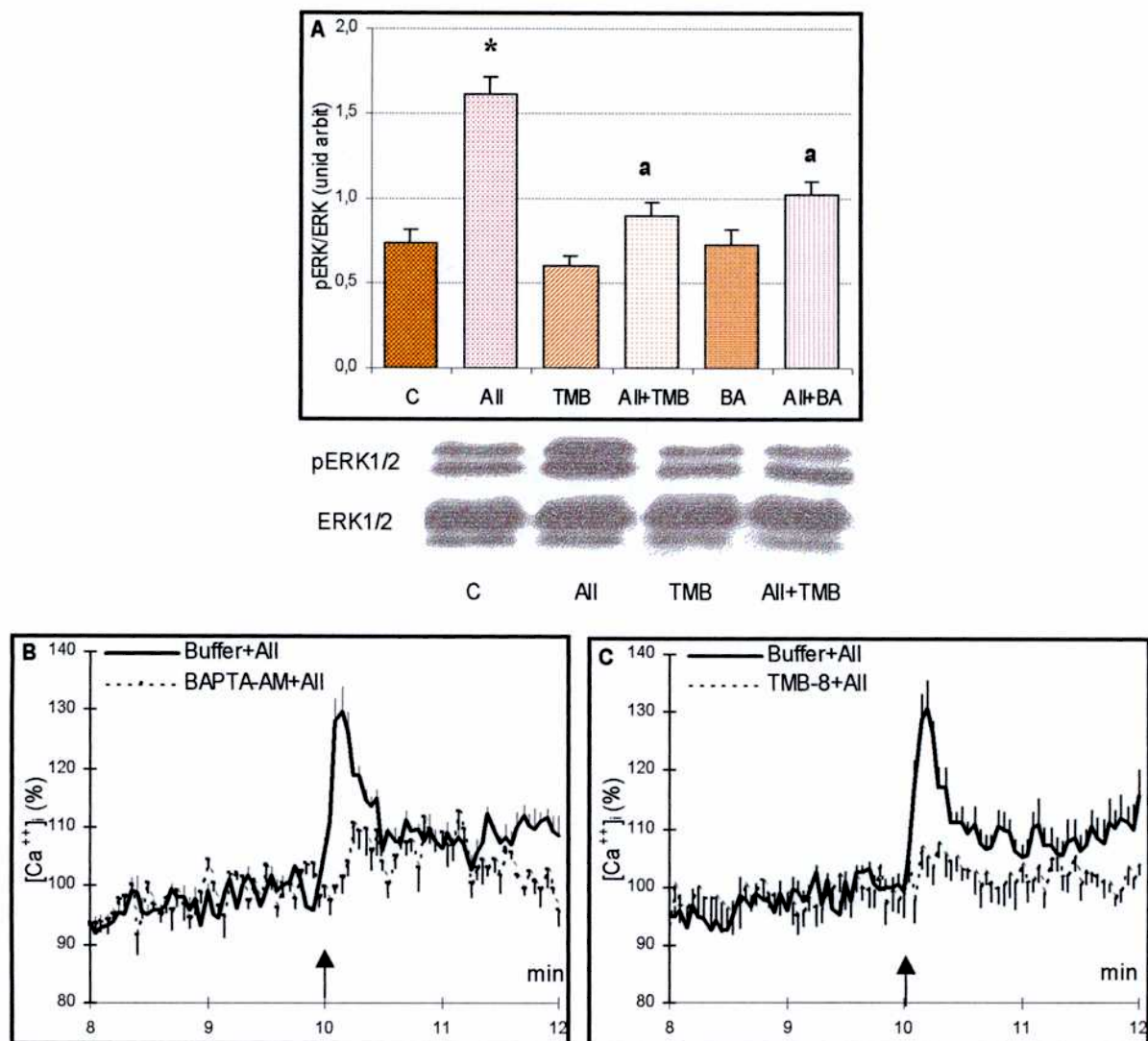


Figura 2.7.A: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 30 min con buffer, BAPTA-AM (BA) 10 μ M o TMB8 (TMB) 100 μ M y luego estimuladas 5 min con buffer o AII 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de AII. N=8. Abajo: Western blot representativo. **B** y **C:** Movilización del calcio intracelular en una suspensión de células adenohipofisarias estimuladas con buffer+AII, BAPTA-AM+AII (B) o TMB8+AII (C). AII: 10 nM, BAPTA-AM: 10 μ M, TMB8: 100 μ M. Los preestímulos se colocaron 10 min antes de la estimulación con AII. Flecha: estímulo de AII. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{++}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con AII. N=8.

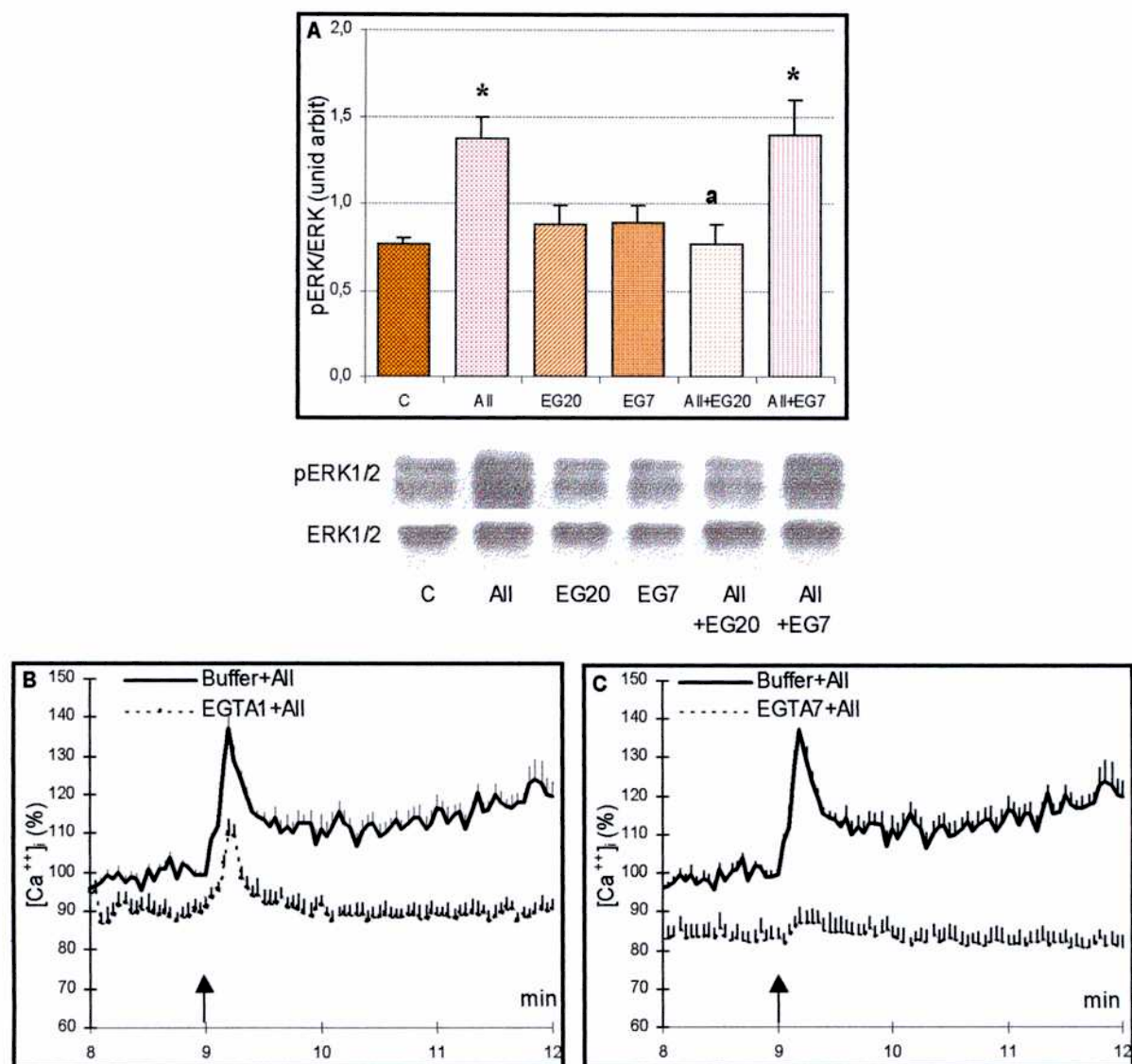


Figura 2.8.A: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas con buffer o EGTA 5 mM durante 7 min (EG7) o 20 min (EG20) y estimuladas los últimos 5 min con buffer o AII 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de AII. N=6. Abajo: Western blot representativo. **B** y **C:** Movilización del calcio intracelular en una suspensión de células estimuladas con buffer+AII o EGTA+AII. El EGTA 5 mM se colocó 1 min (EGTA1, B) o 7 min (EGTA7, C) antes de la estimulación con AII 10 nM. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{++}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con AII. Flecha: estímulo de AII. N=7.

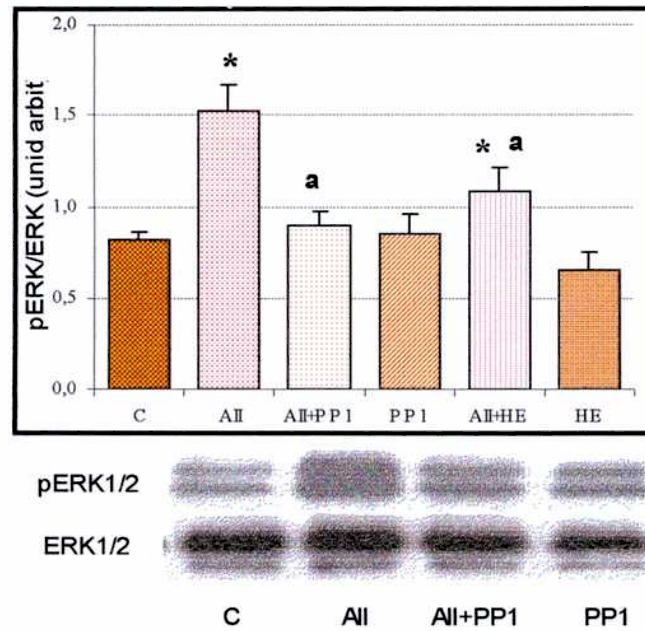


Figura 2.9: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 24 hs con buffer, Herbimicina-A (HE) 1 μ M o PP1 10 μ M y luego estimuladas 5 min con buffer o AII 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de AII. N=9. Abajo: Western blot representativo.

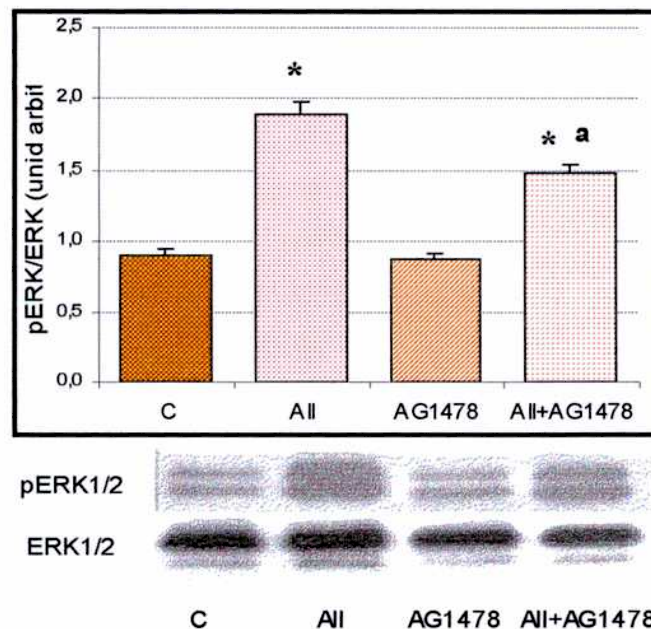


Figura 2.10: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 30 min con buffer o AG1478 200 nM y luego estimuladas 5 min con buffer o AII 100 nM. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de AII. N=4. Abajo: Western blot representativo.

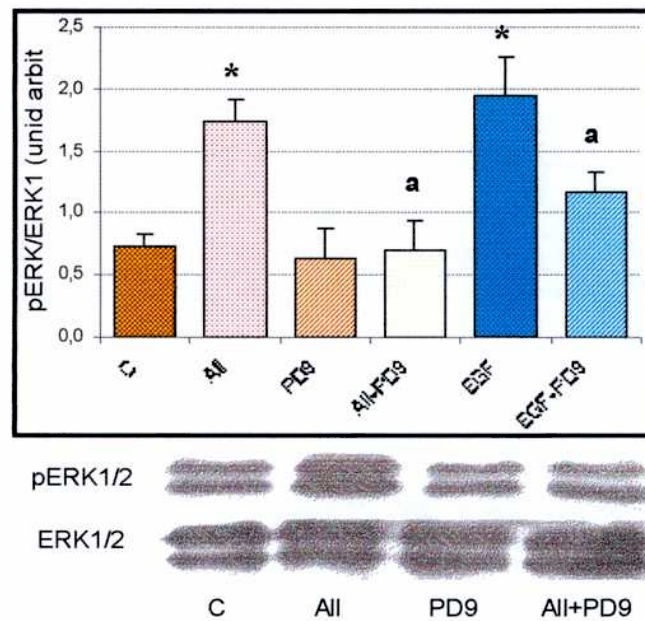


Figura 2.11: Fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias en cultivo preestimuladas durante 1 hr con buffer o PD98059 (PD9) 50 μ M y luego estimuladas 5 min con buffer, All 100 nM o EGF 10 ng/ml. C: control con buffer. Los resultados se expresan relativizados a la ERK total y se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de All o EGF. N=7. Abajo: Western blot representativo.

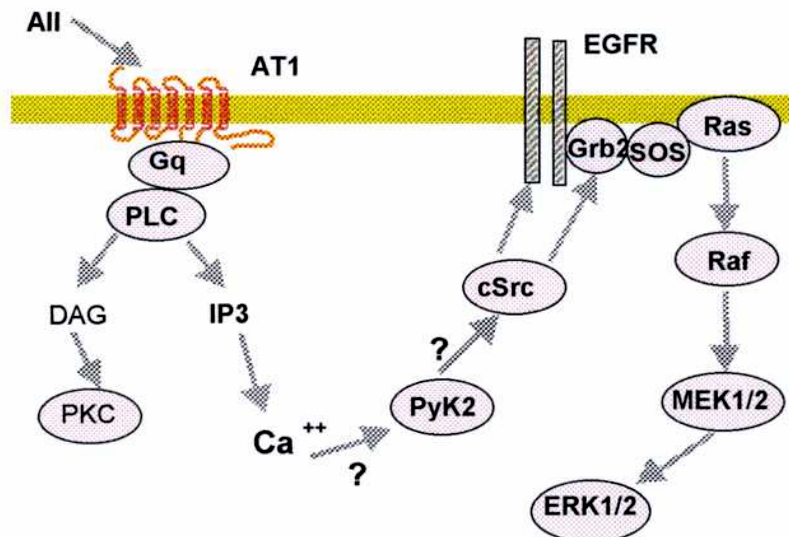


Figura 2.12: Cascada de transducción de señales propuesta para la activación de ERK1/2 por All en adenohipófisis.

Discusión

La activación de ERK1/2 por un GPCR es un mecanismo no tan bien dilucidado como su activación por un RTK. El mecanismo de transducción de señales involucrado en la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII en hipófisis presenta similitudes y diferencias con respecto al descrito para otros tipos celulares. Este tipo de activación es un fenómeno tejido-específico y las diferencias pueden estar relacionadas con un diferente nivel de expresión de los subtipos de receptores o con una expresión diferencial de los diversos elementos involucrados en el mecanismo de activación, dependiendo del tipo celular del que se trate.

En células hipofisarias, describimos por primera vez que la fosforilación de ERK1/2 por AII es un proceso dosis y tiempo-dependiente que alcanza un máximo a los 5 min de estimulación y a una concentración de 10-100 nM. La concentración efectiva 50 (EC₅₀) estimada (1,6 nM) se encuentra en el rango del K_d del receptor AT1 en hipófisis (Chen & Printz 1983). 15 min luego de la estimulación con AII, la fosforilación de ERK1/2 retorna a sus niveles basales. Este patrón de respuesta es similar al encontrado en fibroblastos cardíacos (Murasawa *et al.* 1998a) y en VSMC (Eguchi *et al.* 1996). Sin embargo, en las células BAG, la respuesta alcanza un máximo a concentraciones tan bajas como los 500 pM y vuelve al nivel basal a los 60 min de la estimulación (Tian *et al.* 1998). Por otro lado, en fibroblastos CHO que sobreexpresan al receptor AT1a de rata, AII induce una elevación bifásica de la actividad de ERK1/2 (Wen *et al.* 1995).

En hipófisis el efecto de AII fue bloqueado por el antagonista del receptor AT1, el DUP753, y no por el del receptor AT2, el PD123319, lo que está indicando que la fosforilación de ERK1/2 inducida por AII en este tejido está mediada por AT1. Resultados similares se encontraron en la mayoría de los tejidos estudiados, con la excepción de neuronas neonatales, en las que se encontró que ambos receptores actúan sobre la activación de estas kinasas, aunque de forma opuesta (Huang *et al.* 1996). En el capítulo anterior observamos que la respuesta de fosforilación de ERK1/2 ante AII se encuentra alterada en el caso de la hipófisis tumoral: la fosforilación es significativamente menor y más tardía. Por otro lado, en el tumor hipofisario, parte de esta respuesta pasa a ser dependiente del subtipo AT2.

El receptor AT1 puede unirse tanto a la proteína Gq como a la Gi (Ohnishi *et al.* 1992). La activación de ERK1/2 por AII en hipófisis resultó ser insensible a PTX y

suprimida por un inhibidor de la PLC- β , el U73122. En conjunto estas observaciones indican que, en este tipo celular, el receptor AT1 transduce su señal a través de una proteína Gq insensible a PTX (como en el caso de las VSMC (Eguchi *et al.* 1996), (Tian *et al.* 1998)) y no a través de una Gi (como en las células hepáticas C9 (Shah & Catt 2002)).

El U73122 también fue capaz de evitar la espiga de calcio intracelular inducida por All, como era de esperarse para un inhibidor de la PLC. Sorprendentemente, esta droga produjo por sí misma un incremento agudo del calcio por un lado y la eliminación del aumento resultante de la despolarización de membrana inducida por el KCl. Se ha descrito anteriormente que el U73122 era capaz de promover un aumento del calcio intracelular debido a un bloqueo de las bombas recuperadoras de calcio del retículo responsables de mantener una baja concentración citoplasmática de este catión (De Moel *et al.* 1995). Sin embargo, este inhibidor también es capaz de bloquear canales de entrada de calcio de membrana y canales del retículo sensibles a IP3 en forma independiente a la inhibición de la PLC (Pulcinelli *et al.* 1998). Estos resultados estarían alertando acerca de que el U73122 podría no ser selectivo a las concentraciones requeridas para un bloqueo máximo de la PLC. Alternativamente, esta selectividad podría depender del tipo celular del que se trate.

Ya ha sido descrito anteriormente que la PLC en hipófisis induce la activación de la PKC a través de un aumento del DAG (Suarez *et al.* 2002), y que receptores acoplados a proteína Gq pueden en algunos casos fosforilar a ERK1/2 a través de una activación de la PKC (van Biesen *et al.* 1996). Esta kinasa en principio activaría a ERK1/2 estimulando la fosforilación del EGFR, lo que induce la subsecuente activación de la vía de las Ras-Raf-Mek-Erk (Shah & Catt 2002). Considerando estos antecedentes decidimos evaluar la hipótesis de que All fuera capaz de inducir la fosforilación de ERK1/2 en hipófisis vía la PKC. Sin embargo, nuestros resultados muestran claramente que la depleción de la PKC por un tratamiento prolongado con PMA, o un pretratamiento con el inhibidor específico de esta kinasa, la queleritrina, no afectó la activación de ERK1/2.

Nuestros datos apuntan a una vía principalmente PKC-independiente en la activación de ERK1/2 por All en la hipófisis. Esto contrasta con resultados obtenidos en células hepáticas (Shah & Catt 2002), células BAG (Tian *et al.* 1998) y células CHO que expresan el receptor AT1 (Arai & Escobedo 1996). Otros estudios sin

embargo indican que sería el calcio, y no la PKC, el que jugaría un rol fundamental en la activación de ERK1/2 por AII. Esto fue observado en miocitos cardíacos y en VSMC (Eguchi *et al.* 1996), (Murasawa *et al.* 1998b), (Zou *et al.* 1996), (Sadoshima *et al.* 1995). Nuestro siguiente paso fue entonces determinar el rol del calcio en nuestra vía de señalización.

Los quelantes intracelulares de calcio como el BAPTA-AM y el TMB8, así como una exposición prolongada al quelante extracelular EGTA, evitaron la espiga de aumento de calcio intracelular inducida por AII y redujeron significativamente la fosforilación de ERK1/2. Por otro lado, un pretratamiento más breve con EGTA, que sólo elimina el influjo de calcio desde el exterior celular sin depletar los depósitos internos, no evitó un aumento en los niveles de ERK1/2 fosforilada ni eliminó la espiga de calcio en respuesta a AII. Estos resultados corroboran la hipótesis de que, en hipófisis, el aumento del calcio intracelular es un elemento clave en la fosforilación de ERK1/2 mediada por AII y sugieren, además, que sería el proveniente de los depósitos internos (regulados por IP₃) el principal involucrado en esta respuesta.

La estimulación con AII ha sido asociada con la transactivación de RTKs y la activación de tirosín-kinasas no receptoras (Touyz & Berry 2002), (Yin *et al.* 2003). En nuestro trabajo, el pretratamiento con Herbimicina A, un inhibidor de tirosín-kinasas, disminuyó el aumento de ERK1/2 fosforilada mientras que un inhibidor más específico para la familia Src, el PP1, prácticamente abolió esta fosforilación. Esto indica que una kinasa de esta familia, posiblemente la cSrc, estaría involucrada en la activación de ERK1/2 inducida por AII en hipófisis. Varios estudios enfatizan la importancia de la cSrc en la vía de señalización de AII hacia ERK1/2, como es el caso en fibroblastos cardíacos (Murasawa *et al.* 1998b) y en VSMC (Eguchi *et al.* 1996). Nuestros resultados concuerdan con lo observado en VSMC provenientes de ratones transgénicos deficientes en la cSrc, en los que se describe una disminución de la actividad de ERK1/2 mediada por AII (Ishida *et al.* 1998).

Por otro lado observamos que la inhibición específica del EGFR en hipófisis producida por el AG1478 fue capaz de atenuar la activación de ERK1/2 inducida por AII. Existe actualmente abundante evidencia de la transactivación de RTKs por GPCRs (Saito & Bradford 2001), (Luttrell *et al.* 1999). Este mecanismo ha sido descrito en fibroblastos cardíacos (Murasawa *et al.* 1998a), VSMC (Eguchi *et al.*

1998) y en células hepáticas C9 (Shah & Catt 2002). Inclusive se lo ha asociado con un aumento del calcio intracelular y con la activación de ERK1/2. Sin embargo, la inhibición observada en nuestros experimentos por el AG1478 no fue completa sino parcial, lo que nos está indicando que en nuestro tejido la activación de ERK1/2 por All no dependería por completo de esta transactivación. Lo mismo sucedería en el caso de las VSMC (Eguchi *et al.* 1998).

Los experimentos que realizamos con herbimicina-A, PP1 y AG1478 no alteraron la movilización de calcio intracelular inducida por All (datos no presentados), por lo que proponemos que el aumento de este catión en adenohipófisis es previo a la activación de las tirosín kinasas. Por otro lado, obtuvimos una inhibición total bloqueando específicamente a una tirosín kinasa de la familia Src mientras que sólo una parcial haciendo lo propio con el EGFR, lo que sugiere que la activación de una tirosín kinasa no receptora es previa a la transactivación del receptor. La elevación citoplasmática del calcio puede activar tirosín kinasas calcio-dependientes como la PyK2 o la CADTK. A su vez, se postula que la PyK2 es capaz de acoplarse y activar la cSrc en VSMC luego de una estimulación con All, y ésta inducir a su vez la transactivación del EGFR (Eguchi *et al.* 1999). Aunque serían necesarios nuevos experimentos para determinarlo, es posible que esta interacción se esté produciendo también en hipófisis.

En base a estos resultados, postulamos el esquema presentado en la fig 2.12 como la posible cascada de señales que se produce en el lactotrofo en respuesta a All y que induce la fosforilación y consecuente activación de ERK1/2. La inducción del receptor AT1 por All activaría a una proteína Gq, ésta a la PLC- β que elevaría los niveles de IP₃, y éstos inducirían a su vez la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico. El aumento del calcio intracelular activaría tirosín kinasas sensibles a este catión, como la Pyk2, las cuales fosforilarían a la cSrc, activándola. Esta tirosín kinasa no receptora sería la responsable directa de la transactivación del EGFR, el cual, a través de las proteínas adaptadoras Grb2 y SOS, encendería a su vez la cascada Ras-Raf-Mek que conduce finalmente a la fosforilación de ERK1/2. Alternativamente, la cSrc podría estar también activando a Ras, como se postula en otros sistemas (Naor *et al.* 2000), a través de un reconocimiento entre tirosinas fosforiladas de la cSrc y sitios Sh2 de la Grb2.

En resumen, el presente trabajo demuestra por primera vez que, en células hipofisarias, AII induce la cascada de las MAPKs conducente a la activación de ERK1/2 principalmente por un mecanismo asociado a una proteína Gq y dependiente de la PLC- β , el calcio y la cSrc. Por otro lado, la respuesta de señalización de AII involucra también la transactivación del EGFR. Cuando se consideran los resultados presentes en la bibliografía, resulta evidente que las vías de señalización que conducen del receptor AT1 a la fosforilación de ERK1/2 y el rol relativo de la PKC y el calcio en esta cascada de señales varían considerablemente entre los diferentes tipos celulares en un mismo organismo. Esto se correspondería con las múltiples vías que pueden converger en las ERK1/2. El mecanismo utilizado por un determinado receptor para estimular a ERK1/2 dependería de los componentes enzimáticos que están siendo expresados por ese tipo celular en particular.

Concluyendo, podemos decir que el esclarecimiento del mecanismo de acción de AII sobre la activación de las ERK1/2 en hipófisis puede aportar a la comprensión de aspectos críticos del péptido en esta glándula, como la proliferación y la angiogénesis, que están a su vez muy relacionados con los procesos tumorigénicos.

Gran parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en Am.J.Physiol.(Endocrinol.Metab.) (2003) 285 (3) E645:E653.

PARTE II:

DEHIDROEPIANDROSTERONA

PARTE II: DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)

INTRODUCCION

1 - Generalidades

La dehidroepiandrosterona (DHEA) y su principal metabolito, la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S), son los esteroides de mayor concentración en el plasma humano. Sin embargo, el rango de concentraciones normal encontrado en la población, aún dentro de grupos homogéneos en cuanto a sexo y edad, es muy amplio. En la mujer normal, las concentraciones sanguíneas de DHEA-S se encuentran alrededor de los 5 μ M. Sin embargo, se han encontrado niveles significativamente menores en pacientes portadores de diferentes tipos de cáncer, desórdenes cardiovasculares, diabetes mellitus y enfermedades autoinmunes. Por otro lado, se ha propuesto a DHEA como una hormona que participa de la prevención del envejecimiento y de la adaptación del organismo al estrés, previniendo enfermedades asociadas. En roedores, la concentración sanguínea normal es bastante menor que en humanos. Se postula que DHEA y DHEA-S son interconvertibles en sangre, siendo la forma no sulfatada la más activa y la DHEA-S el reservorio de mayor vida media, aunque muchos de los estudios de cuantificación sérica no discriminan entre ambas.

DHEA es sintetizada principalmente en la glándula suprarrenal a partir de la pregnenolona por acción del citocromo P450-C17 (17 α -hidroxilasa, 17-20-liasa) con requerimiento de NADPH (fig II.1). Posteriormente puede ser transformada localmente en varios tejidos a 7 α -hidroxidehidroepiandrosterona (OH-DHEA) por la α -hidroxilasa CYP7B, a androstenediona (ADIONA) por la 3 β -dehidrogenasa de hidroxiesteroides (3 β -HSD) o a androstenediol (ADIOL) por la 17 β -HSD. Ambos derivados androgénicos pueden metabolizarse a testosterona por medio de estas mismas enzimas. Finalmente, la androstenediona y la testosterona pueden a su vez convertirse respectivamente en los estrógenos estrona y estradiol por medio de la P450 aromatasa. Por lo tanto, DHEA es una molécula precursora tanto de andrógenos como de estrógenos.

No se conocen receptores específicos para DHEA, por lo que aún está en discusión si se la puede considerar una hormona o no. Sin embargo, se postula que

puede actuar tanto sobre receptores estrogénicos como androgénicos, mientras que no sería capaz de hacerlo sobre los de glucocorticoides. Por otro lado, parece haber un considerable grado de variación especie- y tejido-específica en cuanto al tipo de receptor que actúa en cada caso. En la glándula mamaria de la rata, DHEA ejerce su acción vía receptores androgénicos (Gatto *et al.* 1998), (Sourla *et al.* 1998) mientras que en algunas líneas celulares de cáncer mamario humano se reportó que actuaría tanto sobre receptores estrogénicos (Maggiolini *et al.* 1999) como androgénicos (Boccuzzi *et al.* 1993). Se ha sugerido asimismo que el medio ambiente hormonal también determinaría el tipo de receptor por medio del cual DHEA ejerce su efecto (Ebeling & Koivisto 1994), (Boccuzzi *et al.* 1992).

Además de la glándula adrenal, otros órganos son también productores de DHEA y de sus derivados, entre ellos, las gónadas y el sistema nervioso (Akwa *et al.* 1992). La liberación de esta hormona sigue un patrón de tipo circadiano, con un pico previo a la fase de mayor actividad del animal, que en los roedores coincide con el atardecer. En el humano, es el principal producto de la adrenal fetal, pero su producción declina rápidamente luego del nacimiento. Los niveles sanguíneos se mantienen bajos durante toda la infancia, retornan a valores significativos en la pubertad, alcanzan su pico máximo a los 25-30 años y luego decaen gradualmente con la edad hasta alcanzar un 5-10 % del máximo alrededor de los 70-80 años (Hinson & Raven 1999). Este patrón de secreción temporal contrasta con los de otras hormonas adrenales que no presentan cambios tan significativos con la edad e implica que, aunque ACTH puede estimular su producción, no debe ser su único factor regulador. Sin embargo, aún no se ha encontrado otro que actúe específicamente sobre DHEA.

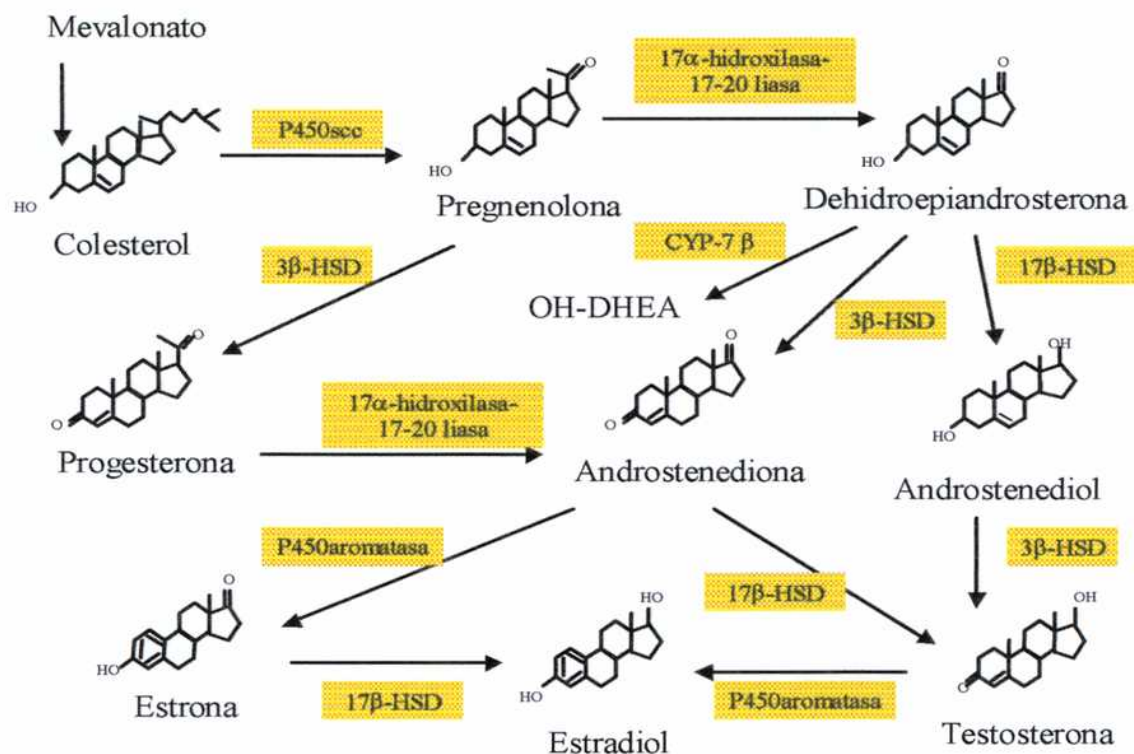


Figura II.1: Principales vías metabólicas de DHEA

DHEA es sintetizada a partir de la pregnenolona por acción de la 17 α -hidroxilasa. Esta puede ser a su vez transformada en androstenediona por la 3 β -HSD y posteriormente en testosterona por la 17 β -HSD. Ambos andrógenos pueden convertirse en los estrógenos estrona y estradiol respectivamente por medio de la P450 aromatasa.

64 - INFORMACIÓN GENERAL • CLARIN • Domingo 18 de marzo de 2001

CIENCIA

UNA HORMONA NATURAL CONTRA LOS TRASTORNOS DE LA EDAD

Causa furor una presunta píldora de la juventud

La DHEA podría evitar las arrugas, la artrosis y la pérdida de la memoria • La probarán en humanos

Fueron centenares los que respondieron al llamado. Provenientes, en su mayor parte, del ambiente de los ne-

agula. La verdad es que siento que estoy envejeciendo. A la mañana siento menos entusiasmo y es preciso que me sacuda y me convenza de que tengo varias cosas por hacer para poder levantarme. Perché que la DHEA podía arreglar mi vida.



Figura II.2

2 - DHEA y tumores

DHEA ha demostrado tener efectos benéficos de tipo inhibitorio sobre la promoción y progresión de diferentes tipos de tumores experimentales en una gran variedad de órganos. Se ha descrito que, cuando se la administra en dosis farmacológicas y tiempos prolongados, DHEA puede inhibir parcialmente procesos tumorigénicos en piel, pulmón, hígado, colon, mama y próstata.

En mujeres con cáncer mamario, se detectaron niveles sanguíneos de DHEA y de DHEA-S menores a los normales, junto con una menor excreción de sus catabolitos (Hinson & Raven 1999). Por otro lado, en modelos de carcinoma mamario de rata inducido por la metilnitrosourea se observó una inhibición del crecimiento tumoral producida por este esteroide (Lubet *et al.* 1998). La administración dietaria de DHEA demostró ser un potente inhibidor del desarrollo de cáncer de próstata inducido por andrógenos en ratas Wistar (Rao *et al.* 1999).

En ratones A/J, este esteroide inhibe la aparición de tumores de pulmón inducidos por el dimetilbenzantraceno (Schwartz & Tannen R.H. 1981). En los Balb/c reduce la tasa de aparición de tumores de colon inducidos por dimetilhidrazina (Nyce *et al.* 1984), mientras que en la cepa CD-1, la aplicación tópica de DHEA inhibe el desarrollo de papilomas y carcinomas cutáneos inducidos por el dimetilbenzantraceno (Schwartz *et al.* 1989), (Pashko *et al.* 1985), (Pashko *et al.* 1984). En linfocitos humanos, DHEA es capaz de inhibir la transformación morfológica y el aumento de la síntesis de DNA inducidos por el virus de Epstein-Barr (Henderson *et al.* 1981).

La capacidad de DHEA de inhibir en forma no competitiva a la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) y la vía de las pentosas puede ser clave para su acción antimitótica y antitumoral al reducir la disponibilidad celular de NADPH (Gordon *et al.* 1987). Aparentemente, algunos pasos críticos del proceso de iniciación (activación de carcinógenos) y promoción (aumento de la tasa de proliferación y formación de superóxidos) tumoral dependen del aporte de este reductor intracelular (Schwartz *et al.* 1986). También sería de importancia la capacidad antioxidante de DHEA al disminuir en forma inespecífica los radicales libres del medio ambiente celular y aumentar en forma específica la proliferación de peroxisomas y enzimas asociadas (Prough *et al.* 1994).

Todos estos datos presentarían a DHEA como una especie de panacea antitumoral. Sin embargo, también se le han descrito acciones de tipo estrogénico que podrían ser estimuladoras de ciertos tipos de tumores estrógeno-dependientes, como algunos tumores ováricos o mamarios. Al respecto se ha descrito que un tratamiento crónico con este esteroide puede inducir proliferación celular en algunas líneas celulares de cáncer mamario humano sensibles a estrógenos (Maggiolini *et al.* 1999). En algunos casos DHEA demostró ser uterotrófica (Nephew *et al.* 2000), lo que también podría estar relacionado con una acción estrogénica. Por otro lado, DHEA suministrada a ratas en dosis farmacológicas puede inducir hiperplasia de glándulas sebáceas (Sourla *et al.* 2000) y carcinogénesis hepática (Rao *et al.* 1992). Este último efecto posiblemente esté relacionado con la inducción de una gran proliferación de peroxisomas y de varias de sus enzimas asociadas, incluyendo la citocromo P450, la NADPH-P450 oxidoreductasa y la palmitoil coenzima A oxidasa (Prough *et al.* 1994).

3 - DHEA y enfermedades cardiovasculares

Ha sido descrito que el nivel de DHEA-S sanguíneo está inversamente relacionado con la posibilidad de muerte por enfermedad cardiovascular, especialmente en hombres mayores de 50 años (Hinson & Raven 1999). DHEA mostró tener también acción de tipo protector revirtiendo la disminución de la función cardíaca y hepatocelular producida ante casos de hemorragia traumática (Jarrar *et al.* 2000), efecto que estaría mediado por receptores estrogénicos. DHEA también tendría efecto preventivo en la arterioesclerosis y la hipertensión (Obut 1998), (Homma *et al.* 1998).

4 - DHEA y diabetes

Como antioxidante, DHEA es capaz de reducir los daños producidos por los altos niveles de radicales libres presentes en la hiperglucemia diabética. Los sinaptosomas aislados de páncreas de ratas tratadas con estreptozotocina reducen los niveles de peróxido de hidrógeno, de iones hidroxilo y superóxido y de otras especies reactivas del oxígeno cuando a estas ratas se las trata previamente con DHEA (Aragno *et al.* 1999), posiblemente debido a la inducción de peroxisomas y

enzimas peroxisomales. Este esteroide también restaura los niveles normales de glutatión reducido y de ácidos grasos insaturados de membrana, así como la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa. Esto trae como consecuencia una mayor preservación de las células β pancreáticas y una mayor liberación de insulina.

En ratas genéticamente diabéticas tratadas con DHEA antes de la aparición de la enfermedad, esta hormona suprime la hiperglucemia, preserva la estructura y función de las células pancreáticas y aumenta la sensibilidad a la insulina (Ladriere *et al.* 1997). En cultivos celulares de riñón de rata, DHEA reduce la peroxidación lipídica y las alteraciones del crecimiento inducidas por los altos niveles de glucosa sanguínea (Brignardello *et al.* 2000).

5 - DHEA y obesidad

DHEA tiene el efecto de reducir el peso corporal, los depósitos de grasa, la hiperfagia, la hiperlipidemia y los altos niveles de leptina e insulina séricos producidos espontáneamente en ratas Zucker genéticamente obesas (Richards *et al.* 2000), (Abadie *et al.* 2000), (Gansler *et al.* 1985), (Muller & Cleary 1985). DHEA revierte el aumento de la adiposidad corporal inducido por la ovariectomía (Mauriege *et al.* 2000) y reduce el asociado al envejecimiento (Han *et al.* 1998). Sin embargo, por otro lado este esteroide adrenal también protege de la pérdida de peso corporal inducida por el estrés de una inmovilización sostenida (Hu *et al.* 2000).

Desde el punto de vista metabólico, se ha descrito que DHEA es capaz de estimular en el adipocito la expresión de resistina, una proteína involucrada en la reducción de la adipogénesis y de la masa de tejido graso a través de una inhibición de la diferenciación adipocitaria (Kochan & Karbowska 2004). Por otro lado, este esteroide produce en adipocitos e hígado una reducción de la lipogénesis como resultado de la inhibición de la ácido graso sintetasa y una reducción de la disponibilidad de poder reductor (Parente & Berdanier 1993) mientras que incrementa la producción de calor al inducir enzimas termogénicas como la G3PDH y la enzima málica (Shepherd & Cleary 1984), (Lardy *et al.* 1995).

En el tejido muscular, DHEA aumenta la síntesis proteica (Parente & Berdanier 1993) y en el tejido adiposo de ratas hembra se ha observado *in vitro* que la DHEA-S produce una disminución en la secreción de LEP (Pineiro *et al.* 1999), hormona que inhibe la ingesta. Sin embargo, el efecto de DHEA sobre la ingesta aún no está

demasiado claro, se ha reportado tanto que la disminuye como que no la modifica (Cleary 1991), (Richards *et al.* 2000). Todo lo anteriormente descrito sobre la acción de DHEA la define como un esteroide con efectos adelgazantes, lo que ha sido y continúa siendo muy promocionado en la actualidad.

6 - DHEA y sistema neuroendócrino

En el sistema nervioso de los vertebrados las concentraciones presentes de DHEA y DHEA-S son abundantes. Sin embargo, mientras que a nivel sistémico la DHEA es la forma más activa, a nivel central lo sería la DHEA-S, funcionando como neuroesteroide. En este tejido DHEA es producida en neuronas y en astrocitos, pero no en oligodendrocitos (Zwain & Yen 1999a), (Zwain & Yen 1999b) y actúa principalmente a través de la modulación de receptores de neurotransmisores. En este sentido, se propone que activaría los glutamatérgicos NMDA e inhibiría a los gabaérgicos. Dentro de las acciones de DHEA en el SNC, se la ha propuesto como estimuladora de la neurogénesis en hipocampo de rata y protectora ante la acción deletérea de la corticosterona (Karishma & Herbert 2002), (Kimonides *et al.* 1999) y el estrés oxidativo (Bastianetto *et al.* 1999). Estos efectos pueden estar relacionados con otros descritos en relación con la facilitación de la memoria y el aprendizaje (Wolf & Kirschbaum 1999), (Frye & Lacey 1999). DHEA también sería inductora de una sensación de bienestar general (Arlt *et al.* 2000), (Valtysdottir *et al.* 2003) y tendría influencias sobre el registro electroencefalográfico durante el sueño no-REM (Schiffelholz *et al.* 2000).

La DHEA-S estimula en forma dosis-dependiente la secreción de melatonina por parte de la glándula pineal (San Martín & Touitou 2000) y la DHEA modifica en adenohipófisis su producción y secreción hormonal (Simard *et al.* 1988), (Simard & Labrie 1987). Por otro lado, en un estudio prospectivo realizado en pacientes adultos sanos, la administración de DHEA indujo un aumento en la IGF-1 sanguínea (Vermeulen 1997), (Pei & Melmed 1997), lo que fue también observado en ratas (McIntosh *et al.* 1999).

7 - DHEA y sistema reproductivo

Además de los efectos uterotróficos ya descritos, DHEA en algunos casos

induce en la rata una pérdida de la ciclicidad y estimula la producción de quistes ováricos, dando origen al síndrome de ovario poliquístico (Knudsen *et al.* 1975), (Ward *et al.* 1978). En algunos casos, esto puede estar asociado a la proliferación y maduración de mastocitos ováricos (Parshad & Batth 1999). En el modelo de rata con síndrome de ovario poliquístico, DHEA es capaz de estimular la producción de IGF-1 por parte de las células de la granulosa tanto *in vivo* como *in vitro* (Yan *et al.* 1997). El aumento de IGF-1 induciría una mayor proliferación de este tipo celular, lo que llevaría consecuentemente a una mayor liberación estrogénica. Esto puede en parte ser la causa del hiperestrogenismo observado en estas ratas luego de la administración crónica de DHEA. Debido a estos efectos estrogénicos, se ha propuesto a DHEA como un efectivo agente para terapias de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas.

8 - DHEA e inmunidad

Se ha observado una disminución de los niveles de DHEA y DHEA-S en la mayoría de las enfermedades autoinmunes (Toth & Horvath 2002), (Merrill *et al.* 1996). En este sentido, se encontraron efectos benéficos de DHEA sobre el desarrollo del lupus eritematoso sistémico (Van Vollenhoven RF. 2002) y la miastenia gravis (Duan *et al.* 2003). Por otro lado, se detectaron menores niveles sanguíneos de DHEA-S en mujeres en edad fértil con esclerosis sistémica (La Montagna *et al.* 2001) y en pacientes con artritis reumatoidea (Cutolo *et al.* 2002). También se describió a DHEA como benéfica en el tratamiento de cierto tipo de alergias (Yu *et al.* 2002) y se la ha propuesto incluso como inhibidora de la replicación y reactivación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) resistente a AZT en líneas celulares crónicamente infectadas (Yang *et al.* 1994) y en cultivos linfocitarios humanos (Henderson *et al.* 1992).

9 - DHEA y estrés

Se ha propuesto a DHEA como una hormona que participa de la adaptación del organismo al estrés, previniendo enfermedades asociadas como la arterioesclerosis, hipertensión, diabetes, alergias, inmunodeficiencias y cáncer (Obut 1998). En ratas con estrés inducido por una inmovilización sostenida, DHEA revierte la pérdida de

peso y el aumento de la peroxidación lipídica hepática inducida por el estímulo estresante (Hu *et al.* 2000). En ratas tratadas con corticosterona, implantes subcutáneos de DHEA son capaces de revertir el aumento de triglicéridos e hidroperóxidos lipídicos en sangre y en hígado (McIntosh *et al.* 1999). Por otro lado, en células de hipocampo de rata en cultivo, DHEA tiene un efecto protector ante el estrés oxidativo inducido por el agua oxigenada y el nitroprusiato de sodio (Bastianetto *et al.* 1999). En este modelo, DHEA también es capaz de atenuar respuestas asociadas al estrés inducido por los glucocorticoides (Kimonides *et al.* 1999), (Herbert 1998).

10 - Utilización actual de DHEA

La marcada caída de las concentraciones séricas de DHEA que se produce con la edad, junto con evidencias que demuestran que su nivel en plasma se encuentra significativamente disminuido en diferentes condiciones patológicas (Kroboth *et al.* 1999) llevó a algunos investigadores a definir el “síndrome de deficiencia de DHEA” y a proponer una “terapia de reemplazo hormonal”, especialmente en personas de edad (Morales *et al.* 1994), (Hinson & Raven 1999). Se han realizado numerosos estudios, tanto en animales como en humanos, para determinar si la administración de esta hormona podría ser útil en la prevención de la aparición estos desórdenes. Debido a sus efectos estrogénicos, también se ha propuesto a DHEA como un efectivo agente para terapias de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas.

Toda la gran cantidad de bibliografía existente acerca de las supuestas acciones benéficas de DHEA condujo a que, actualmente, en los Estados Unidos se la publicite como una panacea antitumoral y como la “hormona de la juventud” (Hinson & Raven 1999) (fig II.2), preventiva de muchas enfermedades asociadas con el envejecimiento, incluso la osteoporosis (Higdon *et al.* 2001). En ese país se la puede encontrar ampliamente disponible al público en general vendiéndose como suplemento dietario sin necesidad de prescripción médica. También se producen “cócteles” que supuestamente aumentan su producción en sangre.

Sin embargo, la acción biológica y terapéutica de DHEA hasta el momento es controvertida y no existe un total consenso acerca de los posibles beneficios de una

terapia de reemplazo hormonal con este esteroide. Los pacientes adrenalectomizados tratados solamente con corticosteroides, pero no con DHEA, no presentan patologías aparentes. Por otro lado, se duda aún de su real efecto benéfico a nivel clínico y de los posibles efectos secundarios que pueda tener su uso prolongado (Nippoldt & Nair 1998). Aunque DHEA parece ser un inhibidor de la proliferación celular *in vivo* e *in vitro*, su propia actividad hormonal y otras acciones de tipo deletéreo que posee podría limitar su utilización en la quimioprevención.

Debido a los efectos secundarios indeseados que presenta (especialmente observados a dosis farmacológicas y a tiempos prolongados) y a su rápida metabolización por parte del hígado, se estudia la posibilidad de administrar terapéuticamente esteroides sintéticos símil-DHEA. Existen análogos que no inducirían hipertrofia hepática y uterina, como la 16- α -fluoro-5-androsten-17-ona o la 16- α -fluoro-5 α -androstan-17-ona (Schwartz *et al.* 1989), (Schwartz *et al.* 1988) y precursores con una menor metabolización hepática como la diosgenina (Scott *et al.* 2000).

Las controversias existentes en la bibliografía acerca del rol terapéutico de DHEA en diferentes tipos de tumores y de las acciones estrogénicas que se le describen en algunos casos, nos indujeron a estudiar el efecto de este esteroide en nuestro modelo de tumor hipofisario inducido por estrógenos. Por lo tanto, en la segunda parte de esta tesis abordamos el estudio de un tratamiento crónico con DHEA sobre nuestro modelo, considerando sus efectos sobre los parámetros que consideramos más interesantes en esta patología. Finalmente, y en base a los resultados obtenidos, nos propusimos analizar en forma más directa la acción de DHEA a nivel hipofisario.

CAPITULO 3

***Efecto de un tratamiento in vivo con dehidroepiandrosterona
en un tumor hipofisario inducido por estrógenos***

CAPITULO 3:

Efecto del tratamiento *in vivo* con dehidroepiandrosterona (DHEA) en un tumor hipofisario inducido por estrógenos

Como mencionáramos anteriormente, en los últimos años ha habido un fuerte resurgimiento del interés en DHEA debido a que se le han descrito acciones pleiotrópicas sobre varios órganos y sistemas de tipo antitumoral y rejuvenecedor. Cuando se administra DHEA a dosis farmacológicas y tiempos prolongados, puede inhibir parcialmente la carcinogénesis experimental en una gran variedad de tejidos. Este esteroide también fue descrito como antioxidante y protector contra desórdenes cardiovasculares, diabetes mellitus, obesidad, osteoporosis, estrés y enfermedades autoinmunes. Incluso se ha propuesto a DHEA como inhibidora de la replicación y reactivación del virus HIV-1. En el sistema nervioso central, se le adjudicaron efectos benéficos sobre procesos cognitivos y comportamentales.

Sin embargo, como ya comentamos también existe bibliografía que la describe como inductora de hipertrofismo hepático y uterino, de la proliferación celular en algunas líneas celulares de cáncer mamario sensibles a estrógenos, y del desarrollo de ovarios poliquísticos. Además, DHEA puede aumentar los niveles séricos de estradiol, testosterona y prolactina.

Hasta el momento no se había evaluado la acción de DHEA sobre el tumor hipofisario. Los escasos efectos descritos sobre esta glándula son de tipo estrogénico e incluso bloqueables por antiestrógenos. Entre ellos se encuentra la capacidad de inducir un aumento del contenido celular de PRL y GH (Simard *et al.* 1988), un aumento de la secreción de LH en respuesta a GnRH (Simard & Labrie 1987) y una disminución de la liberación de DA por parte de neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato (Garcia de Yebenes *et al.* 1995). Por otro lado, se ha descrito una capacidad de DHEA de revertir en adenohipófisis la caída que se produce en los niveles del RNAm de POMC con el envejecimiento (Givalois *et al.* 1999).

Sobre la base del amplio rango de actividad anticarcinogénica descrita para DHEA en modelos animales *in vivo* y de datos que sugieren una actividad antiproliferativa *in vitro* sobre células transformadas, y considerando además el hecho de que en muchos casos se le han descrito efectos opuestos de tipo

proliferativo y estrogénico, consideramos interesante estudiar en este capítulo el efecto de un tratamiento crónico *in vivo* con DHEA sobre nuestro modelo de hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos ya descrito anteriormente. Específicamente, evaluamos su acción sobre el peso corporal, el peso hipofisario, el ciclo estral de la rata hembra y los niveles hormonales de PRL, GH, IGF-1 y leptina (LEP) durante el tratamiento.

Resultados

3.A - Efecto de la DHEA sobre el peso corporal

El tratamiento crónico de 7 sem con el estrógeno sintético DES redujo significativamente el peso corporal de las ratas, desde la primera semana en adelante ($p=0,000028$ para T vs C en la 1er sem, fig 3.1). Al final del tratamiento, el grupo tumor mantuvo una reducción significativa respecto del control mientras que su tratamiento con DHEA revirtió leve pero significativamente este efecto ($p=0,0059$ para T+DHEA vs T). En la quinta y séptima semana de tratamiento, DHEA *per se* también produjo una leve pero significativa pérdida de peso corporal ($p=0,04$ para DHEA vs C en la 7ma sem).

3.B - Efecto de la DHEA sobre la hiperplasia adenohipofisaria

El tratamiento con estrógenos aumentó significativamente el peso de la hipófisis anterior (relativizado al peso corporal total) respecto del control ($p=0,00017$ para T vs C, fig 3.2.A) lo cual, por estudios histopatológicos anteriores (ver capítulo anterior), se sabe que se corresponde con una hiperplasia e hipertrofia de lactotopos. Los resultados del ANOVA indican que el tratamiento con DHEA fue capaz de revertir parcialmente esta hiperplasia ($P=0,045$ para T+DHEA vs T), aunque DHEA *per se* también indujo en cierto grado un aumento del peso hipofisario ($p=0,001$ para DHEA vs C). Similares resultados se obtuvieron cuando se compararon los pesos hipofisarios absolutos (datos no presentados). En cuanto al peso de las glándulas adrenales, utilizadas como tejido control, no se observó un efecto significativo en ninguno de los casos (fig 3.2.B).

3.C - Efecto de DHEA sobre los niveles de PRL sérica

Al final del tratamiento (séptima semana), los niveles hormonales se analizaron estadísticamente por separado debido a la diferencia en la toma de las muestras. En esta semana se sacrificaron los animales por decapitación y se obtuvo sangre troncal. Todas las muestras anteriores fueron tomadas, en cambio, por extracción de vena yugular bajo anestesia con éter. Esta diferencia en la toma de muestras explica

los menores niveles de PRL sérica observados en todos los grupos en la séptima semana de tratamiento con respecto a las semanas anteriores (36 ng/ml vs 8 ng/ml para los controles de la 6ta y 7ma semana respectivamente).

El tratamiento del grupo tumor con DHEA mostró una reversión significativa de la hiperprolactinemia desde la cuarta semana en adelante ($p=0,0046$ para T+DHEA vs T en la 4ta sem, fig 3.3.A), diferencia que se mantuvo al finalizar el tratamiento ($p=0,00003$ para T+DHEA vs T en la 7ma sem, fig 3.3.B). El tratamiento del grupo control con DHEA produjo una respuesta de tipo bifásico, con una primera etapa de elevación de la PRL sérica que llegó a ser significativa en la tercer y cuarta semana ($p=0,00048$ y $p=0,045$ para DHEA vs C en la 3er y 4ta sem respectivamente) y una posterior caída hasta niveles cercanos al control en la sexta semana. Sin embargo, el análisis de los datos de la séptima semana de tratamiento indicó que los niveles eran aún significativamente más altos respecto del control ($p=0,038$ para DHEA vs C).

3.D - Efecto de la DHEA sobre los niveles de GH, IGF-1 y LEP séricas

Todos los tratamientos elevaron significativamente los niveles de GH séricos con respecto a los controles sin tratar de la primera a la quinta semana ($p<0,02$ para todos los tratamientos respecto de su control respectivo, fig 3.4.A). Durante el tratamiento, DHEA no fue capaz de revertir los altos niveles de GH sanguíneos alcanzados en el tumor. En la séptima semana de tratamiento por otro lado, cuando las muestras se obtuvieron por decapitación, los valores de GH sérica fueron para todos los grupos mayores a los obtenidos bajo anestesia con éter (7 ng/ml vs 36 ng/ml para los controles de la 6ta y 7ma semana respectivamente). Sin embargo, en esta semana las diferencias alcanzadas entre los distintos grupos no llegaron a ser significativas (p de ANOVA= 0,47, fig 3.4.B).

Los niveles de IGF-1 séricos se vieron disminuidos en el grupo tumor desde la primera semana en adelante, llegando estas diferencias a ser significativas en la primera, segunda, cuarta y quinta semana (fig 3.5.A). El tratamiento de los tumores con DHEA no revirtió este efecto del DES, y la DHEA por sí misma no modificó significativamente los niveles de IGF-I del grupo control. Luego de la decapitación, en la séptima semana, se mantuvo la misma tendencia observada previamente ($p=0,99$ para T+DHEA vs T y $p=0,96$ para DHEA vs C) y los valores alcanzados en

estas condiciones se encontraron dentro del rango de los obtenidos bajo anestesia con éter (fig 3.5.B).

En cuanto a la LEP, el grupo tumor presentó a las 7 semanas de tratamiento unos niveles plasmáticos significativamente mayores a los del control ($p=0.019$, fig 3.6) y el tratamiento con DHEA no revirtió el efecto del DES ($p=0,99$ para T+DHEA vs T). La DHEA *per se* no modificó significativamente los niveles sanguíneos de LEP. Durante el tratamiento, los valores de los distintos grupos siguen las mismas tendencias, mientras que los niveles alcanzados bajo el estrés por éter no fueron significativamente distintos a los observados luego de la decapitación (datos no presentados).

3.E - Efecto de la DHEA sobre el ciclo estral

A continuación quisimos evaluar si el tratamiento con DHEA lograba evitar la típica aparición del estado de estro continuo que se produce ante un tratamiento crónico con estrógenos. Por lo tanto realizamos hisopados vaginales durante 10 días consecutivos comenzando en la segunda, cuarta y sexta semana de tratamiento y analizamos en ellos el estadio del ciclo estral de las ratas. Los resultados indican que los esteroides no introdujeron una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de estros presentes hasta la sexta semana, momento en el que el grupo tumor mostró un marcado aumento en el porcentaje de estros respecto del grupo control ($p=0.00029$, fig 3.7) indicando la desregulación del ciclo estral. El tratamiento con DHEA no revirtió este estado de desarreglo hormonal ($p=0,99$ para T+DHEA vs T) y la DHEA *per se* no produjo alteraciones del ciclo ($p=0,74$ para DHEA vs C).

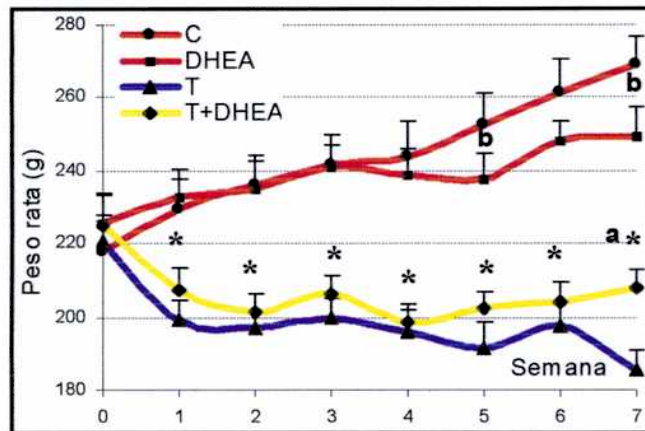


Figura 3.1: Peso corporal durante el tratamiento de ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA). El tratamiento consta del implante subcutáneo de un pellet de 20 mg de DES y/o de 2 pellets de 50 mg c/u de DHEA, que se dejan 7 semanas. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ para T y T+DHEA respecto del control temporal correspondiente. a: $p < 0,05$ para T+DHEA respecto de T. b: $p < 0,05$ para DHEA respecto del control temporal correspondiente. N=15 ratas por grupo.

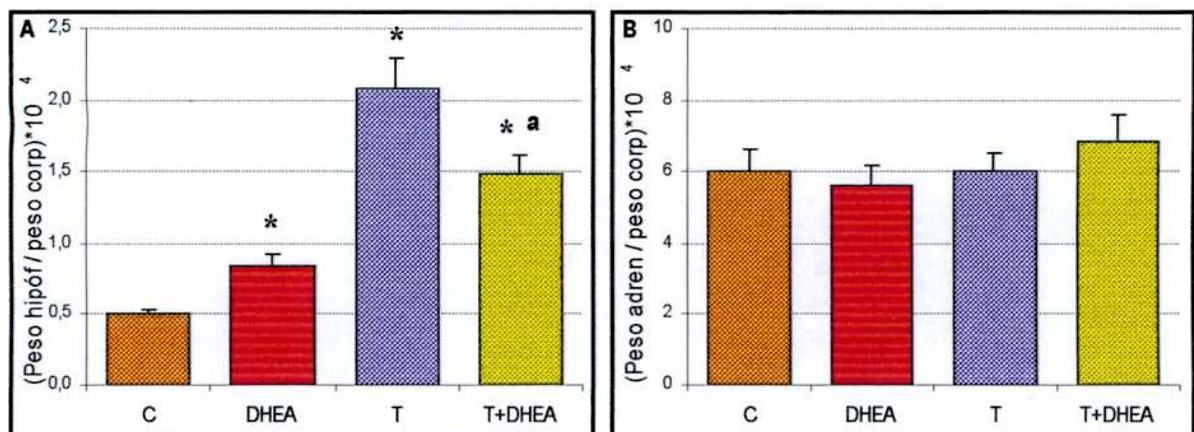


Figura 3.2: Peso adenohipofisario (A) y adrenal (B), relativizado al peso corporal total, de ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA) durante 7 semanas. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de T. N=15 ratas por grupo.

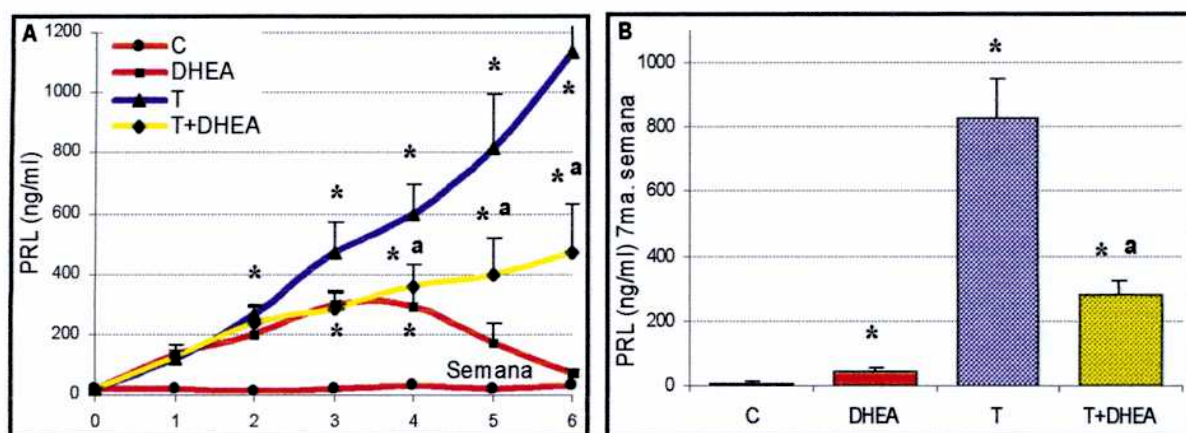


Figura 3.3: Niveles de PRL sérica medidos por RIA durante las primeras 6 semanas de tratamiento (A) y al finalizar el mismo (B) de ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA). En (A) las muestras se obtuvieron a partir de vena yugular bajo anestesia con éter, mientras que en (B) fue a partir de sangre troncal luego de la decapitación. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control temporal correspondiente. a: $p < 0,05$ respecto de T. N=15 ratas por grupo.

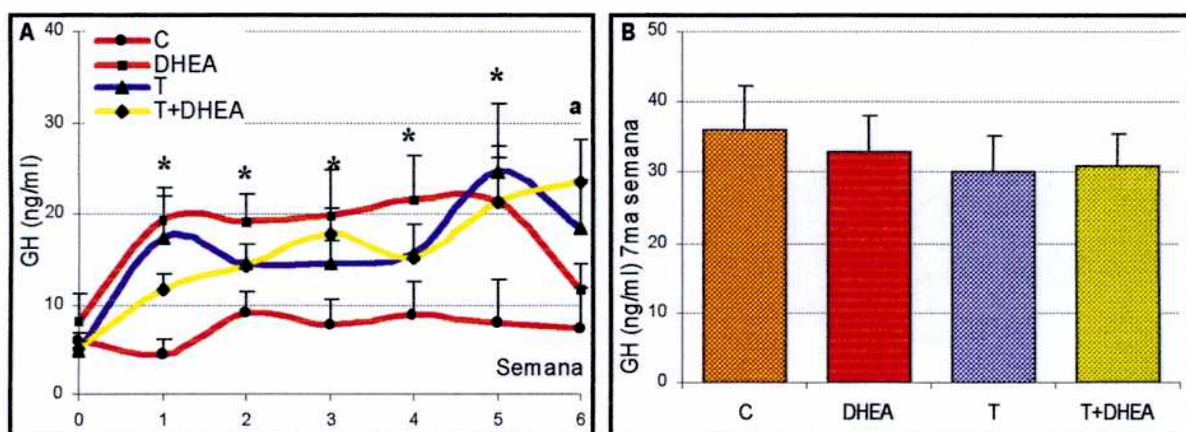


Figura 3.4: Niveles de GH sérica durante las primeras 6 semanas de tratamiento (A) y al finalizar el mismo (B) en ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA). En (A) las muestras se obtuvieron a partir de vena yugular bajo anestesia con éter, mientras que en (B) fue a partir de sangre troncal luego de la decapitación. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ para T, DHEA y T+DHEA respecto del control temporal correspondiente. a: $p < 0,05$ para T y T+DHEA respecto del control temporal correspondiente. N=15 ratas por grupo.

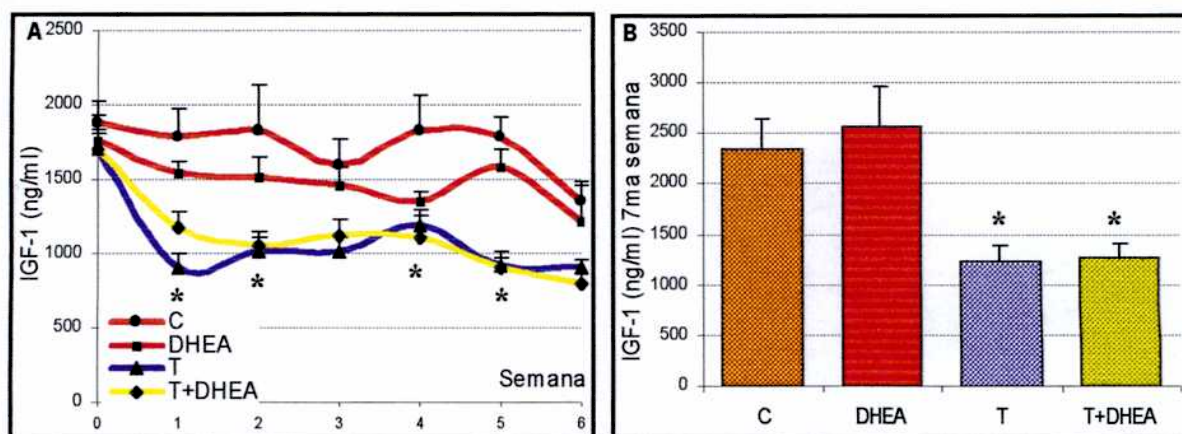


Figura 3.5: Niveles de IGF-1 sérica durante las primeras 6 semanas de tratamiento (A) y al finalizar el mismo (B) en ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA). En (A) las muestras se obtuvieron a partir de vena yugular bajo anestesia con éter, mientras que en (B) fue a partir de sangre troncal luego de la decapitación. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. En A: * $p < 0,05$ para T y T+DHEA respecto del control temporal correspondiente. En B: * $p < 0,05$ respecto del control. N=15 ratas por grupo.

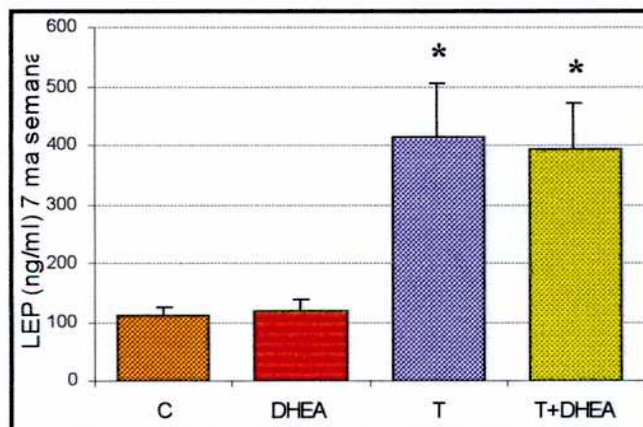


Figura 3.6: Niveles de LEP sérica (obtenidos de sangre troncal por decapitación) al finalizar el tratamiento de 7 semanas en ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA). Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control. N=15 ratas por grupo.

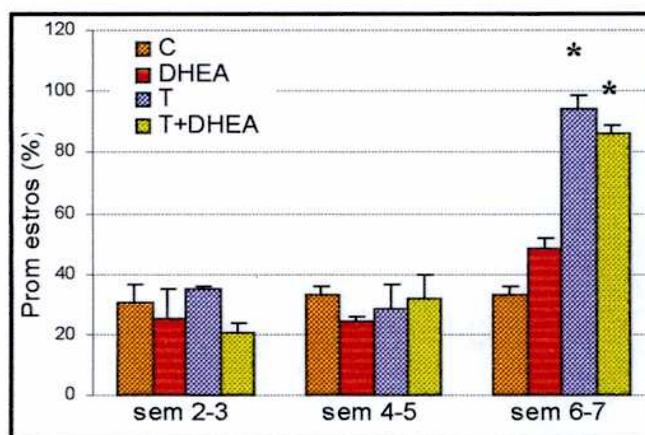


Figura 3.7: Porcentaje de estros a lo largo del tratamiento en las ratas hembra controles (C), tratadas con DES (T), DHEA (DHEA) o DES más DHEA (T+DHEA). Se realizaron hisopados vaginales durante 10 días consecutivos a partir de la 2da, 4ta y 6ta semana de tratamiento y se calculó el porcentaje de estros presentes en cada grupo. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$ respecto del control temporal correspondiente. N=3 experimentos de 6 ratas/grupo.

Discusión

DHEA y DHEA-S son las hormonas esteroideas de origen adrenal de mayor concentración en el plasma humano, siendo alrededor de 20 veces mayor a la de cualquier otra hormona esteroidea circulante en el hombre (Ebeling & Koivisto 1994). Pero, a pesar de su abundancia, su rol fisiológico no se conoce aún completamente. Datos *in vivo* e *in vitro* sugieren que DHEA y sus metabolitos pueden tener efectos de tipo estrogénico o androgénico dependiendo de la homeostasis de hormonas sexuales presente en el individuo. Los resultados de este capítulo muestran que, en la hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos, la DHEA tiene varios efectos de tipo endócrino y metabólico que dependen principalmente del medio ambiente hormonal del animal.

Ya ha sido ampliamente documentado que los estrógenos pueden reducir y la testosterona puede aumentar el peso corporal (Shulman *et al.* 1987), (Borski *et al.* 1996). En nuestro trabajo, las ratas tratadas crónicamente con DES presentan una progresiva pérdida del peso corporal, llegando a alcanzar en la séptima semana de tratamiento sólo un 70% del peso de las ratas controles. El tratamiento con DHEA también posee una leve acción de tipo estrogénico al presentar hacia su finalización una reducción del 7% del peso corporal. Estos resultados concuerdan con otros estudios que indican que este esteroide posee un efecto adelgazante en ratas genéticamente obesas y, en menor medida, en roedores normales.

Como comentamos previamente en la introducción de la parte II, se han propuesto numerosos mecanismos responsables del efecto adelgazante de DHEA. Entre ellos, la capacidad de DHEA de reducir la adipogénesis, la lipogénesis y la termogénesis hepática. El efecto de DHEA sobre la ingesta aún resulta contradictorio en la bibliografía. En particular en nuestro modelo experimental la administración de este esteroide no tuvo efecto alguno sobre los niveles séricos de la LEP, hormona que participa en la ingesta. No podemos descartar, además, la posible producción de metabolitos estrogénicos responsables del efecto reductor del peso corporal.

Cuando se trató con DHEA a los tumores inducidos por estrógenos, en cambio, la pérdida del peso corporal inducida por el DES se vió ligeramente revertida. Esto indica que la DHEA por sí misma podría estar actuando como un estrógeno débil mientras que en combinación con el DES sería capaz de antagonizar parcialmente

sus efectos actuando estrogénicamente (compitiendo por los receptores estrogénicos directamente o vía androstenediol, (Poortman *et al.* 1975)) o androgénicamente. Ha sido reportado en otros trabajos un efecto similar al observado en el nuestro, en el sentido de que DHEA produce una leve disminución del peso corporal en ratas controles mientras que revierte la pérdida de peso que se produce en ratas sometidas a estrés. Estos resultados estarían indicando que la DHEA funciona como un factor homeostático que tiende a mantener los valores del peso corporal en un rango fisiológico normal.

Respecto a la influencia sobre el ciclo estral pudimos observar que el tratamiento crónico con DES, como se había descrito previamente (Kim *et al.* 2002), induce un aumento en la aparición de estros, compatible con una desregulación del ciclo estral y la posterior aparición de un estado de estro continuo. Como comentamos en la introducción de esta segunda parte, DHEA en algunos modelos experimentales produce alteraciones del ciclo estral y estimula la producción de ovarios poliquísticos (Ward *et al.* 1978). Sin embargo, en nuestro modelo este esteroide no aumentó significativamente la aparición de estros por sí mismo, aunque tampoco revirtió el estado de estro continuo que acompaña al tumor hipofisario.

Como ya mencionamos ampliamente en el capítulo II, el tratamiento crónico con DES induce un aumento del peso hipofisario asociado a una hiperplasia e hipertrofia de lactotopos. El tratamiento de este modelo experimental con DHEA fue capaz de revertir parcialmente este aumento. Sin embargo, cuando el esteroide fue aplicado en las ratas controles también produjo *per se* un incremento en este parámetro. En correspondencia con este efecto, DHEA revirtió parcialmente la hiperprolactinemia inducida por el tratamiento estrogénico pero también indujo por sí misma un ligero incremento de la PRL sérica cuando se la administró en animales controles.

Se ha descrito que DHEA estimula la secreción de PRL tanto *in vivo* como *in vitro*, y que este efecto puede ser bloqueado por la utilización de antiestrógenos. El hecho de que en presencia de altos niveles estrogénicos el rol de este esteroide adrenal pueda invertirse estaría indicando que el medio ambiente endócrino es

capaz de condicionar significativamente su acción, como describen otros autores (Ebeling & Koivisto 1994). Nuestros resultados muestran que, en un medio de bajos estrógenos, DHEA tiene un efecto de tipo estrogénico estimulando levemente la hiperplasia hipofisaria, aumentando la prolactina sérica y produciendo una pérdida del peso corporal. Por otro lado, en un medio de abundancia estrogénica, es capaz de antagonizar parcialmente el crecimiento tumoral, la hiperprolactinemia y la pérdida de peso inducidos por el DES.

En la rata, los datos publicados acerca de la influencia de los estrógenos sobre la GH son contradictorios (Muller *et al.* 1999). En nuestro modelo, los niveles de GH séricos que encontramos al finalizar el tratamiento (séptima semana) no se vieron modificados significativamente por ninguno de los dos esteroides. En esta semana, las muestras fueron tomadas a partir de sangre troncal luego de la decapitación de la rata, procedimiento rápido que no llega a estresar al animal y por lo tanto no altera la secreción hormonal.

Sin embargo, cuando analizamos las muestras obtenidas de vena yugular bajo anestesia con éter durante todo el tratamiento, observamos que tanto DES como DHEA revirtieron la inhibición de la secreción de GH que se produce en las ratas controles debido al estrés por éter. Ya ha sido previamente descrito que este tipo agudo de estrés aumenta la secreción de PRL y disminuye la de GH (Diaz-Torga *et al.* 2002). El primer efecto se debería a una disminución en la actividad de neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (Lookingland *et al.* 1990) mientras que el segundo, a una mayor secreción de STT estimulada por la CRH liberada en respuesta al estrés (Arimura *et al.* 1976). Los estrógenos, por su lado, pueden antagonizar en hembras el efecto inhibitorio de la STT sobre la GH hipofisaria *in vitro* (Hertz *et al.* 1989) e *in vivo* (Bray *et al.* 2001), evitando de esta manera la disminución de GH en sangre. De acuerdo con nuestros resultados, DHEA tendría un similar efecto estrogénico de interferencia sobre la caída de GH plasmática inducida por el estrés.

Como es sabido el IGF-1 es el principal mediador de los efectos de la GH en la mayoría de los tejidos. Por lo tanto, y en vista de la influencia estrogénica sobre la GH sérica observada durante el tratamiento, decidimos evaluar también los niveles plasmáticos de IGF-1. Los resultados nos muestran que el DES disminuyó los niveles séricos de este factor de crecimiento, incluso cuando las muestras no fueron tomadas bajo éter (estrés). Se ha descrito que los estrógenos pueden actuar

directamente inhibiendo la expresión génica de IGF-1 en el hígado y en los tejidos periféricos (Borski *et al.* 1996). Por otro lado, el tratamiento con DHEA en nuestro protocolo experimental no revirtió la disminución en los niveles plasmáticos de este factor de crecimiento inducida por el DES ni alteró significativamente los niveles del grupo control. Otros grupos, en cambio, observaron un aumento del IGF-1 sérico en respuesta a la DHEA tanto en humanos (Morales *et al.* 1994), (Arlt *et al.* 2000) como en ratas (McIntosh *et al.* 1999).

La modificación del peso corporal, especialmente si involucra al tejido graso, está muy relacionada con los niveles de LEP sérica. En nuestro trabajo observamos que tanto el DES como la DHEA modifican el peso corporal, por lo que nos interesó conocer los niveles sanguíneos de esta hormona. Lo que observamos es que las ratas bajo un tratamiento crónico con DES muestran un aumento en los niveles de LEP sérica. De acuerdo con esto, se ha descrito que la administración de estrógenos a ratas aumenta la presencia de este péptido en sangre así como la producción de su RNAm en el tejido adiposo (Brann *et al.* 1999), lo que estaría de acuerdo con su efecto sobre la reducción del peso corporal.

En general, la concentración circulante de LEP es mayor en la mujer que en el hombre, incluso luego de su relativización con respecto a la grasa corporal. En la mujer, los niveles se correlacionan positivamente con el estradiol y negativamente con la DHEA, mientras que en el hombre lo hacen positivamente con el estradiol y negativamente con la testosterona y la DHEA-S (Paolisso *et al.* 2001). Por otro lado se ha observado que tanto la DHEA-S como la dihidrotestosterona disminuyen *in vitro* la secreción de LEP por parte del tejido adiposo de ratas hembra normales mientras que DHEA es capaz de reducir *in vivo* los niveles sanguíneos de LEP en ratas genéticamente obesas (Richards *et al.* 2000). Nosotros, en cambio, no observamos ningún efecto de DHEA sobre la concentración plasmática de LEP, tanto en el grupo con tumor hipofisario como en el grupo control, aunque es posible que esta influencia sea más evidente en ratas obesas.

Resumiendo, podemos decir que los resultados de este capítulo muestran que el tratamiento crónico con DHEA atenúa la hiperplasia hipofisaria inducida por estrógenos y la hiperprolactinemia resultante lo que agregaría una acción más de tipo benéfico a las múltiples descritas en la literatura. Sin embargo, el hecho de que

DHEA *per se* también produzca un ligero aumento del peso hipofisario y posea sus propios efectos endócrinos como el de elevar la PRL y, bajo ciertas condiciones, la GH sanguíneas, hace necesario un cuidadoso análisis de los posibles efectos secundarios a la hora de considerar su aplicación clínica, especialmente en terapias preventivas de reemplazo hormonal, o su venta indiscriminada sin receta médica.

Los resultados de este capítulo han sido publicados en J. Endoc. (2002) 174 (3): 447-454.

CAPITULO 4

***Efecto de la dehidroepiandrosterona sobre la liberación
hormonal de células adenohipofisarias in vitro y su
modulación por factores hipotalámicos***

CAPITULO 4:

Efecto de la dehidroepiandrosterona sobre la liberación hormonal de células adenohipofisarias *in vitro* y su modulación por factores hipotalámicos.

Como ya se ha comentado anteriormente, a pesar de los altos niveles séricos de DHEA en humanos, aún no se conoce completamente su rol fisiológico. Datos *in vivo* e *in vitro* sugieren que posee, junto con sus metabolitos, tanto efectos estrogénicos como androgénicos, dependiendo del medio ambiente hormonal del individuo. En el capítulo anterior demostramos que DHEA es capaz de atenuar la hiperplasia hipofisaria y la hiperprolactinemia asociada, aunque también puede producir *per se* diversos efectos hormonales. Sin embargo, poco y nada se conoce acerca de sus mecanismos de acción en la hipófisis.

Se postula que DHEA puede actuar tanto sobre receptores estrogénicos como androgénicos y que, en muchos casos, el medio ambiente hormonal puede influenciar el tipo de receptor con el que interactúa. En varios tejidos, DHEA puede ser metabolizada *in situ* a OH-DHEA por la α -hidroxilasa CYP7B o a ADIOL por la 17 β -HSD, el cual puede a su vez ser α -hidroxilado presumiblemente también por la CYP7B (Rose *et al.* 2001). Está descrito que el ADIOL, al igual que DHEA, puede actuar a través de receptores estrogénicos (Poortman *et al.* 1975). Sin embargo, la introducción de un grupo α -hidroxilo (creando OH-DHEA o OH-ADIOL) reduce considerablemente la capacidad de ambos esteroides de competir por el receptor estrogénico (Li *et al.* 1978). Además de poder ser hidroxilada, DHEA en muchos tejidos puede ser convertida a andrógenos y posteriormente a estrógenos por aromatización local.

El metabolismo de DHEA en la hipófisis no ha sido descrito hasta el momento. Se sabe que, junto con su metabolito ADIOL, es capaz de inducir un aumento del contenido celular de PRL y GH hipofisarios, y que este efecto puede ser bloqueado por antiestrógenos (Simard & Labrie 1987), (Simard *et al.* 1988). Por otro lado, aunque la aromatasa se expresa en el prolactinoma hipofisario, en la hipófisis normal de roedores hembra la expresión de esta enzima es casi inexistente (sólo un 0,84 % de las células resultan ser inmunoreactivas (Carretero *et al.* 1999)).

Considerando estos datos y los resultados obtenidos en el capítulo anterior, decidimos estudiar en mayor profundidad la acción de DHEA y determinar si los

efectos que observamos *in vivo* podrían estar asociados a una acción directa de este esteroide o de alguno de sus principales metabolitos a nivel hipofisario. Para esto realizamos cultivos primarios de células adenohipofisarias normales y evaluamos el efecto de DHEA, OH-DHEA y ADIOL sobre la secreción de PRL y GH hipofisarias *in vitro*, en combinación con secretagogos o inhibidores hipotalámicos de estas hormonas como DA, AII, STT y GHRH. Además, analizamos si DHEA era capaz de modular la producción de segundos mensajeros como el calcio y el AMPc en respuesta a estos estímulos.

Resultados

4.A - Efecto de DHEA y sus metabolitos sobre la liberación basal de PRL y GH *in vitro*

Un pretratamiento de las células adenohipofisarias en cultivo con DHEA (1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M), o ADIOL 1×10^{-7} M durante 2 días no produjo diferencias significativas en la PRL basal liberada al medio durante 3 hs y cuantificada por RIA (fig 4.1.A). Sólo la OH-DHEA 1×10^{-7} M logró disminuir los niveles basales de esta hormona ($p=0,045$ para OH-DH vs C). Cuando se analizó el efecto de estos mismos pretratamientos sobre la liberación basal de GH, se observó que en este caso ninguna de las drogas en las dosis utilizadas tuvo un efecto significativo (fig 4.1.B). Estos resultados de liberación basal se utilizaron como controles de los siguientes ensayos de secreción inducida por estímulos hipotalámicos.

4.B - Efecto de DHEA y sus metabolitos sobre la inhibición de la liberación de PRL *in vitro* y la movilización del calcio intracelular inducidas por DA.

El tratamiento *in vitro* de las células adenohipofisarias con DA 1×10^{-6} M durante 3 hs inhibió la liberación de PRL al medio de cultivo ($p=0,00016$ para DA vs C, fig 4.2.A), mientras que un pretratamiento de 2 días con DHEA 1×10^{-5} M revirtió parcial pero significativamente esta inhibición ($p=0,012$ para DH5+DA vs DA). Menores dosis de DHEA o sus derivados metabólicos OH-DHEA y ADIOL no tuvieron efecto significativo sobre este efecto de la DA. Cuando se analizó la movilización intracelular de calcio en una suspensión de células adenohipofisarias por espectrofluorometría, se observó que un pretratamiento de 8 min con DHEA 1×10^{-5} M fue capaz de eliminar la inmediata y transiente disminución del calcio intracelular inducida por un estímulo con DA 1×10^{-6} M (fig 4.2.B).

4.C - Efecto de DHEA sobre la liberación de PRL y la movilización del calcio intracelular inducidas por All.

Un estímulo de 30 min con All 1×10^{-8} M sobre un cultivo de células adenohipofisarias produjo un aumento significativo en la liberación de PRL ($p=0,03$

para All vs C, fig 4.3.A) mientras que un pretratamiento de 2 días con DHEA 1×10^{-5} M incrementó aún más esta secreción ($p=0,018$ para DH5+All vs All). Menores dosis de DHEA no tuvieron un efecto significativo sobre la estimulación inducida por All. Por otro lado, y como es característico, un estímulo con este péptido 1×10^{-8} M produjo un incremento del calcio intracelular de tipo bifásico, con una primera fase de espiga y otra posterior de meseta (fig 4.3.B). El pretratamiento de 8 min con DHEA 1×10^{-5} M no modificó la fase de espiga, mientras que las diferencias observadas en la fase de meseta no llegaron a ser significativas ($p=0,42$ para DHEA+All vs All en el test t en la fase de meseta).

4.D - Efecto de la DHEA sobre la inhibición de la liberación de GH y PRL *in vitro* inducida por STT.

Cuando se aplicó *in vitro* STT 1×10^{-8} M durante 3 hs la liberación de GH al medio de cultivo se inhibió significativamente ($p=0,00033$ para STT vs C, fig 4.4.A). Sin embargo cuando se pretrataron las células durante 2 días con DHEA 1×10^{-5} ó 1×10^{-6} M, se produjo una reversión parcial de la inhibición inducida por STT ($p=0,037$ para DH5+STT y DH6+STT vs STT). Por otro lado, el pretratamiento con este esteroide no alteró el efecto inhibitorio de la STT sobre la liberación de PRL ($p=0,00017$ para STT vs C y $p=0,99$ para DH5+STT vs STT, fig 4.4.B).

4.E - Efecto de la DHEA y sus metabolitos sobre la liberación de GH, la movilización del calcio intracelular y la producción de AMPc inducidas por GHRH.

Un tratamiento de 3 hs con GHRH 1×10^{-8} M indujo un aumento de la liberación de GH por parte de células adenohipofisarias en cultivo ($p=0,00013$ para GHRH vs C, fig 4.5.A). El pretratamiento de 2 días con DHEA 1×10^{-5} ó 1×10^{-6} M incrementó significativamente este efecto ($p=0,0002$ y $p=0,00063$ para DH5+GHRH y DH6+GHRH vs GHRH, respectivamente). OH-DHEA y ADIOL no modificaron este efecto de la GHRH.

En células adenohipofisarias en suspensión, por otro lado, la respuesta de la concentración interna del calcio frente a un estímulo con GHRH 1×10^{-8} M consistió en un aumento del 21% en forma de meseta, que comenzó a los 15 ± 2 seg de la

aplicación del estímulo y persistió por al menos 3 min (fig 4.5.B). Un pretratamiento de 8 min con DHEA 1×10^{-5} M fue capaz de bloquear este aumento del calcio. El esteroide no alteró sin embargo el efecto despolarizante del potasio 25 mM.

Con respecto a la producción intracelular de AMPc, cuantificado por RIA, pudimos determinar que un pretratamiento de 2 días con DHEA aumentó el efecto estimulador de 30 min de GHRH 1×10^{-8} M sobre la producción de AMPc intracelular ($p=0,0002$ y $p=0,00063$ para DH5+GHRH y DH6+GHRH vs GHRH respectivamente, fig 4.5.C). Como control positivo de inducción de AMPc se utilizó un estímulo de 30 min con forskolina (estimulador de la adenilato ciclase) 5×10^{-7} M, el cual indujo un aumento significativo de este segundo mensajero (datos no presentados).

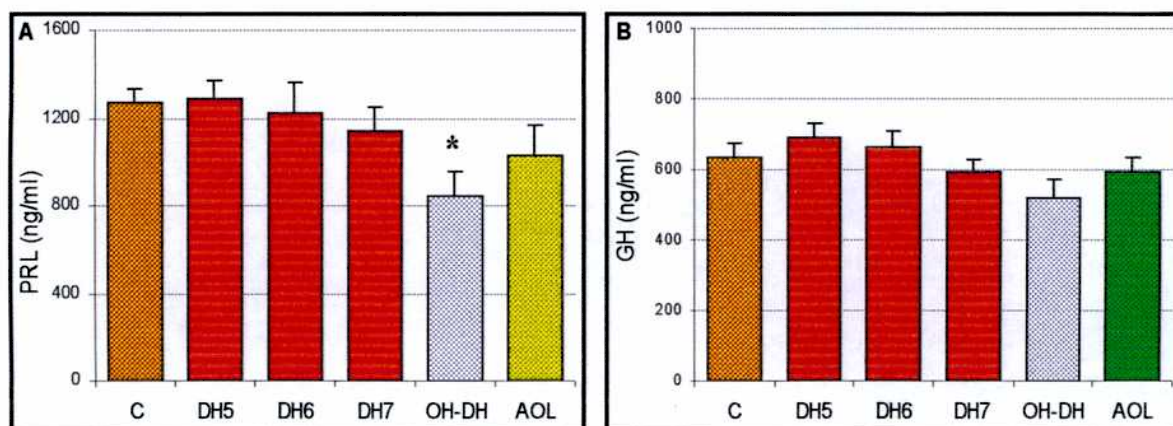


Figura 4.1: Efecto de un pretratamiento de 2 días con DHEA, OH-DHEA o ADIOL sobre la secreción basal de PRL (A) o GH (B) producida durante 3 hs y cuantificada por RIA, en células adenohipofisarias en cultivo primario provenientes de ratas hembra en diestro. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. DH5: DHEA 1×10^{-5} M, DH6: DHEA 1×10^{-6} M, DH7: DHEA 1×10^{-7} M, OH-DH: OH-DHEA 1×10^{-7} M y AOL: ADIOL 1×10^{-7} M. * $p < 0,05$ respecto del control. N=7.

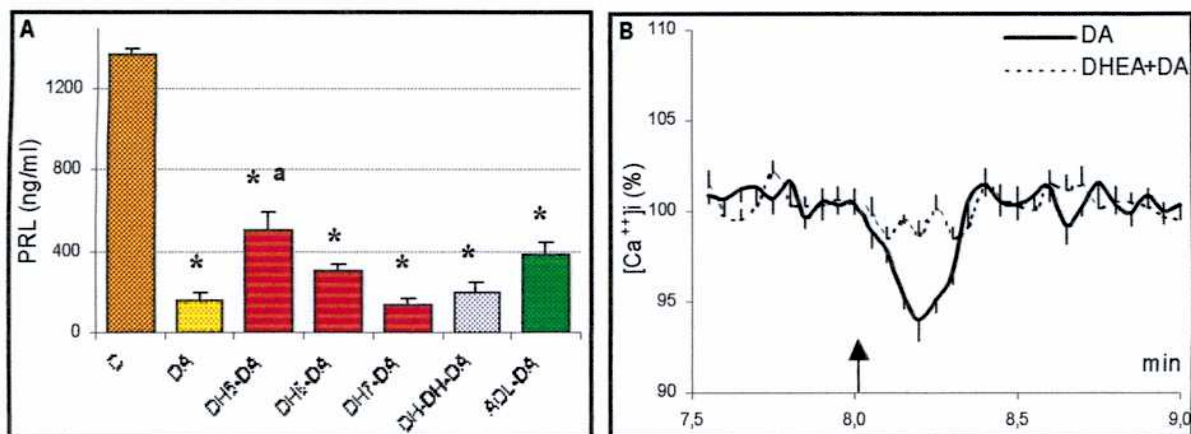


Figura 4.2.A: Efecto de un pretratamiento de 2 días con DHEA, OH-DHEA o ADIOL sobre la inhibición de la secreción de PRL inducida por 3 hs de DA 1×10^{-6} M, cuantificada por RIA, en células adenohipofisarias en cultivo primario provenientes de ratas hembra en diestro. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. C: liberación basal durante 3 hs. DH5: DHEA 1×10^{-5} M, DH6: DHEA 1×10^{-6} M, DH7: DHEA 1×10^{-7} M, OH-DH: OH-DHEA 1×10^{-7} M, AOL: ADIOL 1×10^{-7} M. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de DA. N=4. **B:** Movilización de calcio intracelular medida por espectrofluorometría en una suspensión de células adenohipofisarias pretratadas o no con DHEA 1×10^{-5} M por 8 min y luego estimuladas con DA 1×10^{-6} M (flecha). Los resultados se expresan como porcentaje de variación de la $[Ca^{++}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con DA. N=7.

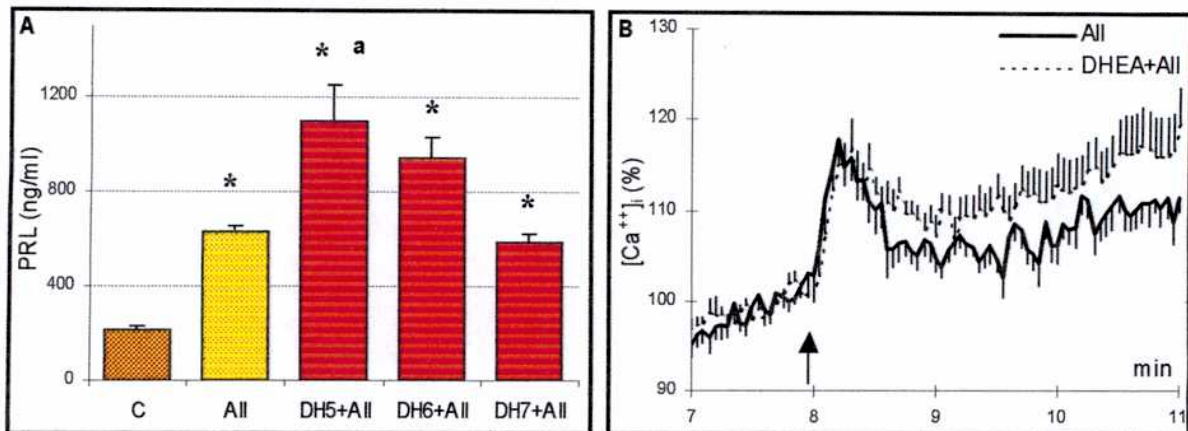


Figura 4.3.A: Efecto de un pretratamiento de 2 días con DHEA sobre la estimulación de la secreción de PRL inducida por 30 min de All 1×10^{-8} M, cuantificada por RIA, en células adenohipofisarias en cultivo primario provenientes de ratas hembra en diestro. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. C: liberación basal durante 30 min. DH5: DHEA 1×10^{-5} M, DH6: DHEA 1×10^{-6} M, DH7: DHEA 1×10^{-7} M. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de All. N=6. **B:** Movilización de calcio intracelular medido por espectrofluorometría en una suspensión de células adenohipofisarias pretratadas o no con DHEA 1×10^{-5} M durante 8 min y luego estimuladas con All 1×10^{-8} M (flecha). Los resultados se expresan como porcentaje de variación de la $[Ca^{2+}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se calculan a partir del promedio de los valores obtenidos durante los 20 seg previos a la estimulación con All. N=7.

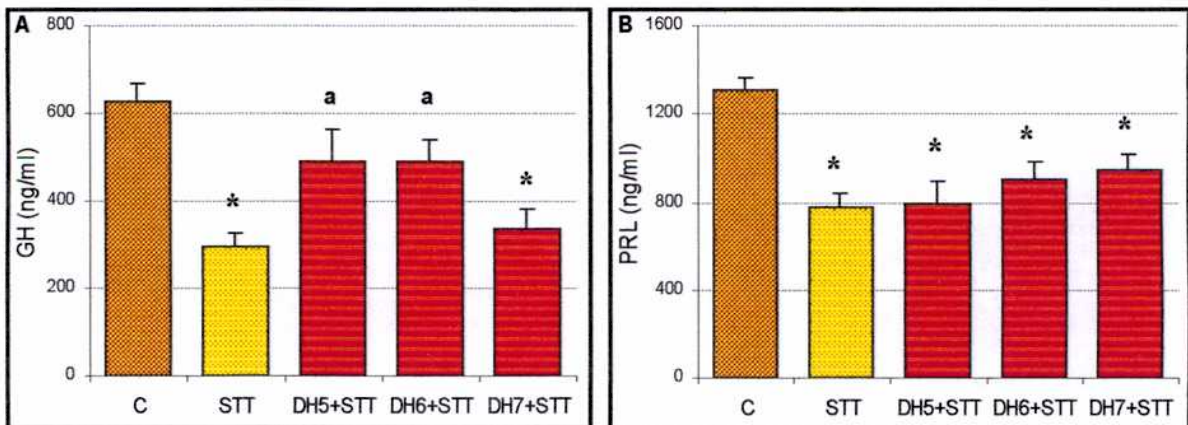


Figura 4.4: Efecto del pretratamiento de 2 días con DHEA sobre la inhibición de la secreción de GH (A) o PRL (B) inducida por 3 hs de STT 1×10^{-8} M, cuantificada por RIA, en células adenohipofisarias en cultivo primario provenientes de ratas hembra en diestro. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. C: liberación basal durante 3 hs. DH5: DHEA 1×10^{-5} M, DH6: DHEA 1×10^{-6} M, DH7: DHEA 1×10^{-7} M. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de STT. N=7.

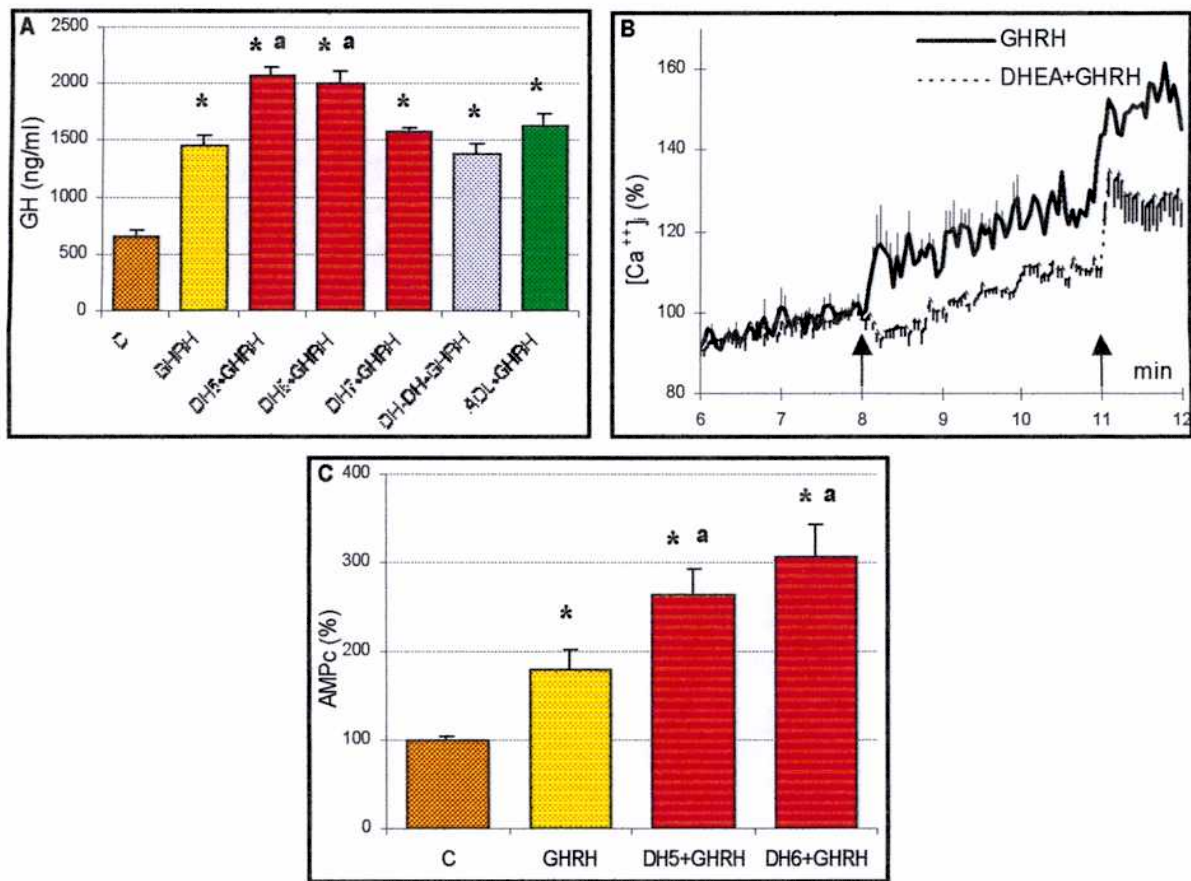


Figura 4.5.A: Efecto de un pretratamiento de 2 días con DHEA, OH-DHEA o ADIOL sobre la estimulación de la secreción de GH inducida por 3 hs de GHRH 1×10^{-8} M, cuantificada por RIA, en células adenohipofisarias en cultivo primario provenientes de ratas hembra en diestro. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. N=7. **B:** Movilización de calcio intracelular medido por espectrofluorometría en una suspensión de células adenohipofisarias pretratadas o no con DHEA 1×10^{-5} M durante 8 min y luego estimuladas con GHRH 1×10^{-8} M (primer flecha). La segunda flecha corresponde a un estímulo de KCl 25 mM. Los resultados se expresan como porcentaje de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por sobre los niveles basales, los cuales se toman a partir del promedio obtenidos 20 seg antes de la estimulación con GHRH. N=6. **C:** Efecto de un pretratamiento de 2 días con DHEA 1×10^{-5} M sobre la producción de AMPc intracelular inducido por 30 min de GHRH 1×10^{-8} M, cuantificado por RIA, en células adenohipofisarias en cultivo primario provenientes de ratas hembra en diestro. Los resultados se representan como la media $\pm$ ES. N=6. C: liberación basal durante 3 hs (A) o 30 min (C), DH5: DHEA 1×10^{-5} M, DH6: DHEA 1×10^{-6} M, DH7: DHEA 1×10^{-7} M, OH-DH: OH-DHEA 1×10^{-7} M y AOL: ADIOL 1×10^{-7} M. * $p < 0,05$ respecto del control. a: $p < 0,05$ respecto de GHRH.

Discusión

En la rata, las concentraciones plasmáticas de DHEA son menores que en el humano. Sin embargo este modelo animal ha sido ampliamente utilizado en el estudio de los efectos del tratamiento con este esteroide sobre numerosos desórdenes (Svec & Porter 1998), (Hinson & Raven 1999). En los últimos años hubo un fuerte resurgimiento del interés en DHEA debido a sus supuestos efectos de tipo antitumoral y rejuvenecedor. Sin embargo sus efectos fisiológicos no son aún demasiado conocidos y sus acciones a nivel farmacológico son aún controvertidas.

En el capítulo anterior describimos que, sobre la hipófisis, DHEA tiene varias acciones de tipo endócrino y metabólico que dependen del medio ambiente hormonal. De este modo, el efecto de este esteroide puede revertirse dependiendo del nivel estrogénico del entorno. Entre estas acciones de tipo dual se encuentra la capacidad de reducir parcialmente el aumento del peso hipofisario inducido por un tratamiento estrogénico crónico por un lado, y la de inducir levemente un aumento de este parámetro en ratas controles por el otro. Consecuentemente con esto, un tratamiento crónico con DHEA reduce la hiperprolactinemia inducida por el DES mientras que es capaz de elevarla levemente en las ratas normales.

Los resultados del presente capítulo apuntan a dilucidar la acción de DHEA directamente sobre la hipófisis y muestran también un efecto dual de la DHEA *in vitro* dependiendo del medio ambiente endócrino. DHEA *in vitro* fue capaz de reducir parcialmente la inhibición de la secreción de PRL inducida por la DA. De la misma forma *in vivo*, en los animales del grupo control con un sistema dopaminérgico intacto que controla la secreción de PRL, el efecto de DHEA es de tipo estimulatorio.

Por otro lado, DHEA *in vitro* en ausencia de DA no modifica la liberación basal de PRL mientras que uno de sus metabolitos, la OH-DHEA, inhibe la secreción. Asimismo, en las ratas tratadas con estrógenos *in vivo* en donde el tono dopaminérgico es bajo (Cramer *et al.* 1979; Jones & Naftolin 1990), el efecto de DHEA ya no es estimulatorio sino que, por el contrario, es parcialmente inhibitorio. Recordemos que la hipófisis está normalmente sometida a un tono dopaminérgico hipotalámico constante que se ve suspendido en el caso de la hiperplasia inducida por estrógenos. Por lo tanto nosotros proponemos que el efecto del tratamiento crónico con DHEA *in vivo* depende al menos en parte de la presencia o ausencia de este tono dopaminérgico inhibitorio.

En la Introducción General comentamos acerca de los mecanismos de transducción de señales que median el control dopaminérgico sobre la secreción de PRL, los cuales finalizan en una hiperpolarización de membrana por un aumento de las corrientes de potasio y una disminución de las de calcio. En nuestros experimentos, DHEA evita la caída de los niveles intracelulares de calcio inducida por la DA. Esto sugiere que el efecto antagonista de DHEA sobre la inhibición de la secreción de PRL inducida por la DA se daría a este nivel de movilización del calcio. Los estrógenos inducen una elevación de PRL por medio de, entre otras cosas, una disminución de la sensibilidad del lactotrofo a la DA. Esto parece también ocurrir con DHEA, por lo que este esteroide en este caso tendría un efecto estrogénico.

Como ya mencionamos ampliamente en la Parte I de esta tesis, AII contribuye a la regulación fisiológica de la secreción de PRL induciendo su liberación tanto *in vitro* como *in vivo* (Diaz-Torga *et al.* 1994; Diaz-Torga *et al.* 1998). De acuerdo a los resultados de este capítulo, la acción estimuladora de AII sobre la secreción de PRL se ve incrementada por el pretratamiento con DHEA. Ya había sido descrito que la sensibilidad hipofisaria a AII es modulada por hormonas esteroideas y está relacionada con el sexo del animal (Diaz-Torga *et al.* 1998; Lachowicz & Rebas 2002). Los estrógenos, sin embargo, reducen la sensibilidad del lactotrofo a la acción secretora de AII.

En el capítulo II demostramos que, en la secreción de PRL mediada por AII, la movilización intracelular de calcio es un elemento fundamental. Además, este catión participa en la desensibilización homóloga y heteróloga de esta secreción (Gonzalez-Iglesias *et al.* 2001) así como en la alteración de la respuesta al octapéptido que se produce en la hiperplasia (Diaz-Torga *et al.* 1998). Sin embargo, en nuestros experimentos *in vitro*, a pesar de que DHEA potencia la liberación de PRL mediada por AII, no altera en forma significativa la movilización intracelular de calcio inducida por el octapéptido. Esto nos sugiere que el efecto potenciador de DHEA sobre la secreción de PRL no estaría siendo mediado por el calcio. Considerando estos resultados junto con los del capítulo anterior, proponemos que el efecto liberador de PRL que ejerce la DHEA *in vivo* está relacionado con un antagonismo de la inhibición dopaminérgica y una facilitación de la estimulación por AII a nivel del lactotrofo.

El tratamiento *in vivo* de nuestros prolactinomas evidenció que, bajo ciertas circunstancias como una situación de estrés inducido por el éter, DHEA induce un incremento de los niveles séricos de GH. Nos interesó por lo tanto estudiar la posible modulación por parte de este esteroide de la secreción de GH inducida *in vitro* por GHRH y STT. Nuestros resultados indican que DHEA no modifica la secreción basal de GH pero sí incrementa el efecto liberador de la GHRH. Se ha descrito que los efectos de este factor liberador están mediados por numerosos sistemas de segundos mensajeros intracelulares incluyendo, entre otros, la producción de AMPc y la movilización de calcio (Anderson *et al.* 2004; Müller *et al.* 1999).

La producción de AMPc inducida por GHRH está asociada a la activación de una proteína Gs, mientras que el aumento del calcio se debería al influjo de este catión a través de canales de calcio voltaje dependientes (Lussier *et al.* 1991). En nuestro trabajo, DHEA incrementó *in vitro* la producción de AMPc a nivel hipofisario en respuesta a GHRH aunque, por otro lado, evitó el aumento del calcio intracelular inducido por este mismo factor. Esto estaría indicando que, en nuestro modelo, el efecto facilitador de DHEA sobre la liberación de GH inducida por GHRH estaría mediado por el AMPc y no por el calcio.

DHEA demostró reducir la acción inhibitoria de la STT sobre la secreción de GH hipofisaria. El mecanismo descrito para la acción de este péptido sobre la secreción celular también involucra, como en el caso de DA, una hiperpolarización de membrana mediada por la activación de canales de potasio y por un bloqueo de canales de calcio voltaje dependientes. Nosotros intentamos medir variaciones de la concentración intracelular del calcio en respuesta a la STT. Sin embargo, pensamos que nuestro sistema de suspensión celular no es lo suficientemente sensible como para evidenciarlas.

Los estrógenos, en cultivos celulares de ratas hembra, reducirían la sensibilidad del somatotropo a la acción de la STT (Hertz *et al.* 1989). Por lo tanto, DHEA estaría mostrando nuevamente, como en el caso de DA, un efecto estrogénico. Estos resultados podrían estar relacionados con los ya descritos en el capítulo anterior, en cuanto a que el estrés por éter induce en las ratas controles una inhibición de la GH sérica, mediada por un aumento de STT, la cual es revertida parcialmente por el tratamiento con esteroides.

Enlazando los resultados de este capítulo con los del anterior, podemos decir que el tratamiento con DHEA *in vivo* podría estar induciendo una mayor liberación de GH en las ratas sometidas a estrés con respecto a las controles al reducir la respuesta inhibitoria del somatotropo a la somatostatina y al aumentar su sensibilidad a la acción estimuladora de la GHRH.

Considerando las acciones estrogénicas de DHEA sobre la modulación del efecto de los inhibidores hipotalámicos DA y STT, junto con datos previos que indican una acción directa de este esteroide sobre receptores estrogénicos hipofisarios, pensamos que el efecto modulador de DHEA sobre la secreción de PRL y GH a nivel de esta glándula se daría, al menos en parte, a través de receptores estrogénicos. DHEA podría estar actuando como un estrógeno débil que compite por su receptor. De este modo, actuando sola presenta efectos levemente estrogénicos mientras que en combinación con el DES es capaz de antagonizarlos parcialmente evidenciando una acción de tipo androgénica. Un efecto similar sobre receptores estrogénicos fue descrito para el ADIOL (Poortman *et al.* 1975).

Los principales derivados metabólicos de DHEA en diferentes tejidos, OH-DHEA y ADIOL, no evidenciaron los mismos efectos que DHEA en la hipófisis normal, por lo que podemos inferir que la acción de DHEA a nivel hipofisario es en gran parte directa y no mediada por sus principales metabolitos. Aunque no podemos descartar la producción de otros derivados con acción local, creemos que el efecto no sería ejercido directamente por estrógenos, ya que en la hipófisis normal de hembra prácticamente no existe la aromatasa. Experimentos adicionales serían necesarios para determinar con mayor exactitud el metabolismo y modo de acción de DHEA a nivel hipofisario.

Concluyendo, podemos decir que DHEA *in vitro*, actuando directa o indirectamente a través de sus metabolitos, es capaz de modular la respuesta hormonal de la hipófisis a sus reguladores hipotalámicos y/o intrahipofisarios. De esta manera puede aumentar la liberación de PRL a través de una reversión parcial de la inhibición dopaminérgica y de una facilitación de la acción secretora de AII. Por otro lado, DHEA puede también inducir la secreción de GH reduciendo la acción inhibitoria de la STT y estimulando el efecto liberador de la GHRH. Esta última

influencia parece estar relacionada con el AMPc y no con el calcio como segundo mensajero.

Estos resultados encontrados *in vitro* se relacionan con los hallados *in vivo* y describen por primera vez el mecanismo de acción de DHEA sobre células adenohipofisarias aisladas. Asimismo pueden contribuir a la explicación de las actuales controversias existentes en relación a la acción de DHEA sobre algunos tipos de tumores, especialmente estrógeno-dependientes, y a los efectos secundarios que muchas veces presenta un tratamiento crónico con este esteroide.

DISCUSSION

GENERAL

DISCUSION GENERAL

La presente tesis doctoral se encuadra dentro del contexto de los factores moduladores que participan de la regulación hipofisaria normal y tumoral. En ella nos propusimos enfocar el estudio de algunos factores que consideramos interesantes en esta modulación: la angiotensina II, la progesterona y la dehidroepiandrosterona. La primera en base a sus acciones relacionadas con la secreción hormonal, la proliferación celular y la angiogénesis; la P4 debido a sus postulados efectos antiestrogénicos; y la DHEA por la extensa bibliografía existente acerca de su capacidad antitumoral y protectora ante numerosas enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Analizamos, por lo tanto, la participación de AII en la génesis tumoral y el posible rol terapéutico de la P4 y la DHEA.

Los tumores hipofisarios son las neoplasias intracraneales más frecuentes en el ser humano (Arafah & Nasrallah 2001). La mayoría de estos adenomas son de origen monoclonal. Sin embargo, luego de una mutación o transformación celular inicial cobra especial importancia la modulación del crecimiento tumoral ejercida por diferentes neurohormonas hipotalámicas, hormonas periféricas y factores de crecimiento de acción local. Por lo tanto, lo que se sostiene en la actualidad es que el tumor hipofisario es el resultado de un proceso de pasos múltiples que involucra a nivel celular la desregulación de la proliferación, la diferenciación y la secreción hormonal y, a nivel tisular, la angiogénesis. Este último proceso es fundamental en la expansión de la masa tumoral y en la generación de metástasis.

Los prolactinomas o adenomas de lactotopos son los tumores hipofisarios más frecuentes y cursan con hiperprolactinemia. Pueden conducir, tanto en la mujer como en el hombre, a la esterilidad, pérdida de densidad ósea, osteoporosis y diversos grados de hipopituitarismo. En la mayoría de los casos surgen como microadenomas que, de no ser diagnosticados y tratados a tiempo, pueden transformarse en macroadenomas e invadir estructuras cercanas. A este nivel de desarrollo tumoral se comienzan a manifestar síntomas típicos de una compresión mecánica intracraneal. Sin embargo, aunque suelen sufrir angiogénesis, raramente se vuelven metastásicos, por lo que en general se los considera de tipo benigno.

Los lactotopos expresan el receptor de estrógenos en mayor densidad que el resto de los tipos celulares hipofisarios, por lo que son especialmente sensibles a

ellos. Los estrógenos inducen la proliferación y diferenciación de este tipo celular así como una mayor síntesis y secreción de PRL (Lieberman *et al.* 1981) y una menor respuesta a la acción inhibitoria de la DA hipotalámica (Raymond *et al.* 1978). Además, son inductores de angiogénesis.

Por lo tanto, la utilización de estrógenos representa una interesante herramienta para el estudio de la promoción y progresión de tumores hipofisarios experimentales. De este modo se ha desarrollado un modelo de prolactinoma en rata provocado por un tratamiento estrogénico crónico que se evidencia a partir de la cuarta semana de tratamiento por una hiperplasia e hipertrofia de lactotopos, asociada a una hiperprolactinemia (De Nicola *et al.* 1978). Hacia la sexta semana, la hiperplasia desarrolla angiogénesis y se convierte en un adenoma (tumor glandular de tipo benigno) (Elias & Weiner 1984). Consideramos que este es un buen modelo tanto para el estudio de los mecanismos tumorigénicos como para el abordaje de nuevas posibilidades terapéuticas.

La AII es un octapéptido sintetizado principalmente en sangre periférica a través del SRA sistémico y participa activamente de la regulación cardiovascular. Asimismo, en diferentes tejidos existen SRA locales, que intervendrían en regulaciones finas tisulares relacionadas o no con la función sistémica. Además de su acción hipertensora, la AII está involucrada en otros procesos biológicos importantes como el crecimiento tisular, la angiogénesis, la secreción hormonal y la facilitación sináptica. En la hipófisis, la AII es sintetizada en el gonadotropo y actúa parácrina y principalmente sobre el lactotopo estimulando la secreción de PRL (Suarez *et al.* 2002).

Se han identificado dos subtipos principales de receptores de AII: el AT1 y el AT2. La mayoría de las acciones biológicas descritas para AII en la literatura son mediadas por el receptor AT1. En hipófisis de rata se ha descrito principalmente la presencia de AT1b en el lactotopo, con una expresión mucho menor de AT1a y AT2 (Lenkei *et al.* 1999), (Suarez *et al.* 2004). El receptor AT2 es muy distinto del AT1 tanto estructural como funcionalmente. Además de compartir una baja homología, las vías de señalización y los efectos descritos para él son marcadamente diferentes a los mediados por AT1. La expresión de AT2 es alta en tejidos embrionarios y fetales en estado de alta proliferación y diferenciación, así como en tejidos adultos en regeneración luego de heridas, en patologías que involucran

proliferación y diferenciación celular o en tejidos con una alta tasa de remodelación asociada con el ciclo estral (Unger 1999). Por otro lado, su expresión en tejido adulto ya diferenciado y con una tasa de crecimiento relativamente baja es en general significativamente menor a la de AT1.

Funcionalmente, aunque se lo conoce en mucho menor medida que al AT1, se ha descrito al AT2 como modulador de procesos biológicos relacionados con el desarrollo, la proliferación y diferenciación celular, la reparación tisular y la apoptosis (Kaschina & Unger 2003), (Csikos *et al.* 1997). En numerosos estudios se ha observado que AII a través del subtipo AT2 tiene efectos opuestos a los mediados por AT1, lo que sugiere que funcionaría en muchos casos como un control contrapuesto a las acciones de AII de tipo estimulatorio vía AT1. De este modo, se ha descrito a AT2 como inhibidor de la proliferación celular, factor apoptótico, antiangiogénico y vasodilatador.

Los estrógenos pueden modular numerosos aspectos del SRA, tanto a nivel periférico como hipofisario (Brosnihan *et al.* 1997), (Stavreus-Evers *et al.* 2001), (Seltzer *et al.* 1992). Entre otras cosas, pueden incrementar en sangre e hipotálamo los niveles de AO. De este modo, un tratamiento estrogénico crónico produciría una elevación de la concentración local de AII en hipófisis. Esta influencia estrogénica sobre el SRA es interesante porque plantea a este sistema y a AII como posibles mediadores locales de los efectos estrogénicos de tipo proliferativo, angiogénico y prolactino-liberador sobre la hipófisis.

Trabajos previos de nuestro laboratorio ya habían detectado alteraciones hipofisarias de la respuesta a AII inducidas por un tratamiento estrogénico crónico (Diaz-Torga *et al.* 1998). Entre ellas, una reducción de la secreción de PRL en respuesta a AII, posiblemente debido a una merma de los receptores AT1 y a un patrón de movilización interna de calcio significativamente alterado. Los resultados de la presente tesis revelan nuevas alteraciones relacionadas con AII en la hipófisis hiperplásica. Entre ellas, encontramos que la expresión del receptor AT1 en la adenohipófisis tumoral se encuentra significativamente disminuida mientras que la del subtipo AT2 se encuentra significativamente incrementada respecto a una hipófisis de hembra en diestro. Ya se conocía anteriormente la modulación de los receptores de AII por estrógenos, pero sólo respecto a la regulación negativa de

AT1. Nuestro hallazgo de que AT2 se viera sobreexpresado en la hipófisis luego de un tratamiento estrogénico es un hecho novedoso.

El tratamiento crónico con estrógenos, al inducir un aumento en la concentración hipofisaria de AII, puede estar provocando una desensibilización del receptor AT1 (por internalización de receptor, inhibición de su expresión o de los mecanismos de transducción de señales, como demostráramos en un trabajo previo (Gonzalez-Iglesias *et al.* 2001)). Es conocido que el nivel de desensibilización es muy alta para el AT1 en comparación con el de AT2. Por otro lado, la propia sobreexpresión de AT2 inducida por los estrógenos podría estar reprimiendo la expresión de AT1 a través de un entrecruzamiento intracelular entre ambas vías de señalización (Armando *et al.* 2002b), (Tanaka *et al.* 1999). Es decir, el aumento de AII inducido por los estrógenos quedaría ahora más expuesto a actuar a través de los receptores AT2.

Existe actualmente abundante evidencia de la activación de vías de tirosín-kinasas por GPCRs. Aunque AT1 es un receptor de siete dominios transmembrana y su principal vía de acción es a través de la activación de proteínas G (es un GPCR), se ha observado en diferentes tejidos que también puede inducir la activación de la vía JAK/STAT y de la vía de las MAPKs ERK1/2, muy relacionadas con la proliferación celular a través de la activación de protooncogenes como c-jun y c-fos (Touyz & Berry 2002). Esta activación oncogénica mediaría en muchos casos los efectos proliferativos y angiogénicos de AII.

En la presente tesis nosotros demostramos la fosforilación y por lo tanto activación de ERK1/2 en hipófisis en respuesta a AII, lo cual hasta el momento no había sido detectado. Además, observamos que el calcio es importante en esta respuesta, por lo que no era de extrañar que la alteración del patrón de movilización interna del calcio presente de la hipófisis tumoral se correspondiera con una alteración en la fosforilación de ERK1/2. Coincidentemente con esto observamos una menor y más tardía fosforilación de ERK1/2 en respuesta a AII en la hipófisis tumoral. Por otro lado, encontramos una alteración en la participación funcional de los receptores involucrados. En la glándula normal, esta fosforilación estaría mediada sólo por el receptor AT1. Sin embargo, el tratamiento estrogénico estaría induciendo la activación de ERK1/2 también a través del subtipo AT2, aunque en este caso la respuesta sería independiente de la movilización interna de calcio.

Estos resultados son de mucho interés, ya que es la primera descripción de una “participación funcional” de los receptores AT2 en la hipófisis.

El hecho de que se produjera la sobreexpresión de AT2 en el prolactinoma es interesante porque podría estar relacionado con un rol regulatorio de este subtipo de receptor, como ya fue sugerido en otros tejidos. El aumento de AT2 se correlaciona con una menor expresión de AT1, una menor activación de ERK1/2 en respuesta a AII y la participación de AT2 en esta respuesta. Por lo tanto, la activación de una nueva vía dependiente de AT2 en la hipófisis tumoral, aunque también está induciendo la fosforilación de ERK1/2, parecería estar reduciendo de alguna manera la eficiencia neta de fosforilación en respuesta a AII ejercida a través del receptor AT1.

Ya habíamos descrito previamente que AII en hipófisis era capaz de inducir secreción de PRL a través de un aumento del calcio intracelular (Suarez *et al.* 2002). Sin embargo, la cascada de transducción de señales involucrada en la fosforilación de ERK1/2 por AII en hipófisis no había sido hasta el momento dilucidada. En general, la activación de ERK1/2 por un GPCR es un mecanismo no tan bien estudiado como el derivado de un RTK. Nosotros hemos demostrado por primera vez que, en células adenohipofisarias normales, la fosforilación de ERK1/2 por AII es un proceso dosis y tiempo-dependiente que alcanza un máximo a los 5 min de estimulación y a una concentración de agonista de 10-100 nM. Luego de la obtención de estos datos nos propusimos determinar la cascada de señales involucrada en la hipófisis normal, utilizando distintos bloqueantes específicos de cada uno de los pasos posiblemente involucrados.

De esta manera, y en base a nuestros resultados, postulamos una vía de activación de ERK1/2 mediada por AII en hipófisis. El modelo propuesto es el siguiente (fig 2.12): la unión de AII con su receptor AT1 induciría la activación de una proteína Gq, la cual activaría a la PLC- β y ésta, al producir IP₃, elevaría el calcio intracelular proveniente del retículo sarcoplásmico. Este aumento del calcio, posiblemente a través de una kinasa sensible a este catión como la PyK2, activaría una tirosín kinasa no receptora de la familia Src. La Src sería la responsable directa de la transactivación del EGFR, el cual activaría a través de sus proteínas de acople el resto de la cascada de las MAPKs conducentes a ERK1/2: Ras, Raf y MEK1/2. La

Src podría estar también activando la vía directamente a través de Ras, como se postula en otros sistemas.

El esclarecimiento del mecanismo de acción de All sobre la activación de las ERK1/2 en hipófisis puede aportar a la comprensión de algunos aspectos críticos de la acción del péptido en esta glándula, como la proliferación y la angiogénesis, que están a su vez muy relacionados con los procesos tumorigénicos.

En esta tesis hemos por lo tanto descripto dos nuevas alteraciones producidas en el prolactinoma en relación con la respuesta a All que evidencian la influencia estrogénica sobre el SRA hipofisario: un cambio en la expresión relativa de sus receptores y una menor respuesta de activación de ERK1/2. La fosforilación de estas kinasas mediada en parte por AT2 en la hipófisis tumoral es la primer evidencia de su presencia “funcional” en la glándula. Por otro lado, la participación de AT2 parecería estar indicando una vez más una acción regulatoria de este receptor sobre los efectos de All mediados por AT1, de tipo estimulatorio, como ha sido ya descripto en otros tejidos. El hecho de que los estrógenos puedan ejercer una regulación dual sobre ambos subtipos de receptores de All enfatiza la importancia de comprender la naturaleza compleja y multifacética de la acción estrogénica sobre los procesos tumorigénicos, la fisiología cardiovascular y la reproducción.

El tratamiento de los tumores hipofisarios humanos apunta básicamente a tres objetivos principales: controlar el crecimiento de la masa tumoral, controlar los síntomas clínicos y bioquímicos del exceso de secreción hormonal y preservar las funciones hipofisarias normales (Arafah & Nasrallah 2001). Estos objetivos se logran muchas veces a través de tratamientos farmacológicos, quirúrgicos y/o radiológicos. Sin embargo, en muchos casos no se logra eliminar totalmente el tumor en forma definitiva sino que éste suele reaparecer si se suspende la terapia farmacológica, aún luego de una cirugía. En otros casos, los prolactinomas resultan resistentes a los tratamientos con agonistas dopaminérgicos. Por lo tanto, aún se continúa en la búsqueda de terapias farmacológicas más efectivas o complementarias.

Se ha descripto que el tratamiento con P4 sería capaz de inhibir los efectos proliferativos inducidos por los estrógenos en diferentes tejidos así como la expresión génica de PRL en la hipófisis (Hsueh *et al.* 1975), (Cho *et al.* 1993). Sin embargo, en nuestro modelo de prolactinoma inducido por estrógenos el tratamiento

con P4 no logró revertir la hiperplasia hipofisaria, la hiperprolactinemia ni la caída del peso corporal. En relación con la respuesta a AII, este esteroide tampoco alteró los patrones de expresión de sus receptores ni la movilización interna del calcio inducida por el octapéptido.

Aunque no fue capaz de revertir los principales parámetros asociados con el desarrollo tumoral, encontramos que la P4 aumentó la secreción basal de PRL *in vitro* en ratas hembra normales y sinergizó con los estrógenos para estimular la liberación de PRL en respuesta a AII. El receptor de AII descrito hasta el momento como involucrado en la respuesta de liberación de PRL es el AT1. Sin embargo, nosotros describimos por primera vez que en ratas con tumor hipofisario tratadas con P4 el receptor AT2 también está participando de la respuesta. Este efecto parece requerir la exposición combinada a ambos esteroides y sería la segunda evidencia de una "participación funcional" de este subtipo de receptor en la hipófisis. Por lo tanto, podemos decir que AT2, aumentado en la hiperplasia hipofisaria, participaría junto con el AT1 en la activación de ERK1/2 y en la liberación de PRL inducidas por AII. En este último caso, sin embargo, sería necesario la acción combinada de la P4 para que la participación del AT2 logre evidenciarse.

Estos resultados pueden ser de gran importancia clínica en la evaluación de los posibles efectos secundarios de las terapias de reemplazo hormonal basadas en los estrógenos combinados o no con la P4, así como en relación con la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis, la hipertensión o incluso el ataque cardíaco congestivo, en donde la interrelación entre los estrógenos y el SRA es fundamental. Sin embargo los resultados obtenidos, aunque pusieron nuevamente en evidencia la funcionalidad del receptor AT2, nos indican que en nuestro modelo la P4 no evidencia tener efectos significativos en cuanto a la posible reversión de las alteraciones producidas por el tratamiento estrogénico. Por lo tanto decidimos analizar en la segunda parte de esta tesis la acción de otro esteroide con postuladas acciones benéficas y antitumorales: la DHEA.

La DHEA y su principal metabolito, la DHEA-S, son los esteroides de mayor concentración en el plasma humano. Sus niveles sanguíneos se encuentran significativamente disminuídos en numerosas patologías, sin embargo, su rol fisiológico aún no está del todo definido (Kroboth *et al.* 1999). DHEA es sintetizada principalmente en la glándula suprarrenal a partir de la pregnenolona por acción de

la 17 α -hidroxilasa y puede ser metabolizada localmente a OH-DHEA, ADIOL o ADIONA. Finalmente, estos andrógenos pueden ser directa o indirectamente aromatizados a estrógenos. Por lo tanto DHEA, además de poder actuar directamente sobre receptores androgénicos o estrogénicos, puede ser una precursora local de andrógenos y de estrógenos, lo que complica el análisis de sus acciones directas. La influencia del medio ambiente hormonal hace aún más complejo el análisis.

En los roedores las concentraciones plasmáticas de DHEA son bastante menores que en humanos. Sin embargo, este modelo animal ha sido ampliamente utilizado en el estudio de los efectos del tratamiento con este esteroide sobre numerosos desórdenes. DHEA ha demostrado tener acciones benéficas inhibitorias de la promoción y progresión de diferentes tipos de tumores experimentales en una gran variedad de órganos. Se ha descrito que, cuando se la administra en dosis farmacológicas y tiempos prolongados, es capaz de inhibir procesos tumorigénicos en piel, pulmón, hígado, colon, mama y próstata (Schwartz *et al.* 1986). Entre otros efectos benéficos adjudicados a DHEA se encuentra su capacidad protectora ante patologías asociadas al envejecimiento, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, obesidad y decadencia cognitiva; así como ante enfermedades de tipo autoinmune, el estrés y la depresión.

Se han realizado numerosos estudios, tanto sobre animales como sobre humanos, para determinar si la administración de esta hormona podría ser útil en la prevención de la aparición estos desórdenes, en especial en personas de edad (Morales *et al.* 1994). Debido a sus efectos estrogénicos, también se ha propuesto a DHEA como un efectivo agente para terapias de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas. Actualmente en los Estados Unidos se la publicita como una panacea antitumoral y como la "hormona de la juventud".

Sin embargo, la acción terapéutica de DHEA aún es controvertida. Muchos aún dudan de que sus efectos sean clínicamente beneficiosos y sostienen que aún hay insuficiente información acerca de los efectos secundarios del uso prolongado de DHEA (Nippoldt & Nair 1998). Aunque parece ser un inhibidor de la proliferación celular *in vivo* e *in vitro*, su propia actividad de tipo estrogénico podría limitar su utilización en la quimioprevención. Al respecto se le han descrito efectos de tipo estimulatorio sobre ciertos tipos de tumores estrógeno-dependientes, como algunos

tumores ováricos o mamarios. Bajo tratamientos farmacológicos prolongados, DHEA demostró en algunos casos ser uterotrófica, inducir hipertrofismo hepático, producir quistes ováricos, desregular el ciclo estral y elevar las concentraciones séricas de hormonas sexuales e IGF-1.

En hipófisis los efectos descritos hasta el momento son de tipo estrogénico (Simard *et al.* 1988), (García de Yébenes *et al.* 1995). Entre ellos se encuentra la capacidad de inducir un aumento del contenido celular de PRL y GH, un aumento de la secreción de LH en respuesta a GnRH y una disminución de la liberación de DA por parte de neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato hipotalámico. Por otro lado, DHEA revierte en adenohipófisis la caída que se produce en los niveles de POMC con el envejecimiento. Sin embargo, hasta el momento no se había evaluado la acción de DHEA sobre el prolactinoma inducido por estrógenos.

En base a las controversias existentes en la bibliografía sobre el rol terapéutico de DHEA en diferentes tipos de tumores y a los efectos estrogénicos que se le describen en algunos casos, nos resultó interesante estudiar el efecto de este esteroide en nuestro modelo. Específicamente, evaluamos su acción sobre el peso corporal, el peso hipofisario, el ciclo estral de la rata hembra y los niveles hormonales de PRL, GH, IGF-1 y LEP durante el tratamiento.

Los resultados obtenidos luego de un tratamiento crónico con DHEA nos mostraron que, en un medio de bajos estrógenos, DHEA tiene un efecto de tipo estrogénico estimulando levemente la hiperplasia hipofisaria, aumentando la prolactina sérica y produciendo una leve pérdida del peso corporal. Por otro lado, en un medio de abundancia estrogénica, es capaz de antagonizar parcialmente la hiperplasia hipofisaria, la hiperprolactinemia y la pérdida de peso corporal inducidos por el estrógeno sintético DES. El hecho de que en presencia de altos niveles estrogénicos el rol de DHEA pueda invertirse estaría indicando que el medio ambiente endócrino es capaz de condicionar en gran medida su acción.

Aparentemente, la capacidad de DHEA de inhibir a la G6PDH y la vía de las pentosas sería una de las claves en su acción antimitótica y antitumoral al reducir la disponibilidad celular de poder reductor y consecuentemente la iniciación y promoción de procesos tumorigénicos (Gordon *et al.* 1987). También sería de importancia su capacidad antioxidante, al aumentar la proliferación de peroxisomas y la síntesis de sus enzimas y al disminuir los radicales libres del medio ambiente

celular. En cuanto al efecto adelgazante de DHEA, numerosos mecanismos han sido propuestos que también estarían relacionados con una disminución del poder reductor. Entre ellos, una reducción de la adipogénesis y la lipogénesis y un aumento de la termogénesis hepática. El efecto de DHEA sobre la ingesta aún resulta contradictorio. En particular en nuestro modelo experimental la administración de este esteroide no tuvo efecto sobre los niveles séricos de LEP, hormona inhibitoria de la ingesta.

En cuanto a la secreción de GH, observamos que tanto el DES como la DHEA revierten la caída de sus niveles plasmáticos inducida por el estrés por éter. Este tipo agudo de estrés aumenta la secreción de PRL y disminuye la de GH. De acuerdo con estos resultados, DHEA estaría evidenciando también aquí un efecto estrogénico y protector ante el estrés. Por otro lado, en nuestro modelo experimental el tratamiento con DHEA no modificó los niveles sanguíneos de IGF-1 y LEP en ratas normales ni revirtió la acción estrogénica sobre estas hormonas. Por otro lado, este tratamiento tampoco tuvo efecto sobre el ciclo estral de la rata.

Los efectos observados en nuestro modelo nos sugieren que DHEA podría estar actuando como un estrógeno débil evidenciando efectos estrogénicos cuando actúa sola pero antagonizando estos mismos efectos en combinación con el DES, posiblemente a través de una competencia por los receptores de estrógenos. Este modo de acción explicaría en parte los resultados de tipo bifásico observados, así como la acción homeostática y regulatoria descrita por nosotros y por otros autores tendiente a mantener distintos parámetros fisiológicos dentro de un rango normal y saludable.

El metabolismo de DHEA en la hipófisis no ha sido descrito hasta el momento. Se sabe que el aumento del contenido celular de PRL y GH inducido por este esteroide puede ser bloqueado por antiestrógenos (Simard *et al.* 1988), por lo tanto en nuestro modelo podría estar actuando directamente a través de receptores estrogénicos. Sin embargo, no debemos descartar su acción a través de derivados (androgénicos o estrogénicos) localmente sintetizados. En la hipófisis de hembra normal la presencia de aromatasa es prácticamente nula, pero esta enzima sí se halla presente en los prolactinomas. Por otro lado, se sabe que la hidroxilación de DHEA o de ADIOL por introducción de un grupo α -hidroxilo por parte de la CYP7B

reduce considerablemente la capacidad de estos esteroides de competir con el estrógeno por su receptor (Li *et al.* 1978).

Considerando estos datos y los resultados obtenidos luego del tratamiento *in vivo*, decidimos estudiar en mayor profundidad la acción de DHEA y determinar si los efectos observados podrían estar asociados a una acción directa de este esteroide o de alguno de sus principales metabolitos a nivel hipofisario. Para esto realizamos cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembra en diestro y evaluamos el efecto de DHEA, OH-DHEA y ADIOL sobre la secreción de PRL y GH hipofisarias *in vitro*, en combinación con secretagogos o inhibidores hipotalámicos de estas hormonas como DA, AII, STT y GHRH. Además, analizamos si DHEA era capaz de modular la producción de segundos mensajeros como el calcio y el AMPc en respuesta a estos estímulos.

DHEA *in vitro* no modifica la liberación basal de PRL ni de GH. Sin embargo, este esteroide es capaz de modular la respuesta hormonal hipofisaria a reguladores hipotalámicos e intrahipofisarios. En cultivo celular adenohipofisario, DHEA aumentó la liberación de PRL a través de una reversión parcial de la inhibición dopaminérgica y de una facilitación de la acción secretoria de AII. Por otro lado, fue capaz también de inducir la secreción de GH reduciendo la acción inhibitoria de la STT y estimulando el efecto liberador de la GHRH. La influencia sobre la modulación dopaminérgica involucraría una alteración en el patrón de movilización interna del calcio, mientras que la influencia sobre la modulación ejercida por la GHRH involucraría al AMPc. Estos resultados obtenidos *in vitro* también evidencian un efecto dual de DHEA dependiendo del medio ambiente endócrino y explican en parte los observados *in vivo*.

De esta manera, en animales del grupo control con un sistema dopaminérgico intacto que controla la secreción de PRL, un tratamiento crónico con DHEA *in vivo* estimula la liberación de esta hormona. Del mismo modo el efecto de la aplicación de DHEA *in vitro* en un cultivo adenohipofisario estimulado con DA también es de tipo estimulatorio. Por otro lado, en las ratas tratadas con estrógenos *in vivo* en donde el tono dopaminérgico es bajo, el efecto de DHEA ya no es estimulatorio sino que, por el contrario, es de tipo inhibitorio. En correlación con esto DHEA *in vitro*, en ausencia de DA, no modifica la liberación basal de PRL pero uno de sus principales metabolitos, la OH-DHEA, la inhibe. Por lo tanto proponemos que el resultado del

tratamiento crónico con DHEA *in vivo* está relacionado con un antagonismo de la inhibición dopaminérgica y una facilitación de la estimulación por AIH a nivel del lactotrofo. No descartamos sin embargo la acción adicional de DHEA sobre circuitos hipotalámicos.

Con respecto a la GH, los resultados del tratamiento *in vivo* también pueden ser correlacionados con los obtenidos *in vitro*. Bajo condiciones de estrés agudo inducido por el éter, en donde se produce un aumento de la secreción de STT, DHEA *in vivo* evidencia un efecto de tipo estimulatorio que revierte la caída de la GH sérica. *In vitro*, la aplicación de este esteroide incrementa el efecto liberador de la GHRH sobre la secreción de la GH hipofisaria y reduce la acción inhibitoria de la STT. El efecto liberador que ejerce DHEA *in vivo* bajo condiciones de estrés agudo sobre esta hormona estaría entonces relacionado con un antagonismo de la inhibición inducida por la STT y una facilitación de la estimulación por GHRH a nivel del somatotrofo.

Los principales derivados metabólicos de DHEA en diferentes tejidos como la OH-DHEA y el ADIOL no evidenciaron tener sus mismos efectos en la hipófisis normal, por lo que podemos inferir que la acción de DHEA a nivel hipofisario es en gran parte *per se*, aunque no podemos descartar la producción de otros derivados con acción local. Por otro lado, los efectos de tipo estrogénicos evidenciados junto con datos bibliográficos que indican que este esteroide es capaz de actuar en hipófisis a través de receptores estrogénicos, nos inclina a pensar que DHEA podría estar efectivamente actuando, al menos en parte, a través de ellos en nuestro modelo.

En conclusión, podemos decir que el tratamiento crónico con DHEA fue parcialmente efectivo al atenuar la hiperplasia hipofisaria inducida por los estrógenos y la hiperprolactinemia resultante. Sin embargo, el hecho de que DHEA *per se* también produzca un ligero aumento de estos parámetros, hace necesario un cuidadoso análisis de los posibles efectos secundarios derivados de su propia acción hormonal a la hora de considerar su aplicación clínica. Esto es especialmente válido considerando su actual promoción y venta indiscriminada sin receta médica y su utilización en terapias preventivas de reemplazo hormonal. Creemos por otro lado que los resultados de esta tesis pueden contribuir a la explicación de las actuales

controversias existentes en relación con la acción de DHEA sobre algunos tipos de tumores, especialmente estrógeno-dependientes, y con los efectos secundarios que muchas veces presenta un tratamiento crónico con este esteroide.

Resumiendo, la primer parte de esta tesis revela algunas de las alteraciones que se producen en la hipófisis hiperplásica en cuanto a la respuesta a All y su relación con la expresión diferencial de sus receptores. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que la participación de AT2 es regulatoria y compensatoria de las acciones de All mediadas por AT1. Se describe por primera vez en la hipófisis la participación funcional de los receptores AT2, la fosforilación de ERK1/2 inducida por All y la cascada de señales involucrada en esta respuesta. Asimismo se analiza el posible rol terapéutico de la P4 y la DHEA.

Los presentes estudios indicarían la existencia de una compleja interrelación entre el SRA hipofisario, el sistema dopaminérgico y las hormonas esteroideas circulantes que participa de la regulación hipofisaria normal y de la génesis tumoral. El estudio de los mecanismos que relacionan la acción estrogénica con la actividad de elementos del SRA es importante a la hora de comprender en mayor profundidad procesos tumorigénicos que implican tanto hiperplasia como angiogénesis. Una comprensión más profunda de la patogénesis de los tumores hipofisarios, que contemple la identificación y descripción de los distintos elementos moduladores involucrados en su génesis y desarrollo, tendrá seguramente un importante impacto sobre la práctica terapéutica al permitir una intervención más temprana y una mejor selección de los protocolos de tratamiento.

Daniel. Del
Gadafu
J. A. C. C. C. C.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abadie JM, Malcom GT, Porter JR & Svec F 2000 Dehydroepiandrosterone alters lipid profiles in Zucker rats. *Lipids* **35** 613-620.
- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM & Quitterer U 2001 The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *Journal of Biological Chemistry* **276** 39721-39726.
- AbdAlla S, Lothar H & Quitterer U 2000 AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407** 94-98.
- Adams EF, Symowski H, Buchfelder M & Poyner D 2000 A polymorphism in the growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) receptor gene is associated with elevated response to GHRH by human pituitary somatotrophinomas in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **275** 33-36.
- Ahmed A, Li X, Shams M, Rollason T, Barnes N & Newton J 1995 Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site. *J Clin Invest.* **96** 848-857.
- Akwa Y, Morfin RF, Robel P & Baulieu EE 1992 Neurosteroid metabolism. *Biochemical Journal* **288** 959-964.
- Alexander J, Biller B, Bikkal H, Zervas N, Arnold A & Klibansky A 1990 Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* **86** 336-340.
- Anderson L, Jeftinija S & Scanes C 2004 Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp Biol Med* **229** 291-302.
- Arafah B & Nasrallah M 2001 Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer* **8** 287-305.
- Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O & Boccuzzi G 1999 Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biological Medicine* **26(11-12)** 1467-1474.
- Arai H & Escobedo JA 1996 Angiotensin II type 1 receptor signals through raf-1 by a protein kinase C-dependent, ras-independent mechanism. *Molecular Pharmacology* **50** 522-528.
- Arbogast LA & Voogt JL 1997 Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology* **138** 3016-3023.
- Arimura A, Smith W & Schally A 1976 Blockade of the stress-induced decrease in blood GH by antisomatostatin serum in rats. *Endocrinology* **98** 540-543.
- Artl W, Callies F & Allolio B 2000 DHEA replacement in women with adrenal insufficiency: pharmacokinetics, bioconversion and clinical effects on well-being, sexuality and cognition. *Endocrine Research* **26** 505-511.
- Armando I, Jezova M, Juorio A, Terron J, Falcon-Neri A, Semino-Mora C, Imboden H & Saavedra J 2002a Estrogen upregulates renal angiotensin II AT(2) receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* **283** F934-F943.

Armando I, Terrón JA, Falcón-Neri A, Takeshi I, Häuser W & Inagami T 2002b Increased Angiotensin II AT₁receptor expression in paraventricular nucleus and hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation in AT₂ receptor gene disrupted mice. *Neuroendocrinology*. **76** 137-147.

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

Balsa JA, Sanchez-Franco F, Pazos F, Lara JI, Lorenzo MJ, Maldonado G & Cacicedo L 1998 Direct action of Serotonin on Prolactin, Growth Hormone, Corticotropin and Luteinizing Hormone release in Cocultures of Anterior and Posterior Pituitary Lobes: Autocrine and/or Paracrine Action of Vasoactive Intestinal Peptide. *Neuroendocrinology*. **68** 326-333.

Bartha L, Nagy G, Kiem D, Fekete M & Makara G 1991 Inhibition of suckling-induced prolactin release by dexamethasone. *Endocrinology* **129** 635-640.

Bastianetto S, Ramassamy C, Poirier J & Quirion R 1999 Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Molecular Brain Research* **66**(1-2) 35-41.

Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Thyssen SM, Diaz-Torga GS & Libertun C 1994 Effects of LHRH and AngII on prolactin stimulation are mediated by hypophysial AT₁ receptor subtype. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)* **266** E274-E278.

Ben-David M, Danon A, Benveniste R, Weller C & Sulman F 1971 Results of radioimmunoassays of rat pituitary and serum prolactin after adrenalectomy and perphenazine treatment in rats. *J Endocrinol* **50** 599-606.

Ben-Jonathan N & Liu JW 1992 Pituitary lactotrophs: endocrine, paracrine, juxtacrine and autocrine interactions. *Trends of Endocrinology and Metabolism*. **3** 254-258.

Benndorf R, Boger R, Ergun S, Steenpass A & Wieland T 2003 Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res* **93** 438-447.

Bickerton RK & Buckley JP 1961 Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **106** 834-836.

Blackwell RE. 1985 Diagnosis and management of prolactinomas. *Fertil Steril*. **43** 5-16.

Blum M, McEwen BS & Roberts JL 1987 Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment. *Journal of Biological Chemistry* **262** 817-821.

Boccuzzi G, Aragno M, Brignardello E, Tamagno E, Conti G, Di Monaco M, Racca S, Danni O & Di Carlo F 1992 Opposite effects of dehydroepiandrosterone on the growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinomas. *Anticancer Research* **12** 1479-1483.

Boccuzzi G, Di Monaco M, Brignardello E, Leonardi L, Gatto V, Pizzini A & Gallo M 1993 Dehydroepiandrosterone antiestrogenic action through androgen receptor in MCF-7 human breast cancer cell line. *Anticancer Research* **13** 2267-2272.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA 1998 Prolactin (PRL) and its

receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine reviews* **19** 225-268.

Bonnet F, Cooper ME, Carey RM, Casley D & Cao Z 2001 Vascular expression of angiotensin type 2 receptor in the adult rat: influence of angiotensin II infusion. *Journal of Hypertension* **19** 1075-1081.

Borski RJ, Tsai W, DeMott-Friberg R & Barkan AL 1996 Regulation of somatic growth and the somatotrophic axis by gonadal steroids: primary effect on insulin-like growth factor I gene expression and secretion. *Endocrinology* **137** 3253-3259.

Bouck N. 1990 Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* **2** 179-185.

Brann DW, De Sevilla L, Zamorano PL & Mahesh VB 1999 Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* **64** 659-663.

Brann DW, Rao I & Mahesh VB 1988 Antagonism of estrogen -induced prolactin release by progesterone. *Biology of Reproduction* **39** 1067-1073.

Bray MJ, Vick TM, Shah N, Anderson SM, Rice LWIA, Evans RM & Veldhuis JD 2001 Short-term estradiol replacement in postmenopausal women selectively mutes somatostatin's dose-dependent inhibition of fasting growth hormone secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 3143-3149.

Brignardello E, Gallo M, Aragno M, Manti R, Tamagno E, Danni O & Boccuzzi G 2000 Dehydroepiandrosterone prevents lipid peroxidation and cellular growth inhibition induced by high glucose concentration in cultured rat mesangial cells. *Journal of Endocrinology* **166**(2) 401-406.

Brosnihan KB, Li P, Ganten D & Ferrario CM 1997 Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *American Journal of Physiology* **273** R1908-R1915.

Brue T, Pellegrini I, Priou A, Morange I & Jaquet P 1992 Prolactinomas and resistance to dopamine agonists. *Hormone Research*. **38** 84-89.

Bumpus FM, Pucell AG, Daud AI & Husain A 1988 Angiotensin II: an intraovarian regulatory peptide. *American Journal of Medical Sciences* **295** 406-408.

Campbell DJ 1987 Tissue renin angiotensin system: sites of angiotensin formation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **10** 51-58.

Carretero J, Burks DJ, Vazquez G, Rubio M, Hernandez E, Bodego P & Vazquez R 2002 Expression of aromatase P450 is increased in spontaneous prolactinomas of aged rats. *Pituitary* **5** 5-10.

Carretero J, Vazquez G, Blanco E, Rubio M, Santos M, Martin-Clavijo A, Torres JL & Vazquez R 1999 Immunohistochemical evidence of the presence of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Research* **295** 419-423.

Chang K-J, Lee TTY, Linares-Cruz G, Fournier S & De Lignieres B 1995 Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle *in vivo*. *Fertility and Sterility* **63** 785-791.

Chen CL & Meites J 1970 Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary

prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* **86** 503-505.

Chen F-CM & Printz MP 1983 Chronic estrogen treatment reduces angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology* **113** 1503-1510.

Chen FM, Hawkins R & Printz MP 1982 Evidence for a functional independent brain-angiotensin system: correlation between regional distribution of brain angiotensin receptors, brain angiotensinogen and drinking during the estrous cycle of rats. *Experimental Brain Research* **4(suppl)** 157-168.

Cho B, Suh Y, Yoon Y, Lee C & Kim K 1993 Progesterone inhibits the estrogen -induced prolactin gene expression in the rat pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology* **93** 47-52.

Clauser E, Curnow KM, Davies E, Conchon S, Teutsch B, Vianello B, Monnot C & Corvol P 1996 Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *European Journal of Endocrinology* **134** 403-411.

Cleary M 1991 The antiobesity effects of DHEA in rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **196** 8-16.

Clifton KH & Meyer RK 1956 Mechanism of anterior pituitary tumor induction by estrogen. *Anatomical Record* **125** 65-81.

Cramer OM, Parker.C.R. & Porter JC 1979 Estrogen inhibition of dopamine release into hypophyseal portal blood. *Endocrinology* **104** 419-422.

Csikos T, Gallinat S & Unger T 1997 Extrarenal aspects of angiotensin II function. *Eur J Endocrinol*. **136** 349-358.

Culman J, Hohle S, Qadri F, Edling O, Blume A, Lebrun C & Unger T 1995 Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. *Clin Exp Hypertens*. **17** 281-293.

Cushing H 1912 *The Pituitary Body and its Disorders*. Philadelphia.

Cutolo M, Foppiani L & Minuto F 2002 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis impairment in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *J Endocrinol Invest*. **25** 19-23.

Danser AH. 1996 Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem*. **157** 211-216.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW & Unger TH 2000 International Union of Pharmacology.XXIII. The Angiotensin Receptors. *Pharmacological Reviews* **52** 415-472.

De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA & Labrie F 1977 Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* **100** 1496-1504.

De Mello WC 1994 Is an intracellular renin-angiotensin system involved in control of cell communication in heart? *J.Cardiovasc.Pharm*. **23** 640-646.

De Moel MP, Van de Put FH, Vermegen TM, De Pont JH & Willems PH 1995 Effect of the aminosteroid, U73122, on Ca²⁺ uptake and release properties of rat liver microsomes. *Eur J Biochem* **234** 626-631.

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.

De Paul AL, Pons P, Aoki A & Torres AI 1997 Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochem* **99** 277-289.

Denef C & Andries M 1983 Evidence for paracrine interaction between gonadotropes and lactotropes in pituitary cell aggregates. *Endocrinology* **112** 813-822.

Deschepper CF & Ganong WF 1991 Distribution of angiotensinogen immunoreactivity in rat anterior pituitary glands. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **197** 304-309.

Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, Baxter JD & Ganong WF 1986 Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal and pituitary of the rat. *Proceedings of the National Academy of Science.U.S.A.* **83** 7552-7556.

Deschepper CF, Seidler CD, Steele MK & Ganong WF 1985 Further studies on the localization of angiotensin II-like immunoreactivity in the anterior pituitary gland of the male rat, comparing various antisera to pituitary hormones and their specificity. *Neuroendocrinology*. **40** 471-475.

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 GS, Becu-Villalobos D & Libertun C 1994 Ontogeny of angiotensin-induced prolactin release in vivo and in vitro in female and male rats. *Neuroendocrinology*. **59** 57-62.

Diaz-Torga GS, Gonzalez Iglesias A, Achaval-Zaia R, Libertun C & Becu-Villalobos D 1998 Angiotensin II induced calcium mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *American Journal of Physiology* **274** E534-E540.

Drust DS & Martin TF 1984 Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates protein phosphorylation in GH₃ pituitary cells by a lipid-linked, protein kinase C-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry* **259** 14520-14530.

Duan R, Link H & Xiao B 2003 Dehydroepiandrosterone therapy ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats. *J Clin Immunol*. **23** 100-106.

Duffy B, Vincent JD, Fleury H, Du Pasquier P, Gourdji D & Tixier-Vidal A 1979 Dopamine inhibition of action potentials in a prolactin secreting cell line is modulated by estrogen in rats. *Nature* **282** 855-857.

Duffy-Barbe L, Rodriguez F, Arsaut J, Verrier D & Vincent JD 1982 Angiotensin II stimulates prolactin release in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology*. **35** 242-247.

Dzau VJ 1988 Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects. *American Journal of Medicine* **84(3A)** 22-27.

Dzau VJ & Hirsch AT 1990 Emerging role of the tissue renin-angiotensin systems in congestive heart failure. *European Heart Journal* **11(B)** 65-71.

Ebeling P & Koivisto VA 1994 Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* **343** 1479-1481.

Eggena P, Zhu J, Clegg K & Barrett J 1993 Nuclear angiotensin receptors induce transcription of renin and angiotensinogen mRNA. *Hypertension*. **22** 496-501.

Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F & Hirata Y 1999 Involvement of PYK2 in Angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. **33** 201-206.

Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H & Inagami T 1996 Identification of an essential signaling cascade for Mitogen-activated protein kinase activation by Angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **271** 14169-14175.

Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F & Inagami T 1998 Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the Angiotensin II-induced Mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **273** 8890-8896.

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 K, Weiner R & Mellon S 1990 Effect of extracellular matrix on prolactin secretion and mRNA accumulation in GH3 cells. *DNA Cell Biol* **9** 369-375.

Enjalbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Sainz A, Jard S, Lombard S, Kordon C & Bockaert J 1986 Angiotensin II and dopamine modulate both cyclic AMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. *Journal of Biological Chemistry* **261** 4071-4075.

Ewert S, Laesser M, Johansson B, Holm M, Aneman A & Fandriks L 2003 The angiotensin II receptor type 2 agonist CGP 42112A stimulates NO production in the porcine jejunal mucosa. *BMC Pharmacol*. **3** 2.

Farfel Z, Bourne H & Iiri T 1999 The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med*. **340** 1012-1020.

Farrell W & Clayton R 1999 Tumour suppressor genes in pituitary tumour formation. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. **13** 381-393.

Farrell W, Simpson D, Frost S & Clayton R 1999 Methylation mechanisms in pituitary tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* **6** 437-447.

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.

Fett J, Strydom D, Lobb R, Alderman E, Bethune J, Riordan J & Vallee B 1985 Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* **24** 5480-5486.

Fink G 2000 Neuroendocrine Regulation of Pituitary Function: General Principles. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edn 1, pp 107-133. Eds PM Conn & ME Freeman. Totowa, New Jersey: Humana Press.

- Folkman J. 1995 Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1** 27-31.
- Folkman J, Watson K, Ingber D & Hanahan D 1989 Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* **339** 58-61.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A & Nagy G 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* **80** 1523-1631.
- Frye CA & Lacey EH 1999 The neurosteroids DHEA and DHEAS may influence cognitive performance by altering affective state. *Physiological Behaviour* **66** 85-92.
- Ganong WF 1995 Reproduction and the renin-angiotensin system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **19** 241-250.
- Ganong WF 1989 Angiotensin II in the brain and pituitary: contrasting roles in the regulation of adenohypophyseal secretion. *Hormone Research*. **31** 24-31.
- Gansler TS, Muller S & Cleary MP 1985 Chronic administration of dehydroepiandrosterone reduces pancreatic beta-cell hyperplasia and hyperinsulinemia in genetically obese Zucker rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **180** 155-162.
- Garcia de Yebenes E, Hong M & Pelletier G 1995 Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on pituitary prolactin and arcuate nucleus neuron tyrosine hydroxylase mRNA levels in the rat. *J Neuroendocrinol* **7** 589-595.
- Gatto V, Aragno M, Gallo M, Tamagno E, Martini A, Dimonaco M, Brignardello E & Boccuzzi G 1998 Dehydroepiandrosterone inhibits the growth of DMBA-induced rat mammary carcinoma via the androgen receptor. *Oncology Reports* **5** 241-243.
- Gershengom MC & Thaw C 1985 Thyrotropin releasing hormone stimulates biphasic elevation of cytoplasmic free calcium in GH3 cells. Further evidence that TRH mobilizes cellular and extracellular calcium. *Endocrinology* **116** 591-596.
- Givalois L, Li S & Pelletier G 1999 Effects of ageing and dehydroepiandrosterone administration pro-opiomelanocortin mRNA expression in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. *Journal of Neuroendocrinology* **11(9)** 737-742.
- Goldenberg I, Grossman E, Jacobson KA, Shneyvays V & Shainberg A 2001 Angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiomyocyte culture: a possible role of AT1 and AT2 receptors. *Journal of Hypertension* **19** 1681-1689.
- Gonzalez Iglesias A, Diaz-Torga G, Lux-Lantos V, Libertun C & Becu-Villalobos D 1999 Calcium influx and intracellular stores in angiotensin II stimulation of normal and hyperplastic pituitary cells. *American Journal of Physiology* **277** E455-E463.
- Gonzalez-Iglesias A, Suarez C, Feierstein C, Diaz-Torga G & Becu-Villalobos D 2001 Desensitization of Angiotensin II: effect on $[Ca^{2+}]_i$, inositol triphosphate, and prolactin in pituitary cells. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)* **280** E462-E470.
- Gordon GB, Shantz LM & Talalay P 1987 Modulation of growth, differentiation and carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Advances in Enzyme Regulation* **26** 355-382.
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M & Kalinyak JE 1991 Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *Journal of Clinical Investigation*. **88** 921-933.

- Greenland K & Sernia C 2004 Oestrogenic regulation of brain angiotensinogen. *J Neuroendocrinol.* **16** 508-515.
- Grossman A & Besser G 1985 Prolactinomas. *Br Med J (Clin Res Ed)*. **290** 182-184.
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY 1985 A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **260** 3440-3450.
- Gsponer J, De Tribolet N, Deruaz J, Janzer R, Uske A, Mirimanoff R, Raymond M, Rey F, Temler E, Gaillard R & Gomez F 1999 Diagnosis, treatment, and outcome of pituitary tumors and other abnormal intrasellar masses. Retrospective analysis of 353 patients. *Medicine (Baltimore)* **78** 236-269.
- Haggi ES, Torres AI, Maldonado CA & Aoki A 1986 Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation. *J Endocrinol* **111** 367-373.
- Halasz B 2000 The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edn 1, pp 3-21. Eds M Conn & ME Freeman. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Hamada J, Cavanaugh P, Lotan O & Nicolson G 1992 Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. *Br J Cancer* **66** 349-354.
- Han DH, Hansen PA, Chen MM & Holloszy JO 1998 DHEA treatment reduces fat accumulation and protects against insulin resistance in male rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53(1)** B19-B24.
- Harding J, Wright J, Swanson G, Hanesworth J & Krebs L 1994 AT₄ receptors: specificity and distribution. *Kidney International* **46** 1510-1512.
- Harrison-Bernard LM, El-Dahr SS, O'Leary DF & Navar LG 1999 Regulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA and protein in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. **33** 340-346.
- Hauser P & Oberbauer R 2002 Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal disease. *Wien Klin Wochenschr* **114** 671-677.
- Healy DP, Ye M-Q, Yuan L-X & Schachter BS 1992 Stimulation of angiotensinogen mRNA levels in rat pituitary by estradiol. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* **263** E355-E361.
- 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.
- Hein L, Meinel L, Dzau VJ & Kobilka BK 1997 Intracellular trafficking of Angiotensin II and its AT₁ and AT₂ receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Molecular Endocrinology* **11** 1266-1277.
- Henderson E, Schwartz AG, Pashko L, Abou-Gharbia M & Swem D 1981 Dehydroepiandrosterone and 16-alpha-bromo-epiandrosterone: inhibitors of Epstein-Barr virus-induced transformation of human lymphocytes. *Carcinogenesis* **2** 683-686.
- Henderson E, Yang JY & Schwartz AG 1992 Dehydroepiandrosterone (DHEA) and synthetic DHEA analogs are modest inhibitors of HIV-1 IIIB replication. *AIDS Research and Human*

Retroviruses **8** 625-631.

Herbert J 1998 Neurosteroids, brain damage, and mental illness. *Experimental Gerontology* **33(7-8)** 713-727.

Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K & Melmed S 1990 Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **71** 1427-1433.

Hertz P, Silbermann LE, Even L & Hochberg Z 1989 Effects of sex steroids on the response of cultured rat pituitary cells to growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Endocrinology* **125** 581-585.

Higdon K, Scott A, Tucci M, Benghuzzi H, Tsao A, Puckett A, Cason Z & Hughes J 2001 The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. *Biomed Sci Instrum.* **37** 281-286.

Hinson JP & Raven PW 1999 DHEA deficiency syndrome: a new term for old age? *Journal of Endocrinology* **163** 1-5.

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.

Homma M, Onodera T, Hirabatake M, Oka K, Kanazawa M, Miwa T & Hayashi T 1998 Activation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase by dehydroepiandrosterone sulphate as an anti-hypertensive agent in spontaneously hypertensive rats. *J Pharm Pharmacology* **50(10)** 1139-1145.

Horiuchi M, Lehtonen JYA & Daviet L 1999 Signaling mechanism of the AT₂ angiotensin II receptor: crosstalk between AT₁ and AT₂ receptors in cell growth. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **10** 391-395.

Horvath E, Kovacs K & Ezrin C 1977 Junctional contact between lactotrophs and gonadotrophs in the rat pituitary. *IRCS Medical Science* **5** 511.

Houben H, Tilemans D & Denef C 1990 Towards a functional significance of peptides and biogenic amines produced by the anterior pituitary. *Journal of Endocrinology Investigation* **13** 855-863.

Hsieh K-P & Martin TFJ 1992 Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins G_q and G₁₁. *Molecular Endocrinology* **6** 1673-1681.

Hsueh AJW, Peck EJ & Clark JH 1975 Progesterone antagonism of the estrogen receptor and estrogen-induced uterine growth. *Nature* **254** 337-339.

Hu Y, Cardounel A, Gursoy E, Anderson P & Kalimi M 2000 Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* **59** 753-762.

Huang SW, Tsai SC, Tung YF & Wang PS 1995 Role of progesterone in regulating the effect of estradiol on the secretion of thyrotropin-releasing hormone and dopamine into hypophyseal portal blood in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* **61** 536-541.

Huang XC, Richards EM & Sumners C 1996 Mitogen-activated protein kinases in rat brain

neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *Journal of Biological Chemistry* **271** 15635-15641.

Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T & Marumo F 1992 Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension*. **19** 753-757.

Inagami T, Guo DF & Kitami Y 1994 Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. *Journal of Hypertension (Suppl.)* **12** 583-594.

Inagami T, Mizano K, Nakamaru MPKN, Naruse M, Naruse K, Misono K, Okamura T, Kawamura M & Higashimori K 1988 The renin-angiotensin system: an overview of its intracellular function. *Cardiovascular Drugs Therapeutics* **2** 453-458.

Ishida M, Ishida T, Thomas S & Berk B 1998 Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **82** 7-12.

Iwai N & Inagami T 1992 Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Letters* **298** 257-260.

Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI & Chaudry IH 2000 Mechanisms of the salutary effects of dehydroepiandrosterone after trauma-hemorrhage: direct or indirect effects on cardiac and hepatocellular functions? *Archives of Surgery* **135** 416-423.

Jin X, Fukuda N, Su J, Lai Y, Suzuki R, Tahira Y, Takagi H, Ikeda Y, Kanmatsuse K & Miyazaki H 2002 Angiotensin II type 2 receptor gene transfer downregulates angiotensin II type 1a receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. **39** 1021-1027.

Jones EE & Naftolin F 1990 Estrogen effects on the tuberoinfundibular dopaminergic system in the female rat brain. *Brain Research* **510** 84-91.

Kaiser UB 2001 Editorial: Pituitary Gene Therapy-Hypotheses on the Hypophysis. *Endocrinology* **142** 528-531.

Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC & Neill JD 1992 Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: Differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **183** 1090-1096.

Karishma K & Herbert J 2002 Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur J Neurosci*. **16** 445-453.

Kaschina E & Unger T 2003 Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. **12** 70-88.

Kim H, Shin J, Kim T, Kang I, Seok J, Kim I, Park K & Han S 2002 Evaluation of the 20-day pubertal female assay in Sprague-Dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone, and flutamide. *Toxicol Sci* **67** 52-62.

Kimonides VG, Spillantini MG, Sofroniew MV, Fawcett JW & Herbert J 1999 Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. *Neurosciences* **89(2)** 429-436.

Knudsen JF, Costoff A & Mahesh VB 1975 Dehydroepiandrosterone induced polycystic

ovaries and acyclicity in the rat. *Fertility and Sterility* **26** 807-817.

Kochan Z & Karbowska J 2004 Dehydroepiandrosterone up-regulates resistin gene expression in white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* **218** 57-64.

Koike G, Winer E, Horiuchi M, Brown D, Szpirer C, Dzau V & Jacob H 1995 Cloning, characterization, and genetic mapping of the rat type 2 angiotensin II receptor gene. *Hypertension.* **26** 998-1002.

Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ & Frye RF 1999 DHEA and DHEA-S: a review. *Journal of Clinical Pharmacology* **39** 327-348.

Kunert-Radek J & Pawlikowski M 1992a Angiotensin II stimulation of the rat pituitary tumoral cell proliferation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* **183** 27-30.

Kunert-Radek J & Pawlikowski M 1992b Angiotensin II stimulation of the rat pituitary tumoral cell proliferation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **183** 27-30.

La Montagna G, Baruffo A, Buono G & Valentini G 2001 Dehydroepiandrosterone sulphate serum levels in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* **19** 21-26.

Lacau-Mengido IM, Mejía M, Diaz-Torga G, Gonzalez Iglesias A, Formía N, Libertun C & Becu-Villalobos D 2000 Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *Journal of Animal Science* **78** 1-8.

Lachowicz A & Rebas E 2002 Gender differences in steroid modulation of Angiotensin II-induced protein kinase C activity in anterior pituitary of the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **294** 95-100.

Ladriere L, Laghmich A, Malaisse-Lagae F & Malaisse WJ 1997 Effect of dehydroepiandrosterone in hereditarily diabetic rats. *Cellular and Biochemical Function* **15** 287-292.

Lardy H, Partridge B, Kneer N & Wei Y 1995 Ergosteroids: induction of thermogenic enzymes in liver of rats treated with steroids derived from dehydroepiandrosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** 6617-6619.

Laron Z. 2001 Consequences of not treating children with laron syndrome (primary growth hormone insensitivity). *J Pediatr Endocrinol Metab.*2001;**14 Suppl 5**:1243-8; discussion 1261-2 **14** 1243, 1261-1248, 1262.

Laron Z. 2002 Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 deficiency on ageing and longevity. *Novartis Found Symp.*2002;**242**:125-37; discussion 137-42. **242** 125-142.

Lebrun C, Blume A, Herdegen T, Seifert K, Bravo R & Unger T 1995a Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neurosciences* **65** 93-99.

Lebrun C, Mollenhoff E, Bao G, Culman J & Unger T 1995b Angiotensin II induces the expression of c-fos mRNA in the central nervous system of the rat. *Clin Exp Hypertens.* **17** 877-893.

Lenkei Z, Nuyt AM, Grouselle D, Corvol P & Llorens-Cortes C 1999 Identification of endocrine cell population expressing the AT1B subtype of angiotensin II receptors in anterior pituitary. *Endocrinology* **140** 472-477.

- Lerant A & Freeman ME 1998 Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Research* **802** 141-154.
- Leri A, Fiordaliso F, Setoguchi M, Limana F, Bishopric NH, Kajstura J, Webster K & Anversa P 2000 Inhibition of p53 function prevents renin-angiotensin system activation and stretch-mediated myocyte apoptosis. *Am.J.Pathol.* **157** 843-857.
- Li K, Foo T & Adams JB 1978 Products of dehydroepiandrosterone metabolism by human mammary tumors and their influence on estradiol receptor binding. *Steroids* **31** 113-127.
- Lieberman ME, Maurer RA, Claude P, Wiklund J, Wertz N & Gorski J 1981 Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Adv Exp Med Biol* **138** 151-163.
- Lippoldt A, Paul M, Fuxe K & Ganten D 1995 The Brain Renin-Angiotensin system: Molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin.and Exper.Hypertension* **17** 251-266.
- LLedo PM, Homburger V, Bockaert J & Vincent JD 1992 Differential G protein-mediated coupling of D-2 dopamine receptors to K^+ and Ca^{2+} currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron* **8** 455-463.
- Lloyd HM, Meares JD & Jacobi J 1975 Effects of oestrogen and bromocriptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. *Nature* **255** 497-498.
- Lloyd RV 1983 Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. An immunohistochemical study. *Am.J.Pathol.* **113** 198-206.
- Lookingland K, Gunnet J, Toney T & Moore K 1990 Comparison of the effects of ether and restraint stress on the activity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in female and male rats. *Neuroendocrinology*. **52** 99-105.
- Lubet LA, Gordon GB, Prough RA, Lei XD, You M, Wang Y, Grubbs CJ, Steele VE, Kelloff GJ, Thomas CF & Moon RD 1998 Modulation of methylnitrosourea-induced breast cancer in Sprague Dawley rats by dehydroepiandrosterone: dose-dependent inhibition, effects of limited exposure, effects on peroxisomal enzymes, and lack of effects on levels of Ha-Ras mutations. *Cancer Research* **58(5)** 921-926.
- Lussier BT, French MB, Moor BC & Kraicer J 1991 Free intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]$) and growth hormone release from purified rat somatotrophs. I. GH-releasing factor-induced Ca^{2+} influx raises $[Ca^{2+}]$. *Endocrinology* **128** 570-582.
- Luttrell LM, Daaka Y & Lefkowitz RJ 1999 Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Current Opinion in Cell Biology* **11** 177-183.
- MacFadyen RJ 1993 Role of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in the development of heart failure: implications for therapy. *Cardiology* **83** 38-48.
- Maciag T 1984 Angiogenesis. *Prog Hemost Thromb.* **7** 167-182.
- MacLeod RM & Lehmeyer JE 1973 Suppression of pituitary tumor growth and function by ergot alkaloids. *Cancer Research* **33** 849-855.
- Maga G & Hubscher U 2003 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* **116** 3051-3060.
- Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S & Picard D 1999 Adrenal androgens stimulate the

proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Research* **59** 4864-4869.

Maldonado C & Aoki A 1994 Occurrence of atypical lactotrophs associated with levels of prolactin secretory activity. *Biocell* **18** 83-95.

Mancina R, Susini T, Renzetti A, Forti G, Razzoli E, Serio M & Maggi M 1996 Sex steroid modulation of AT2 receptors in human myometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 1753-1757.

Marrero M, Schieffer B, Paxton W, Heerdt L, Berk B, Delafontaine P & Bernstein K 1995 Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* **375** 247-250.

Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M & Matsubara H 1998 Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *Journal of Clinical Investigation*. **101** 527-535.

Matsusaka T & Ichikawa I 1997 Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol*. **59** 395-412.

Maurer RA 1982 Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *Journal of Biological Chemistry* **257** 2133-2136.

Mauriege P, Langin D, Montminy V, Martel C, Despres JP, Belanger A, Labrie F & Deshaies Y 2000 Effect of long-term percutaneous adrenal steroid treatment on adipose tissue metabolism. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **24 Sup.2** S148-S150.

McCabe CJ & Gittoes NJL 1999 PTTG- a new pituitary tumour transforming gene. *Journal of Endocrinology* **162** 163-166.

McCormick F 1993 Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* **363** 15-16.

McIntosh M, Bao H & Lee C 1999 Opposing actions of dehydroepiandrosterone and corticosterone in rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **221** 198-206.

Melmed S. 1999 Pathogenesis of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* **28** 1-12.

Merrill J, Dinu A & Lahita R 1996 Autoimmunity: The Female Connection. *Medscape Womens Health* **1** 5.

Meyer RK & Clifton KG 1956 Effect of diethylstilbestrol induced tumorigenesis on the secretory activity of the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* **58** 686-694.

Miguel Mancera J, Laiz Carrion R & Del Pilar Martin del Rio M 2002 Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Gen Comp Endocrinol*. **129** 95-103.

Millan MA & Aguilera G 1988 Angiotensin II receptors in testes. *Endocrinology* **122** 1984-1990.

Mindermann T & Wilson C 1994 Age-related and gender-related occurrence of pituitary

adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* **41** 359-364.

Missale C, Russel Nash S, Robinson S, Jaber M & Caron MG 1998 Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **78** 189-225.

Miyata N, Park F, Feng Li X & Cowley AW 1999 Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am.J.Physiol.(Renal Physiol.)* **277** F437-F446.

Morales A, Nolan J, Nelson J & Yen S 1994 Effects of replacement dose of DHEA in men and women of advancing age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **78** 1360-1367.

Moreau C, Rasolonjanahary R, Zamora AJ, Enjalbert A, Kordon C & Llorens-Cortes C 1997 Expression of angiotensin II receptor subtypes AT(1A) and AT(1B) in enriched fractions of dispersed rat pituitary cells. *Neuroendocrinology*. **66** 416-425.

Müller E, Locatelli V & Cocchi D 1999 Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological Reviews* **79** 511-607.

Muller E, Locatelli V & Cocchi D 1999 Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* **79** 511-607.

Muller S & Cleary MP 1985 Glucose metabolism in isolated adipocytes from lean and obese Zucker rats following treatment with dehydroepiandrosterone. *Metabolism* **34** 278-284.

Munzenmaier AH & Greene AS 1996 Opposing actions of Angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*. **27** 760-765.

Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y, Gotoh N, Shibuya M, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M & Matsubara H 1998a Angiotensin II type 1 receptor-induced extracellular signal-regulated protein kinase activation is mediated by Ca²⁺/calmodulin-dependent transactivation of epidermal growth factor. *Circ.Res.* **82** 1338-1348.

Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M & Matsubara H 1998b Role of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAK β /RAFTK in Angiotensin II-induced Ras/ERK signaling. *Hypertension*. **32** 668-675.

Naftilan AJ, Pratt RE, Eldrige CS, Lin HL & Dzau VJ 1989 Angiotensin II induces c-fos expression in smooth muscle cells via transcriptional control. *Hypertension*. **13** 706-711.

Nagy G, Mulchahey JJ & Neill JD 1988 Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **122** 364-366.

Nahmias C & Strosberg AD 1995 The Angiotensin AT2 receptor: searching for signal transduction pathways and physiological functions. *Trends Pharmacology Sciences* **16** 223-225.

Naor Z, Benard O & Seger R 2000 Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **11** 91-99.

Neill JD, Freeman ME & Tillson SA 1971 Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. *Endocrinology* **89** 1148-1153.

Neill JD & Nagy GM 1994 Prolactin Secretion and Its Control. In *The Physiology of*

Reproduction, edn 2, pp 1833-1860. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.

Nephew KP, Osborne E, Lubet RA, Grubbs CJ & Khan SA 2000 Effects of administration of tamoxifen, toremifene, dehydroepiandrosterone, and vorozole on uterine histomorphology in the rat. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **223**(3) 288-294.

Neuss M, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt A & Fleck E 1994 Human cardiac fibroblasts express an angiotensin receptor with unusual binding characteristics which is coupled to cellular proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. **204** 1334-1339.

Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M & Inada M 1995 Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* **95** 46-54.

Nippoldt TB & Nair KS 1998 Is there a case for DHEA replacement? *Baillieres Clinical and Endocrinological Metabolism* **12** 507-520.

Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombard JH & Greene AS 1998 Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am.J.Physiol.(Heart.Circ.Physiol.)* **275** H1395-H1403.

Nouet S & Nahmias C 2000 Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **11** 1-6.

Nyce JW, Magee PN, Hard GC & Schwartz AG 1984 Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in Balb/c mice by dehydroepiandrosterone. *Carcinogenesis* **5** 57-62.

O'Reilly M, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane W, Flynn E, Birkhead J, Olsen B & Folkman J 2004 Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88** 277-285.

O'Reilly M, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal R, Moses M, Lane W, Cao Y, Sage E & Folkman J 1994 Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79** 315-328.

Obut TA 1998 Dehydroepiandrosterone, reticular area of adrenal cortex and resistance to stress and disease. *Vestn Ross Akad Med Nauk* **10** 18-22.

Ohnishi J, Ishido M, Shibata T, Inagami T, Murakami K & Miyazaki H 1992 The rat angiotensin II AT_{1A} receptor couples with three different signal transduction pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **186** 1094-1101.

Okada S & Kopchick J 2001 Biological effects of growth hormone and its antagonist. *Trends Mol Med* **7** 126-132.

Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM & Carey RM 1997 Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. **30** 1238-1246.

Page RB 1988 The Anatomy of the Hypothalamo-Hypophyseal Complex. In *The Physiology of Reproduction*., pp 1161-1233. Eds E Knobil & J Neill. New York: Raven Press.

Paolisso G, Rizzo MR, Mone CM, Tagliamonte MR, Gambardella A, Riondino M, Carella C, Varricchio M & D'Onofrio F 2001 Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clinical Endocrinology* **48** 291-297.

Parente JAJr & Berdanier CD 1993 Drugs that suppress hepatic fat synthesis in starved-refed BHE/cdb rats also have an effect on muscle protein synthesis. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **204** 172-179.

Parshad RK & Batth BK 1999 Cystogenesis of antral follicles induced by dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates mast cell proliferation and maturation in the house rat (*Rattus rattus*) ovary. *Indian Journal of Experimental Biology* **37**(9) 933-935.

Pashko LL, Hard GC, Rovito RJ, Williams JR, Sobel EL & Schwartz AG 1985 Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin papillomas and carcinomas by dehydroepiandrosterone and 3-beta-methylandrosterone in mice. *Cancer Research* **45** 164-166.

Pashko LL, Rovito RJ, Williams JR, Sobel EL & Schwartz AG 1984 Dehydroepiandrosterone (DHEA) and 3-beta-methylandrosterone: inhibitors of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-initiated and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-promoted skin papilloma formation in mice. *Carcinogenesis* **5** 463-466.

Pawlikowski M, Grochal M, Kulig A, Zielinski K, Stepien H, Kunert-Radek J & Mucha S 1996 The effect of angiotensin II receptor antagonists on diethylstilbestrol-induced vascular changes in the rat anterior pituitary gland: a quantitative evaluation. *Histol.Histopathol* **11** 909-913.

Pei L & Melmed S 1997 Isolation and characterization of a pituitary tumor-specific transforming gene. *Molecular Endocrinology* **11** 433-441.

Phelps C & Hymer WC 1983 Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology*. **37** 23-31.

Pineiro V, Casabiell X, Peino R, Lage M, Camina JP, Menendez C, Baltar J, Dieguez C & Casanueva F 1999 Dihydrotestosterone, stanazolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: lack of effect of testosterone. *Journal of Endocrinology* **160** 425-432.

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. *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* **51** 183-189.

Pirolì GG, Grillo CA, Ferrini MG, Lux-Lantos V & De Nicola AF 1996 Antagonism by progesterone of diethylstilbestrol-induced pituitary tumorigenesis in Fischer 344 rats: effects on sex steroid receptors and tyrosine hydroxylase mRNA. *Neuroendocrinology*. **63** 530-539.

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.

Platia M, Catt K & Aguilera G 1985 Localization of angiotensin converting enzyme in the rat gonadotroph. *Federation Proceedings* **44** 1358.

Poisner AM & Downing GJ 1995 Renin-Angiotensin system in placenta. In *Placental Toxicology*, pp 175-196. Ed BVR Sastry. Boca Raton: CRC Press, Inc.

Poortman J, Prenen JAC, Schwarz F & Thijssen JHH 1975 Interaction of delta-5-androstene-3beta, 17beta-diol with estradiol and dihydrotestosterone receptors in human myometrial and mammary cancer tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **40** 373-379.

- Prough RA, Johnson Webb S, Wu HQ, Lapenson DP & Waxman DJ 1994 Induction of microsomal and peroxisomal enzymes by dehydroepiandrosterone and its reduced metabolite in rats. *Cancer Research* **54** 2878-2886.
- Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM & Husain A 1991 Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2- angiotensin II receptor. *Endocrinology* **128** 1947-1959.
- Pulcinelli F, Gresele P, Bonuglia M & Gazzaniga P 1998 Evidence for separate effects of U73122 on phospholipase C and calcium channels in human platelets. *Biochem Pharmacol* **56** 1481-1484.
- Raizada M, Rydzewski B, Lu D & Sumners C 1993 Angiotensin II type 1 receptor-mediated stimulation of c-fos gene expression in astroglial cultures. *Am J Physiol.* **265** C1046-C1049.
- Rao KVN, Johnson WD, Bosland MC, Lubet RA, Steele VE, Kelloff GJ & McCormick DL 1999 Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by early and delayed administration of dehydroepiandrosterone. *Cancer Research* **59** 3084-3089.
- Rao MS, Subbarao V, Yeldandi AV & Reddy JK 1992 Hepatocarcinogenicity of dehydroepiandrosterone in the rat. *Cancer Research* **52** 2977-2979.
- Rastinejad F, Poverini P & Bouck N 1989 Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* **56** 345-355.
- Ray D & Melmed S 1997 Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocrine reviews* **18** 206-228.
- Raymond V, Beaulieu M, Labrie F & Boissier J 1978 Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* **200** 1173-1175.
- Richards RJ, Porter JR & Svec F 2000 Serum leptin, lipids, free fatty acids, and fat pads in long-term dehydroepiandrosterone-treated Zucker rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine.* **223** 258-262.
- Roberts K, Krebs L, Kramer E, Shaffer M, Harding J & Wright J 1995 Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats. *Brain Research* **682** 13-21.
- Rose K, Allan A, Gauldie S, Stapleton G, Lorraine D, Dott K, Martin C, Wang L, Hedlund E, Seckl JR, Gustafsson J-A & Lathe R 2001 Neurosteroid hydroxylase CYP7B. Vivid reporter activity in dentate gyrus of gene-targeted mice and abolition of a widespread pathway of steroid and oxysterol hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* **276** 23937-23944.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, Ruperez M, Mezzano S, Ardiles L, Justo P, Ortiz A & Egido J 2003 Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl* **86** S21-S26.
- Saavedra JM 1992 Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine reviews* **13** 329-380.
- Sadoshima J & Izumo S 1993 Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* **73** 413-423.
- Sadoshima J, Xu Y, Slayter H & Izumo S 1993 Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* **75** 977-984.

Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP & Izumo S 1995 Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca^{2+} -dependent signaling. *Circ.Res.* **76** 1-15.

Saito Y & Bradford BC 2001 Transactivation: a novel signaling pathway from Angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J.Mol.Cell.Cardiol.* **33** 3-7.

San Martín M & Touitou Y 2000 DHEA-sulfate causes a phase-dependent increase in melatonin secretion: a study of perfused rat pineal glands. *Steroids* **65(9)** 491-496.

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.

Scheithauer BW, Sano T, Kovacs K, Young WF Jr, Ryan N & Randall R 1990 The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. *Mayo Clin Proc* **65** 461-474.

Schiffelholz T, Holsboer F & Lancel M 2000 High doses of systemic DHEA-sulfate do not affect sleep structure and elicit moderate changes in non-REM sleep EEG in rats. *Physiological Behaviour* **69** 399-404.

Schramme C & Denef C 1983 Stimulation of prolactin release by angiotensin II in superfused rat anterior pituitary cell aggregates. *Neuroendocrinology*. **36** 483-485.

Schwartz AG, Fairman DK, Polansky M, Lewbart ML & Pashko LL 1989 Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted skin papilloma formation in mice by dehydroepiandrosterone and two synthetic analogs. *Carcinogenesis* **10** 1809-1813.

Schwartz AG, Lewbart ML & Pashko LL 1988 Novel dehydroepiandrosterone analogues with enhanced biological activity and reduced side effects in mice and rats. *Cancer Research* **48** 4817-4822.

Schwartz AG, Pashko L & Whitcomb JM 1986 Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicological Pathology* **14** 357-362.

Schwartz AG & Tannen R.H. 1981 Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene- and urethan-induced lung tumor formation in A/J mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Carcinogenesis* **2** 1335-1337.

Schwartz J & Cherny R 1992 Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophyseal hormones. *Endocrine reviews* **13** 453-475.

Schwartz J & Perez FM 1994 Intercellular interactions in the anterior pituitary. *Journal of Endocrinology Investigation* **17** 459-470.

Scott A, Higdon K, Benghuzzi H, Tucci M, Cason Z, England B, Tsao A & Hughes J 2000 TCPL drug delivery system: the effects of synthetic DHEA and diosgenin using an ovariectomized rat model. *Biomedical Science Instruments* **36** 171-176.

Seltzer A, Pinto JEB, Viglione PN, Correa FMA, Libertun C, Tsutsumi K, Steele MK & Saavedra JM 1992 Estrogens regulate angiotensin-converting enzyme and angiotensin

receptors in female rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology*. **55** 460-467.

Shah BH & Catt KJ 2002 Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: roles of protein Kinase C δ , Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth factor receptor *trans*-activation. *Molecular Pharmacology* **61** 343-351.

Sharma H, Van Heugten H, Goedbloed M, Verdouw P & Lamers J 1994 Angiotensin II induced expression of transcription factors precedes increase in transforming growth factor-beta 1 mRNA in neonatal cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. **205** 105-112.

Sharma M, Sharma R, Greene AS, McCarthy ET & Savin VJ 1998 Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. *Am.J.Physiol.(Renal Physiol.)* **274** F623-F627.

Sharma R, Sharma M, Vamos S, Savin VJ & Wiegmann TB 2001 Both subtype 1 and 2 receptors of angiotensin II participate in regulation of intracellular calcium in glomerular epithelial cells. *Journal of laboratory and clinical medicine* **138** 40-49.

Shelat SG, King JL, Flanagan-Cato LM & Fluharty SJ 1999 Mineralocorticoids and glucocorticoids cooperatively increase salt intake and angiotensin II receptor binding in rat brain. *Neuroendocrinology*. **69** 339-351.

Shepherd A & Cleary MP 1984 Metabolic alterations after dehydroepiandrosterone treatment in Zucker rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* **246** E123-E128.

Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J & Klagsbrun M 1984 Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223** 1296-1299.

Shulman DI, Sweetland M, Duckett G & Root AW 1987 Effect of estrogen on the growth hormone secretory response to GH-releasing factor in the castrate adult female rat *in vivo*. *Endocrinology* **120** 1047-1051.

Simard J & Labrie F 1987 Adrenal C₁₉-5-ene steroids induce full estrogenic responses in rat pituitary gonadotrophs. *Journal of Steroid Biochemistry* **26(5)** 539-546.

Simard J, Vincent A., Duchesne R. & Labrie F. 1988 Full oestrogenic activity of C₁₉-delta 5 adrenal steroids in rat pituitary lactotrophs and somatotrophs. *Molecular and Cellular Endocrinology* **55** 233-242.

Sinha YN 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine reviews* **16** 354-369.

Sourla A, Martel C, Labrie C & Labrie F. 1998 Almost exclusive androgenic action of dehydroepiandrosterone in the rat mammary gland. *Endocrinology* **139** 753-764.

Sourla A, Richard V, Labrie F & Labrie C 2000 Exclusive androgenic effect of dehydroepiandrosterone in sebaceous glands of rat skin. *Journal of Endocrinology* **166** 455-462.

Stavreus-Evers A, Parini P, Freyschuss B, Elger W, Reddersen G, Sahlin L & Eriksson H 2001 Estrogenic influence on the regulation of hepatic estrogen receptor-alpha and serum level of angiotensinogen in female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. **78** 83-88.

Steele MK, Brownfield MS & Ganong WF 1982 Immunocytochemical localization of angiotensin immunoreactivity in gonadotrophs and lactotrophs of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*. **35** 155-158.

Stefaneanu L, Kovacs K, Lloyd R, Scheithauer B, Young WJ, Sano T & Jin L 1992 Pituitary lactotrophs and somatotrophs in pregnancy: a correlative in situ hybridization and immunocytochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. **62** 291-296.

Stoll M, Meffert S, Stroth U & Unger T 1995a Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *Journal of Hypertension* **13** 1529-1534.

Stoll M, Muscha Steckelings U, Paul M, Bottari SP, Metzger R & Unger T 1995b Angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. **95** 651-657.

Su JZ, Fukuda N, Jin XQ, Lai YM, Suzuki M, Tahira Y, Takagi H, Ikeda Y, Kanmatsuse K & Miyazaki H 2002 Effect of AT₂ receptor on expression of AT₁ and TGF- β receptors in VSMCs from SHR. *Hypertension*. **40** 853-858.

Suarez C, Diaz-Torga G, Gonzalez Iglesias A, Cristina C & Becu-Villalobos D 2004 Upregulation of Angiotensin II type 2 (AT₂) receptor expression in estrogen-induced pituitary hyperplasia. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)* **286** E786-E794.

Suarez C, Garcia Tomadú I, Cristina C, Vela J, Gonzalez Iglesias A, Libertun C, Diaz-Torga G & Becu-Villalobos D 2002 Angiotensin and calcium signaling in the pituitary and hypothalamus. *Cellular and Molecular Neurobiology* **22** 315-333.

Svec F & Porter J 1998 The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **218** 174-191.

Swanson G, Hanesworth J, Sardinia M, Coleman J, Wright J, Hall K, Miller-Wing A, Stobb J, Cook V, Harding E & et al 1992 Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept*. **40** 409-419.

Takeda-Matsubara Y, Nakagami H, Iwai M, Cui TX, Shiuchi T, Akishita M, Nahmias C & Ito M 2002 Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension*. **39** 41-45.

Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K & Miyazaki H 1995 Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **207** 593-598.

Tanaka M, Tsuchida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M & Inagami T 1999 Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT₁ receptor in AT₂ knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **258** 194-198.

Terada Y, Tomita K, Homma MK, Nonoguchi H, Yang T, Yamada T, Yuasa Y, Krebs EG & Marumo F 1995 Sequential activation of MAP kinase cascade by angiotensin II in opossum kidney cells. *Kidney International* **48** 1801-1809.

Thorner 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.

- Tian Y, Smith RD, Balla T & Catt KJ 1998 Angiotensin II activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and Ras/Raf-1 kinase in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **139** 1801-1809.
- Timmermans PBMWM, Benfield P, Chiu AT, Herblin WF, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JM & Smith RD 1993 Angiotensin II receptors and angiotensin II antagonists. *Pharmacological Reviews* **45** 205-251.
- Toth E & Horvath C 2002 [The role of adrenal and gonadal hormones in the pathogenesis of autoimmune polyarthritis]. *Orv Hetil.* **143** 1121-1128.
- Touyz R & Berry C 2002 Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res.* **35** 1001-1015.
- Tsai SC, Lu CC, Lau CP, Hwang GS, Lee HY, Chen SL, Huang SW, Shih HC, Chen YH, Chiao YC, Wang SW & Wang PS 1996 Progesterone stimulates in vitro release of prolactin and thyrotropin involving cAMP production in rat pituitary. *Chinese Journal of Physiology* **39** 245-251.
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M & Iwasaka T 1998 Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ.Res.* **83** 1035-1046.
- Tuomisto J & Mannisto P 1985 Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacological Reviews* **37** 249-332.
- Unger T 1999 The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *Journal of Hypertension* **17** 1775-1786.
- Valtysdottir S, Wide L & Hakkgreb R 2003 Mental wellbeing and quality of sexual life in women with primary Sjogren's syndrome are related to circulating dehydroepiandrosterone sulphate. *Ann Rheum Dis.* **62** 875-879.
- van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE & Lefkowitz RJ 1996 Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* **17** 698-714.
- Van Vollenhoven RF. 2002 Dehydroepiandrosterone for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Pharmacother.* **3** 23-31.
- Vermeulen A 1997 Juvenile hormones, reality or myth? *Verh K Acad Geneeskd Belg* **59(1)** 19-33.
- Viswanathan M & Saavedra J 1992 Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides.* **13** 783-786.
- Viswanathan M, Stromberg C, Seltzer A & Saavedra J 1992 Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptors in neointima of rat aorta. *J Clin Invest.* **90** 1707-1712.
- Vrontakis ME, Yamamoto T, Schroedter IC, Nagy JI & Friesen HG 1989 Estrogen induction of galanin synthesis in the rat anterior pituitary gland demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neurosciences Letters* **100** 59-64.
- Ward CW, Costoff A & Mahesh VB 1978 The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Biology of Reproduction* **18**

614-623.

Weber H, Taylor D & Molloy C 1994 Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest.* **93** 788-798.

Wehrenberg W & Giustina A 2000 Neuroendocrine regulation of Growth Hormone secretion. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edn 1, pp 181-195. Eds M Conn & ME Freeman. Totowa, New Jersey: Humana Press.

Weidner N, Semple J, Welch W & Folkman J 1991 Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* **324** 1-8.

Wen Y, Nadler JL, Gonzales N, Scott S, Clauser E & Natarajan R 1995 Mechanism of Ang II-induced mitogenic responses: role of 12-lipoxygenase and biphasic MAP kinase. *American Journal of Physiology* **271** C1212-C1220.

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.

Wintour EM, Moritz K, Butkus A, Baird R, Albiston A & Tennis N 1999 Ontogeny and regulation of the AT₁ and AT₂ receptors in the ovine fetal adrenal gland. *Molecular and Cellular Endocrinology* **157** 161-170.

Wolf OT & Kirschbaum C 1999 Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animals and humans. *Brain Research Reviews* **30** 264-288.

Woods A, Hall P, Shepherd N, Hanby A, Waseem N, Lane D & Levinson D 1991 The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S + G2 + M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* **19**; 21-27. 21-27.

Wynick D, Hammond PJ, Akinsanya KO & Bloom SR 1993 Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function. *Nature* **364** 529-532.

Wynick D, Small CJ, Bacon A, Holmes FE, Norman M, Ormandy CJ, Kilic E, Kerr NCH, Ghatei M, Talamantes F, Bloom SR & Pachnis V 1998 Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95** 12671-12676.

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.

Yan Z, Lee GY & Anderson E 1997 Influence of dehydroepiandrosterone on the expression of insulin-like growth factor-1 during cystogenesis in polycystic rat ovaries and in cultured rat granulosa cells. *Biology of Reproduction* **57**(6) 1509-1516.

Yang JY, Schwartz AG & Henderson EE 1994 Inhibition of 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant HIV-1 infection by dehydroepiandrosterone in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201** 1424-1432.

Yin G, Yan C & Berk BC 2003 Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35** 780-783.

Ying C, Gregg DW & Gorski J 1996 Estrogen-induced changes in rRNA accumulation and

RNA polymerase I activity in the rat pituitary: correlation with pituitary tumor susceptibility. *Molecular and Cellular Endocrinology* **118** 213.

Yu C, Liu Y & Chen C 2002 Dehydroepiandrosterone attenuates allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-sensitized mice. *J Microbiol Immunol Infect.* **35** 199-202.

Zafar M, Ezzat S, Ramyar L, Pan N, Smyth H & Asa S 1995 Cell-specific expression of estrogen receptor in the human pituitary and its adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* **80** 3621-3627.

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

Zhao Y, Biermann T, Luther C, Unger T, Culman J & Gohlke P 2003 Contribution of bradykinin and nitric oxide to AT2 receptor-mediated differentiation in PC12 W cells. *J Neurochem* **85** 759-767.

Zhuang Z, Ezzat S, Vortmeyer A, Weil R & Lubensky IA. 1997 Mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in pituitary tumors. *Cancer Research* **57** 5446-5451.

Zou Y, Komuro I, Yamazaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T & Yazaki Y 1996 Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **271** 33592-33597.

Zwain IH & Yen SS 1999a Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology* **140**(2) 880-887.

Zwain IH & Yen SS 1999b Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* **140**(8) 3843-3852.