# Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

# **Tesis** Doctoral

Estudio de la participación del receptor de dopamina D2 en la regulación de lactotropodos hipofisarios y su influencia en el desarrollo de prolactinomas mediante la generación de un ratón transgénico tejido específico

# Pérez Millán, María Inés

2010

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 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:

Pérez Millán, María Inés. (2010). Estudio de la participación del receptor de dopamina D2 en la regulación de lactotropodos hipofisarios y su influencia en el desarrollo de prolactinomas mediante la generación de un ratón transgénico tejido específico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Cita tipo Chicago:

Pérez Millán, María Inés. "Estudio de la participación del receptor de dopamina D2 en la regulación de lactotropodos hipofisarios y su influencia en el desarrollo de prolactinomas mediante la generación de un ratón transgénico tejido específico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

## **EXACTAS** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA** Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

#### ESIUDIO DE LA PARIICIPACIÓN DELRECEPIOR DE DOPAMINA D2 EN IA REGULACIÓN DE LACTOTROPOS HIPOFISARIOS Y SU INFLUENCIA EN EL DESARROLLO DE PROLACTINOMAS MEDIANIE LA GENERACIÓN DE UN RATÓN TRANSGÉNICO TEJIDO ESPECÍFICO

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas

# Lic. María Inés Pérez Millán

Directores de tesis:

Dra Damasia Becú

Dr Marcelo Rubinstein

Consejero de estudios: Dr Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación Hipofisaria, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Laboratorio de animales transgénicos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET).

Buenos Aires, Febrero 2010.

INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. LA DOPAMINA	5
1.1 Síntesis, liberación y degradación de la dopamina	5
1.2 Vías dopaminérgicas	9
1.3 Receptores dopaminérgicos	12
2. Hipófisis	15
2.1 Prolactina	16
2.2 Hormona de crecimiento	18
3. TUMORES HIPOFISARIOS	20
3.1 Patogénesis hipofisaria	21
3.2 Prolactinomas	22
3.2.1 Modelos experimentales de prolactinomas	
OBJETIVOS GENERALES	29
CAPÍTULO 1	30
GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA DE RATONES MUTANTES	20
OBJETIVOS DEL CAPITULO 1	31
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1. Sistema Cre-loxP	33
2. ANIMALES TRANSGÉNICOS COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO	37
3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PROLACTINA	38
4. PROLACTINA Y METABOLISMO	39
4.1 Prolactina y la regulación del peso corporal	40
4.2 Prolactina, páncreas e insulina	41
4.3 Prolactina y tejido adiposo	
CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS:	44
Parte 1. Generación de líneas de ratones transgénicos Prl-Cre	44
a. Construcción del transgén Prl-Cre	44
Cortes con enzimas de restricción y aislamiento por electroelución	48
Reacciones de ligación	18
Durana a ción da bastanias comunicatas	
Freparación de bacterias competentes	
Transformación por electroporación	
Identificación de colonias con el inserto deseado	
b. Preparación del transgén Prl-Cre para la microinyección pronuclear	50
c. Generación del ratón transgénico Prl-Cre	51
Obtención de embriones	51
Microinyección pronuclear	
Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas	53
d Identificación y caracterización de los retones transpónicos	53
a. Inchrigtención y curacientación de 105 ratories transgenicos	
Extruction de ADN genomico	
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
Determinación de la distribución de la enzima Cre recombinasa	55
Inmunohistoquímica para Cre y Prolactina visualizada en campo claro	55

Inmunohistoquímica para Cre y Prolactina visualizada con microscopía electrónica.	
Inmunofluorescencia para Cre	60
PCR en tiempo real para ARNm de Cre	
Determinación de la actividad de la recombinasa Cre	
Obtención de animales doble transgénicos Prl-Cre.EGFP+	
Cruza de las líneas Prl-Cre con ratones C57Bl/6J	
PARTE 2. RATÓN PITD2RKO	65
Caracterización de los animales pitD2RKO	
Hibridación in situ para el RD2	
Colección de muestras de sangre y orina	
Niveles de PRL en sangre basales e inducidos por haloperidol	
Niveles de PRL en sangre en hembras y machos a lo largo del crecimiento	71
Niveles de IGF-1 en sangre	71
Obtención de muestras para el estudio del ciclo estral	
Desarrollo de catatonía inducida por haloperidol	
Talla y curvas de peso	73
Ingesta de alimento	73
Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT)	
Niveles de insulina pancreática	
Niveles de MUPs en orina	
Analisis de la generación de prolactinomas en hembras pitD2KKO	
Anál Isis Estadístico	
CAPITULO 1: RESULTADOS	
PARTE 1. GENERACIÓN DE LÍNEAS DE RATONES TRANSGÉNICOS PRL-CRE	
a. Construcción de un transgén que expresa la recombinasa Cre bajo el promotor	de prolactina 78
b. Producción de animales transgénicos Prl-Cre	
c. Distribución de la expresión de la recombinasa Cre en las líneas de transgénico	os Prl-Cre81
Expresión de ARNm de Cre	
Expresión de Cre en hipófisis	
Colocalización de prolactina y la recombinasa Cre	
d. Línea reportera ROSA-EGFP	
Expresión de EGFP en hipófisis y colocalización con PRL	
PARTE 2. RATONES PITD2RKO	
Caracterización de las líneas de ratones pitD2RKO	
Hibridación in situ para el ARNm del RD2	
Niveles de PRL sérica basales e inducidos vor haloveridol en ratones vitD2RKO adu	ıltos90
Catatonia inducida por haloperidol	
Niveles de PRI en sanore a lo largo del crecimiento	94
Ciclo estral	
Curringe da nace u talla	
Curvus ut ptou y tuttu Incosta da alimento	
Ingesta de la mento.	
ivioeies de insuina en el pancreas y tolerancia a la glucosa	
Niveles de IGF-I en sangre en machos y hembras adultas	
MUPs en orina en machos y hembras adultas	

Generación de hiperplasia hipofisaria en hembras pitD2RKO	105
Proliferación celular y angiogénesis en adenomas hipofisarios en hembras pitD2RKO	108
CAPÍTULO 1: DISCUSIÓN	111
CAPÍTULO 2	
ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS	123
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 2	124
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN	125
1. TUMORES HIPOFISARIOS	
1.1 Clasificación	125
2. Angiogénesis	132
2.1 Medidas de angiogénesis	136
3. PROLIFERACIÓN	137
4. TUMORES Y NESTINA	138
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	140
PACIENTES	140
INMUNOHISTOQUÍMICA	140
Análisis estadístico	141
CAPÍTULO 2: RESULTADOS	142
Proliferación	143
Marcadores de angiogénesis	144
CORRELACIÓN ENTRE PROLIFERACIÓN Y ANGIOGÉNESIS	151
NESTINA	152
CAPÍTULO 2: DISCUSIÓN	156
CONCLUSIÓN GENERAL	162
BIBLIOGRAFÍA	165

# Estudio de la participación del receptor de dopamina D2 en la regulación de lactotropos hipofisarios y su influencia en el desarrollo de prolactinomas mediante la generación de un ratón transgénico tejido específico

Con el objetivo de estudiar la participación del receptor dopaminérgico D2 (RD2) en células hipofisarias productoras de prolactina hemos desarrollado ratones mutantes incapaces de expresar el gen de RD2 (Drd2) selectivamente en lactotropos. Para producir estos ratones con mutaciones nulas de Drd2 restringidas a lactrotropos generamos ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de prolactina de ratón (PrI-Cre) y luego los cruzamos con ratones mutantes condicionales para el gen del RD2 (Drd2<sup>flox/flox</sup>) para producir ratones mutantes y transgénicos compuestos (Drd2<sup>flox/flox</sup>.Tg PrI-Cre). La caracterización molecular y bioquímica mostró que los ratones Drd2<sup>flox/flox</sup>.Tg PrI-Cre no expresan Drd2 en el lóbulo anterior de la hipófisis pero sí en el lóbulo intermedio y en todas las áreas del cerebro donde Drd2 se expresa normalmente. En consecuencia, esta nueva cepa de ratones con mutaciones nulas de Drd2 restringidas a lactotropos fue denominada pitD2RKO. Los ratones pitD2RKO presentan niveles elevados de prolactina que resultan extremadamente altos en hembras adultas aue desarrollan prolactinomas hipofisarios. Como consecuencia de la falta de receptores RD2 lactotrópicos, los niveles de prolactina de los ratones pitD2RKO no aumentan luego de la administración aguda del antagonista de RD2s, haloperidol. Las curvas de crecimiento corporal de los ratones pitD2RKO resultaron normales así como los distintos parámetros asociados al eje de la hormona de crecimiento (GH), en marcado contraste con lo estudiado en ratones mutantes totales del RD2 (Drd2-/-) que son enanos. Esta observación indica que la ausencia de RD2s de los lactotropos hipofisarios no es responsable del déficit severo presente en el eje de GH de los ratones Drd2<sup>-/-</sup>. Sorprendentemente, las hembras pitD2RKO presentan un aumento considerable de la ingesta de alimento y del peso corporal a partir de los 90 días de edad, probablemente como consecuencia de los elevados niveles prolactinomas prolactina. Finalmente, analizamos crónicos de los experimentales resultantes en nuestro nuevo modelo y ampliamos el estudio a adenomas hipofisarios humanos; en ambos casos, de manera interesante, observamos un aumento en la proliferación celular y en la angiogénesis de los adenomas respecto a las hipófisis controles, contrariamente a lo publicado.

Palabras clave: sistema Cre/*loxP*, receptor de dopamina D2, adenomas hipofisarios, prolactina.

# Study of the participation of dopamine D2 receptor in pituitary lactotropes and their influence in the development of prolactinomas by generation of a transgenic tissue specific mouse

To study the participation of the dopamine D2 receptor (D2R) on pituitary lactotropes we have generated mutant mice that are unable to express the D2R gene (Drd2) selectively in lactotropes. We first generated transgenic mice expressing Cre recombinase under the transcriptional control of the mouse prolactin promoter (PrI-Cre). PrI-Cre transgenic mice were mated with mutant mice carrying conditional null mutations of Drd2 (Drd2<sup>flox/flox</sup>) to produce compound mutant/transgenic mice (Drd2<sup>flox/flox</sup>.Tg PrI-Cre). Molecular and biochemical characterization of these mice showed they lack Drd2 expression in the anterior lobe of the pituitary while normally expressing *Drd2* in the pituitary intermediate lobe and in all brain areas. Thus, we designated this novel lactotrope-specific Drd2 mutant mouse strain pitDrd2-<sup>-/-</sup> o pitD2RKO. PitD2RKO mice had elevated serum prolactin levels that were extremely high in adult females which eventually developed pituitary prolactinomas. As a result of lactototrope D2R disruption, the acute administration of the D2R antagonist haloperidol failed to raise prolactin levels in pitD2RKO mice. Body growth curves in pitD2RKO mice were normal as well as several parameters related to the growth hormone (GH) axis, in clear contrast to what had been shown in null Drd2 mutant mice (Drd2--- or D2RKO). This observation indicates that the absence of D2Rs in pituitary lactotropes is not responsible for the severe GH axis deficit found in D2RKO mice. Strikingly, pitD2RKO female mice developed a considerable increase in food intake and body weight starting at 90 days old, probably as a consequence of their chronically elevated prolactin levels. Finally, we analyzed the resulting experimental prolactinomas in our new model and extended the study to human pituitary adenomas. In both cases we observed a rise in cell proliferation and angiogenesis in the pituitary adenomas respect to the normal pituitary.

Key words: Cre/loxP system, dopamine D2 receptor, pituitary adenomas, prolactin.

## Introducción General

#### 1. La dopamina

La función de la dopamina (DA) como un potencial neurotransmisor en vías neuronales específicas del sistema nervioso central fue sugerida a fines de la década del 50 por el neurofarmacólogo Arvid Carlsson, quien por este decubrimiento recibió el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 2000. La DA fue llamada asi porque es una monoamina, y su precursor es la 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, (1)).

#### 1.1 Síntesis, liberación y degradación de la dopamina

La DA es biosintetizada en numerosos tejidos, principalmente en el tejido nervioso, en la médula de las glándulas suprarrenales, primero por la hidroxilación de los aminoácidos L-tirosina a L-DOPA mediante la enzima tirosina hidroxilasa, y después por la decarboxilación de la L-DOPA por la L-aminoácido aromático decarboxilasa (que se denomina frecuentemente como dopa decarboxilasa, Figura 1). En células noradrenérgicas la enzima dopamina-β-hidroxilasa convierte a la DA en NA mientras que en células adrenérgicas la enzima feniletanolamina N-metiltranferasa convierte a la NA en adrenalina.



**Figura 1: Biosíntesis de la dopamina.** A través de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas, el aminoácido L-tirosina se transforma en L-DOPA, para luego decarboxilarse mediante la DOPAdecarboxilasa, generando dopamina (DA).

En neuronas, después de su síntesis, la DA es almacenada en vesículas, las que son liberadas en las sinapsis en respuesta a un potencial de acción presináptico (Figura 2). La DA es incorporada a las vesículas a través de un transportador de alta afinidad (VMAT2), que funciona acoplado a una bomba de protones (H<sup>+</sup>) dependiente de la hidrólisis de adenin tri fosfato (ATP) (2) que introduce una molécula de DA al interior de la vesícula por cada dos protones eliminados. Cuando ocurre la despolarización del terminal sináptico por la llegada de un potencial de acción se abren canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje presentes en el terminal, y la consiguiente entrada de Ca<sup>2+</sup> promueve la fusión de las vesículas conteniendo al neurotransmisor con la membrana

sináptica, provocando la descarga de su contenido al espacio sináptico.

La finalización de la señal dopaminérgica ocurre a través del transportador de dopamina (DAT) presente en el terminal presináptico, el cual recapta la DA extracelular dependiendo de un gradiente de Na<sup>+</sup> (3). La actividad del transportador está regulada por los niveles de DA presentes en el espacio sináptico dado que la acción de la DA sobre sus receptores presinápticos conduce a una cascada de transducción de señales que culmina en la fosforilación del DAT, incrementando su actividad (4). Una vez recaptada, la DA puede ser almacenada nuevamente en las vesículas para su reutilización, o degradada por la enzima monoamina oxidasa (MAO, Figura 2).

Las vías de degradación de la DA dependen de las enzimas metabólicas que se encuentran en diferentes células y tejidos. La DA recaptada dentro del terminal es degradada por la MAO, una enzima que se encuentra en las mitocondrias (Figura 2). Existen dos isoenzimas capaces de degradar monoaminas, la MAO-A y la MAO-B, que se diferencian en su especificidad celular y tisular siendo la MAO-A más afín por la NA y la serotonina y la MAO-B más afín por la DA. El producto final de la acción de la MAO sobre la DA es el ácido 3,4dihidroxifenilacético (DOPAC). Por otro lado, la DA presente en el espacio sináptico también puede ser degradada por intermedio de la catecol O-metiltransferasa (COMT), una enzima que se expresa en la membrana celular, y cuyo metabolito es la 3-O-metildopamina, que luego es convertida en ácido homovainillínico (HVA) por la MAO intracelular.

7



**Figura 2: Esquema de una sinapsis dopaminérgica**. La DA, una vez sintetizada, es incorporada a las vesículas a través del transportador VMAT2. La liberación de DA se produce por la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular, a través de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes activados por la llegada de un potencial de acción, que promueve la unión de las vesículas a la membrana externa. La DA una vez liberada, puede actuar en los receptores pre o post- sinápticos. El transportador de DA produce una rápida internalización de la DA que, una vez recaptada, es degradada por la MAO al metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). El DOPAC puede ser convertido a HVA por acción de la COMT. Abreviaturas: DA: dopamina; MAO: monoaminooxidasa; COMT: catecol-O-metil-transferasa; HVA: ácido homovanílico, metabolito de la DA; VMAT: transportador vesicular de las monoaminas; AC: adenil ciclasa; AMPc: adenosinamonofosfato cíclico; Gs y Gi: proteínas G estimuladoras e inhibitorias de la AC (Tomada de (5)).

#### 1.2Vías dopaminé rgicas

En el sistema nervioso central, la DA es sintetizada por las neuronas de la sustancia nigra y del área tegmental ventral y por neuronas hipotalámicas del núcleo arcuato. Las neuronas dopaminérgicas de estas áreas proyectan sus axones a diferentes zonas, formando así las distintas vías dopaminérgicas (Figura 3):

- 1- La vía nigroestriatal: está formada por las neuronas que proyectan desde la zona compacta de la substantia nigma (SNpc) del cerebro medio hacia el estriado (o caudado-putamen), producen el 70% de la DA del cerebro. La degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales conduce a la enfermedad de Parkinson, que se caracteriza por temblores, rigidez postural y bradiquinesia (dificultad para iniciar los movimientos).
- 2- La vía mesocortical: las neuronas de esta vía unen el área tegmental ventral con el área prefrontal medial, cingulada y entorrinal de la corteza y áreas límbicas. Está relacionada con funciones emocionales, motivacionales y cognitivas cuya disfunción se vincula a la etiología de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia.
- 3- La vía mesolímbica: el tracto mesolímbico proyecta hacia zonas del cerebro anterior como el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, la amígdala y la corteza piriforme. Estas neuronas presentan un interés particular por estar involucradas en los efectos euforizantes y de refuerzo producidos por las drogas de abuso como la nicotina, cocaína, alcohol, anfetamina y opioides (6).
- 4- La vía tuberoinfundibular: es un sistema neuroendócrino compuesto por neuronas ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo (región A12) que proyectan hacia el lóbulo

intermedio de la hipófisis y hacia el extremo basal de la eminencia media donde se encuentran los vasos portales que irrigan la hipófisis DA liberada anterior. La por estas neuronas tuberoinfundibulares DAérgicas (TIDA) actúa sobre la hipófisis regulando la síntesis y liberación de péptidos derivados de la proopiomelanocortina y la prolactina de manera inhibitoria (Figura 4). Las células lactotropas que producen prolactina, secretan esta hormona continuamente en ausencia de DA. La prolactina a su vez estimula la liberación de DA a modo de retroalimentación corta. Las alteraciones de esta vía neuroendócrina modifican la liberación de hormonas hipofisarias generando problemas metabólicos y de fertilidad, y pueden conducir al desarrollo de tumores hipofisarios (7) (8). Otro grupo de neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato y de la parte ventral del núcleo periventricular anterior, proyectan directamente sobre los lóbulos intermedio y posterior de la hipófisis, y se denomina haz tuberohipofisario dopaminérgico, THDA. Esta vía regula hormonas de la hipófisis intermedia, como la hormona melanocito estimulante o α-MSH, y además la DA descargada en el lóbulo neural alcanza la hipófisis anterior por los vasos portales cortos.



**Figura 3. Vías dopaminérgicas principales en el cerebro.** Las neuronas de la vía dopaminérgica nigroestriatal presentan los cuerpos celulares en la *sub stantia nigra pars compacta* (A9), en el cerebro medio y proyectan sus axones hacia el cuerpo estriado. El sistema mesocorticolímbico posee los cuerpos celulares en el área tegmental ventral (A10) y proyecta hacia el núcleo *ac c umbe ns*, el tubérculo olfatorio, la corteza prefrontal y corteza entorrinal, la amígdala, entre otros. La vía más corta (A12) se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo e inerva la hipófisis a través de la circulación portal (Modificada de (9)).



11

**Figura 4. Diagrama de los sistemas dopaminérgicos hipotalámicos-hipofisarios.** Las neuronas TIDA se originan en la región A12 del núcleo arcuato dorsomedial. Tienen axones cortos que terminan en la zona externa de la eminencia media cerca del plexo capilar primario de los vasos portales. La dopamina liberada es transportada por los vasos portales largos hacia el lóbulo anterior (LA) de la pituitaria. Las neuronas THDA/PHDA se originan principalmente en la región A14 del núcleo periventricular y envían proyecciones a los lóbulos neural (LN) e intermedio (LI) de la pituitaria. Los vasos portales cortos conectan ente el LN y el LA, pero no al LI el cual es avascular (Tomada de (10)).

La DA cumple muchas funciones en el cerebro, incluyendo la participación importante en el comportamiento y la cognición, la actividad motora, la motivación y la recompensa, la regulación de la producción de leche, el sueño, el humor, la atención, y el aprendizaje.

#### 1.3 Receptores dopaminérgicos

Todos los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete pasos transmembrana, tres *lo o p s* extracelulares y tres intracelulares (8).

Hasta el presente se han descripto cinco receptores agrupados en dos subfamilias. La subfamilia D1, que incluye los receptores D1 y D5, que se encuentran acoplados en forma positiva a la adenilato ciclasa, y la subfamilia D2, que incluye los receptores D2, D3 y D4, acoplados en forma negativa a la adenilato ciclasa o a otras cascadas de transducción de señales.

La porción extracelular aminoterminal contiene un número similar de aminoácidos en todos los subtipos de receptores, pero varía el número y sitio de las glicosilaciones. La porción carboxiterminal es 7 veces más larga en los receptores tipo D1 respecto a los receptores tipo D2 (RD2). Esta región carboxiterminal es rica en residuos serina y treonina, y contiene el residuo de cisteína conservado en todos los receptores acoplados a proteína G. En los receptores tipo D1, el residuo de cisteína se encuentra cerca del inicio del extremo carboxiterminal, mientras que en los D2 este residuo se encuentra al final de la porción carboxiterminal del receptor. Por otro lado, el tercer *lo o p* intracelular es mayor en la subfamilia D2 que en la D1.

Como mencionamos previamente en el sistema nervioso central el RD2 se encuentra distribuido en núcleos donde se originan las vías dopaminérgicas centrales, indicando que este receptor es uno de los principales autorreceptores. En la hipófisis los principales tipos celulares donde se localizan los RD2 son los lactotropos y los melanotropos. El RD3 tiene una distribución específica en áreas límbicas (11), mientras que el RD4 aparece altamente expresado en la corteza frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo y mesencéfalo.

En esta tesis, nos centraremos en el RD2, que representa el principal autorreceptor de los sistemas dopaminérgicos, importante para la transmisión postsináptica, y es el principal receptor dopaminérgico hipofisario a través del cual se regula la síntesis y secreción de prolactina. Este receptor ha sido el objeto de numerosos estudios que demostraron su participación en importantes procesos fisiológicos, como la liberación y síntesis de hormonas hipofisarias y el control de la actividad motora. Los RD2 representan el blanco terapéutico de drogas antipsicóticas de mayor importancia, así como de diversos procesos neuropatológicos como la enfermedad de Parkinson y el Síndrome de Tourette. También los agonistas del RD2 son el tratamiento de adenomas hipofisarios, usados en más específicamente en pacientes con prolactinomas.

13

Por otro lado, la gran mayoría de las drogas que se utilizan en la clínica para tratamiento de obesidad a nivel central tienen acciones sobre el sistema monoaminérgico. Muchas de ellas se relacionan con la inhibición de la recaptación de los neurotransimores como serotonina y dopamina. La dopamina regularía el apetito y la saciedad al actuar en áreas hipotalámicas específicas. Sin embargo, los efectos de la dopamina en el control del apetito no son claros y resultan conflictivos a la hora de interpretarlos. Se observó que el tratamiento sistémico con agonistas de los receptores D1/D2 disminuyen la ingesta (12;13). En contraposición, otros estudios demuestran que si se utilizan agonistas selectivos específicos para el RD2 la ingesta aumenta (14).

Los RD2 también se encuentran fuera del sistema nervioso central como en la hipófisis, glándula adrenal, riñón, corazón, vasos sanguíneos, páncreas y ganglios simpáticos.

Los genes que codifican para estos receptores poseen una organización genómica con múltiples exones, lo que permite variantes de receptores por procesamientos alternativos del ARNM. El RD2 presenta dos variantes funcionales, una isoforma corta (D2S) y una larga (D2L), que difieren en 29 aminoácidos en el tercer loop intracelular. Ambas variantes del receptor se unen a proteínas G inhibitorias (Gi). Otra particularidad de estas dos isoformas es que están involucradas en forma diferencial en la función presináptica y la postsináptica. Mediante el estudio de ratones que carecen de la expresión de la isoforma larga ( $D2L^{r/r}$ ) se observó que estos receptores estarían preferentemente involucrados en las respuestas postsinápticas mientras que los D2S actuarían como autorreceptores inhibitorios en las neuronas del cerebro medio (15).

En la rata, el eje dopaminérgico hipotálamo-hipofisario está involucrado en la diferenciación, proliferación y supervivencia de células de la hipófisis durante el desarrollo (16). Las acciones de la dopamina en la hipófisis están integradas principalmente por los RD2. Los lactotropos y melanotropos expresan tanto la forma larga del receptor dopaminérgico tipo 2, D2L, como la forma corta, D2S (17). Existen distintas subpoblaciones de lactotropos que expresan ambas variantes en distintas proporciones (8). El cociente D2L/D2S se ve afectado por esteroides sexuales in vitro (18) (19). Por otro lado, el estradiol disminuye el efecto de la dopamina a nivel hipofisario, es decir su actividad inhibitoria de la prolactina (20), y también afecta el metabolismo de la dopamina hipotalámica (21). Ratones que sobreexpresan la isoforma D2S presentan un drástico descenso de los niveles de PRL, mientras que aquellos que sobreexpresan la isoforma D2L por el contrario, poseen elevados niveles de la hormona, sugiriendo que ambas isoformas tienen funciones distintas en la hipófisis (19). Aunque estudios in vitro determinan que la principal vía de la DA en los lactotropos es mediante los D2S (17). La acción de dopamina sobre otros tipos celulares de la hipófisis es más controvertida.

Como en esta tesis estudiamos el RD2 de la hipófisis, a continuación se describe dicha glándula y su función.

#### 2. Hipófisis

La hipófisis es una glándula pequeña que se encuentra en la base del cerebro, sobre el bolsillo o fosa del hueso esfenoides denominada silla turca, ya que su forma es semejante a una montura o silla de montar. Está subdividida en dos lóbulos, el anterior o adenohipófisis y el posterior o neurohipófisis. Entre ambos existe una pequeña zona llamada *pars inte me dia* o hipófisis intermedia. En los humanos esta zona es prácticamente inexistente pero en otras especies de vertebrados como los roedores es más grande y funcional.

El desarrollo de la hipófisis responde a la actividad de distintos factores de transcripción y hormonas que en forma coordinada establecen cada linaje celular. Entre los grupos celulares presentes en la adenohipófisis, el linaje tiro-somato-mamotropo recibió especial atención. Este linaje da origen a los tirotropos o células secretoras de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), a los somatotropos o células secretoras de la hormona de crecimiento (GH) y finalmente como último paso de esta línea de diferenciación a los lactotropos o células secretoras de PRL. Se demostró que la expresión de los factores de transcripción Prop-1 y Pit-1/GHF1 es un prerrequisito temprano para la determinación de este linaje, que requiere además de factores hipotalámicos como GHRH para la proliferación de somatotropos (22) y de estrógenos para la proliferación de lactotropos (23). Por otro lado, se encuentran dentro de la hipófisis las células gonadotropas, productoras de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH); las corticotropas que producen la hormona estimulante de la corteza suprarrenal (ACTH), las melanotropas o productoras de la hormona estimulante de melanocitos (MSH), y las folículo estrelladas que tienen funciones de soporte y comunicación paracrina.

En el presente trabajo, nos centraremos en las células hipofisarias que sintetizan y liberan prolactina, los lactotropos.

#### 2.1 Prolactina

La hormona PRL fue identificada en 1928 y purificada en 1939. Su localización más conocida es en las células de la hipófisis anterior, los lactotropos. En humanos también fue identificada en el sistema nervioso central, el sistema inmune, el útero y la glándula mamaria.

Actúa en numerosos tejidos como el hígado, el ovario, el testículo, la próstata y principalmente en la glándula mamaria. Es tal vez, la hormona hipofisaria que participa en el mayor número y diversidad de procesos fisiológicos (24).

Las células secretoras de PRL se detectan recién a las semanas 15-17 embrionarias en humanos y el contenido hipofisario de PRL aumenta desde la mitad hasta el fin de la gestación sin una diferencia aparente entre Los niveles séricos fetales también sexos. aumentan progresivamente hasta alcanzar un pico antes del nacimiento, inmediatamente después se da otro aumento que dura varios días y declina en el primer mes de vida. Después de la pubertad, las concentraciones séricas de PRL en mujeres son el doble respecto a los hombres. En el embarazo la PRL circulante aumenta progresivamente hasta 7-10 veces más que en mujeres no embarazadas y este aumento de PRL es necesario para el correcto desarrollo de la glándula mamaria para la posterior lactancia (24).

La secreción de PRL está afectada por numerosos estímulos, tanto externos como internos. La succión es el estímulo externo de mayor importancia y el estrés y los niveles de esteroides gonadales también aumentan la liberación de PRL. Muchos estímulos son traducidos por el hipotálamo, que elabora y secreta hacia la hipófisis una serie de factores liberadores (PRF) o inhibidores (PIF) de la secreción de PRL.

Los lactotropos presentan una alta actividad espontánea de secreción de PRL. Por este motivo, la secreción de PRL está bajo un control hipotalámico tónico inhibitorio. La DA, como ya mencionamos, es el neurotransmisor catecolaminérgico principal en la inhibición de la PRL, es capaz de inhibir tanto *in vivo* como *in vitro*, a través de los RD2 (25).

También, la PRL es capaz de regular su propia liberación al actuar sobre el sistema dopaminérgico del hipotálamo. El aumento de PRL produce un aumento en la actividad de las células TIDA, por lo que disminuye la liberación hormonal por parte de los lactotropos. Estas neuronas dopaminérgicas responden a cambios tanto agudos como crónicos con algunas excepciones: preñez, lactancia y en el caso de prolactinomas. Esto es debido a que se vuelven refractarias a los altos niveles de PRL, dando como resultado estados fisiológicos o patológicos de hiperprolactinemia (25).

Cuando se exponen los lactotropos a DA, se inactivan los canales de voltaje dependientes de calcio y por lo tanto también la liberación de gránulos con PRL. Más lentamente, se inhibe la adenilato ciclasa (AC) que produce la inactivación de la PKA y una consecuente supresión de la expresión de genes que incluyen Pit-1, factor necesario para la expresión tanto del gen de PRL como de GH. Aunque la cantidad de DA que llega a la hipófisis es suficiente para inhibir tónicamente la PRL, se postulan otros PIFs cuyos papeles fisiológicos no están aún bien determinados, como endotelinas, somatostatina, acetilcolina y GABA, entre otros.

Por otro lado, además de los estrógenos, también existen péptidos estimuladores de la secreción de PRL. Algunos de ellos son la hormona liberadora de tirotropina (TRH), péptido intestinal vasoactivo (VIP).

#### 2.2 Hormona de crecimiento

Si bien la influencia del RD2 sobre la PRL está bien demostrada, poco se sabe sobre el control que ejerce sobre la GH. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que en edades tempranas el RD2 es crítico para la estimulación de este eje, y su ausencia en ratones knoc kout totales para el RD2 ( $Drd2^{-1/2}$ ) causa retardo de crecimiento (26).

El eje hipotalámico-hipofisario-somático en mamíferos recibe una multiplicidad de señales a lo largo del desarrollo madurativo de cada individuo lo que aporta un enorme valor adaptativo en relación a su éxito reproductivo posterior. Dos neuropéptidos hipotalámicos controlan la síntesis y liberación de GH en los somatotropos del lóbulo anterior de la hipófisis: la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (STT). Los desbalances en los niveles de GHRH o GH producen alteraciones en fenotipos relacionados al crecimiento somático(27) (28) (29) mientras que la falta de SST altera el programa secundario de dimorfismo sexual(30) (31).

GHRH estimula la proliferación de los somatotropos en la hipófisis así como la síntesis y liberación de GH. Por su parte, SST inhibe tanto la liberación de GHRH como de GH. La liberación de GH sigue un patrón pulsátil que presenta un dimorfismo sexual muy marcado. Mientras que en hembras los niveles plasmáticos de GH son más constantes, de períodos más largos y menor amplitud, en machos la liberación hipofisaria de GH presenta períodos más cortos y de amplitud mucho mayor, por lo que los niveles plasmáticos son más variables a lo largo del día. Estos patrones diferenciales de aumento y descenso en la liberación de GH cumplen un papel clave en la determinación del desarrollo corporal normal en machos y hembras.

La GH plasmática tiene muchos blancos de acción, controlando el crecimiento corporal a través de su acción sobre células del hígado, del músculo esquelético, del tejido óseo y de adipocitos. La acción de GH sobre los hepatocitos induce la producción y liberación del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-I) al torrente sanguíneo. IGF-I tiene receptores específicos en varios tejidos del organismo donde participa estimulando el crecimiento somático (32) y la maduración sexual (33). La estimulación pulsátil de GH sobre el hígado determina la producción de niveles altos de proteínas mayoritarias de la orina (MUPs, por Major Urinary Proteins) en machos y de bajos niveles en hembras, es por ello que la medición de MUPs en orina es una técnica muy utilizada para medición indirecta de la pulsatilidad de GH. Las MUPs son una familia de

proteínas poligénicas y altamente polimórficas sintetizadas en el hígado, hasta hace poco sólo se conocía una función de estas proteínas: transportar feromonas volátiles presentes en la orina.

En el genoma del ratón existen unos 35 genes de MUPs, mayormente localizados en el cromosoma 4. Esos genes altamente polimórficos codifican proteínas de tamaños variables que son secretadas desde el hígado y rápidamente excretadas por el riñón. Cada ratón expresa una combinación de alrededor de 4 a 6 MUPs diferentes y el grado de polimorfismo genético es tan elevado que cada combinación puede ser diferente dentro de la misma población de ratones salvajes (34) (35).

Recientemente se ha descripto que las MUPs también juegan un rol crucial en el metabolismo de la glucosa, regulando programas lipogénicos y gluconeogénicos en el hígado. Se ha demostrado que la expresión hepática de MUPs está regulada por señales metabólicas o nutricionales, por ejemplo, su expresión disminuye en animales con diabetes tipo 2, sugiriendo que las MUPs contribuyen a la hiperglucemia, resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa en la diabetes (36) (37).

#### 3. Tumores hipofisarios

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

La mayoría de los tumores hipofisarios crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos porque no son metastásicos y permanecen dentro de la silla turca aunque también pueden crecer en forma expansiva hacia los tejidos vecinos. Estos tumores invasivos no se consideran malignos, incluso cuando hay invasión de duramadre. Se definen como verdaderos carcinomas sólo cuando hay presencia de metástasis craneoespinal y/o sistémica, y éstas son raras con una incidencia de menos del 0,5% de los tumores hipofisarios sintomáticos (38).

#### 3.1 Patogénesis hipofisaria

Existen dos teorías que intentan explicar los mecanismos por los cuales se desarrolla la tumorigénesis hipofisaria. Las dos teorías principales confrontan a la estimulación hormonal contra un defecto hipofisario intrínseco. Un esquema integrado concilia ambas teorías de tumorigénesis aplicando la teoría de varios pasos en la carcinogénesis. Según ella, el evento iniciador sería una alteración genética que transforma a una única célula mientras que las hormonas y factores de crecimiento participarían en la promoción de la proliferación celular en un paso posterior.

La mayoría de los adenomas hipofisarios humanos son de origen monoclonal, lo que es una evidencia de que la alteración molecular conduce a transformación celular como evento inicial del proceso. Sin embargo, los oncogenes involucrados en la carcinogénesis de otros sistemas no estarían participando en el desarrollo de estos tumores; varios estudios excluyen la participación de oncogenes como ms, c-myc, c-myb y c-fos, aunque estos genes han llegado a asociarse con los tumores de hipófisis más agresivos e invasivos (39).

Además de la mencionada naturaleza clonal de los adenomas hipofisarios que apoya a los defectos somáticos intrínsecos como principal etiología de estos tumores, el hecho de que se encuentren adenomas bien circunscriptos, rodeados por tejido normal no hiperplásico refuerza dicha teoría (39).

21

Por otra parte, los factores de crecimiento y sus receptores, así como las hormonas tróficas hipotalámicas, implicados en la regulación del crecimiento y función de las células hipofisarias proveen mecanismos alternativos ya que las células en proliferación tendrán un mayor riesgo de sufrir alteraciones genéticas durante la mitosis, y las manifestaciones de las alteraciones genéticas serían precipitadas por los estímulos de crecimiento (40).

Pero también, existen otras evidencias que apoyan la etiología hormonal:

- a) El desarrollo de adenomas hipofisarios en casos de estimulación hipotalámica excesiva.
- b) La respuesta de las hormonas hipofisarias a la estimulación de péptidos exógenos.
- c) La pérdida del control inhibitorio hormonal como es el caso de la falta de respuesta a dopamina, y desarrollo de adenomas.
- d) Las evidencias de producción de hormonas hipotalámicas dentro de la hipófisis lo que sugiere un rol para la estimulación local.

#### 3.2 Prolactinomas

Dentro de los adenomas hipofisarios, son de particular interés en este trabajo los prolactinomas o adenomas secretores de PRL.

Estos tumores hipofisarios son los más frecuentes, aunque si se examina la estadística en muestras quirúrgicas este subtipo de adenoma es mucho menos prevalente debido al exitoso tratamiento primario de los prolactinomas con agonistas dopaminérgicos (41). Se ha reportado que el 35% de los tumores hipofisarios en mujeres producen prolactina (PRL) y que un 6% producen PRL junto con otra hormona hipofisaria. La secreción excesiva de PRL causa oligomenorrea o amenorrea, y galactorrea, y éstos son los síntomas generales por los que los prolactinomas son detectados precozmente en las mujeres.

En los hombres en cambio, la galactorrea es rara y los síntomas de hipogonadismo tales como impotencia y falta de libido llevan a la consulta médica en forma bastante tardía. Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más asociados a MEN-1 (Neoplasia endócrina múltiple-1). Mientras que la mayoría de estos tumores puede reducirse por el tratamiento con bromocriptina o cabergolina, algunos pacientes poseen resistencia al tratamiento dopaminérgico, esto puede deberse a un número reducido de receptores de DA o a fallas en la transducción de la señal de los RD2 (42) (43).

#### 3.2.1 Modelos experimentales de prolactinomas

Existen varios modelos que han sido utilizados ampliamente en diversos trabajos, algunos son, administración farmacológica de estrógenos en forma crónica en ratas (44), ratas seniles (45), animales transgénicos, como por ejemplo ratones que sobreexpresan galanina en lactotropos (46); TGF alfa (47); NGF (48); un receptor truncado tipo 4 de FGF (49) o ratones *kno c ko ut* para el receptor de prolactina (50).

En nuestro laboratorio hemos trabajado durante los últimos años en el modelo de ratones knoc kout total para el RD2 ( $Dnd2^{-/-}$ ). Estos ratones fueron generados por los Dres. Malcolm Low en Portland, Oregon, USA y Marcelo Rubinstein (INGEBI, CONICET) en Buenos Aires (7) por deleción del exón 7 completo y la mitad 5´ del exón 8 del gen del RD2 murino mediante recombinación homóloga. Dichos exones codifican para los últimos 2 dominios transmembrana del RD2, el tercer loop extracelular y la cola carboxi-terminal intracitoplasmática. La zona delecionada fue

reemplazada por un cassette que confiere resistencia a neomicina y esta secuencia es a la vez utilizada para la genotipificación de los ratones por PCR a partir de DNA genómico.

Demostramos en el laboratorio que los ratones  $Drd2^{-1}$  de ambos sexos tienen mayores niveles de PRL sérica que sus pares WT ya en la sexta semana de vida, y que en las hembras la prolactinemia siempre es mayor que en los machos (Figura 5). Hemos demostrado en estos ratones que la falta de este receptor en todo el organismo produce hiperplasia de lactotropos con un aumento del peso de la hipófisis de 2-3 veces respecto a las hembras WT, una disminución en el número de los demás tipos celulares de la glándula y eventualmente adenomas en hembras a los 8 meses de edad (51) (52). A los 17-18 meses las hembras  $Drd2^{-/-}$  desarrollan verdaderos adenomas hipofisarios evidenciados por la presencia de nódulos multifocales, agrandamiento de la glándula con aumento del peso de unas 30 veces respecto a las hembras WT y destrucción de las fibras de reticulina, característica patognómica de adenoma. A esta edad los machos presentan pequeños nódulos multifocales también con ruptura de la red de reticulina indicando desarrollo de múltiples adenomas (53).



Figura 5: Niveles de prolactina sérica medidos por RIA en ratones hembra y macho  $Drd2^{-/-}$  y WT a lo largo del desarrollo. \* p< 0,05  $Drd2^{-/-}$  vs WT de la misma edad y sexo (26).

Pero también demostramos otros fenotipos endócrinos en el ratón  $Drd2^{-/-}$ , tales como un retardo del crecimiento corporal y alteración del eje GH-IGF-I (26) (54), modificaciones de los circuitos que controlan la ingesta (55), y fallas en la homeostasis de la glucosa. Describimos que los  $Drd2^{-/-}$  tienen igual peso corporal que sus controles al nacer, pero una disminución significativa del 15% de su peso corporal a partir del primer mes de vida. Esta alteración en el eje de crecimiento fue diferente entre sexos, los machos mantuvieron la diferencia de peso hasta los 8 meses de edad, mientras que la hembras tuvieron menor peso hasta los 4 meses, edad a la cual alcanzaron el peso de las hembras WT (Figura 6, 26).



Figura 6: Peso corporal de hembras y machos a distintas edades. \* p<0,05, animales  $Drd2^{-/-}$  vs WT de la misma edad y sexo (26).

Por otro lado, el largo corporal total, medido de la nariz al ano, también resultó ser menor en los  $Drd2^{-/-}$  respecto a los WT a los 4 meses de

edad. Este retraso en el crecimiento corporal se correlacionó con alteraciones en el perfil hormonal de GH sérica durante el desarrollo. Los animales WT mostraron altos niveles de GH sérica en el primer mes de vida y luego una disminución a lo largo del desarrollo. En cambio, los  $Drd2^{-/-}$ presentaron niveles muy bajos de GH a lo largo de la vida. A los 4 meses de edad ya no se observaron diferencias en los niveles plasmáticos de GH entre genotipos (Figura 7). Dado que muchas acciones de GH son mediadas por IGF-1 (56), determinamos un correlato entre crecimiento y perfil de secreción de GH y los niveles circulantes de IGF-1 en los dos genotipos. Tanto en machos como en hembras, los niveles de IGF-1 en suero fueron significativamente menores en ratones  $Drd2^{-/-}$ .



Figura 7: Niveles de GH sérica (ng/ml) en ratones de ambos sexos. \* p<0,05, animales  $Drd2^{-/-}$  vs WT de la misma edad y sexo.

El metabolismo energético y el control de la ingesta son motivo de constantes investigaciones. El sistema dopaminérgico fue involucrado en diferentes y numerosos procesos que conforman la homeostasis energética.

En nuestro modelo experimental, demostramos que no existen diferencias entre genotipos en cuanto a la ingesta de alimento, pero si la misma se relativiza al peso corporal, los  $Drd2^{-/-}$  resultan tener una mayor ingesta que los WT, lo que indicaría que la eficiencia de la ingesta es mayor en animales WT. A pesar de la mayor ingesta en los  $Drd2^{-/-}$  hemos descripto altos niveles del péptido anorexigénico (a MSH) y bajos niveles del precursor de péptidos orexigénicos (PPO) en los  $Drd2^{-/-}$  en comparación con los WT, postulando que los altos niveles de PRL sérica compensaban el efecto anorexígeno de estos dos eventos (55).

Finalmente, demostramos que la homeostasis de la glucosa está afectada en los  $Drd2^{-1/2}$ , evidenciando una potente función de la DA a través del RD2 en el metabolismo de la glucosa. Los  $Drd2^{-1/2}$  presentaron en la adultez glucemias basales en ayuno mayores respecto a sus pares WT, con una moderada intolerancia a la glucosa, en correlación con menores niveles séricos de insulina en respuesta a la glucosa (57). En resumen, demostramos que la alteración del RD2 en todo el organismo modifica la reguación de la PRL, del eje somático, de la ingesta y del metabolismo de la glucosa.

A raíz de estos resultados previos de nuestro laboratorio, en los ratones *Drd2-<sup>,-</sup>*, que carecen de RD2 en todos los tejidos, nos proponemos definir a qué nivel (hipofisario, periférico o central) la falla de los RD2 impacta en cada eje, es decir, en el eje de crecimiento, en el metabolismo y en el desarrollo de tumorigénesis hipofisaria.

Nuestra **hipótesis** es que la ausencia del RD2 en hipotálamo condiciona el retardo de crecimiento, mientras que la ausencia de RD2 hipofisario está implicada en el desarrollo de prolactinomas. El RD2 hipotalámico y/o hipofisario podría condicionar la ingesta.

EL primer **objetivo** de esta tesis doctoral es investigar los efectos de la ausencia del RD2 exclusivamente en lactotropos. Para esto nos propusimos generar ratones transgénicos condicionados mediante la tecnología  $\operatorname{Cre}/loxP$  y analizar si como consecuencia de la falta prolongada de estimulación del RD2 en los lactotropos se desarrollan prolactinomas, transtornos de crecimiento o alteraciones matabólicas. El segundo objetivo de esta tesis doctoral consiste en estudiar adenomas hipofisarios humanos, para comparar características de proliferación y angiogénesis entre los adenomas humanos y murinos y determinar si este nuevo modelo experimental podría ser utilizado para el estudio de la etiopatogenia de prolactinomas humanos.

### <u>Objetivos generales</u>

Los objetivos generales de esta tesis doctoral son:

Capítulo 1: Generar una cepa de ratones con mutaciones del gen Drd2 restringidas a lactotropos para estudiar la función de la prolactina en la ingesta, el crecimiento corporal y el desarrollo de tumores hipofisarios.

Para esto nos propusimos generar y caracterizar ratones transgénicos condicionados mediante la tecnología  $\operatorname{Cre}/\operatorname{lo} xP$ , la cual permite introducir mutaciones nulas en el gen del RD2 exclusivamente en un tipo celular.

# Capítulo 2: Estudiar factores angiogénicos y de proliferación en adenomas hipofisarios humanos.

En particular, es de nuestro interés determinar la expresión de factores angiogénicos y de proliferación en adenomas hipofisarios humanos, y compararlos con los resultados observados en lo ratones con disrupción del RD2 específicamente en los lactotropos. Y establecer asimismo, correlaciones entre los parámetros analizados para los distintos tipos de tumores hipofisarios.

# Capítulo 1

Generación y caracterización de la línea de ratones mutantes pitD2RKO

# <u>Objetivos del Capítulo 1</u>

Los objetivos del Capítulo 1, parte 1 y 2 son:

#### Parte 1

- Generar un ratón transgénico que exprese la recombinasa Cre en la hipófisis (PrI-Cre), mediante la identificación de secuencias génicas vecinas al gen de PRL, que funcionen como promotor específico de lactotropos. Para ello, estudiar el promotor de PRL de ratón, diseñar y clonar el transgen Promotor de prolactina-Cre para luego microinyectarlo en el pronúcleo de cigotas B6CBF<sub>2</sub>. Transferir las cigotas microinyectadas a oviductos de hembras pseudopreñadas y asi obtener por recombinación el ratón transgénico PrI-Cre.
- 2) Determinar la validez experimental de los ratones PrI-Cre, mediante el análisis de la expresión de Cre en la hipófisis y en distintos tejidos y mediante la cruza de estos transgénicos con una línea reportera de la actividad de Cre, los ROSA-EGFP.

#### Parte 2

3) Generar ratones con mutaciones nulas de Drd2 restringidas a la hipófisis mediante la cruza de ratones Drd2<sup>flox/flox</sup> con ratones Prl-Cre. Caracterizar a los ratones Drd2<sup>flox/flox</sup>Tg.Prl-Cre (pitD2RKO) a nivel molecular, bioquímico y funcional y determinar si efectivamente carecen de RD2s en la hipófisis.

- 4) Estudiar el eje hipotalámico-hipofisario en ratones pitD2RKO en comparación con sus hermanos *Drd2flox/flox* a través de la determinación de curvas de crecimiento corporal (peso y talla), ingesta, niveles hipofisarios de PRL, niveles séricos de PRL e IGF-I y de insulina pancreática, y niveles urinarios de las proteínas mayoritarias de la orina (MUPs).
- 5) Caracterizar fisiológicamente a la línea de ratones pitD2RKO en el desarrollo de hiperplasia hipofisaria y analizar la expresión de factores angiogénicos y de proliferación en estos prolactinomas.
# Capítulo 1: Introducción

#### 1. Sistema Cre-loxP

La técnica convencional de ratones *knockout* ha sido muy útil para descifrar las bases moleculares y celulares del comportamiento de los genes y sus productos, debido a que genera animales que heredan deleciones del gen en estudio en todas las células del organismo (26;45;52). Sin embargo, una deleción no restringida en tiempo o región puede conducir a severos defectos en el desarrollo y muerte prematura, lo que impediría el análisis de las funciones de los genes en ratones jóvenes o adultos. Además, el *knockout* global hace difícil la interpretación de fenotipos anormales atribuyéndolos a un tipo particular de tejido o célula, ya que todas las células están mutadas.

A raíz de estos problemas se han propuesto estrategias de recombinación tejido específicas (58) y mutaciones inducibles (59). Uno de estos sistemas se basa en la utilización de la recombinasa Cre del bacteriófago P1 (60-62), que permite activar una mutación en un momento y/o tejido determinado y asi, evitar defectos durante el desarrollo, superar la aparición de mecanismos compensatorios y evitar la concurrencia de múltiples fenotipos simultáneos.

El bacteriófago P1 codifica para la proteína recombinasa Cre de 38 kDa que cataliza la recombinación sitio especifica del ADN entre secuencias de 34 pb repetidas llamadas loxP (63). Cre es un miembro de la familia de las integrasas dentro de las recombinasas, las que reconocen secuencias de nucleótidos específicas y funcionan a través de una unión covalente transitoria de ADN con la proteína (64). Los sitios loxP son palindrómicos excepto por una secuencia central que le provee a cada sitio una orientación unidireccional (65). Repeticiones directas de dos sitios loxP provocan la escisión del fragmento contenido entre ellos por medio de la recombinasa, mientras que repeticiones invertidas provocan la inversión del mismo (66).

Estas secuencias loxP pueden ser artificialmente insertadas en el genoma de células embrionarias multipotentes por recombinación homóloga, de tal forma que flanqueen uno o más exones codificantes del gen de interés. De esta manera, el "gen floxeado" podrá ser anulado únicamente en las células donde se expresa Cre (Figura 1.1). Para obtener el ratón mutante de interés, se generan ratones transgénicos homocigotas para el gen floxeado y se cruzan con un segundo ratón transgénico que contiene el transgén Cre bajo el control transcripcional de un promotor tejido o célula específico, que puede o no ser inducible. En ratones homocigotas para el gen floxeado y portadores del transgén Cre, se producirá recombinación Cre/loxP, y por lo tanto se delecionará el gen floxeado. Esto sucederá solamente en aquellos tipos celulares en los cuales el promotor asociado a Cre sea activo.

Distintos laboratorios en el mundo han desarrollado ratones transgénicos para Cre específicamente acoplado a distintos promotores, que son catalogados en la página de Nagy Lab (http://www.mshri.on.ca/nagy/default.htm).



**Figura 1.1. Esquema de construcción de un mutante condicional.** El primer paso consiste en la introducción de 2 sitios loxP flanqueando una región clave del gen a estudiar (en este caso el exón 2) mediante recombinación homóloga en células embrionarias multipotentes (ES). Un cassette de resistencia a un antibiótico se introduce como marcador de selección también flanqueado por sitios lo xP para su posterior remoción. Mediante la acción de la recombinasa Cre *in vitro* o a través de un ratón transgénico de expresión muy temprana de Cre se activa la primera ronda de mutaciones somáticas. Se seleccionan aquellos clones de células o ratones que hayan incorporado la deleción tipo 2 que determina un alelo condicional para la posterior deleción del exón 2 de manera controlada. (Tomada de la tesis doctoral de Daniela Noaín) Para determinar la especificidad de los ratones transgénicos que expresan Cre bajo el control transcripcional de promotores específicos, existen distintas líneas de ratones transgénicos reporteros que permiten ver la expresión y actividad de la recombinasa Cre. En nuestro laboratorio se utilizó la línea reportera B6; 129- $Gt(ROSA)26So t^{m_2Dho}/J$ , conocida popularmente como ROSA-EGFP (67). Estos ratones tienen el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) insertado en el locus Gt (ROSA) 26So r. La expresión de esta proteína está bloqueada por un fragmento STOP, codón de finalización de la traducción, que se encuentra flanqueado por sitios b x P y ubicado entre la secuencia de EGFP y el promotor Gt (ROSA) 26Sor. En presencia de Cre, comenzará a expresarse EGFP ya que el fragmento STOP será escindido. Por lo tanto, en aquellas células en donde se exprese la recombinasa Cre se verá la expresión de EGFP, indicando que la enzima se expresa y es activa (Figura 1.2).



#### Figura 1.2: Esquema del transgén de las animales reporteros ROSAEGFP.

En esta tesis se generó la línea de ratones transgénicos PrI-Cre, animales que expresan la recombinasa Cre en la hipófisis bajo el control transcripcional del promotor de PRL. A continuación, se describe brevemente la caracterización del promotor de PRL y algunos aspectos de funcionales y metabólicos de esta hormona.

#### 2. Animales transgénicos como herramienta de estudio

La generación de ratones genéticamente modificados para distintos componentes de las rutas del sistema dopaminérgico constituye una herramienta poderosa en el estudio del rol de la dopamina *in vivo*.

En este trabajo se generaron ratones knoc kout para el RD2 sólo en los lactotropos, mediante la tecnología Cre/loxP. Para ello, primero se generó un ratón transgénico PrI-Cre, en el cual la recombinasa Cre se expresa bajo el promotor de PRL hipofisaria, luego este animal se cruzó con otro que contiene las secuencias loxP flanqueando el exón 2 del gen del RD2 ( $Drd2^{flox/flox}$ ), ratón floxeado generado recientemente en el laboratorio del Dr Marcelo Rubinstein en el INGEBI-CONICET. Como resultado de la cruza se obtuvo un ratón  $Drd2^{flox/flox}$  Tg.PrI-Cre, que llamaremos de aquí en adelante pitD2RKO.

La generación de estos nuevos ratones transgénicos nos permitirá dilucidar la participación selectiva de los RD2 hipofisarios e inferir la participación de los RD2 hipotalámicos en el desarrollo de prolactinomas, el crecimiento corporal y la expresión de distintos factores de crecimiento relacionados con los tumores hipofisarios. De este modo podremos trabajar con un modelo de prolactinoma, sin otro fenotipo asociado, que será de gran utilidad para estudiar los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. Por otro lado, de acuerdo a las múltiples alteraciones que encontramos en los ratones  $Drd2^{-/-}$ , en el crecimiento somático y el metabolismo, este nuevo modelo experimental pitD2RKO nos permitirá dilucidar el rol de la PRL en las mencionadas alteraciones.

#### 3. Regulación de la expresión génica de prolactina

Tanto el gen de PRL como el de GH están compuestos por 5 exones separados por 4 intrones. Los intrones del gen de PRL son más largos, formando un gen más extenso, de 10kb, respecto al de GH que tiene 2kb. Como sucede con la mayoría de las proteínas secretoras, el gen de PRL codifica para una prohormona que contiene en el extremo N-terminal una señal peptídica de 28-30 residuos. Luego del corte proteolítico de esta señal peptídica, la PRL madura en roedores y en humanos está formada por 197 y 199 aminoácidos respectivamente, y posee tres puentes disulfuro intramoleculares. Los promotores que controlan la expresión génica de GH y PRL han sido caracterizados en detalle. Muchos trabajos se han focalizado en el estudio del gen de PRL de rata, un menor número en PRL humana y muy pocos en el gen PRL de raton (68).

El gen de PRL de ratón está bajo el control transcripcional de un promotor próximo situado entre -250 y -10 pares de bases y una región distal enhancer localizada entre -1800 y -1500 pares de bases relativo al sitio de inicio de la transcripción. La región promotora, desde -3000 hasta +33 es necesaria para que la expresión del gen de PRL sea específica en la hipófisis (68). Las secuencias que rodean a la región distal enhancer restringen la expresión de PRL a los lactotropos hipofisarios in vivo (69) (70). Como se puede observar en la figura 1.3, el gen de PRL de rata posee múltiples sitios de unión para la proteína Pit-1: cuatro sitios en la zona promotora próxima y otros 4 en la distal enhancer (71). Pit-1 es un factor de transcripción específico de la indispensable para el desarrollo hipófisis, de los lactotropos, somatotropos y tirotropos. Mutaciones en el gen de Pit-1 causan deficiencias hormonales tanto en ratones como en humanos (72). Igualmente, Pit-1 por sí mismo es necesario pero insuficiente para la transcripción del gen de PRL, ya que regula la transcripción interactuando con receptores hormonales nucleares y con varios factores coreguladores (68).

El receptor de estrógenos (RE) es un receptor nuclear con alta afinidad de unión a los elementos de respuesta estrogénica (ERE) presentes en ciertos genes. En la región distal *e nhanc e r* del gen de PRL de rata se describió un sitio ERE (Figura 1.3).



ura 1.3: Diagrama esquemático del promotor de prolactina. Si indican los sitios de unión Pit-1 y el sitio ERE (Tomado de (69)).

#### 4. Prolactina y metabolismo

Desde el descubrimiento en los años 1930s como una hormona hipofisaria distintiva que estimula la producción de leche, la prolactina ha atrapado la atención de muchos clínicos y científicos con diversos intereses.

Como ya mencionamos previamente, la PRL actúa en numerosos tejidos como la glándula mamaria, el hígado, el ovario, el testículo y la próstata. Es la hormona hipofisaria de mayor versatilidad en cuanto al número y diversidad de procesos que regula (73). La PRL participa en distintas funciones que van desde la producción de leche en mamíferos, el control de comportamientos reproductivos y hasta la osmorregulación. Dado los múltiples roles que adopta algunos autores han sugerido renombrar esta hormona como "omnipotina" o "versatilina".

En comparación con GH, un regulador metabólico muy bien descripto y estudiado, las acciones de la PRL sobre la homeostasis metabólica en condiciones de no lactancia han recibido poco atención. Sin embargo, recientemente se han publicado diversos trabajos que estudian los efectos de la PRL en la regulación del peso corporal, el desarrollo de islotes pancreáticos, el control de la producción de insulina, la diferenciación de adipocitos y el metabolismo de lípidos (68). A continuación se describe brevemente cada uno de estos puntos.

#### 4.1 Prolactina y la regulación del peso corporal

Las señales perisféricas que intervienen en el estado nutricional afectan circuitos cerebrales que regulan la ingesta de alimento y el gasto energético. Estas señales incluyen sustratos ricos en energía como ácidos grasos y glucosa así como también hormonas y adipoquinas. En la actualidad se conoce que la PRL es orexigénica en peces y aves, sin embargo en los mamíferos está en discusión el rol de la PRL en la regulación del peso corporal. En ratas se vio que elevados niveles de PRL en forma crónica están asociados con un aumento de la ingesta de alimento y de peso corporal, y que este efecto se puede revertir con la administración de un agonista dopaminérgico como la bromocriptina (74) (75) (76) . Inyecciones de PRL en el núcleo paraventricular de rata aumentan la ingesta de alimento, indicando que la PRL interactúa con centros hipotalámicos que regulan el apetito (77). Los resultados en ratones son controvertidos. Experimentos en machos a los que se les trasplantaron hipófisis ectópicas mostraron un pequeño aumento del peso corporal (78). Asimismo, animales adultos deficientes en el receptor de PRL mostraron un descenso del peso corporal (79), si bien este resultado no pudo ser confirmado más tarde en animales jóvenes (80) (81). Por otro lado, ratones hembras que sobreexpresan PRL presentan una disminución de grasa abdominal pero sin cambios del peso corporal (82). Ben Jonathan y col publicaron ganancia de peso y adipogénesis normal en ratones deficientes de PRL, hecho que podría indicar que la PRL tiene un papel menor en la regulación del peso corporal y que todavía no se conoce a ciencia cierta la relación entre esta hormona y la regulación del peso corporal (83).

En humanos, altos niveles de PRL como consecuencia de la presencia de prolactinomas producen aumento del peso corporal en algunos pacientes, pudiendo revertirse este efecto mediante la administración de bromocriptina (84) (85). Por otro lado, estudios con pacientes psicóticos medicados con antagonistas del RD2 mostraron un aumento del peso corporal, pudiendo este efecto relacionarse con el RD2 central o el aumento de prolactina. En conclusión, los efectos de la PRL sobre el peso corporal y la ingesta de alimento no se conocen aún con precisión, y queda por determinarse si altos niveles de PRL son la causa o consecuencia de una ganancia de peso.

#### 4.2 Prolactina, páncreas e insulina

La insulina juega un rol crucial en la homeostasis metabólica regulando los niveles séricos de glucosa. La función mejor establecida de las hormonas lactogénicas en el páncreas es durante el embarazo, cuando producen un aumento de la producción de insulina en respuesta al incremento de la demanda metabólica de la madre, y afectan el desarrollo de los islotes pancreáticos del feto.

Durante el embarazo se inducen alteraciones en el metabolismo de la madre como respuesta a la demanda de energía del feto. Se produce un aumento de la ingesta calórica de la madre, una secreción elevada de insulina, en algunos tejidos se genera resistencia a insulina y aumenta el metabolismo de lípidos. El páncreas tiene un rol muy importante en estas adaptaciones. Durante el embarazo, las células  $\beta$ sufren cambios estructurales y funcionales que incluyen: 1) aumento de la secreción de insulina estimulada por la glucosa; 2) aumento de la síntesis de insulina; 3) aumento de la proliferación de las células  $\beta$ ; 4) incremento de las uniones entre las células  $\beta$  y 5) aumento del metabolismo de la glucosa (86) (87).

La administración de PRL a ratas produce un descenso del umbral de respuesta de la insulina a la glucosa; por ende, aumenta la secreción de insulina y también el acoplamiento entre las células  $\beta$ . Asimismo, PRL estimula la liberación de insulina en las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos a través de Stat5 y otras vías (78), y asi regula la estructura y la función de los islotes induciendo la fosforilación de los sustratos 1 y 2 del receptor kinasa de insulina vía la activación de PI3K y activa también la vía de MAPK (88) (89). Por otro lado, estudios con islotes de ratas tratados con PRL revelan que esta hormona regula río arriba un grupo de genes asociados con la regulación del ciclo celular mientras que río abajo a genes relacionados con la apoptosis (90).

Estudios clínicos revelan que la PRL produce efectos diabetogénicos, dado que pacientes con hiperprolactinemia están asociados siempre con hiperinsulinemia y con resistencia a insulina (91) (92).

#### 4.3 Prolactina y tejido adiposo

El tejido adiposo está compuesto por adipocitos que contienen lípidos, por pre-adipocitos y células endoteliales e inmunes. EL tejido adiposo es un órgano endócrino muy importante, cuyas hormonas, las adipoquinas, actúan en el cerebro, hígado, páncreas y músculo para regular el balance energético, la resistencia a insulina y la respuesta inflamatoria. Siempre se creyó que los receptores de PRL no se expresaban en el tejido adiposo, habiéndose propuesto que la PRL no sería un regulador directo de las funciones de los adipocitos (93). Recientemente, se han publicado evidencias de lo contrario. Se ha descripto que los receptores de PRL se expresan en el tejido adiposo pardo y blanco de ratones, de rata y de humanos. Esta expresión aumenta durante la lactancia y en animales que sobre expresan PRL (82).

Evidencias recientes muestran un rol de la PRL en la adipogénesis. Estudios con ratones deficientes en el receptor de PRL muestran una disminución en el peso del tejido adiposo sin alteraciones en el peso corporal ni en la ingesta de alimento. Esta reducción deriva de un descenso en el número de adipocitos, sin cambios en su volumen (81).

La PRL altera la liberación de adipoquinas, incluyendo a la leptina, adiponectina e interleuquina 6 (IL-6). La leptina regula la ingesta de alimento y el consumo energético, es la adipoquina más estudiada. Sin embargo, la información de la relación entre PRL y leptina es controvertida. Por ejemplo, los niveles séricos de leptina están disminuidos en ratones deficientes del receptor de PRL (79) y están elevados en animales que sobreexpresan la hormona (94). Sin embargo, ratones machos *knoc kout* para PRL presentaron un aumento en los niveles séricos de leptina (83). En humanos no hay una correlación consistente entre PRL sérica y los niveles de leptina (68).

43

# Capítulo 1: Materiales y métodos:

# Parte 1. Generación de líneas de ratones transgénicos Prl-Cre

## a. Construcción del transgén Prl-Cre

Para la construcción del transgén fueron llevados a cabo los siguientes pasos:

- 1. Tras un análisis bioinformático de la secuencia 5´ flangueante del gen de prolactina de ratón, se decidió utilizar un fragmento de 3 kb (-3000 a +60) (Figura 1.1). Estudios previos demostraron que un fragmento del promotor, desde -3000 hasta +33 es necesario para que la expresión del gen de PRL sea específica en la hipófisis (70). Para optimizar la amplificación del fragmento a utilizar como promotor, se dividió en dos partes contiguas que luego se ligaron. Se obtuvieron los dos fragmentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de una ratón tipo salvaje o WT de la cepa C57BI/6J. Para ello se diseñaron *prime rs* específicos con el agregado de secuencias de corte para las enzimas de restricción HindIII, EcoRI y Pstl (Figura 1.2). Mediante PCR con Pfx50<sup>™</sup> DNA Polyme rase (Invitrogen), enzima que genera productos de PCR con extremos romos, y con estos pares de primers en determinadas condiciones (Tabla 1.1) se obtuvieron dos productos de PCR: fragmento 1 de 1349 pb y fragmento 2 de 1561 pb.
- Cada uno de los fragmentos conteniendo parte del promotor de prolactina, fueron eluidos de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y clonados en el sistema pZero Background<sup>™</sup> /Kan cloning kit (Invitrogen) que disminuye el número de colonias

no recombinantes. El vector de clonado pZero<sup>™</sup> contiene el gen letal c c dB fusionado al extremo C-terminal de LacZa. La inserción de un fragmento de ADN interrumpe la expresión del gen de fusión LacZa-ccdB permitiendo el crecimiento sólo de las recombinantes positivas. Las células que contienen vectores no recombinantes, no crecen. Primero se digirió el plásmido con EcoRV, dejando extremos romos, y luego se ligaron cada uno de los fragmentos en forma separada. Se transformaron por electroporación bacterias E coli TOP10, ya que esta cepa no contiene el gen lacl q, factor inhibidor en trans del gen c c dB. La todos fragmentos fue confirmada calidad de los por secuenciación.

- El plásmido pZero conteniendo el fragmento 1 fue digerido con las enzimas HindIII y EcoRI y el plásmido pZero conteniendo el fragmento 2 fue digerido con EcoRI y Pstl.
- 4. El plásmido pMCCrePGK-Hyg, conteniendo la secuencia codificante del gen de la recombinasa Cre seguida de la secuencia de poliadenilación del gen del antígeno T del virus SV40, fue digerido con HindIII y Pstl, para tener los extremos cohesivos complementarios a cada uno de los fragmentos del promotor de prolactina.
- Se realizó una triple ligación, del fragmento 1 seguido del fragmento 2 del promotor de prolactina de ratón, seguido del gen de la recombinasa Cre.
- 6. Finalmente el transgén PrI-Cre fue liberado del vector por doble digestión con Xhol y Notl, obteniéndose un fragmento de 4,5 kb. Este contiene 3 kb del promotor de prolactina de ratón fusionado a la secuencia codificante completa del gen de la recombinasa Cre del bacteriófago P1.



**Figura 1.1: Secuencia del promotor de prolactina de ratón.** Las letras resaltadas en rojo indican las secuencias donde fueron diseñados los *prime rs* y en amarillo las secuencias donde serán insertados los sitios de corte de las enzimas de restricción. Las letras en celeste indican el comienzo del primer exón. El ATG subrayado es el inicio de la traducción del gen de prolactina.

Prime r 1sentido: 5' TTAAGCTTCAAGTGTACTCCAGATTGCC 3' (Hind III)Prime r 1antisentido: 5' GGTGAATTCCTTAGTTTCCTCC 3' (Eco RI)

Prime r 2 sentido: 5'GGAGGAAAACTAAGGAATTCACC 3'(Eco RI)Prime r 2 antisentido: 5'ATCTGCAGTGCTGGGAACACACTTCTCC 3'(Pst I)

**Figura 1.2:** *Prime rs* diseñados para dividir la secuencia en dos fragmentos. Las secuencias de corte de HindIII y PstI fueron agregadas en los extremos 5'de cada *prime r*, mientras que el sitio de corte para EcoRI ya existía en la secuencia del promotor (resaltado en amarillo se muestran las secuencias de corte para las enzimas de restricción).

**Tabla 1.1: Reacción de PCR**para la obtención de los fragmentos de ADN delpromotor de prolactina de ratón de la cepa C57Bl/6J.

MIX PCR	
Prime rs se ntido y antise ntido (fragmento 1)	1 µM
Prime rs se ntido y antise ntido (fragmento 2)	0.3 µM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
DNA	200 ng
dntp´s	200 µM
Buffe r	TrisHCI 20 mM; KCI 50 mM
Pfx taq polimerasa	1.25 UE
H <sub>2</sub> O	Vf= 50 µl

Programa		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 ciclo de desnaturalización inicial	94	3
35 ciclos: de desnaturalización- apareamiento y extensión	94	1
	58	1 min 15 seg
	72	2
1 ciclo de Extensión final	72	5

Las técnicas de biología molecular utilizadas para la obtención del transgén se describen a continuación.

#### Cortes con enzimas de restricción y aislamiento por

#### electroelución

La preparación de fragmentos y vectores para reacciones de ligación, fue realizada mediante cortes con enzimas de restricción de acuerdo a las instrucciones del proveedor, partiendo de 5 µg a 20 µg del fragmento o vector deseado, y posterior electroelución en geles de agarosa.

El aislamiento por electroelución de fragmentos y vectores fue llevado a cabo mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa con 0,1 µg/µl de bromuro de etidio, utilizando TBE 0,5X (tris borato 45mM, EDTA 1mM pH8) como *buffer* de corrida. Luego de efectuada la separación, se identificaron las bandas con un transiluminador UV y se cortaron los bloques de agarosa conteniendo las bandas deseadas con una hoja de afeitar. Estos fueron colocados dentro de tubos *e ppe ndo rf* y se aisló el ADN de la agarosa utilizando columnas de intercambio iónico: *DNA and purific atio n kit* (Amersham Bioscience GFX <sup>TM</sup> PCR).

#### Reacciones de ligación

Para realizar las reacciones de ligación se utilizaron 10 a 20 ng de vector. Los insertos se agregaron en una proporción molar, con respecto al vector, de 3:1 (estas proporciones fueron calibradas corriendo previamente inserto y vector en un gel de agarosa). Las mezclas de vector e insertos se incubaron con 2UE de la ligasa de ADN del fago T4 (Gibco BRL) en el *buffer* de ligación provisto que contiene ATP, en un volumen final de 10  $\mu$ l. Los tubos se incubaron durante una hora a 16°C y

luego se procedió a realizar la transformación de bacterias competentes.

#### Preparación de bacterias competentes

A partir de un stock de glicerol se obtuvieron colonias independientes de la cepa TOP10 de EColi. Con una de estas colonias se realizó un inóculo de 3 ml de LB (1% de bactotriptona, 0,5% de extracto de levadura y 1% de NaCl) y fueron crecidas a 37°C con agitación hasta alcanzar una OD<sub>550</sub> de 0,3. Con este cultivo se inocularon 100 ml de medio LB y se creció en agitación a 37°C hasta alcanzar una OD<sub>550</sub> de 0,5. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 2000g durante 15 minutos a 4°C. El medio fue descartado y el precipitado resuspendido en hielo con 40 ml de agua estéril. Se centrifugó nuevamente a 2000g por 15 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet nuevamente en frío en 40 ml de agua estéril. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 2000g por 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet, en hielo, se resuspendió en 20 ml de glicerol 10% y se transfirió a tubos estériles que se centrifugaron a 4000g por 15 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido finalmente en 1 ml de glicerol 10%. Las células se dejaron reposar en hielo por 15 minutos y se fraccionaron. Por último se guardaron a -70°C hasta su uso.

#### Transformación por ele c troporación

Las bacterias competentes se descongelaron manteniéndolas en hielo y se fraccionaron de a 50 µl en tubos *eppendorf* estériles. Se agregaron 2 µl de producto de ligación previamente diluido e incubado a 65°C para disminuir la contaminación con sales e inhibir la ligasa, eventos que afectan la electroporación. Se mezcló con una pipeta estéril, se incubó 1 minuto en hielo y se transfirió a una cubeta de electroporación. A continuación se realizó la electroporación en el electroporador (Cell Porator, Gibco BRL) a 280 V, inmediatamente se agregaron 450 µl de LB y se transfirió a un *e ppe ndo rf* estéril. Se incubó a 37°C durante una hora en agitación (200 rpm). Por último se plaquearon 100 µl de las bacterias transformadas en placas conteniendo LB y kanamicina, debido a que el vector posee resistencia a kanamicina, y se dejaron en estufa a 37°C por 18 horas.

#### Identificación de colonias con el inserto deseado

Para identificar las colonias que llevan el producto de ligación deseado, se realizó un inóculo con colonias aisladas crecidas a partir de la transformación en 3 ml de LB suplementado con kamamicina. Se dejó crecer toda la noche a 37°C en agitación y luego se aisló el ADN plasmídico utilizando *Wizard PlusSV Minipreps DNA purification System* (Promega). Una vez obtenido el ADN plasmídico puro, se identificaron las construcciones deseadas mediante cortes con enzimas de restricción como fue detallado anteriormente, y por posterior visualización en geles de agarosa con bromuro de etidio.

# **b.** Preparación del transgén Prl-Cre para la microinyección pronuclear

El transgén a microinyectar fue liberado de la secuencia plasmídica con las enzimas Xhol y Notl, y para descartar la secuencia del vector, el transgén fue aislado de un gel de agarosa y purificado usando columnas de intercambio iónico Elutip-D (Schleicher and Schuell, Keene, NH). Luego fue precipitado con 10% v/v NaAcO 3M (pH 5,2) y 2,5 vol de etanol 100% a -20°C por 2 horas. Posteriormente, se hicieron dos lavados con etanol 70% y se resuspendió en b uffe r de microinyección (TrisHCl 5mM, pH 7,4; EDTA 0,1mM). Fue cuantificado por espectofotometría a 260nm y por gel, y se llevó a una concentración de 500 moléculas/pl con el mismo b uffe r.

#### c. Generación del ratón transgénico Prl-Cre

Los animales usados se encuentran en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Los cuartos están acondicionados a 22°C, con un fotoperíodo de 12 horas (luz 7:00 –19:00 hs) y ventilación permanente. Se les proporciona alimento balanceado y agua *ad libitum*.

#### **Obtención de embriones**

Para obtener embriones aptos para la microinyección se aparearon hembras C57BL/6J con machos CBA/J y se obtuvieron híbridos de primera generación (F1) B6CBF1. Los machos F1 se mantuvieron en jaulas individuales y se los utilizó como padrillos para fecundar hembras F1 superovuladas. La superovulación se indujo en hembras B6CBF1 jóvenes (entre 4 y 5 semanas de edad) mediante un tratamiento hormonal que comenzó tres días antes de la recolección de óvulos fecundados con una inyección de 5 UI intraperitoneal (i.p.) de PMS (pregnant mare serum) a las 15 horas. Dos días más tarde los animales recibieron 5 Ul i.p. de hCG (human conionic gonadotrophin) a las 13 horas. Inmediatamente estas hembras fueron colocadas en jaulas individuales con machos B6CBF1. A la mañana siguiente las hembras que fueron copuladas por el macho (se verificó mediante la presencia de semen en el tapón vaginal) se sacrificaron y mediante una incisión abdominal se expusieron los tractos reproductivos. Los oviductos se aislaron y colocaron en una placa de 35 mm con medio M2 (Sigma,

NaCl 88mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 1,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2 mM, glucosa 5,5 mM, piruvato de sodio 0,33 mM, lactato de sodio 19,8 mM, EDTA 0,1 mM, BSA 0,3%, penicilina 120UI/ml, 50µg/ml de sulfato de estreptomicina, 0,001% de rojo fenol, HEPES 25 mM, pH 7,4). Mediante el uso de un microscopio de disección, un par de forceps y un par de agujas 25G, se disociaron los oviductos para liberar los ovocitos fertilizados rodeados por una masa de células del *cumulus*. Estos se aspiraron con una pipeta Pasteur previamente estiradas sobre un mechero y se colocaron en una gota de medio M2 con 1% de hialuronidasa (Sigma) por 5 minutos para separar los embriones de las células del *cumulus*. Luego los embriones se lavaron pasándolos por medio M2 y fueron guardados en incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta el momento de la microinyección en grupos de a 20. La cantidad obtenida de ovocitos fertilizados aptos para separar seperovulada.

#### Microinyección pronuclear

Los ratones transgénicos fueron generados por microinyección pronuclear de cigotas B6CBF2. Para la microinyección se utilizaron micropipetas sujetadoras e inyectoras preparadas a partir de capilares de borosilicato y estiradas con un estirador vertical de micropipetas.

Los ovocitos fertilizados fueron colocados en una gota de medio M2 equilibrado con HEPES ubicada en el centro de un portaobjetos, se observaron bajo un microscopio y se seleccionaron aquellos que tenían ambos pronúcleos bien visibles. Con la ayuda de la pipeta sujetadora y un micromanipulador se introdujo la pipeta de microinyección en los embriones y se descargó 1-2 pl de la solución de ADN (500 moléculas del transgén/pl) dentro del pronúcleo más visible. Los embriones microinyectados fueron colocados en el incubador, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, hasta el momento de la transferencia. Se espera que entre el 85 y 90% de los embriones sobreviven a la microinyección.

#### Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas

Para obtener hembras pseudopreñadas se pusieron en contacto la noche anterior a la recolección de embriones varias hembras jóvenes (de 6 y 9 semanas de edad) con machos vasectomizados. A la mañana siguiente se seleccionaron 3 hembras con tapón vaginal, signo de copulación. Las hembras pseudopreñadas fueron anestesiadas con 2,2,2-tribromoetanol (Avertina, Sigma) 300 mg/kg i.p. Luego de una incisión lateral, se expuso el oviducto a transferir. Se rompió la membrana que recubre al oviducto, se identificó la ámpula y se insertó a través de ella una pipeta Pasteur fina cargada con los embriones. Se descargaron en total unos 20 a 30 embriones por oviducto. Luego de la transferencia se cerró la incisión con sutura.

#### d. Identificación y caracterización de los ratones transgénicos

#### Extracción de ADN genómico

Los ratones nacidos de los embriones microinyectados fueron apartados de sus madres a los 21 días de edad y separados por sexo. Para determinar cuáles eran transgénicos se realizaron biopsias de la porción terminal de la cola con un bisturí. Los animales fueron identificados previamente con una marcación según un código de perforaciones en las orejas. Los segmentos de cola extraídos se incubaron a 55°C en *buffer* de digestión (TrisHCI 50mM, pH8; EDTA 100mM; SDS 0,5%; 0,5 mg/ml de proteinasa K, GIBCO BRL) durante 12 horas. El ADN se extrajo por métodos comunes. Brevemente, se precipitó el ADN en frío, 40 minutos a -70°C y se centrifugó a 12000g por 40 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el pellet y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización.

La presencia del transgén se detectó por PCR con *prime rs* específicos de las secuencias transgénicas como se detalla a continuación.

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de animales transgénicos PrI-Cre se llevó a cabo mediante la amplificación de una región del transgén, utilizando los *prime rs* del promotor de PRL sentido (5'CCTTCATTTCTGGCCAATG3') y Cre antisentido (5'AGGCAATTTTGGTGTACGG3'). Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 1.2. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 1,3% con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV.

MIX PCR	Concentración	
Prime rs se ntido y antise ntido	1 μM	
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
DNA	200 ng	
dntp´s	200 µM	
Buffe r	TrisHCl 20 mM; KCl 50 mM	
Taq polimerasa	1 UE	
H <sub>2</sub> O	Vf= 30µl	

Tabla 1.2: Reacción de PCR para el genotipificado de los animales
transgénicos Pil-Cre

Programa		
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 ciclo de desnaturalización inicial	95	3
35 ciclos: de desnaturalización- apareamiento y extensión	94	1
	56	1
	72	1
1 ciclo de Extensión final	72	5

# Determinación de la distribución de la enzima Cre recombinasa

La detección de la enzima Cre recombinasa se realizó por inmuhistoquímica utilizando anticuerpos anti-Cre y mediante PCR en tiempo en real se analizó la presencia o ausencia de expresión de ARNm de Cre en distintos tejidos.

# Inmunohistoquímica para Cre y Prolactina visualizada en campo claro

Los animales utilizados para inmunohistoquímica fueron perfundidos, luego de hacer una punción cardíaca, con solución salina 2 ml (NaCl 0,9%) y a continuación con 30 ml de 4% paraformaldehído en PBS. Se extrajeron cerebros e hipófisis, se fijaron en la misma solución de paraformaldehído y luego, los cerebros fueron seccionados con un vibrátomo (50 µm) para lo cual fueron incluidos en agarosa 2% y una vez cortados se colectaron en placas multipocillos conteniendo KPBS (NaCl 0,9%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16mM, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,6 mM). Las hipófisis fueron incluídas en parafina, previamente incubadas en alcohol 70% 1 hora, seguido de alcohol 96% durante toda la noche, luego alcohol 100% dos veces durante 1 hora cada uno, seguido de dos incubaciones de 30 minutos en xileno y finalmente incluídas en parafina a 63°C. Las hipófisis así incluidas fueron cortadas en un micrótomo (4 µm). Los cortes de cerebros fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 hora en una solución 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en KPBS. El exceso se lavó durante 20 minutos con KPBS en agitación. Luego se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4°C con agitación en una solución conteniendo anticuerpo primario anti-Cre policional hecho en conejo (1:500; Babco) y 2% NGS (normal goat se num, suero normal de cabra). Luego se lavó dos veces durante 20 min con KPBS a temperatura ambiente para incubar durante 2 horas en agitación con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo

biotinilado hecho en cabra (1:100; *Biotinylate d anti-rabbit Lg G*, BA1000, Vector). Seguido se lavó dos veces con KPBS durante 20 min y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el complejo streptoavidina/peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector). Siguieron dos lavados en KPBS de 20 min y para el revelado de la señal se incubó a temperatura ambiente con agitación hasta observar aparición de color marrón en una solución con 0,025% de 3,3´-diaminobencidina (DAB, Sigma) y 0,05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo incubando las secciones en KPBS, luego se hicieron lavados con KPBS. Finalmente las secciones fueron montadas en portaobjetos y se dejaron secar al aire. A continuación se deshidrataron con una serie de alcoholes con concentraciones crecientes (70, 96 y 100%) y xileno, y fueron cubiertos con cubreobjetos utilizando *Pe mo unt* (Fisher, USA) como adhesivo y se miraron al microscopio en campo claro.

Para las hipófisis el protocolo de inmunhistoquímica fue el siguiente: las secciones antes de comenzar la inmunohistoquímica se desparafinaron incubándolas primero en xileno, seguido de alcoholes con concentraciones decrecientes (100, 96, 90 y 70%) y por último en PBS. Luego se trataron con  $H_2O_2$  3% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente para inhibir la peroxidasa endógena. Se realizó la recuperación antigénica con *buffer* citrato (Sodium citrate trisodium salt 3%, MP Biomedicals) en microondas durante 10 min. Los cortes fueron preincubados con leche descremada al 5% durante 1 hora para bloquear los sitios de unión inespecífica. Luego se hizo la incubación con el primer anticuerpo al igual que en los cortes de cerebro, durante la noche a 4°C, seguidamente los cortes fueron lavados con PBS e incubados a temperatura ambiente durante 1 hora con segundo anticuerpo biotinilado y luego con el complejo de avidina y biotina (ABC) preformado, por 30 min. Después de los correspondientes lavados se agregó la solución de DAB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en todos los casos los

56

reactivos fueron los mismos que los descriptos para los cortes de cerebro. Se siguió el desarrollo del color marrón al microscopio, se detuvo la reacción por inmersión en PBS, y las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratas y montadas con DPX (Biochemika, Fluka) y observadas al microscopio de campo claro.

Un grupo de secciones de hipófisis fueron sometidas a doble marcación para prolactina y Cre. Para ello, primero se les hizo la inmunohistoquímica contra Cre revelada con DAB y a continuación las muestras se incubaron en una solución conteniendo anticuerpo primario policional anti-PRL hecho en cabra (1:250; Santa Cruz, USA) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente para luego incubar durante dos horas con el anticuerpo secundario anti IgG de cabra hecho en caballo (1:100; By otiny lated anti-goat IgG, BA1000, Vector, USA), a temperatura ambiente. Luego se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con avidinaperoxidasa (Vector Lab). Al cabo de la incubación se lavaron dos veces con PBS y se reveló con SG (Substrate kit for peroxidase, Vector), se inhibió la reacción lavando con PBS al ver aparecer bajo microscopio marca de color negra. Las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratas y montadas con DPX (Fluka) y visualizadas al microscopio en campo claro.

En todos los experimentos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con PBS.

En todos los casos, las células inmunorreactivas fueron fotografiadas con un microscopio Zeiss Axiostar plus equipado con una cámara digital Cannon PowerShot G6.

57

### Inmunohistoquímica para Cre y Prolactina visualizada con microscopía electrónica

Procesamiento de glándulas hipofisarias para microscopía electrónica

Las glándulas hipofisarias fueron fijadas en Karnosvky compuesto de una mezcla de formaldehído al 4% y glutaraldehído 2% en el *buffe r* cacodilato de sodio 0.1M durante un período mínimo de 2 horas a temperatura ambiente. El material fue posteriormente lavado en agua destilada y deshidratado en soluciones acuosas de alcohol etílico de graduaciones crecientes de 50, 70 y 90%, durante 15 min cada uno, a temperatura ambiente. La inclusión se realizó en resina acrílica LR White (The London Resin Co. Ltd) cumpliendo los siguientes pasos:

*Pre inc lusió n e n IR-white |a lc o ho l:* se mezcló en igual proporción LR-White puro y alcohol 90% y se sumergieron las glándulas durante 2 horas con agitación.

*Pre inc lusió n e n IR-white puro*: se reemplazó la mezcla por plástico puro y se dejó a 4°C toda la noche.

*Inc lusió n:* se realizó en cápsulas de gelatina. Se colocó el material en el fondo de la cápsula, se llenó con LR-White, se tapó y se llevó a estufa (56°C) por 48 horas para la correcta polimerización de la resina.

La identificación ultraestructural simultánea de diferentes moléculas es posible con la técnica de doble marcación con partículas de oro coloidal de dos tamaños bien definidos. Esta metodología permite localizar simultáneamente la presencia de dos antígenos en una misma sección. Con esta finalidad, las glándulas hipofisarias incluidas en LRW fueron seccionadas en cortes finos de 80 nm (color de interferencia dorado) con una cuchilla de diamante en un ultramicrótomo JEOL JUM-7. Los cortes se montaron sobre grillas de níquel de 300 barras sin soporte. De esta forma las dos caras de las secciones de tejido quedan expuestas, una en su totalidad y la opuesta entre las barras de la grilla. Las grillas se colocaron sobre gotas de los reactivos depositados sobre Parafilm dentro de una cámara húmeda. El protocolo de la reacción inmunocitoquímica fue el siguiente: se incubaron los tejidos con PBS-BSA al 1% como solución de bloqueo durante 15 minutos, luego se secó el exceso de medio con papel de filtro y se transfirió una gota de anticuerpo policional anti-Cre (1:5000 en PBS-BSA 1%; Babco) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al otro día, se lavó exhaustivamente con agua destilada y se bloqueó con PBS-BSA al 1% durante 15 minutos. Se secó el exceso de medio con papel de filtro y se incubaron las muestras con anticuerpo secundario anti-conejo (1:20 en PBS-BSA al 1%; Electron Microscopy Sciences) conjugado con partículas de oro coloidal de 16nm (IgG-oro) durante 60 minutos a 37°C. Finalmente, se lavó con agua destilada y se secaron las grillas a 37°C. A continuación se invirtió la grilla y se procesó el lado opuesto de la misma forma para identificar la hormona prolactina gránulos secretorios de células lactotropas. contenida en ΕI procedimiento inmunocitoquímico decripto para Cre fue repetido utilizando el anticuerpo primario anti-PRL (1:4000 en PBS-BSA al 1%; Santa Cruz). Un anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con partículas de oro coloidal de 5nm de diámetro (1:20; Sigma) fue utilizado como complejo marcador. Los cortes fueron secados a 37°C, coloreados con solución acuosa saturada de acetato de uranilo durante 60 segundos, examinados en un microscopio Zeiss LEO 906-E y fotografiados con una cámara Megaview III a una magnificación superior a 10.000X.

#### Inmunofluorescencia para Cre

Se realizaron inmunofluorescencias para la detección de Cre en cortes de hipófisis preparados como se describió en el paso anterior. La incubación con el primer anticuerpo, anti-Cre policional hecho en conejo (1:500; Babco) se hizo durante toda la noche a 4 °C. Finalmente se incubó con segundo anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra acoplado a Te xas Re d (1:100; Vector) por 1,5 horas. Se lavó con PBS y se montaron los portaobjetos con Vectashield (Vector Labs) que contiene un agente que impide el decaimiento de la fluorescencia. Las secciones se analizaron en un microscopio confocal Nikon C1 Plan Apo.

#### PCR en tiempo real para ARNm de Cre

Se extrajeron diferentes tejidos: adenohipófisis, hipotálamo, riñón, hígado, corazón, pulmón y ovario de los animales transgénicos Prl-Cre y controles, en hielo y en condiciones libres de ARNasas, se colocaron los tejidos en 100 µl de Trizol (Invitrogen) hasta el momento de la extracción del ARN total. Esta extracción consistió en una homogenización del tejido con homogenizador manual, luego se agregaron 80 µl de cloroformo, se incubó 2 minutos a 30°C y se centrifugó 15 minutos a 12000 g para precipitar las proteínas. Se obtuvo el sobrenadante y se le agregó 200 µl de isopropanol, se incubó 10 minutos a 30°C y se centrifugó 10 minutos a 12000 g para precipitar el ARN. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron 400 µl de etanol 70% para lavar el precipitado. Se centrifugó nuevamente 5 minutos a 7500 g, se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire durante 15 minutos. Finalmente se resuspendió al ARN en 10 µl de agua pretratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para eliminar posibles trazas de RNAsas y se chequeó su integridad corriendo una alícuota en un gel de agarosa, se cuantificó por espectrofotometría midiendo absorbancia a 260 nm y su

pureza fue evaluada por la relación de absorbancias a 260 nm/280 nm (>1.8). Se lo guardó a -70°C para su posterior utilización en la RT-PCR.

Luego se obtuvo ADNc por RT-PCR a partir de 3 µg de ARN total en presencia de 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de buffer Tris-HCI (pH 8,6), 0,5 mM de deoxy-NTPs, 1 mM de DTT, 0,5 µg de *prime r* oligo-(deoxythymidine) (Biodynamics), y 20 unidades de transcriptasa reversa MMLV (Epicentre). Esta reacción se realizó a 37°C durante 1 hora en el termociclador. Para verificar la ausencia de ADN genómico, en una muestra control se omitió la transcriptasa reversa. La ausencia de fragmentos de ADN amplificados por PCR en estos controles indicó el aislamiento de ARN libre de ADN genómico.

Para la PCR en tiempo real, se diseñaron *primers* sentido y antisentido basados en las secuencias publicadas en GeneBank de la recombinasa Cre y ciclofilina de ratón utilizando el software *Prime rExp re ss* (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Invitrogen. Las secuencias de los *prime rs* fueron las siguientes:

<u>Cre sentido</u>: 5'-CGTACTGACGGTGGGAGAATC-3'

Cre antisentido: 5'-CCCGGCAAAACAGGTAGTTA-3'

Ciclofilina sentido: 5'-GTGGCAAGATCGAAGTGGAGAAAC-3'

Ciclofilina antisentido: 5'-TAAAAATCAGGCCTGTGGAATGTG-3'

Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 1.3. Se utilizó el  $TAQurate^{TM}$  GREEN Real-Time PCR MasterMix (Eppicentre). Los productos acumulados de ADN fueron monitoreados por el sistema de detección del equipo ABI7500 (Applied Biosystems), y los resultados fueron registrados y guardados continuamente y en tiempo real durante la reacción. Estos resultados fueron posteriormente validados mediante la realización de curvas de disociación de los productos de PCR, generadas al final de la corrida mediante el aumento de la temperatura de las muestras desde 60°C hasta 95°C, mientras se registraba la fluorescencia de los productos. La pureza de los productos fue confirmada posteriormente por electroforesis en geles de agarosa. Cada muestra fue analizada por triplicado junto con controles sin molde para monitorear contaminación con ADN genómico.

Los cálculos del número de copias iniciales de ARNM en cada muestra se realizaron de acuerdo al método del ciclo en el que se alcanza el umbral de detección (*cycle threshold o Ct*). El Ct de cada muestra fue calculado como el umbral de fluorescencia (R<sub>n</sub>) utilizando el programa ABI7500 *se que nc e de te c tio n syste m*, con una línea de base automática. Para todos los pares de *prime rs* diseñados, se confirmó la linearidad de la señal de la RT-PCR utilizando un rango de diluciones seriadas de un ADNc de referencia que cubria la cantidad de ARNM esperada en las muestras experimentales ("rango dinámico"), y se obtuvo una clara correlación lineal entre la cantidad de ADNc y el Ct en al menos 40 ciclos de RT-PCR.

La expresión génica relativa de Cre se normalizó utilizando el house ke e ping ciclofilina mediante el uso del método de la curva estándar, como describe el fabricante (User Bulletin no. 2). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (AU) para la comparación entre muestras. Las unidades arbitrarias se definieron como el nivel de expresión relativo al de una muestra de un ratón WT (muestra calibradora).

#### Tabla 1.3: Reacción de PCRen tiempo real para el ARNm de Cre.

MIX PCR tiempo real	Concentración		Programa		
Prime rs se ntid o	0,29 µM			Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Prime rs antisentido	0,29 µM		1 ciclo de desnaturalización inicial	95	10
ADNC	100ng		35 ciclos: de desnaturalización- apareamiento y extensión	95	0,5
kit	5 µl			63	1
H <sub>2</sub> O	Vf= 10µl			72	0,3
			Lectura de datos	88	

#### Determinación de la actividad de la recombinasa Cre

#### Obtención de animales doble transgénicos Prl-Cre.EGFP+

Los animales de las líneas transgénicas Prl-Cre fueron apareados con animales reporteros de la actividad de Cre, ratones B6;129-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm2Sho</sup>/J (ratones adquiridos del laboratorio Jackson, USA, en un background puro B6;129), conocidos popularmente como ROSAEGFP (sólo expresan el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) en células que expresan Cre). Los ratones doblemente transgénicos (PrlCre+ y EGFP+, según determinaciones por PCR) se perfundieron con paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros e hipófisis de estos animales, se fijaron en la misma solución de paraformaldehído y luego, los cerebros y las hipófisis fueron tratados para inmunofluorescencia de la misma manera que se describió antes para las inmunofluorescencias de Cre. Se utilizó anticuerpo primario anti-EGFP hecho en conejo (1:250; Abcam, USA) y como secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra acoplado a fluoresceína (1:100; FITC, Vector). Los cortes fueron contrateñidos con ioduro de propidio y montados con Vectashield (Vector).

Un grupo de secciones de hipófisis fueron sometidas a doble marcación para prolactina y EGFP. Para ello, primero se les hizo la inmunohistoquímica para EGFP revelada con FITC y a continuación las muestras se incubaron en una solución conteniendo anticuerpo primario policlonal anti-PRL hecho en cabra (1:250; Santa Cruz) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron dos veces con PBS a temperatura ambiente para luego incubar durante dos horas con el anticuerpo secundario anti IgG de cabra hecho en caballo (1:100; Vector) acoplado a Te xa s Re d, a temperatura ambiente. Luego se lavaron dos veces con PBS y posteriormente se montaron de la misma forma que ya fue descripta para la doble marcación de PRL y Cre.

#### Cruza de las líneas Prl-Cre con ratones C57Bl/6J

Por otro lado se hicieron retrocruzas, que consistieron en aparear las crías de las líneas fundadoras Prl-Cre con la cepa pura endocriada C57BI/6J con el objetivo de aumentar el background genético de la cepa C57BL/6J.

Los experimentos siguientes se realizaron en ratones retrocruzados 6 veces (n=6), que equivale a un porcentaje teórico de 98,4% de contribución genética de C57BI/6J.

#### Parte 2. Ratón pitD2RKO

Los animales transgénicos PrI-Cre n=6 se cruzaron con ratones que poseen el exón 2 del RD2 flanqueado por secuencias lo xP ( $Drd2^{flox/flox}$ ), retrocruzados por 10 generaciones con ratones de la cepa C57BI/6J. Estos animales fueron generados en el laboratorio del Dr Marcelo Rubinstein en el INGEBI-CONICET por el Dr Diego Gelman y caracterizados por la Dra Daniela Noaín.

Brevemente, la construcción del alelo del *Drd2* modificado (Figura 1.3, A) se realizó mediante técnicas de ingeniería genética con el objetivo de flanquear al exón 2 del gen con secuencias lo xP. El vector de recombinación fue introducido en células embrionarias (ES) de la línea J1 de la cepa 129S4/Jae (línea de células ES salvaje derivada de una subcepa de ratón 129). Para permitir la búsqueda de las células en las que ocurrió recombinación homóloga entre la construcción modificada y el alelo endógeno salvaje, se introdujo el gen de resistencia a neomicina (neo) como factor de selección positivo y el gen de la timidina quinasa (TK) como factor de selección negativo, ambos bajo el control transcripcional del promotor de fosfogliceroquinasa (PGK). Este cassette completo también se encuentra flanqueado por sitios loxP, para permitir su posterior remoción. Estas células ES modificadas dieron luqar a ratones auimera mediante SU microinyección en blastocistos de ratónes C57BI/6J colectados de madres superovuladas. Los blastocistos microinyectados luego fueron transferidos a madres sustitutas pseudopreñadas. Se obtuvieron 4 quimeras, dos hembras de bajo porcentaje y dos machos con más del 95% de quimerismo. En la adultez, ambos machos fueron cruzados con hembras C57BI/6J para obtener heterocigotas portadores del alelo  $Drd2^{flox/+}$  y finalmente se obtuvieron homocigotas para el alelo  $Drd2^{flox/flox}$ n=10, que fueron los utilizados en esta tesis. Los sitios loxP introducidos son

65

sensibles a la recombinación homóloga mediante la recombinasa Cre del bacteriofago P1. La inducción de las deleciones Tipo I, Tipo II y Tipo III pudieron seguirse mediante análisis de Southern blot (Figura 1.3, B) o por PCR con *prime rs* específicos para detectar las diferentes variantes.

Es de interés destacar que los ratones mutantes condicionales para el RD2 constituyen el primer, y hasta el momento, único modelo de ratón mutante condicional generado en la Argentina.

Dado que los  $Dnd2^{flox/flox}$  no presentaron alteraciones ni en la expresión ni en la funcionalidad del RD2 respecto a sus hermanos WT, y que los ratones Prl-Cre presentaron expresión de Cre funcional específicamente en hipófisis, en lactotropos, se aparearon ambas líneas. De ahora en más, se denominarán pitD2RKO a los ratones transgénicos compuestos  $Dnd2^{flox/flox}$  Tg. Prl-Cre. Para el análisis de la línea pitD2RKO se realizó una caracterización a nivel neuroquímica y funcional, y se utilizó como control de cada experimento a los animales  $Dnd2^{flox/flox}$ , previamente evaluados en el laboratorio.

# A



Figura 1.3: Estrategia para producir ratones con el alelo Drd2 "floxeado" y detectar todos los alelos posibles mediante Southern blot. (A) El vector de recombinación permitió la incorporación de 3 sitios loxP y un marcador de selección (cassette neo<sup>r</sup>) mediante recombinación homóloga en células embrionarias (ES). Dos clones seleccionados ( $Drd2^{flox-neo/+}$ ) fueron microinyectados en blastocistos de ratones C57Bl/6J. El cassette PGK-neo<sup>r</sup> fue luego eliminado mediante cruza de mutantes heterocigotas con ratones transgénicos Ella-Cre obteniéndose ratones  $Drd2^{flox/+}$ . (B) Análisis de Southern blot de ADN de ratones digerido con Xbal o EcoRI hibridado con las sondas A y B, respectivamente en donde se demuestra inequívocamente la presencia de todos los tipos de recombinantes, incluido el alelo  $Drd2^{flox/+}$ .

#### Caracterización de los animales pitD2RKO

#### Hibridación in situ para el RD2

*Obtención del vector pRiboD2E2:* A partir de un plásmido generado por el Dr. Diego Gelman, que contiene el ADNc de los exones 1, 2, 3 y 4 del *Drd2* (pRiboD2E1E4); obtenidos por retrotranscripción a partir de ARN total, amplificados por PCR con *primers* específicos y clonados en el vector pGEMTeasy<sup>®</sup> y con el objetivo de generar un molde apropiado para la obtención de una ribosonda específica del exón 2 del *Drd2*, se liberó un fragmento de 281 pb del exón 2 cortando con BamHI, dentro del exón, y EcoRI, en el vector. Este fragmento se volvió a clonar en pGEMTeasy<sup>®</sup> y al plásmido resultante se lo denominó pRiboD2E2.

Sinte sis de una ribosonda específica del exón 2 de Drd2: Para sintetizar la ribosonda se incubó 1  $\mu$ g del plásmido pRiboD2E2, previamente linealizado con la enzima de restricción BamHI, con el buffer de transcripción, que contiene Tris-HCI 40 mM, pH = 8,0; MgCl2 15 mM; DTT 15 mM; BSA 0,05 mg/ml; 60 U de un inhibidor de ARNsas (ARNse out, Invitrogen); ATP, CTP y GTP 0,5 mM; 2  $\mu$ l DIG-UTP (digoxigenina, Roche) y 16 U de T7 polimerasa (New England Biolabs). Luego de incubar durante 70 minutos a 37 °C, se digirió el plásmido con Dnase I (Invitrogen). Las ribosondas se purificaron con columnas (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Quiagen) y se eluyeron en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de ARNsa.

Hibridación in situ con ribosondas: Los cerebros y las hipófisis frescos fueron congelados en isopentano a -30 °C, inmediatamente incluidos en Tissue-Tek y mantenidos por 1 hora a -20 °C. Luego, se montó la muestra sobre la platina del equipo (MicroM, modelo: HM 505 N) y se generaron cortes coronales de 15-60  $\mu$ m de espesor. Las secciones fueron montadas en portaobjetos superfrost plus (Fisher).
Finalmente, los vidrios se secaron durante 20 min al aire y se guardaron a -70°C hasta su posterior utilización. Al iniciar el experimento los tejidos fueron descongelados y equibrados a temperatura ambiente al menos 30 minutos y luego tratados con proteinasa K 10  $\mu$ g/ml en buffer TE 10X (100 mM Tris, 10 mM EDTA) a temperatura ambiente por 15 min. Luego se lavaron 2 veces con el mismo b uffer y a continuación se trataron con trietanolamina (TEA) 0,1 M pH 8 por 3 min, se incubaron en ácido acético anhidro 0,25% en TEA 0,1 M por 10 min, se lavaron dos veces en SSC 2 x (0,3 M NaCl, 0,03 M Citrato de Sodio, pH 7,2), y finalmente se deshidrataron en forma rápida con etanol en concentraciones crecientes. Para la prehibridación se incubaron los preparados con el buffer de hibridación (formamida 66%, NaCl 260 mM, solución de Denhardt 1,3 x [50x: ficoll 1%, polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%], EDTA 1,3 mM, Tris-HCl 13 mM pH 8,0, sulfato de dextrano al 13%) por 1 hora a 57°C. Las ribosondas marcadas con DIG se calentaron a 65°C durante 2 min (con 0,5 mg/ml de ARNt y DTT 10 mM en agua) y se agregaron al buffer de hibridación en una concentración de 85 ng/ml. La hibridación se realizó a 70°C durante toda la noche. Al día siguiente los preparados fueron lavados 4 veces con SSC 4X y sujetos a digestión con ARNsa A (20 µg de ARNsa A/ml; 0,5 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH8; 1 mM EDTA pH 8) a 37°C por 30 min. Luego se sometieron a lavados sucesivos con SSC 2x, 1x, 0,5x /1mM DTT y a un lavado final a 65°C en SSC 0,1x /1mM DTT por 30 min. Después de un lavado rápido en la misma solución a temperatura ambiente, se deshidrataron los preparados con concentraciones crecientes de etanol, se sumergieron en emulsión Kodak N-TB2 (diluida 1:1 en agua destilada). Los preparados se revelaron, se deshidrataron con etanol y se montaron con Vectashield (Vector). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss Axiostar plus equipado con una cámara digital Cannon PowerShot G6.

#### Colección de muestras de sangre y orina

La colección de muestras de sangre y de orina se realizó para determinar valores de moléculas de interés circulantes o excretadas, como por ejemplo PRL o IGF-I en suero, o proteínas urinarias mayores (MUPs) en orina. La colección de ambos fluidos se realizó entre las 15 y 17 h. Para los experimentos de medición de IGF-I y PRL séricos la muestra se tomó por punción de la mejilla del animal sin previa exposición a droga alguna. Con aproximadamente 300 µl de sangre se obtuvo suficiente plasma para la medición de ambas moléculas por duplicado por radioinmunoensayo (RIA).

La colección de las muestras de orina se realizó simplemente colocando un tubo eppendorf en el área genital del animal mientras éste era sujetado por el pellejo. La manipulación de los animales suele ser un factor estresante para éstos por lo que normalmente orinan durante este proceso. Se obtuvieron aproximadamente 100 µl de orina por cada animal, lo cual es suficiente para la determinación de MUPs.

#### Niveles de PRL en sangre basales e inducidos por haloperidol

Primeramente se inyectaron los animales con solución salina (NaCl 0,9%) i.p. (vehículo) y a la hora se extrajo sangre por punción de la mejilla. A la semana siguiente, los mismos grupos de animales se inyectaron con haloperidol (3mg/kg i.p. Haloperidol Hydrochloride, TOCRIS), y a la hora se extrajo sangre de mejilla. Con ambos sueros, post salina y post haloperidol, se procedió a medir los niveles de PRL mediante radioinmunoensayo (RIA).

El protocolo de RIA fue el siguiente: la curva de concentraciones del estándar de referencia y la dilución de las muestras fue realizada en *buffer* de ensayo: *buffer* fosfato (PBS) con 1% de albúmina de huevo (EA). La solución de PBS fue compuesta por *buffer* fosfato 0,01M, NaCl 70 0,15M y 0.01% azida sódica, pH final 7,4. El primer anticuerpo (IgG policional de conejo anti-PRL de ratón, 1:100000; NHPP-NIDDK, USA) y la hormona marcada (aproximadamente 10000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 24 hs. Al día siguiente, el segundo anticuerpo (suero policional de oveja anti-IgG de conejo, 1:90) fue agregado al ensayo e incubado a 4°C por 24 hs. Luego de esta incubación se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación refrigerada (4°C, Beckman Instruments) a 3000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se midió la radioactividad asociada al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador gamma (eficiencia: 82%, Hewlett Packard). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 7,2% y 12,8% respectivamente.

# Niveles de PRL en sangre en hembras y machos a lo largo del

#### crecimiento

También se extrajeron muestras de sangre de mejilla de los ratones a distintas edades y mediante el mismo protocolo de RIA descripto anteriormente, se midió PRL en sueros a distintas edades.

#### Niveles de IGF-1 en sangre

Las muestras de suero para RIA de IGF-I (15 µl) y los estándares de IGF-I fueron sujetos al método de crioprecipitación con etanol ácido (95). IGF-I se determinó usando un anticuerpo (IgG policional de conejo anti-IGF-I de ratón, 1:10000; UB2-495) provisto por los Dres. L. Underwood y J.J. Van Wyk, y distribuido por el "Hormone Distribution Program" del NIDDK. Se usó IGF-I humano recombinante (rh IGF-I, Chiron Corp., Emeryville, CA) como radioligando y como ligando no marcado. La sensibilidad del ensayo fue de 6 pg por tubo. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 8,2% y 14,1%, respectivamente. El protocolo, una vez obtenidos los extractos fue semejante al RIA de PRL previamente descripto.

#### Obtención de muestras para el estudio del ciclo estral

La identificación de las distintas fases del ciclo estral se realizó mediante la obtención de extendidos vaginales en hembras de 5 meses de edad. Los extendidos fueron observados en un microscopio campo claro. Los estadíos del ciclo estral estudiados fueron diestro, estro y proestro. Los resultados fueron expresados como % de días en diestro y % de días en estro.

#### Desarrollo de catatonía inducida por haloperidol

Se realizó el test de la barra. Este test se utiliza para determinar el nivel de catatonía que adquiere un animal luego de una inyección de haloperidol, droga antagonista de los RD2, y es parámetro de funcionalidad del los RD2 centrales. La dosis del neuroléptico utilizada en esta prueba fue de 1,5 mg/kg. La prueba consistió en colocar al animal sobre sus patas delanteras en una barra de 2 cm de diámetro fijada a 6 cm de altura, parado sobre sus patas traseras en la superficie de la mesa de trabajo. Se realizaron 5 intentos en los que se determinó el tiempo de inmovilidad del animal una vez que fue exitosamente posado sobre la barra. El tiempo de corte de cada intento fue de 3 minutos. Finalmente, se determinó el tiempo máximo que el animal permaneció inmóvil en los 5 intentos.

#### Talla y curvas de peso

Los animales fueron pesados y tallados una vez por mes, desde el 1º mes a 11 meses de edad. Se pesaron siempre en la misma balanza (Dhaus) y se midió el largo corporal entre la nariz y el ano, estos ensayos se realizaron en el bioterio.

#### Ingesta de alimento

La medición de la ingesta de alimento se realiza para determinar la cantidad de alimento ingerido por un animal en un cierto período de tiempo. Estas mediciones consistieron en pesar la comida entregada al animal en su jaula y aquella remanente cada 24 horas durante una semana. También se registró el peso corporal del animal diariamente durante todo el período del experimento. El parámetro analizado fue la cantidad de comida ingerida diariamente.

#### Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT)

Este ensayo se realizó en ratones pitD2RKO de 6 meses de edad y sus respectivos controles. Los animales fueron ayunados durante 8 horas y fueron inyectados con glucosa intraperitoneal 3g/kg. Se tomaron muestras de sangre por punción en la cola para la medición de glucosa en el momento con un medidor electrónico de glucosa (Dex-II, Bayer). Los tiempos de toma de muestra de sangre fueron 0, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos post inyección de glucosa.

#### Niveles de insulina pancreática

Los niveles de insulina en el páncreas fueron medidos mediante radioinmunoensayo. Para ello, los páncreas fueron pesados y homogeneizados en agua (1g de tejido en 8ml de agua) y se cuantificaron las proteínas con el Qubit™ Quantitation Kit (Invitrogen, Buenos Aires).

Luego se procedió a la extracción de insulina de los tejidos. Al homogenato, conteniendo 15 mg de proteínas, se le agregó un volumen de etanol:ácido acético (70:5) y se volvió a homogeneizar. Se separaron 400 µl y el resto se guardó a -70°C. Se incubaron las muestras a 4°C por 24 horas, luego se centrifugaron a 4600 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se neutralizó con igual volumen de Tris base 0,85 M. Se incubó una hora a -20°C y se centrifugó a 5700 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente se pasó el sobrenadante a otro tubo. Para el RIA se hicieron diluciones de las muestras y se sembraron 20µl (conteniendo 400 µg de proteína) de cada una.

El protocolo de RIA fue el siguiente: la curva de concentraciones del estándar de referencia y la dilución de las muestras fue realizada en buffer de ensayo: 200 mg/l de sulfato de protamina, fosfato de sodio monobásico 4,14 g/l, 0,5% de detergente Tween, y EDTA 0,1M, pH final 7,5. Se utilizó como estándar para hacer las curvas insulina humana provista por los Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina). El primer anticuerpo (IgG policional de cobayo anti-insulina de ratón, 1:50000; Sigma) y la hormona marcada (aproximadamente 10000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 24 hs. Al día siguiente, el segundo anticuerpo (anti-IgG de cobayo hecho en conejo, 1:100000) fue agregado al ensayo e incubado a 4°C por 8 hs. Luego de esta incubación se agregó el tercer anticuerpo (suero policional de oveja anti-IgG de conejo, 1:90) y se incubó a 4°C por 24 hs. Se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación refrigerada (4°C, Beckman Instruments) a 3000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue aspirado y se midió la radioactividad asociada al

74

precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en el contador gamma. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron 8,5 y 14,4 % respectivamente.

#### Niveles de MUPs en orina

Las muestras de orina fueron colectadas se centrifugaron durante 3 minutos a 9900 rpm. Luego fueron corridas en un gel 12% SDS-PAGE y teñidas con *Coomassie blue*. Las MUPs representan el mayor componente protéico de la orina de ratón. La densitometría se realizó sobre la banda mayoritaria de 20 KDa con los *so ftwa re s* Image-quant o Scion, y se calculó como % del promedio de intensidad obtenida en machos wt.

#### Análisis de la generación de prolactinomas en hembras pitD2RKO

A los 11 meses de edad se sacrificaron las hembras pitD2RKO y se extrajeron sus hipófisis. Se las pesó y dividió en dos: por un lado se procesaron en *buffer* para RIA para medir el contenido de PRL de homogenatos de hipófisis (RIA, técnica ya descripta. Se sembraron 100 ng de proteína por tubo de reacción); y por otro lado se las incluyó en parafina para inmunofluoresecencia de PRL y GH (también técnicas ya descriptas, en este caso los anticuerpos que se utilizaron fueron: anti-PRL hecho en cabra, 1:250; Santa Cruz y anti-GH hecho en mono, 1:400; Santa Cruz). Los anticuerpos secundarios fueron anti IgG de cabra acoplado a FITC y anti IgG de mono acoplado a TR, ambos 1:100; Santa Cruz.

#### Evaluación de parámetros angiogénicos y de proliferación

Con el objetivo de determinar eventos que caracterizan la angiogénesis en el desarrollo de prolactinomas se estudió la expresión

de CD31 (*c* husste r mo le c ule of diffe re ntiation) en tejidos hipofisarios de hembras pitD2RKO y  $Drd2^{flox/flox}$  de 11 meses de edad. En estas muestras se determinó la densidad microvascular y el porcentaje de área marcada.

Se detectó CD31 por inmunohistoquímica siguiendo el protocolo de inmunohistoquímica previamente descripto, se utilizó el anticuerpo primario anti-CD31 hecho en cabra (1:200; Santa Cruz) y el anticuerpo secundario anti IgG de cabra biotinilado (1:100; Vector) y se reveló con DAB. Se obtuvieron imágenes de todo el tejido usando un objetivo de 100x. Luego utilizando el programa Image J se calculó el área de cada vaso en las imágenes de los cortes inmunoteñidos y el área total de cada corte. El porcentaje de área vascular se calculó tomando como 100% al área total del tejido. La densidad microvascular fue calculada contando el número de vasos por mm<sup>2</sup> de tejido.

Por otro lado, se calculó el índice de proliferación celular contando núcleos positivos para PCNA en tejidos hipofisarios de hembras pitD2RKO y *Drd2flox/flox* de 11 meses de edad. Para ello se realizaron inmunohistoquímicas siguiendo el protocolo previamente descripto, se utilizó el anticuerpo primario anti-PCNA hecho en conejo (1:200, Santa Cruz) y el anticuerpo secundario anti IgG de conejo biotinilado (1:100; Vector) y se reveló con DAB. Se obtuvieron imágenes de todo el tejido usando un objetivo de 100x.

#### Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas realizadas en los diferentes ensayos se llevaron a cabo utilizando los programas STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., USA). En cada figura en la sección resultados se indican las pruebas estadísticas utilizadas para cada caso. A modo de resumen, se utilizó **Prueba de T** en el análisis de la longitud del fémur, los pesos de los tejidos, la ingesta de alimento, en la determinación del nivel plasmático de IGF-I y tisular de insulina, en la determinación del contenido de PRL intrahipofisario medido por RIA y por inmunohistoquímica, en la cuantificación del nivel de MUPs en orina, en el ensayo del ciclo estral, en el cálculo del índice de proliferación celular y densidad y área vascular. Se analizaron mediante **ANOVA DE MEDIDAS REPEIIDAS (AMR)** todos los datos de pesos y tallas de los animales a lo largo del tiempo. También se utilizó esta prueba en las determinaciones del tiempo de inmovilidad en los test de catatonía, en las determinaciones de los niveles plasmáticos de PRL basal e inducido por haloperidol y en el test de tolerancia a la glucosa. En los casos en los que fueron necesarias pruebas *post hoc* se realizaron comparaciones de Fisher. Un P < 0,05 fue considerado significativo.

## Capítulo 1: Resultados

# Parte 1. Generación de líneas de ratones transgénicos Prl-Cre

# a. Construcción de un transgén que expresa la recombinasa Cre bajo el promotor de prolactina

Para dirigir la expresión de la recombinasa Cre en los lactotropos hipofisarios, se construyó el transgén conteniendo la secuencia codificante de la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de 3 kb de prolactina de ratón de la cepa C57BI/6J. Este transgén denominado PrI-Cre (Figura 1.4) se construyó en dos pasos: primero el promotor de prolactina fue aislado mediante PCR a partir de ADN de un ratón WT, en dos fragmentos: fragmento 1 de 1349 pb y fragmento 2 de 1561 pb (Figura 1.5). Estos, luego fueron ligados al gen de Cre y finalmente el transgén PrI-Cre fue purificado y liberado del vector por medio de doble digestión con las enzimas con Xhol y NotI (detalles en Materiales y Métodos). El inserto finalmente fue preparado para microinyección pronuclear.



**Figura 1.4: Esquema del transgén PM-Cre**. La línea amarilla representa el promotor de prolactina de ratón de 3 kb de longitud, la roja, al gen de la recombinasa Cre del bacteriófago P1 y la verde, la secuencia de poliadenilación del gen del antígeno T del virus SV40. X (XhoI) y N (Not I) son las enzimas utilizadas para la liberación del transgén del plásmido.



**Figura 1.5: Geles de agarosa** de los cuales se aislaron los fragmentos del promotor de prolactina de ratón (izquierda: fragmento 1 de 1549 pb. Derecha: fragmento 2 de 1561 pb). En ambos geles, la primera calle muestra el marcador de peso molecular, las flechas indican los pares de bases que corresponden a cada banda.

#### b. Producción de animales transgénicos Prl-Cre

El transgén se microinyectó en uno de los pronúcleos de ovocitos fertilizados de ratón. Estos se transfirieron a los oviductos de hembras pseudopreñadas y a las tres semanas del nacimiento se analizaron las crías en búsqueda del transgén. En total nacieron 61 animales de embriones microinyectados resultando 9 positivos para el transgén siendo la eficiencia de la transgénesis del 15%.

La presencia del transgén fue detectada por PCR, a partir de ADN genómico, con *primers* específicos obteniéndose un producto de 328 pb que abarca parte del promotor de PRL y parte del gen de la recombinasa Cre.

Para establecer una colonia de animales transgénicos, los ratones transgénicos obtenidos por microinyección (F0), fueron apareados con ratones no transgénicos de la cepa C57Bl6/J. De estos 9 animales transgénicos PrI-Cre, 5 fueron capaces de transmitir el transgén a la filiación 1 (F1). Los porcentajes de transgénicos F1 fueron cercanos al 50%, indicando que en estos casos el transgén se integró en los embriones de la F0 en un estadio que aseguró la presencia del transgén en las células germinales y que el evento de integración fue anterior a la primera división mitótica de la cigota microinyectada. Los 4 animales restantes, no fueron capaces de transmitir el transgén y por lo tanto fueron descartados.

Por lo tanto, se obtuvieron 5 líneas de animales portadores del transgén PrI-Cre, que contenían la recombinasa Cre del bacteriófago P1 bajo el control transcripcional de prolactina. Las 5 líneas fueron denominadas con los números 1, 2, 3, 6 y 8.

# c. Distribución de la expresión de la recombinasa Cre en las líneas de transgénicos Prl-Cre

Debido a que los transgenes se insertan al azar en el genoma, las 5 líneas de transgénicos PrI-Cre se mantuvieron y analizaron en forma aislada. Seguidamente se realizaron una serie de estudios para determinar si el promotor de prolactina era capaz de dirigir la expresión de la recombinasa Cre a la hipófisis. Para ello, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real e inmunohistoquímica en tejidos de ratones transgénicos PrI-Cre.

#### Expresión de ARNm de Cre

Se comprobó mediante una técnica cuantitativa, PCR en tiempo real, la expresión de la enzima Cre recombinasa en la hipófisis y otros tejidos de cada una de las 5 líneas de transgénicos Prl-Cre. Se utilizó como control negativo hipófisis de ratones WT y como control positivo hipófisis de ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre en todo el organismo bajo el control de un promotor constitutivo (Figura 1.6). Se analizaron parámetros cuantitativos y también los relativos a la hipófisis respecto del resto de los tejidos como prueba de selectividad de expresión. Se observó diferencia de expresión entre las distintas líneas siendo la línea 3 la que presentó mayor expresión de ARNm de Cre, seguida de la línea 6. Los animales de las líneas 1, 2 y 8 presentaron muy baja expresión de ARNm de Cre en hipófisis aunque mayor a la de los ratones WT.

También se observó que los animales de la Línea 3 y la 6 presentaron la mayor relación entre la cantidad de ARNm de Cre respecto a otros tejidos como el hipotálamo, el ovario y el riñón. En el hígado, pulmón y corazón no hubo señal de ARNm de Cre en estas dos líneas. Los animales de la línea 1 mostraron muy baja expresión del ARNm de Cre en hipófisis, y mayores niveles en el hipotálamo. Las líneas 8 y 2, tuvieron muy baja expresión del mensajero en la hipófisis y ausencia del mismo en los demás tejidos analizados (Figura 1.6).



Figura 1.6: Análisis de la expresión de ARNm de Cre en diferentes tejidos en cada una de las 5 líneas de transgénicos PH-Cre. n=5 para cada línea. La línea 3 presenta mayor expresión de ARNm de Cre en hipófisis, seguida de la línea 6. Las líneas 1, 2 y 8 muestran muy baja expresión. Como controles se utilizaron hipófisis WT (control negativo) e hipófisis de animales trasgénicos Cre (control positivo). En todos los casos las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.

#### Expresión de Cre en hipófisis

Secciones de hipófisis de 4 µm de espesor obtenidas por cortes en micrótomo fueron sometidas a ensayos de inmunohistoquímica para identificar la presencia de la proteína transgénica Cre.

En la Figura 1.7 puede verse que la recombinasa Cre se expresa en la hipófisis. Debido a que la proteína Cre recombinante cuenta en su extremo N-terminal con una señal de localización nuclear, su inmunomarcación se detecta en el núcleo de las células. Algunas secciones de los tejidos hipofisarios, fueron contrateñidos con hematoxilina y se observó que no todos los núcleos eran positivos para Cre (Figura 1.7 E).



Figura 1.7: Localización de la recombinasa Cre en hipófisis. Secciones de hipófisis incluidas en parafina de 4 µm de espesor de los animales transgénicos PrI-Cre, fueron sometidas a inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

utilizando como anticuerpo primario anti-Cre. Panel **A**: Cre en hipófisis de animales PrI-Cre, visualizada con Texas red en microscopio confocal A=1000x, **B** control, hipófisis de una animal WT A=1000x, **C**: Cre en hipófisis de animales PrI-Cre, revelada con DAB, **D**: control, hipófisis de una animal WT. **E** Cre en hipófisis de animales PrI-Cre revelada con DAB y **F**: control, hipófisis de una animal WT. En D, E y F los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina. Las fotos en campo claro fueron tomadas con un objetivo 100x.

#### Colocalización de prolactina y la recombinasa Cre

Para determinar si Cre se expresa particularmente en los lactotropos, se hizo un ensayo de doble marcación secuencial de Cre y prolactina, con anticuerpos policionales específicos para cada una de las proteínas. A pesar de que en secciones de hipófisis de los ratones transgénicos Pri-Cre de las 5 líneas se observaron células que coexpresan PRL y Cre, la inmunomarcación irregular obtenida con el anticuerpo anti-PRL no permitió establecer una cuantificación precisa del grado de colocalización de Cre en lactotropos (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Colocalización de PRLy Cre en hipófisis. Secciones de hipófisis incluidas en parafina de 4 µm de espesor de los animales transgénicos PrI-Cre fueron sometidas a doble inmunohistoquímica utilizando como anticuerpos primarios anti-Cre y anti-PrI, y fueron reveladas con DAB para Cre y con SG para PRL. Panel A: Colocalización de Cre (DAB) y PRL (SG) en hipófisis de un ratón transgénico PrI-Cre de la línea 3, **B** en otro ratón transgénico PrI-Cre de la línea 4, **C**: PRL (SG) en hipófisis de una animal WT

control. La PRL muestra un patrón de expresión citoplasmática y la recombinasa Cre nuclear. Fotos tomadas con objetivo 100x.

La expresión de la recombinasa Cre y de PRL, también fue evaluada por inmunohistoquímica con microscopía electrónica, utilizando partículas de oro de distinto diámetro para cada uno de los anticuerpos. Se observó expresión de Cre nuclear en secciones de hipófisis de animales transgénicos PrI-Cre. Las células positivas para Cre fueron también positivas para PRL, indicando patrones de expresión coincidentes (Figura 1.9).



**Figura 1.9: Colocalización de PRL y Cre en hipófisis.** Secciones de hipófisis de los animales transgénicos PrI-Cre, fueron sometidas a doble inmunohistoquímica utilizando como anticuerpos primarios anti-Cre y anti-PrI. Se oberva inmunomarcación de PRL con oro de 5 µm y de Cre con oro de 15 µm de diámetro. **A:** Ratón PrI-Cre de línea 6 y **B ratón** WT. En ambos casos, las barras de la escala en el ángulo inferior derecho representan 1 µm.

#### d. Línea reportera ROSA-EGFP

Luego de obtener la evidencia de la presencia del ARNm de Cre y de la proteína Cre en las hipófisis de los animales transgénicos, se decidió estudiar si la Cre transgénica tenía actividad enzimática *in vivo*. Con este objetivo, cada una de las 5 líneas de los animales transgénicos Prl-Cre se cruzaron con ratones trasngénicos que sirven como reporteros de la actividad de Cre. Estos ratones conocidos comúnmente como ROSA-EGFP, tienen insertado en el locus ROSA26 el gen de EGFP precedido por un fragmento que contiene codones de terminación traduccionales, flanqueados por dos sitios loxP. Estos ratones no expresan EGFP a menos que este fragmento "STOP" sea removido por Cre. Luego de cruzar los ratones PrI-Cre con los ROSA-EGFP se idetificaron por medio de PCR, a partir de ADN genómico, los animales doble transgénicos (PrI-Cre.EGFP<sup>+</sup>).

#### Expresión de EGFP en hipófisis y colocalización con PRL

En secciones de hipófisis de animales PrI-Cre.EGFP<sup>+</sup> se observó expresión de EGFP, indicando que Cre se expresó en esas células y fue capaz de escindir el fragmento STOP flanqueado por secuencias loxP, permitiendo que se exprese EGFP (Figura 1.10).

Para determinar si las células que expresan EGFP y por ende Cre, en la hipófisis eran lactotropos, se hizo un ensayo de doble marcación con prolactina, con anticuerpos policionales específicos para cada una de las proteínas.

Se observó coexpresión celular de PRL y EGFP en citoplasma en las hipófisis de los animales doble transgénicos PrI-Cre de las 5 líneas estudiadas (Figura 1.10). No se pudo realizar un análisis cuantificativo más profundo debido a problemas de la técnica y cruza de los anticuerpos.

En conjunto los resultados muestran que los ratones transgénicos Prl-Cre expresan Cre en la hipófisis, mediante inmunohistoquímica y PCR en tiempo real, y que esta enzima es activa *in vivo*, mediante la visualización de EGFP en hipófisis de animales doble transgénicos (Prl-Cre.EGFP<sup>+</sup>).



Figura 1.10: Localización de EGFP en hipófisis de animales doble transgénicos Pth Cre.EGFP. Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica anti-EGFP y anti-PRL. Panel A: EGFP en verde en hipófisis de animales PrI-Cre.EGFP<sup>+</sup>, A=1000x. B: EGFP revelado con DAB (marrón) en citoplasma y núcleos contrateñidos con hematoxilina en hipófisis de animales PrI-Cre.EGFP<sup>+</sup>. Foto tomada con objetivo 100x. C y D: Colocalización de EGFP y Prolactina en hipófisis. En verde se presenta EGFP con FITC y en rojo prolactina con TR. El naranja indica colocalización de ambas proteínas (señalado con flechas rojas). Panel C: Ratón doble transgénico de la línea 3, D: Ratón doble transgénico de la línea 6.

### Parte 2. Ratones pitD2RKO

#### Caracterización de las líneas de ratones pitD2RKO

El análisis descripto hasta aquí permitió seleccionar tres líneas de ratones transgénicos Prl-Cre: la 3, 6 y 8 con alta, intermedia y baja expresión de ARNm de Cre en hipófisis, respectivamente. Estas tres líneas fueron retrocruzadas por 6 generaciones a la cepa C57Bl/6J n=6 (ver retrocruza en Materiales y Métodos) y posteriormente cruzados con ratones mutantes condicionados del gen del receptor de dopamina D2 ( $Drd2^{flox/flox}$ ). (De ahora en adelante se llamarán pitD2RKO a los ratones

 $Drd2^{\text{flox/flox}}$ .Tg PrI-Cre. Para el análisis de cada línea pitD2RKO se realizó una caracterización a nivel neuroquímica (hibridación *in situ*) y funcional (niveles de PRL sérica basales y post haloperidol, catatonia, curvas de peso corporal y talla), y se utilizaron como control de cada experimento a los animales  $Drd2^{\text{flox/flox}}$  (ver Materiales y Métodos).

Se analizaron machos y hembras pitD2RKO de las líneas 3, 6 y 8, con excepción de la línea 6, que dado que no se han obtenido un número suficiente de crías macho pitD2RKO de esta línea, se trabajó solo con hembras.

#### Hibridación in situ para el ARNm del RD2

En primer lugar, mediante la técnica de hibridación *in situ* se determinó la presencia o ausencia del ARNm del RD2 en los animales de la línea pitD2RKO en el cuerpo estriado y la glándula pituitaria.

La Figura 1.11, muestra que los animales pitD2RKO carecen de señal positiva para el RD2 en el lóbulo anterior de la hipófisis y no presentan alterada la expresión del receptor en el lóbulo intermedio, mientras que sus hermanos *Drd2flox/flox* muestran una clara señal en las estructuras esperadas: lóbulo intermedio y anterior. En ambos genotipos la expresión del RD2 en el cerebro no presentó ninguna alteración (dato no mostrado). Este resultado confirmó la restricción de la mutación del RD2 a la adenohipófisis.



Figura 1.11. Hibridación in situ con una sonda específica para el RD2 en ratones pitD2RKO. Una sonda específica del exón 2 del RD2 fue utilizada sobre cortes de 16 µm de pituitarias de animales pitD2RKO. Se observó ausencia de expresión del RD2 en las adenohipófisis (AN) de los pitD2RKO y expresión en el lóbulo intermedio (LI) (Paneles **A, B y C**, fotos tomadas con objetivos 5x, 40x y 100x respectivamente). Mientras que en animales  $Drd2^{flox/flox}$  se observó una señal positiva en ambas estructuras (Paneles **D, E y F** fotos tomadas con objetivos 5x, 40x y 100x respectivamente). Los cuadrados de las figuras A y D indican las zonas del tejido que se visualizan con mayor poder en las figuras B y E.

# Niveles de PRL sérica basales e inducidos por haloperidol en ratones pitD2RKO adultos

Para comprobar que la ausencia de señal específica para el RD2 en la hipófisis, determinada en los experimentos de hibridación *in situ*, se correlaciona con una efectiva ausencia de función del receptor hipofisario, se determinó el nivel sérico de PRL en machos y hembras adultas de las líneas 3 y 8 de pitD2RKO, y en hembras adultas de la línea 6, 30 minutos después de una inyección con solución salina o de una inyección de 3mg/kg de haloperidol.

Luego de la inyección de la droga antagonista del RD2, tanto hembras como machos  $Drd 2^{flox/flox}$ , mostraron un significativo aumento de los niveles de PRL sérica (Figura 1.12), mientras que esto no ocurrió en los animales pitD2RKO de las líneas 3 y 6 (Figura 1.12 A, B y C). Estos resultados indicaron que el RD2 hipofisario en los ratones pitD2RKO de las líneas 3 y 6 no era funcional. Los ratones pitD2RKO de la línea 8, en cambio, mostraron un comportamiento similar a los controles  $Drd 2^{flox/flox}$ , en concordancia con los bajos nieveles de expresión de Cre hipofisaria en esta línea. Ratones hembras y machos de la línea 8 mostraron valores normales de PRL sérica a uno y tres meses de edad. En consecuencia la línea 8 fue descartada (Figura 1.13).





Figura 1.12: Niveles de PRL basales e inducidos por halopendol en hembras y machos adultos de ratones pitD2RKO. Los niveles de prolactina fueron dosados por RIA de sueros obtenidos luego de una invección de salina (barras celestes) o de una dosis de 3 mg/kg de haloperidol (barras rojas). Con el objeto de discriminar el efecto de la droga sobre los distintos genotipos, se realizaron ANOVA de medidas repetidas (AMR) y contrastes post hoc de Fisher. Se puede observar que tanto en hembras (A) (n=10, Interacción tratamiento x genotipo p=0,035: salina vs haloperidol en Drd2flox/flox \*p=0,018) como en machos (B) de la línea 3 (n=11 Interacción tratamiento x genotipo p=0,048: salina vs haloperidol en  $Drd2^{flox/flox}$ \*p=0,017) los niveles de PRL aumentan significativamente luego de la administración de la droga y no en los ratones pitD2RKO hembras (salina vs haloperidol p=0,89) y machos (salina vs haloperidol p=0,41). (C) El mismo resultado se aprecia en hembras adultas de la línea 6, aumento de PRL luego de la inyección de la droga en hembras  $Drd2^{flox/flox}$  y no asi en las pitD2RKO (n=4, interacción genotipo x tratamiento p=0,03: salina vs haloperidol en  $Drd2^{flox/flox}$ \*p=0,038, y en pitD2RKO p=0,99) (D y E) Animales pitD2RKO de la línea 8, hembras (n=6, interacción tratamiento x genotipo NS. salina vs haloperidol \*p<0,004 para ambos genotipos) y machos (n=4, interacción tratamiento x genotipo NS. salina vs haloperidol \*p<0,005 para ambos genotipos) mostraron una respuesta similar a la de sus controles  $Drd2^{flox/flox}$ , motivo por el cual esta línea fue eliminada. En todos los casos las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.



Figura 1.13: Niveles de PRL basales en hembras y machos de la línea 8 pitD2RKO. Los niveles de prolactina fueron dosados por radioinmunoensayo en sueros de distintas edades de animales  $Drd2^{flox/flox}$  (barras azules) y de pitD2RKO (barras amarillas). No se observaron diferencias entre genotipos para esta línea (AMR, Fisher: interacción genotipo x edad NS. Efectos genotipo y edad p>0.5. Hembras: n=7 y machos: n=4) Las barras indican el promedio y las barras de error E. S.M.

#### Catatonia inducida por haloperidol

Para demostrar que la carencia de RD2 funcional es exclusiva de la hipófisis en animales pitD2RKO de las lineas 3 y 6, se estudió la funcionalidad del RD2 a nivel del sistema nervioso. Para ello, se determinó la capacidad de una dosis de haloperidol (1,5 mg/kg) de inducir catatonia medida como tiempo prolongado de inmovilidad de los animales apoyados con sus manos sobre una barra horizontal (Figura 1.14). Se observó que en los animales controles como así también en los pitD2RKO, tanto de la línea 3 como de la 6, tras una inyección de haloperidol se indujo catatonia, lo que se evidenció por el aumento notable en el tiempo de inmovilización en la barra. Como control de este experimento se utilizaron ratones knoc kout totales para el RD2 ( $Drd2^{-/}$ ); en estos animales como puede verse en la figura 1.15 la droga no tuvo efecto.

Por lo tanto, los pitD2RKO de las líneas 3 y 6, no presentaban una alteración del RD2 a nivel del sistema nervioso central, estos datos

correlacionaban con las hibridaciones in situ que demostraban la presencia de los RD2 en cerebro, y ausencia solo en la hipófisis anterior.

La línea 8 ya había sido descartada por los resultados obtenidos en el experimento previo, donde se realizaron mediciones de PRL sérica luego de la administración de haloperidol.



**Figura 1.14:** Catatonia inducida por haloperidol en ratones de las líneas 3 y 6 pitD2RKO. Mediante el test de inmovilidad sobre una barra se determinó la catatonia inducida por haloperidol. Se observó que en el estado basal (barras azules, salina) los animales no presentaban un nivel de inmovilidad mayor a 50 segundos en ningún genotipo analizado, mientras que luego de una dosis de haloperidol (1,5 mg/kg) (barras rojas), se observó un aumento significativo de la inmovilidad en los ratones  $Drd2^{flox/flox}$  y pitD2RKO (AMR, Fisher: Línea 3, n=5 Interacción tratamiento x genotipo p=0,009; sal vs hal \*p=0,0009 y 0,0001 para  $Drd2^{flox/flox}$  y pitD2RKO, respectivamente; Línea 6, n=4 interacción tratamiento x genotipo p=0,0001; sal vs hal \*p=0,001 y 0,0004 para  $Drd2^{flox/flox}$  y pitD2RKO, respectivamente), mientras que esto no ocurría en los  $Drd2^{-/-}$  (n=5). Estos resultados demuestraron que los RD2 cerebrales estaban intactos en los pitD2RKO de ambas líneas. Las barras indican el promedio y las barras de error E. S.M.

#### Niveles de PRL en sangre a lo largo del crecimiento

La dopamina ejerce un tono inhibitorio sobre la liberación de prolactina a través de los RD2s presentes en los lactotropos del lóbulo anterior de la hipófisis. Con el objetivo de determinar la ausencia de estos receptores en las hipófisis de los animales pitD2RKO se medieron los niveles de PRL sérica basales en hembras y machos pitD2RKO de la línea 3 y 6 a diferentes edades (Figura 1.15).



Figura 1.15: Niveles de PRL sérica a distintos meses de edad en ratones pitD2RKO de las líneas 3 y 6. El contenido de PRL sérica se midió por RIA. Se observó un gran aumento de los niveles de PRL sérica a partir del mes y de los 5 meses de edad en las hembras pitD2RKO en las líneas 3 y 6, respectivamente. (AMR, Fisher: Hembras, línea 3 n=6 interacción genotipo x edad NS, pitD2RKO vs  $Drd2^{flox/flox}$  \*p<0,033; línea 6 n=4 Interacción genotipo x edad p=0,002, pitD2RKO vs  $Drd2^{flox/flox}$  \*p<0,003 para las edades indicadas. Machos línea 3 n=5 interacción genotipo x edad NS, pitD2RKO vs  $Drd2^{flox/flox}$  p>0,05). Las barras celestes indican los promedios de los niveles de PRL sérica de animales  $Drd2^{flox/flox}$  y las barras amarillas de los pitD2RKO. Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.

Estos datos nos indican claramente que a lo largo del desarrollo existe una falta de inhibición de la liberación de prolactina en ratones hembras pitD2RKO, lo que produce hiperprolactinemia basal crónica.

#### Ciclo estral

Debido a que las hembras pitD2RKO presentaron hiperprolactinemia se decidió evaluar si el ciclo estral de estos animales estaba alterado. Para ello se hicieron extendidos vaginales, que fueron observados en un microscopio de campo claro. Los momentos del ciclo estral estudiados fueron diestro, estro y proestro y los resultados fueron expresados como % de días en diestro y % de días en estro. Como se puede ver en la figura 1.16 las hembras pitD2RKO tienen alterado el ciclo estral, se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos en el % de días en estro y diestro.



**Figura 1.16: Ciclo estral de hembras pitD2RKO.** (Prueba de T, n=11, % diestro \*p=0,0077 entre genotipos; % estro \*p=0,0046 entre genotipos). Las barras celestes indican animales del genotipo  $Drd2^{flox/flox}$  y las barras amarillas de los pitD2RKO. Las barras indican el promedio y las líneas el error E. S.M.

#### Curvas de peso y talla

Como describimos en trabajos previos en el laboratorio, en los ratones *knoc kout* totales (*Drd2-/-*) hay un retardo de crecimiento con fallas en el sistema GHRH-GH-IGF I (26). Datos preliminares indicaban que el RD2 de la hipófisis no participaba en este defecto ya que la dopamina no era capaz de modular la secreción de GH en hipófisis aisladas *in vitro* (54). El ratón pitD2RKO, cuyo RD2 central es funcional sirve para establecer el nivel de acción del RD2 sobre el eje de crecimiento. Para ello evaluamos distintos parámetros asociados a este eje: talla nariz-ano, longitud femoral, curvas de crecimiento, niveles séricos de IGF-I y niveles de excreción de MUPs.

Como puede verse en la figura 1.17 las hembras y los machos pitD2RKO de las líneas 3 y 6 no presentaron alteraciones en la talla ni en la longitud femoral. Pero en forma interesante a partir de los 4 meses de edad se produjo un aumento significativo del peso corporal en las hembras pitD2RKO con respecto a sus pares  $Drd2^{flox/flox}$  (Figura 1.18). Este aumento de peso fue acompañado por un aumento de peso de tejido graso, las hembras pitD2RKO a los 11 meses de edad, de ambas líneas presentaron un aumento de peso del hígado, de la grasa gonadal y de la retroperitoneal (Figura 1.19). En la línea 8, en cambio las curvas de peso fueron similares en ambos genotipos (datos no mostrados).



Figura 1.17: Talla y longitud femoral de los animales de las líneas 3 y 6 pitD2RKO. No se detectaron diferencias en la talla a lo largo del desarrollo, ni en el largo del fémur a los 11 meses de edad entre genotipos, tanto en machos como en hembras. (Talla: AMR, Hembras, línea 3, n=6, p>0,99; línea 6, n=4, p>0,87. Machos línea 3 n=7, p>0,99. Fémur: Prueba de T, Hembras, línea 3, n=6, p=0,84; línea 6, n=4, p=0,92. Machos línea 3, n=4, p=0,18). Las barras celestes indican los valores promedios de los animales del genotipo  $Drd2^{flox/flox}$  y las barras amarillas de los pitD2RKO. Las barras indican el promedio y las líneas el error E.S.M.



**Figura 1.18: Curvas de pesos de ratones pitD2RKO de las líneas 3 y 6.** Se pesaron los animales entre el primer mes y 11 meses de edad. Se observó un gran aumento del peso corporal a partir del 4 mes de vida en las hembras pitD2RKO (AMR, Fisher, línea 3 hembras, n=10, interacción genotipo x edad: p=0,0001, pitD2RKO vs  $Drd2^{flox/flox}$ \*p<0,02 para las edades indicadas; línea 6, n=4 interacción genotipo x edad: p=0,0001, pitD2RKO vs  $Drd2^{flox/flox}$  \*p<0,002 para las edades indicadas; línea 6, n=4 interacción genotipo x edad: p=0,0001, pitD2RKO vs  $Drd2^{flox/flox}$  \*p<0,003 para las edades indicadas. Línea 3 machos n=11 p>0,99 para el efecto genotipo). Las barras celestes indican los pesos de animales del genotipo  $Drd2^{flox/flox}$  y las barras amarillas de los pitD2RKO. Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.



Figura 1.19: Peso de tejido adiposo de ratones pitD2RKO de las líneas 3 y 6. Se pesaron las grasas gonadales, retroperitoneales y el hígado, un tejido en donde se acumula grasa de los animales pitD2RKO de la línea 3 y 6 a los 11 meses de edad. Se observó un gran aumento de peso de estos tejidos en las hembras pitD2RKO (Prueba de T, hembras, línea 3 n=6 \*p<0,001; línea 6 n=4 \*p<0,001, machos línea 3 n=4 p>0,93). Las barras celestes indican los pesos de animales del genotipo  $Drd2^{flox/flox}$  y las barras amarillas de los pitD2RKO. Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M. En el panel inferior se muestra una foto a modo ilustrativo del mayor tamaño corporal y acumulación de grasa de los ratones hembras pitD2RKO respecto a sus pares  $Drd2^{flox/flox}$ .

#### Ingesta de alimento

Debido al gran aumento de peso corporal de las hembras pitD2RKO a partir del cuarto mes de edad se decidió estudiar si este aumento estaba relacionado a cambios en la conducta alimenticia. Para ello se realizó un experimento de ingesta de alimento, tanto en las hembras de la línea 3 como en la 6 (Figura 1.20). Como puede observarse, las hembras pitD2RKO de ambas líneas, presentaron un aumento en la ingesta diaria. En los machos, en cambio, no se observó un aumento en la ingesta de alimento en correlación con el mantenimiento del peso corporal (dato no mostrado).

Estos resultados de ingesta de alimento podrían estar rel

acionados con el nivel de PRL sérica elevada, ya que como se ha descripto previamente, altos niveles de PRL inducen hiperfagia (96;97).



Figura 1.20: Registro de ingesta de alimento en hembras de las líneas 3 y 6 pitD2RKO. Los datos representan el promedio por animal y por genotipo del consumo de alimento regular *a d libitum* durante una semana en ratones hembras, en amarillo pitD2Rko y en celeste  $Drd2^{flox/flox}$ . Se observa un aumento de ingesta de alimento en las hembras pitD2RKO de ambas líneas (Prueba t, Línea 6 n=4 \*p<0,05, Línea 3 n=9 \*p<0,045). Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.

#### Niveles de insulina en el páncreas y tolerancia a la glucosa

Dada la relación que existe entre obesidad y diabetes, se quiso evaluar si las hembras pitD2RKO desarrollaban algunas de las características de la diabetes. Para ello se midió, a los 11 meses de edad en ambas líneas, el contenido de insulina en el páncreas por RIA y se realizó el test de tolerancia a la glucosa *in vivo*. Las hembras pitD2RKO mostraron una mayor concentración de insulina pancreática que sus controles (Figura 1.21 A) y si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta a la glucosa en un ipGTT, se observó un tendencia en las hembras pitD2RKO a una disminución más lenta de los niveles de glucosa (Figura 1.21 B). Estos mismos experimentos se hicieron en machos y no se obtuvieron diferencias entre genotipos (datos no mostrados).



Figura 1.21: Contenido de insulina en páncreas de hembras pitD2RKO de 11 meses de edad y Test de tolerancia a la glucosa en hembras *in vivo*. A: Las hembras pitD2RKO presentaron mayor concentración de insulina en el páncreas (Prueba de T, n=6 \*p<0,033). B: En el test de la glucosa no hubo diferencias entre genotipos, aunque se puede ver una disminución más lenta en los valores de glucosa en los pitD2RKO respecto a la control (AMR, n=7 p>0,15).

#### Niveles de IGF-I en sangre en machos y hembras adultas

Otro parámetro analizado fue el factor de crecimiento tipo insulina-l (IGF-I) por radioinmunoensayo (RIA), cuya síntesis en el hígado es controlada por la hormona de crecimiento (GH) (Figura 1.22). El IGF-I es un efector directo de esta hormona, y se lo utilizó por lo tanto como parámetro indirecto de la medida de GH circulante, evitando así la medición de esta hormona, difícil tarea debido a su liberación pulsátil. No se observaron diferencias en los niveles de IGF-I ni en hembras ni en machos pitD2RKO de ambas líneas con respecto a sus controles  $Drd2^{flox/flox}$ , indicando que el gen del RD2 hipofisario no estaría involucrado en el control del crecimiento y por lo tanto comprobando nuestra hipótesis de la participación del RD2 central en el retardo de crecimiento, previamente observado por nosotros en los ratones  $Drd2^{-/-}$ .





**Figura 1.22:** Niveles de IGFI en sangre en machos y hembras adultos. Se muestran los resultados del RIA de IGF-I circulante en sangre. No se observan diferencias significativas entre genotipos de ninguna de las líneas, ni en machos ni en hembras. (Prueba de T, Línea 3 hembras n=4 p=0,82 y machos n=4 p=0,09; Línea 6 n=4 p=0,13). Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.

#### MUPs en orina en machos y hembras adultas

En ratones otro marcador de las acciones de GH, además de la IGF-I sérica, es el complejo denominado proteínas mayores urinarias (MUPs), que son importantes al momento de determinar deficiencias en GH en los modelos de ratones (98). Ha sido descripto que los niveles de las MUPs responden a la pulsatilidad de la GH (99) y nosotros demostramos que están disminuidos en los ratones *knoc kout* totales para RD2 (100), y también se ha visto que están involucrados en procesos de lipogénesis.

Se observó en ambos genotipos la diferencia sexual descripta para las MUPs: machos mayores niveles que en hembras. Corroborando nuestros resultados de IGF-I y de las curvas de peso y talla no se hallaron diferencias en los niveles de MUPs entre genotipos en los machos (Figura 1.23). Por otro lado, a pesar del mayor peso corporal que se observaba en hembras pitD2RKO en relación a sus pares floxeados, las MUPS estaban disminuídas, sugiriendo que dicho aumento de peso no estaba relacionado a la GH, sino al aumento de prolactina e ingesta. La disminución de MUPs podría estar relacionada a una compensación de la lipogénesis observada en el hígado.



104


**Figura 1.23:** Niveles de MUPs en orina de ratones pitD2RKO de la línea 3 y 6. En forma ilustrativa (abajo) se muestra un gel donde las bandas de MUPs están teñidas con *coomasie blue*. Las calles subrayadas representan a los animales pitD2RKO y las otras a los  $Drd2^{flox/flox}$ . La cuantificación por densitometría (arriba) de la banda mayoritaria de 20 KDa muestra que tanto en la línea 3 como en la 6, las hembras presentan niveles menores de MUPs mientras que en los machos no se observan diferencias entre genotipos (Prueba T, Línea 3 hembras n=11 \*p=0,0053; Línea 6 hembras n=4 \*p=0,0072 y Línea 3 machos n=10 p=0,36). Las barras indican la media y las barras de error indican E.S.M.

#### Generación de hiperplasia hipofisaria en hembras pitD2RKO

Las hembras pitD2RKO de las líneas 3 y 6 y sus controles fueron sacrificadas a los once meses de edad. Se observó un agrandamiento de la hipófisis, que casi duplicó su peso en las hembras pitD2RKO con respecto a las  $Drd2^{flox/flox}$ . Mientras que en los machos no se observaron diferencias entre genotipos (Figura 1.24). Esto se correlacionó con una hiperplasia de lactotropos como se observa en la figura 1.25. Y también con el aumento del contenido de PRL intrahipofisario medido por RIA en los homogenatos hipofisarios (Figura 1.26).



**Figura 1.24:** Peso de las glándulas hipofisarias de pitD2RKO de las líneas 3 y 6. Las hembras de 11 meses de edad pitD2RKO de la línea 6 y 3 presentaron un aumento de tamaño de la hipófisis respecto a los controles. Este resultado no se observó en los machos (Prueba T, Línea 3 hembras n=6 \*p=0,038; Línea 6 hembras n=4 \*p=0,023 y Línea 3 machos n=4 p=0,78). Las barras indican la media y las barras de error indican E.S.M. En el panel inferior se observan dos hipófisis representativas de ambos genotipos.



Figura 1.25: Immunofluorescencia para PRLen hipófisis de hembras pitD2RKO de 11 meses de edad. Se muestran cortes de hipófisis en parafina de 4 µm, inmunoteñidos para PRL con FITC, de animales  $Drd2 f^{lox/flox}$  (panel izquierdo A: foto tomada con ocular 20x y C: 60x) y de pitD2RKO de las líneas 3 y 6 (panel derecho **B** foto tomada con ocular 20x y **D** 60x). Se puede observar en el gráfico de la cuantificación (% de área marcada en relación al área total) una mayor marca de PRL en las hipófisis de los animales pitD2RKO respecto de sus controles (Prueba de T n=6 \*p<0,05).



Figura 1.26: Contenido de PRL intrahipofisario de animales pitD2RKO de 11 meses de edad. El contenido de PRL sérica se medió por radioinmunoensayo. Se observó un gran aumento de los niveles de PRL en las hipófisis de las hembras pitD2RKO, no así en los machos (Prueba T, Hembras, línea 3 n=6 \*p<0,05; línea 6 n=4 \*p<0,05. Machos línea 3 n=4 p=0,76). Las barras celestes indican los pesos de animales del genotipo  $Drd2^{flox/flox}$  y las barras amarillas de los pitD2RKO. Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.

# Proliferación celular y angiogénesis en adenomas hipofisarios en hembras pitD2RKO

#### **PCNA**

En las hipófisis de las hembras pitD2RKO el porcentaje de núcleos positivos para PCNA fue 1,94 %  $\pm$  0,71, mientras que en las de los animales controles fue de 0,90 %  $\pm$  0,10. Este resultado es una evidencia de una hiperplasia hipofisaria en las hembras pitD2RKO, junto con un aumento del contenido intrahipofisario de PRL como se describió anteriormente (Figura 1.27).



Figura 1.27: Índice de proliferación celular en hipófisis de hembras pitD2RKO de 11 meses de edad. Se muestran cortes de hipófisis en parafina de 4 µm, inmunoteñidos para PCNA con DAB, de animales Drd2 flox/flox y pitD2RKO. Se puede observar en el gráfico de la cuantificación (% de núcleos positivos para PCNA en relación los núcleos totales) un mayor índice de proliferación en las hipófisis de los animales pitD2RKO respecto de sus controles (Prueba de T hembras n=6 \*p<0,05). Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M. En el panel inferior se muestran imágenes representativas de las inmunohistoquímicas cuantificadas, A: PCNA con DAB en Drd2 flox/flox, **B** PCNA en hembras pitD2RKO. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina y las fotos fueron tomadas con objetivo 100x.

#### **CD31**

Continuando con el estudio de las hipófisis de las hembras pitD2RKO, se analizó la vasculatura mediante inmunohistoquímica con el marcador endotelial CD31. No se observaron diferencias en la DMV (n de vasos/mm2), evaluada por la determinación de vasos CD31 positivos, entre genotipos. Sin embargo, el área vascular (determinada como área ocupada por vasos en relación al área total) estaba aumentada en las hipófisis pitD2RKO respecto a las controles (Figura 1.28).



Figura 1.28: Área y densidad vascular en hipófisis de hembras pitD2RKO de 11 meses de edad. A partir de inmunohistoquímica para CD31 se estudiaron los siguientes parámetros, en hembras pitD2RKO n=6. A: Área vascular (% área de vasos/área total), se observa una mayor área vascular en las hipófisis pitD2RKO (Prueba de T, \*p<0,50), y B Densidad vascular (número de vasos/mm<sup>2</sup>), (Prueba de T, p>0,36). Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M. Las figuras C y D muestran cortes de hipófisis en parafina de 4 µm, inmunoteñidos para CD31 con DAB, de animales hembras de 11 meses de edad, Drd2 for/flox y pitD2RKO respectivamente. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina y las fotos fueron tomadas con objetivo 100x.

### Capítulo 1: Discusión

En trabajos previos en nuestro laboratorio, demostramos que en los ratones *Drd2-/-* la ausencia de control dopaminérgico produce un fenotipo de hiperprolactinemia crónica e hiperplasia de lactotropos lo que promueve la formación de prolactinomas particularmente en las hembras provocando infertilidad (51). También demostramos que el RD2 no solamente actúa sobre la regulación de la prolactina, sino que participa activamente en la secreción de GH (26) (54) y en la expresión del ARNm de GHRH (100). Por otro lado, también describimos el RD2 modula la expresión de varios componentes relacionados a la ingesta y el metabolismo (55).

En los ratones  $Drd2^{-/-}$  la manifestación de efectos compensatorios y de fenotipos solapados, han generado la necesidad de contar con una nueva herramienta genética que permita estudiar los fenotipos asociados a la falta del RD2 con dominios espaciales más restringidos. Dado que en los  $Drd2^{-/-}$  no se han podido separar los fenotipos de alteraciones en el crecimiento con los de la hiperprolactinemia, en la presente tesis generamos cinco líneas de ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de prolactina de ratón (PrI-Cre), con el objetivo de obtener un kno c ko ut con deleción del RD2 en la hipófisis.

Una vez generados los ratones transgénicos PrI-Cre (5 líneas), el primer desafío consistió en validar si la recombinasa Cre se expresaba en la hipófisis. Los resultados obtenidos a través de PCR en tiempo real revelaron que las 5 líneas de ratones PrI-Cre expresaban ARNm de Cre en la hipófisis y con distinto nivel de expresión entre ellas, algunas líneas tenían muy baja expresión o expresión ectópica por lo que fueron descartadas. Mediante inmunohistoquímicas en campo claro y en microscopía electrónica se observó expresión de Cre en lactotropos, ya que colocalizó con PRL. Posteriormente, se evaluó la actividad funcional de la enzima Cre. Para ello se cruzaron los ratones Prl-Cre con ratones transgénicos que sirven como reporteros de la actividad de Cre, los ratones comúnmente conocidos como los ROSA-EGFP. Se comprobó que la recombinasa Cre era activa, evidenciándose por la presencia de EGFP en la hipófisis y su colocalización celular con la hormona prolactina. Estos resultados en su conjunto indicaron que la recombinasa Cre y provocar la escisión del fragmento floxeado.

El análisis de la expresión del ARNm de Cre en las distintas líneas, nos permitió seleccionar tres líneas de ratones transgénicos Prl-Cre: la 3, la 6 y la 8, con alta, intermedia y baja expresión del mensajero respectivamente. Los ratones de estas tres líneas fueron cruzados con ratones mutantes condicionados del gen del receptor de dopamina D2  $(Drd2^{flox/flox})$ . Los ratones  $Drd2^{flox/flox}$ .Tg Prl-Cre fueron denominados pitD2RKO.

Se caracterizaron los animales pitD2RKO a nivel neuroquímico y funcional. En primer lugar, mediante hibridación *in situ* para el ARNm del RD2 se comprobó la ausencia del mismo en el lóbulo anterior de la hipófisis, mientras que su expresión en el lóbulo intermedio y en las distintas áreas del cerebro no se vio alterada en los animales pitD2RKO. Por otro lado, se confirmó la restricción de la mutación del RD2 a la hipófisis sin alterar la expresión del gen y su función en el sistema nervioso central, por medio de pruebas funcionales liberación de prolactina en respuesta a haloperidol y de catatonia inducida por haloperidol, respectivamente, tanto en hembras como en machos. Estos resultados se observaron en ratones pitD2RKO de las líneas 3 y 6, no así en los de la línea 8, por esto está última línea fue descartada.

Una vez demostrada la ausencia de RD2 a nivel hipofisario y que su expresión a nivel del sistema nervioso central no se encontraba alterada en la línea de ratones pitD2RKO, se prosiguió con la caracterización del fenotipo. Se determinó el nivel de PRL sérica basal en hembras y en machos a lo largo del crecimiento. Las hembras pitD2RKO, como era de esperarse por la falta de control dopaminérgico, presentaron una hiperprolactinemia desde el primer mes de vida hasta los 11 meses de edad, mientras que en los machos no se observó un aumento de PRL sérica en los pitD2RKO respecto a los controles. El control dopaminérgico en machos es menos marcado que en hembras y la proporción de lactotropos también es menor en machos. En efecto, se ha descripto que el antagonismo de los RD2s produce una liberación mucho menor en machos que en hembras (100;101). El dimorfismo sexual que existe en el control dopaminérgico de la secreción de PRL indica la importancia de roles independientes de la hormonas esteroides sexuales en la síntesis de PRL. La estimulación de la transcripción y el almacenamiento de PRL inducida por los estrógenos asegura, en las hembras, una reserva de PRL para responder a las demandas fisiológicas durante la preñez y la lactancia. Por otro lado, en las hembras, esta reserva está sujeta a un control más fuerte por parte del RD2 en comparación con machos, en los que el papel de la prolactina no es tan importante. Nuestros resultados también sugieren que en machos la inhibición de la prolactina por RD2 es complementada quizás por otros factores autocrinos o paracrinas.

A raíz del resultado de una elevada PRL sérica en hembras pitD2RKO, se decidió analizar el ciclo estral, ya que la PRL participa en la regulación del ciclo reproductor. En el modelo  $Drd2^{-,-}$ , los machos presentan una espermatogénesis normal, mientras que las hembras tiene ciclos estrales alterados, y menor nivel de estrógenos séricos. Ratones hembras knoc kout para el gen de PRL y para su receptor son estériles, con alteraciones del ciclo estral. Las hembras knoc kout para el receptor de PRL presentan menor número de folículos y de óvulos, menor cantidad de óvulos fertilizados y aquellos que son fertilizados tienen un desarrollo lento y la mayoría no llega a blastocisto (102). También se demostró que la PRL es necesaria para la implantación del blastocito y el desarrollo embrionario. Por otro lado, sólo el 50% de los machos knockout para el receptor de PRL son fértiles, el resto es completa o parcialmente infértil (103) (104). En roedores, la PRL tiene acción luteotrópica, promueve la producción de progesterona y el mantenimiento de la gestación. Además, la hiperprolactinemia en humanos, está asociada normalmente con amenorrea, ausencia de ovulación, disminución de la libido y disfunciones orgásmicas. El mecanismo más probable por el cual altos niveles de PRL sérica inducen alteraciones en el ciclo reproductor es vía la inhibición de la producción y/o pulsatilidad de GnRH (hormona liberadora de gondotrofina) a través, en parte, de la activación del RD2 por la PRL. Sin embargo, también se propuso que su acción podría estar relacionada a la pérdida de un control de retroalimentación positiva de los estrógenos sobre la secreción de gonadotropinas, o a la interferencia de la PRL en el desarrollo folicular y la producción de progesterona. En los hombres, altos niveles de PRL producen hipogonadismo, reducción de la secreción de GnRH y de testosterona y causa disfunciones de erección (68).

En concordancia, el ciclo estral en las hembras pitD2RKO estaba alterado, con un aumento del porcentaje de días en diestro y una disminución de días en estro, respecto a las hembras controles. Esto indicaría que la retroalimentación de la prolactina sobre el tono dopaminérgico hipotalámico (que impacta sobre la GnRH) es funcional, agregando una evidencia más sobre la integridad del RD2 central. Se hicieron curvas de peso y talla a lo largo del crecimiento. Corroborando nuestra hipótesis, que el RD2 hipofisario no sería el responsable de las alteraciones de crecimiento observadas en los ratones  $Drd2^{-/-}$ , no se hallaron diferencias en la talla ni en la longitud femoral entre ratones pitD2RKO y los  $Drd2^{flox/flox}$ , indicando que los RD2 centrales son los responsables del retardo en el crecimiento observado en los  $Drd2^{-/-}$ .

Las hembras pitD2RKO a los 4 meses de edad presentaron un aumento de peso corporal significativo respecto a las controles, y esta diferencia se incrementó aún más con la edad. El aumento de peso se relacionó a un incremento en la ingesta de alimento. La relación entre PRL y la regulación del peso corporal en ratones está en continuo debate y discusión. En ratas está descripto que la hiperprolactinemia crónica está asociada con un aumento de la ingesta de alimento y de peso corporal, y que este efecto se puede revertir con la administración de un agonista dopaminérgico como la bromocriptina (74) (76). Inyecciones de PRL en el núcleo paraventricular de rata aumentan la ingesta de alimento, indicando que la PRL interactúa con centros hipotalámicos que regulan el apetito (77). Sin embargo, experimentos similares en ratones, dieron resultados controvertidos. Nuestros resultados en ratones indican un aumento de la ingesta frente a una hiperprolactinemia sostenida. El incremento de la ingesta fue mayor que el observado en los ratones  $Drd2^{-/-}$ . Esto pone de relevancia el papel fundamental del RD2 central en los mecanismos que regulan la ingesta. Como describimos en trabajos previos, en los Drd2<sup>-,-</sup> la a-MSH estaba aumentada, y disminuido el precursor de orexinas, dos eventos anorexígenos (55) que dependerían de la falta de RD2 central. En el presente modelo, la presencia del RD2 central impactaría sobre a-MSH y orexinas de forma de aumentar la ingesta en forma adicional al efecto de la PRL. Por lo tanto, es de nuestro interés, como continuación de esta

tesis doctoral, medir los péptidos hipotalámicos vinculados a la ingesta de alimento en las hembras pitD2RKO. Hemos desarrollado un modelo en donde se podrán estudiar en profundidad las funciones metabólicas de la PRL, sin encontrarse afectados los RD2 hipotalámicos ni el eje de crecimiento.

Por lo tanto, este nuevo modelo experimental, nos permite separar las funciones de la DA centrales de las hipofisarias, que en el ratón *Drd2*-/- parecían compensadas o solapadas. En este contexto, pudimos corroborar la participación de la DA a través del RD2 central y no hipofisario, en el crecimiento corporal normal y en la secreción de GH (26).

La acción de la DA sobre la secreción de GH ha sido desde hace tiempo motivo de controversia. Existe una base anatómica que permite relacionar el sistema de GHRH con el sistema dopaminérgico. Estudios de colocalización demuestran que neuronas que sintetizan GHRH en la zona ventrolateral del núcleo arcuato del hipotálamo sintetizan tirosina hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de DA. Esto fue observado en hipotálamos provenientes de rata y de ratón (105-107). En ratas, se ha descripto además que el precursor de DA, levodopa, y agonistas dopaminérgicos estimulan la secreción de GH, efecto que es antagonizado por haloperidol (108). Sin embargo, esta respuesta parece involucrar un componente alfa-adrenérgico (16).

En humanos, los agonistas dopaminérgicos producen una liberación de GH, mientras que si se inyectan en pacientes acromegálicos, cuyos niveles basales de GH son elevados, el efecto que se observa es del tipo inhibitorio (109). En niños con bajos niveles de GH el efecto de DA es estimulatorio, mientras que si poseen altos niveles basales de GH el efecto que se observa es opuesto. Es decir que la acción de la DA dependería de los niveles basales de GH. Esto podría explicarse por la capacidad de la DA de estimular la secreción tanto de STT como de GHRH (110) y por la distinta sensibilidad al estímulo con DA de las neuronas de GHRH y STT dependiendo del tono dopaminérgico endógeno. Es decir, todos estos resultados indicarían una acción dopaminérgica sobre el eje de crecimiento preponderantemente central.

En cultivos primarios de hipófisis humanas y de monos, la DA inhibe la secreción de GH. Esto ocurre tanto sobre células normales como células de adenomas secretores de GH, y en ambos casos la acción parece estar mediada por distintos tipos de receptores de DA (108) (16). En células adenohipofisarias de rata, en cambio, los resultados no son tan claros. Cultivos celulares incubados durante períodos prolongados con agonistas dopaminérgicos muestran una inhibición de la liberación de GH. Pero cuando las células de la hipófisis anterior son perfundidas y tratadas con DA, se produce una estimulación de la secreción de GH (111). Otros trabajos, sin embargo, apoyan un efecto inhibitorio de la DA sobre la secreción de GH también en células perfundidas (110). Finalmente, se ha descripto que la DA estimula la liberación de GH en células hipofisarias de rata en cultivo primario, efecto que parece estar mediado por receptores de dopamina tipo 1 (53).

Por último, el control dopaminérgico de GH en ratones ha sido escasamente documentado. Nuestros resultados previos en ratones *Drd2-/-* asignaban a este receptor una acción final estimuladora sobre el eje de GHRH-GH (26), al menos durante la primer etapa de la vida.

Pero los resultados obtenidos con ese modelo están influenciados por el entorno que genera la falta del RD2 en todos los tejidos. A partir del presente trabajo con el desarrollo del modelo pitD2RKO se puede postular que la alteración del eje de GHRH-GH en los  $Drd2^{-/-}$ , con niveles séricos de GH muy bajos al nacimiento, que correlacionan con bajo IGF-I sérico, menor peso corporal y menor talla, es consecuencia de la ausencia del RD2 a nivel hipotalámico y que el RD2 hipofisario no está involucrado en este eje.

Por otro lado, en roedores existen proteínas indicadores de la pulsatilidad de GH, como el complejo de proteínas denominadas proteínas mayores urinarias (MUPs), que son importantes al momento de determinar deficiencias en GH en modelos experimentales (98). En los *Drd2<sup>-/-</sup>* habíamos demostrado un descenso en las MUPs, consistente con la disminución del eje GH-GHRH y el retardo de crecimiento. En forma sorprendente, en las hembras pitD2RKO las MUPs estaban disminuidas a pesar del incremento del peso de los ratones y de no presentar alteraciones en la talla ni en la longitud femoral. Esto indicaría que, en este caso las MUPs no eran reguladas por GH.

Las proteínas mayores urinarias son un grupo heterogéneo de proteínas producidas en el hígado que son inmediatamente excretadas a la orina con un peso aproximado de 20kDa. Pertenecen a la familia de proteínas lipocalinas; éstas tienen una estructura terciaria compuesta por un bolsillo hidrofóbico en donde se une el ligando. Esta estructura les confiere a las lipocalinas la habilidad de transportar y unir una variedad de sustancias lipofílicas, incluyendo ácidos grasos, colesteroles, prostanglandinas y feromonas (99). Se ha demostrado que las MUPs se unen las feromonas volátiles, actuando como proteínas a transportadoras de las mismas. En los roedores juegan un importante papel en el reconocimiento individual, la marca territorial y el comportamiento social (112). Son las proteínas más abundantes de la orina y los machos secretan niveles de estas proteínas hasta tres veces más altos que las hembras (99).

118

Recientemente se ha demostrado que estas proteínas también están involucradas en las respuestas metabólicas. Por el momento, algunos autores proponen una relación entre las MUPs y el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Zhou y col. observaron que ratones que sobreexpresan MUPs en el hígado, presentan una reducción de la glucemia y de la intolerancia a la glucosa en modelos de diabetes y por otro lado, en cultivo de hepatocitos de ratón se determinó que las MUPs inhiben los programas de gluconeogénesis. Se postula que las MUPs regularían el metabolismo glucídico aumentando la sensibilidad a insulina (36). Si bien estas proteínas son sintetizadas en el hígado, existen evidencias de que el músculo esquelético es el tejido metabólico blanco donde podrían actuar provocando un aumento de gasto de energía y un incremento en la señalización de la insulina (37).

Los niveles de glucosa circulante son controlados por un sistema regulatorio complejo para abastecer constantemente al metabolismo celular, siendo el páncreas a través de la secreción de insulina un componente esencial de este sistema. El hígado también participa en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Durante la etapa de absorción, la glucosa ingerida es captada por los hepatocitos y convertida en glucógeno y lípidos. En la fase post absorción, los hepatocitos producen glucosa, que es secretada a la circulación. Por lo tanto, la insulina regula la producción de la glucosa hepática, principalmente mediante la regulación de programas gluconeogénicos hepáticos. La insulina disminuye la producción de glucosa hepática mediante la inhibición de genes claves de la gluconeogénesis. Por otro lado, el hígado secreta una variedad de proteínas, incluyendo IGF-I, factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) y las MUPs. En modelos animales de obesidad genética o inducida con la dieta, se vio que los niveles de ARNm y de proteína de las MUPs en el hígado están marcadamente disminuídos (36) (37).

En forma similar, en nuestro modelo determinamos que las hembras obesas pitD2RKO presentaron un menor nivel de MUPs, por lo que pensamos que esto podría ser un efecto compensatorio del hígado por el gran aumento de contenido graso, o una falla hepática por el aumento de lípidos.

El significado fisiológico de la PRL en las funciones pancreáticas está dado principalmente por el aumento de la secreción de insulina y de la masa de los islotes durante el embarazo, tanto en roedores como en humanos. La PRL aumenta la proliferación de las células beta, la transcripción del gen de insulina y la secreción de insulina dependiente de glucosa en los islotes pancreáticos (113). En modelos animales de hiperprolactinemia crónica, se observaron mayores niveles de glucosa y de insulina. En humanos, tanto hombres como mujeres con hiperprolactinemia crónica, presentan hiperinsulinemia y respuestas exageradas en la secreción de insulina frente a un estímulo de glucosa. Asimismo, una deficiencia en los receptores de PRL, produce hipoplasia de células beta y de los islotes, reducción de la insulina pancreática y alteraciones en la secreción de insulina como respuesta a la glucosa (88). Consistente con estos resultados decriptos, en nuestro modelo pitD2RKO se observó un aumento de los niveles de insulina pancreáticos y una respuesta frente a un estímulo de glucosa levemente alterada, efectos que podrían ser consecuencia de una hiperprolactinemia.

Por último las hembras pitD2RKO constituyen un nuevo modelo de prolactinomas experimentales resistentes a dopaminérgicos. Las hembras pitD2RKO a los 11 meses de edad presentaron una hiperplasia hipofisaria con un mayor índice de proliferación celular (medido con PCNA) y un aumento en el porcentaje del área vascular (vasos marcados con CD31) respecto a las hipófisis de animales controles.

La importancia del estudio de los tumores endócrinos radica en la necesidad de hallar marcadores moleculares y características que predigan el comportamiento que tendrán dichos tumores y que expliquen por qué algunos se vuelven agresivos e invasivos mientras que otros permanecen adormecidos por años hasta encontrarlos en forma casual en las autopsias o en estudios de áreas cerebrales por otros motivos ajenos a la función de la hipófisis. Los adenomas hipofisarios son en su mayoría benignos, de crecimiento lento con una frecuencia de metástasis extremadamente baja (114). Por lo tanto esta característica de escasa agresividad es un fenómeno que por sí mismo merece ser estudiado, para ver qué marcadores los diferencian de otros tumores más agresivos y/o malignos. La mayoría de los prolactinomas son benignos y responden a una terapia con agonistas dopaminérgicos, pero existen situaciones en las que se observa resistencia a la terapia, o intolerancia a las drogas, y en consecuencia se generan tumores de gran tamaño que requieren cirugía, radioterapia o ambas (115). Si bien no se han identificado mutaciones en el RD2 en adenomas hipofisarios humanos de lactotropos (116), en prolactinomas resistentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos hay una disfunción en los RD2 (42;117;118).

Los esfuerzos para dilucidar la patogénesis de los prolactinomas permitirán en un futuro desarrollar terapias moleculares alternativas o complementarias para estos casos de resistencia y agresividad. Y este nuevo modelo experimental presentado en esta tesis doctoral con alteración del RD2 a nivel hipofisario nos provee de una herramienta única no solo en el estudio de prolactinomas, sino en particular de aquellos resistentes a agonistas dopaminérgicos que son los más agresivos.

En resumen, hemos disecado fenotipos centrales de periféricos para el RD2, que en el mutante nulo total  $Drd2^{-/-}$  aparecían solapados y

de interpretación confusa, mediante el desarrollo de una nueva herramienta biológica, ratones mutantes condicionales para el RD2 (pitD2RKO). Asimismo, esta nueva línea de ratones constituye un nuevo modelo para la investigación de las funciones metabólicas de la PRL y de la patología de la hiperplasia hipofisaria.

En la segunda parte de esta tesis ampliamos lo estudiado en el modelo experimental a adenomas hipofisarios humanos.

## Capítulo 2

## Adenomas hipofisarios humanos

## Objetivos del Capítulo 2

Los objetivos del Capítulo 2 son:

- Analizar la expresión de factores angiogénicos y de proliferación en distintos tipos de adenomas hipofisarios humanos.
- 2) Determinar la presencia o ausencia de nestina en los adenomas hipofisarios humanos.
- 3) Realizar correlaciones entre los distintos parámetros estudiados.

## Capítulo 2: Introducción

#### 1. Tumores hipofisarios

La tumorigénesis es un proceso complejo durante el cual el equilibrio celular se pierde por un aumento en la proliferación y/o defectos en los caminos que regulan la apoptosis y la división celular. Los eventos tempranos en la tumorigénesis suelen originarse como resultado de una transformación celular que ocurre en una única célula, la cual escapa de los mecanismos de control de la célula normal.

La mayoría de los tumores hipofisarios crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos porque no son metastásicos y permanecen dentro de la silla turca aunque también pueden crecer en forma expansiva hacia los tejidos vecinos.

#### 1.1 Clasificación

Los tumores de hipófisis pueden clasificarse teniendo en cuenta su capacidad funcional (actividad hormonal) y también mediante una clasificación anatómica o radiográfica según el tamaño del tumor y su grado de invasión local.

<u>**Clasificación funcional</u></u>: Se clasifican según la hormona que producen, como funcionantes si sobreproducen alguna hormona de la hipófisis anterior, o no funcionantes, si no existe síndrome clínico (endócrino) aparente (Figura 2.1).</u>** 

Dentro de los distintos tipos de adenomas hipofisarios se encuentran:

#### Prolactinomas (PRLoma)

Son los tumores hipofisarios más frecuentes. Una gran mayoría de estos tumores puede reducirse por el tratamiento con bromocriptina o cabergolina, son drogas que actúan directamente sobre el receptor de dopamina tanto del lactotropo normal como tumoral determinando la inhibición de la síntesis y secreción de prolactina y del crecimiento de los lactotropos con la consiguiente reducción del tamaño tumoral. Sin embargo, algunos pacientes poseen resistencia al tratamiento dopaminérgico, esto puede deberse a un número reducido de receptores de dopamina o a fallas en la transducción de la señal de los RD2 (42) (43). Si esto ocurre, entonces se recurre al tratamiento quirúrgico. La cirugía hipofisaria transeptoesfenoidal ha tenido un gran desarrollo con la introducción del microscopio quirúrgico (119), lo que posibilitó la extirpación selectiva de los adenomas hipofisarios con conservación de la hipófisis normal y con baja incidencia de complicaciones. Esta modalidad quirúrgica permite la normalización endócrina con frecuente preservación y hasta mejoría del resto de los ejes hipofisarios luego de la descompresión tumoral y la reducción o eliminación del efecto de masa en los macroprolactinomas expansivos resolviendo la sintomatología neurológica y oftalmológica. Es de suma utilidad en los casos de intolerancia persistente o de resistencia a los agonistas dopaminérgicos, y crecimiento tumoral o pérdida visual durante el tratamiento médico. La vía transcraneana es solamente utilizada para tumores de localización extraselar y con expansión fuera de la línea media.

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más asociados a MEN-1 (Neoplasia endócrina múltiple-1). El gen MEN-1 fue identificado en el cromosoma 11q13 y se piensa que es un gen supresor de tumor, entonces una mutación de inactivación causaría el desarrollo de un tumor. No todos los pacientes con esta enfermedad desarrollan prolactinomas, lo que sugiere que existiría alguna otra modificación en otro gen para producir el prolactinoma (120). Existen evidencias que los prolactinomas en los pacientes con MEN-1 son más agresivos que aquellos esporádicos (121).

#### Somatotropinomas (GHoma)

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

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

#### Ade nomas mixtos

Los adenomas mixtos son aquellos que poseen algunas células positivas para GH y otras positivas para PRL. La intensidad de inmunomarcación para una u otra hormona generalmente es alta y similar para ambas. El porcentaje de células que expresan cada una de las hormonas es importante; en general se considera que un clon de células positivas para una hormona pertenece al tumor cuando le corresponden entre el 15 al 20% de toda la masa tumoral. Si el porcentaje de células positivas para una hormona es menor al 5% se considera que podrían corresponder a células hipofisarias normales atrapadas por el tumor. Si el porcentaje se halla entre el 5 y el 15% es imprescindible correlacionar el hallazgo con la clínica, los niveles séricos hormonales y la localización de la toma para que se pueda definir su importancia, dado que no interesaría el porcentaje de positividad de las células si la muestra fue tomada de un área de infiltración extraselar.

## Ade nomas se c re to re s de GH y PRL (mamosomatotropinoma)

Estos adenomas se presentan clásicamente con acromegalia y discreta hiperprolactinemia, son acidófilos y poseen alto porcentaje de células positivas tanto para GH como para PRL. Es importante que el porcentaje sea alto, mayor al 50% para cada una de los hormonas, entonces asi se puede inferir que ambas hormonas se hallan en la misma célula.

#### Ade nomas no funcionantes y gonadotropinomas (IHy FSH)

Los adenomas no funcionantes son el segundo tipo más común de tumores hipofisarios (alrededor del 30 % de los adenomas) y además el subtipo más común de macroadenomas. Los pacientes se presentan en general con signos de hipopituitarismo y con alteraciones del campo visual por efecto de la masa tumoral, que a veces comprime el tallo hipofisario e impide que llegue dopamina a los lactotropos generando una hiperprolactinemia leve. Muchos de estos tumores expresan la subunidad alfa de las gonadotrofinas (122) pero no muestran evidencias de síndromes clínicos.

Otros adenomas, en cambio producen LH y FSH activas, que provocan desórdenes menstruales en las mujeres. Estos son en general

diagnosticados tardíamente por sus efectos mecánicos que causan dolores de cabeza, síntomas visuales y neurológicos.

### Adenomas secretores de la hormona adenocorticotrofa (ACTH)

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

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

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

#### Tiro tropinomas (TSHoma)

Son raros, representan el 0.5-2% de los neoplasmas de hipófisis y más del 70% de éstos son macroadenomas. Su incidencia es mayor en mujeres que en hombres. Muestran síntomas de hipertiroidismo pero con TSH alta, medida por RIA (38).

#### Adenomas de células madre

El diagnóstico de este tipo de adenoma requiere de microscopía electrónica, ya que se necesita la ratificación ultraestructural en la que es posible observar un tumor con células monomorfas y que ocasionalmente poseen características prolactínicas (exocitosis ectópica) asociadas a caracteres de células somatotropas (cuerpos fibrosos citoplásmaticos) y variable grado de transformación oncocítica de las células. Estos adenomas suelen tener un comportamiento biológico muy agresivo, son macroadenomas de corto tiempo de evolución e infiltración extensa, con discreta hiperprolactinemia. Mediante inmunohistoquímica presentan positividad débil y en bajo porcentaje de células tanto para GH como para PRL, y si a estos datos histopatológicos se le suma la evolución clínica tórpida, con recividas a corto plazo y evolución fatal en poco tiempo, existiría poca posibilidad de tratarse de otro adenoma que no fuera un adenoma acidófilo de células madres (123).

#### Carc ino mas hipo fisarios

Los carcinomas de hipófisis son extremadamente raros, por definición se consideran carcinomas de hipófisis a los tumores primitivos de las células endócrinas de la adenohipófisis que dan metástasis cráneo-espinales y/o extracraneales. Por lo tanto, lo único que diferencia al carcinoma de un adenoma invasor es la metástasis. Es importante, hacer el diagnóstico diferencial entre extensión intracraneal del tumor y la metástasis. Esta última se define como el crecimiento discontinuo o remoto del tumor. Si bien el mecanismo de diseminación no es claro, los carcinomas de hipófisis pueden mostrar diseminación cerebroespinal, además de intra y extracraneal (124).

En los últimos 100 años, se publicaron menos de 50 casos de carcinomas, y en su mayoría de pacientes femeninos. Se presentaron

con signos y síntomas locales y muchos fueron endocrinológicamente silentes.



Figura 2.1: Adenomas hipofisarios y las patologías que desanollan. (Modificada de (39)).

<u>Clasificación anatómica</u>: Dentro de esta clasificación los adenomas se categorizan según cuatro grados (Figura 2.2).

- Grado I: son microadenomas, lesiones dentro de la pituitaria que miden menos de 1 cm de diámetro. Estos adenomas no causan ninguna destrucción de la silla turca.
- 2) Grado II: adenomas mayores a 1 cm de diámetro, pueden presentar extensión supraselar sin evidencias de invasión.
- 3) Grado III: adenomas que presentan una pequeña o gran invasión local, sin erosión de la silla turca.
- Grado IV: tumores ampliamente invasivos y que involucran estructuras extraselares incluyendo hueso, hipotálamo y seno cavernoso.



Figura 2.2: Clasificación de los tumores hipofisarios (Modificada de (125)).

La invasividad de estos tumores está en discusión. Algunos sugieren que una significativa invasión local podría ser considerada un signo de potencial malignidad (126). Sin embargo, los tumores hipofisarios que invaden la duramadre son relativamente comunes y no exhiben metástasis (127). La invasividad podría correlacionar con el tipo y con el tamaño del tumor. Los más comúnmente invasivos son los tirotropinomas y los no funcionantes (126). En la actualidad, no se conoce ningún marcador que prediga un comportamiento de invasividad.

#### 2. Angiogénesis

Los órganos endócrinos son altamente vascularizados, poseen un epitelio fenestrado recubriendo los vasos sanguíneos, para una mejor transferencia de sustancias a través de la pared permeable vascular. El aporte sanguíneo es esencial para las funciones metabólicas y endócrinas de la glándula. Diferencias en concentraciones séricas de diversos factores conducen a alteraciones en la secreción de hormonas, la regulación de este sistema se produce a través de complejos mecanismos de retroalimentación, que tienen que ser rápidos y precisos, por lo tanto requiere de un aporte sanguíneo eficiente (128).

La glándula pituitaria, a diferencia de otros tejidos en donde se ha estudiado la angiogénesis, tiene doble aporte sanguíneo. El principal aporte sanguíneo está dado por los vasos portales largos, que proveen un medio de comunicación entre el hipotálamo y la adenohipófisis, llevando neurotransmisores y otros péptidos hipotalámicos estimuladores e inhibidores de la secreción y proliferación de las células de la hipófisis anterior. Por su parte, la secreción adenohipofisaria alcanza el lóbulo posterior a través de los vasos portales cortos (Figura 2.3). Los capilares del sistema porta hipofisario son fenestrados lo que favorece el intercambio de sustancias con las células endócrinas de la glándula. Pero hay además un sistema adicional arterial directo, la hipófisis recibe oxígeno y nutri





133

#### Figura 2.3: Vasculatura de la hipófisis normal. (Modificada de (125)).

La angiogénesis se define como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, juega un rol esencial en los procesos fisiológicos como ser el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual. Asimismo, es también muy importante en ciertas patologías, como la arterosclerosis, la artritis, la retinopatía diabética y la psoriasis (128).

Un área de investigación muy estudiada y de gran interés es la relación entre la angiogénesis y la biología de los tumores. Basándose en experimentos en lo que tumores implantados en órganos aislados son incapaces de desarrollarse, mientras que cuando el mismo tumor es implantado dentro de un vaso sanguíneo, no solo induce angiogénesis sino que también crece y produce metástasis, *Fo lkman* propuso que tumores sólidos dependen del proceso angiogénico para crecer y que este aumento de tamaño tumoral requiere de un aumento correspondiente en su vascularización (129).

La angiogénesis (medida como densidad microvascular en el tumor o DMV) correlaciona con el comportamiento del tumor. En muchos tumores humanos, incluyendo mama, vejiga y estómago se vio que un aumento en la angiogénesis estaba asociado al desarrollo de metástasis (130) (131), peor diagnóstico (132) (133) y reducida sobrevida (134) (135).

La angiogénesis es un proceso complejo, que involucra varias etapas, por un lado la estimulación dada por factores pro-angiogénicos y por otro la reducción de inhibidores angiogénicos. El balance entre ellos determina el fenotipo angiogénico final del tumor. Sin embargo, en los tumores hipofisarios el papel de la vascularización y la angiogénesis es un tema de amplio debate. Sc he c hte r en 1972 reportó que el parénquima de tumores hipofisarios parecía menos vascularizado que el tejido normal (136). Estudios siguientes, evaluaron la vascularización mediante inmunohistoquímica para marcadores específicos de endotelio y confirmaron que la DMV de adenomas hipofisarios era menor que la de la glándula normal (137).

Esta disminución de la densidad vascular es inusual en otros tipos de tumores, como el de mama y de próstata, que son más vascularizados que el tejido normal (130) (133). Dado que existen lesiones benignas o precancerosas que presentan una mayor vasculatura que sus tejidos normales, la razón por la cual los adenomas hipofisarios son menos vascularizados que la glándula normal no sería por su naturaleza de tumor benigno.

Sin embargo, si bien el grado de vascularización alcanzado por el tejido hipofisario tumoral es controvertido, varios estudios han demostrado que la angiogénesis en los tumores hipofisarios está relacionada con el comportamiento y la respuesta tumoral. Diferencias en angiogénesis entre distintos tipos de tumores hipofisarios fueron estudiadas en prolactinomas y se ha visto que los microprolactinomas son menos vascularizados que los macroprolactinomas (138). Por el contrario, otros autores han reportado que no hay diferencias entre la vasculatura de la hipófisis normal y la de microprolactinomas, pero que sorprendentemente los macroprolactinomas presentan una menor densidad vascular (139).

En contraste con lo anterior, no se han observado diferencias en la DMV entre adenomas de diferentes tamaños secretores de hormona de crecimiento (GH) (138).

135

Con respecto al grado de invasión se ha visto que los prolactinomas invasivos son significativamente más vascularizados que los no invasivos (140) y los macroprolactinomas y tumores secretores de ACTH con menor densidad vascular tienen mayor probabilidad de remisión por cirugía que los de alta densidad vascular (140).

Otra evidencia importante de la relación entre angiogénesis y agresividad tumoral es el hecho de que los carcinomas de hipófisis tienen una mayor vascularización que los adenomas (141) y por último los niveles de ARNm para VEGF, un potente factor angiogénico, son mayores en los adenomas que en las hipófisis normales (142).

Dos estudios morfológicos en tumores hipofisarios humanos determinaron la existencia de un aporte sanguíneo arterial directo hacia el adenoma; esto también se confirmó en modelos animales experimentales (143) (144). Estudios mediante microscopía electrónica en prolactinomas, determinaron la presencia de arterias en el 81% de los casos sin observar angiogénesis en hipófisis controles. Además, los tumores con aporte arterial eran de mayor tamaño (143). Estos estudios, corroboran que los adenomas hipofisarios reciben un aporte sanguíneo directo del sistema arterial.

En definitiva no existen afirmaciones concluyentes sobre la naturaleza portal o arterial de los nuevos capilares formados, y sobre el papel de la angiogénesis en los adenomas hipofisarios.

#### 2.1 Medidas de angiogénesis

La densidad microvascular (DMV) es una de las medidas más utilizadas para el estudio de angiogénesis en distintos tipos de tumores, determina la cantidad de vasos por área. La DMV está estrechamente relacionada con el comportamiento tumoral, su crecimiento y avance de metástasis en cáncer de pulmón, de mama y de vejiga (145;146). Otro parámetro utilizado como medida de angiogénesis es el porcentaje de área vascular. Ambas variables, han sido estudiadas en diferentes tipos de tumores cuantificando vasos marcados por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para diferentes marcadores de endotelio. Los más utilizados son los anticuerpos contra el antígeno relacionado al Factor VIII (FVIII), CD31 y CD34 (moléculas de *c luste r* (grupo) de diferenciación) y UEA1 (aglutinina-1 de *ule x e uro pa e us*). Estos marcadores difieren en la sensibilidad de detección del endotelio. CD31 y CD34 son los marcadores más específicos y sensibles, reconocen tanto vasos maduros como nuevos; FVIII marca vasos grandes pero no reconoce vasos pequeños (147) y UEA1 si bien marca vasos pequeños, también reconoce, en el aparato de Golgi de algunas células neoplásicas (148).

#### 3. Proliferación

La medida de proliferación celular en tumores se ha usado para predecir el comportamiento tumoral. Existen numerosos factores involucrados en los procesos mitogénicos, pero en la actualidad el marcador más utilizado es el Ki-67, medido por inmunohistoquímica con el anticuerpo MIB-1. Ki-67 es una proteína nuclear, de 395 kD, se expresa a lo largo de todo el ciclo celular (fases G1, S, G2 y M) y está ausente en G0, es por esto que permite distinguir células en proliferación de aquellas en reposo. La proteína Ki-67 fue definida originalmente por la detección de la misma con el anticuerpo Ki-67, que fue generado inmunizando ratones con los núcleos del *Linfoma de Hodgkin*. El nombre se deriva de la ciudad del origen, Kiel, Alemania y el número del pozo de la placa de 96 que contenía el clon original (149).

Otro antígeno utilizado como medida de proliferación es el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). En 1978 se describió un suero autoinmune aislado de pacientes con lupus 137 eritematoso sistémico, que era capaz de reconocer un antígeno nuclear presente en las células proliferantes, este antígeno fue denominado PCNA. Es una proteína de 36kDa, acídica nuclear, no histónica, que actúa como proteína auxiliar de la ADN polimerasa delta, siendo indispensable para la síntesis de ADN. La expresión de PCNA comienza en la fase G1 del ciclo celular, alcanza un máximo en la fase S y comienza a disminuir hacia la fase G2/M. Tiene una vida media de más de 20 horas y también participa en mecanismos que involucran la reparación del daño de ADN.

#### 4. Tumores y Nestina

Nestina es una proteína de filamento intermedio clase VI, de 220 KD, que compone el citoesqueleto. Durante muchos años se creyó que su expresión era específica del sistema nervioso, ya que fue identificada por primera vez en el sistema nervioso central de embriones de rata, donde se expresa abundantemente (150). Durante el desarrollo postnatal, la expresión de nestina en el cerebro se vuelve más restringida y se puede encontrar particularmente en el neuroendotelio inmaduro y en la zona subventricular en células progenitoras en proliferación (151) (152) (153). Sin embargo, nestina también se ha identificado en células progenitoras o células madre de otros tejidos, como la dermis, el páncreas, el hígado, células del endotelio vascular en desarrollo, células estelares activas del cerebro, la retina, el tejido dental y el fóliculo piloso (150).

Recientemente se demostró la probable existencia de células madre en hipófisis de ratones adultos mediante la generación de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo elementos regulatorios del gen de nestina (154). Si bien muchos autores suponen la participación de células madre en la génesis de los tumores de hipófisis, no existen al respecto, datos consistentes en la literatura.

En este contexto, analizaremos los procesos de proliferación y angiogénesis en prolactinomas y otros adenomas hipofisarios, y su relación con la existencia de células madre en los mismos. Éste es un tema explorado para otros tipos de tumores, habiéndose aislado células madre en leucemias (155), mieloma múltiple y también en tumores sólidos como el cáncer de mama (156), de pulmón (157) y distintos tumores cerebrales (158). El estudio de células madre en adenomas hipofisarios resulta interesante para comprender los mecanismos de generación de este tipo de tumores y la falta de respuesta a drogas convencionales en ciertos casos, que podrían explicarse por la existencia de células madre causantes del crecimiento de la masa tumoral (159). Por otro lado, en ciertos tumores y en el proceso de regeneración pancreática se ha relacionado la nestina con la generación de nuevos vasos, y en este contexto nuestro interés es relacionar la nestina con la angiogénesis en los tumores hipofisarios. Finalmente, el entendimiento de los mecanismos moleculares que mantienen a las células madre proporcionaría nuevas terapias contra estas células enfocadas a las vías asociadas a la regulación de la autorenovación y la diferenciación.

## Capítulo 2: Materiales y métodos

#### **Pacientes**

Las muestras analizadas pertenecen a pacientes del Hospital de Santa Lucía que fueron derivados a neurocirugía por diagnóstico de tumor hipofisario.

Se dividieron los adenomas de acuerdo a su secreción hormonal en somototropinomas, prolactinomas, mixtos, tirotropinomas, gonadotropinomas, adenomas secretores de ACTH y adenomas no funcionantes.

Luego de la cirugía transesfenoidal parte del tejido hipofisario tumoral fue enviado para su estudio anátomo-patológico (como de rutina) y parte fue fraccionado y colocado en formalina 4% para la determinación de marcadores del endotelio vascular o de proliferación celular por inmunohistoquímica.

Todos los pacientes fueron informados por el cirujano interviniente de los estudios que se iban a realizar, firmando el respectivo consentimiento. La privacidad del paciente fue siempre preservada. El Comité de Bioética del Hospital Santa Lucía y del Instituto de Biología y Medicina Experimental aprobaron el uso del Consentimiento Informado del presente trabajo.

Las muestras controles fueron compradas en Abcam, Inc., USA.

#### Inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formalina fueron procesados en forma similar a lo descripto para ratones en materiales y métodos del capítulo 1. En este caso los anticuerpos empleados para inmunohistoquímica fueron
los siguientes: anti Ki-67 (1:200; Santa Cruz Biotechnology), anti CD31 (1:250; Santa Cruz Biotechnology), anti CD34 (1:250; Santa Cruz Biotechnology) y anti nestina (1:80; Abcam). Todos hechos en conejo, por lo tanto se utilizó como anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (1:100; Vector).

La angiogénesis se cuantificó como DMV, contando número de vasos teñidos con CD31 o CD34 por mm<sup>2</sup>. También se calculó el porcentaje de área marcada, para ello se tomó como 100% al área total del tejido y el área marcada como al área ocupada por vasos. El área se determinó por análisis de imagen con el programa Image J. El recuento se hizo con fotos tomadas con ocular 40X, y se contaron 5 campos por preparado, y por lo menos 3 preparados por paciente para cada anticuerpo. Los vasos se dividieron por tamaño en dos grupos, chicos y grandes, menores y mayores a 100 µm<sup>2</sup>, respectivamente.

El área ocupada por nestina se calculó como porcentaje del área total del tejido, el recuento se hizo con fotos tomadas con ocular 100x, con el programa Image J, se contaron la cantidad de fotos necesarias para abarcar todo el corte.

El índice de proliferación celular se calculó como porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 en relación a núcleos totales. Se contaron con el programa Imaje J fotos tomadas con un ocular 100x, la cantidad de fotos necesarias para abarcar todo el corte.

### Análisis estadístico

Se determinó el coeficiente de correlación de **Spearman** para las distintas variables analizadas y el test no paramétrico **Kruskal Wallis** seguido del post test de Dunn para el estudio de la DMV, el porcentaje de área vascular y el tamaño de los vasos entre los distintos tipos de tumores hipofisarios. Para el análisis de la frecuencia de Ki-67 se utilizó el

test chi cuadrado para varios grupos. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un p<0,05.

# Capítulo 2: Resultados

Se analizaron un total de 71 muestras tumorales humanas, 35 adenomas no funcionantes, 17 adenomas secretores de PRL, 11 secretores de GH, 5 de ACTH, 2 mixtos (secretores de GH y PRL), un gonadotropinoma y 4 muestras controles (Figura 2.1).



Figura 2.1: Distribución de las muestras analizadas.

La edad promedio de nuestro grupo de pacientes fue de 45 años <u>+</u> 13,6 (rango 19 a 70 años). De las 71 muestras, 44 (62%) pertenecían a mujeres y 27 (38%) a hombres. El promedio de tiempo de evolución de los tumores fue de 3 años (rango 0,5 a 10 años).

Se evaluó el índice de proliferación celular mediante inmunohistoquímica para Ki-67, la densidad vascular y el porcentaje de área vascular con dos marcadores diferentes, CD31 y CD34, y por último se analizó la expresión de nestina como marcador de células madre.

#### Proliferación

La actividad proliferativa media con Ki-67 fue 2,7 %  $\pm$  0,6. El 71,2 % de los casos presentaron Ki-67 < 3 %, el 23,1 % presentaron un índice de proliferación entre el 3 y el 10 %, y el 5,8 % un Ki-67 mayor al 10 % (Figura 2.2).



Figura 2.2: Distribución de los casos según el porcentaje de células positivas para Ki-67. N=52. La mayoría de los adenomas presentó un frecuencia de índice de proliferación menor al 3% (chi cuadrado \*p<0,01).

No se observó correlación del índice de Ki-67 con la edad del paciente, (p=0,84) ni con el tiempo de evolución del tumor (p=0,44). Entre sexos se vio una tendencia (p=0,07) de un mayor porcentaje de Ki-143 67 en tumores de pacientes mujeres respecto a hombres que no llegó a ser estadísticamente significativa.

Al analizar el índice de proliferación promedio para cada tipo tumoral, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tipos de tumores (p=0,48; figura 2.3).



**Figura 2.3: Ki-67 en los distintos tipos de adenomas hipofisarios.** No se observaron diferencias en el índice de proliferación entre los distintos tipos de adenomas (Prueba de Kruskal Wallis, Ghoma n=9; NF n=27 y PRLoma n= 10, p>0,48). Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M.

### Marcadores de angiogénesis

#### **CD31**

No se observaron diferencias en la DMV (n de vasos/mm<sup>2</sup>), medida a través de la determinación de vasos CD31 positivos, entre los distintos tipos de adenomas (p=0,85). Sin embargo, al evaluar el área vascular (determinada como área ocupada por vasos en relación al área total) se observó una disminución de la misma en las muestras tumorales respecto a las hipófisis normales (p=0,048); esto se podría explicar por la presencia de un mayor número de vasos grandes (p=0,045, definidos como vasos con área superior a 100  $\mu$ m<sup>2</sup>) con respecto a los chicos en las hipófisis normales, contrariamente a lo que ocurrió en los adenomas (Figura 2.4 A, B y C).







**Figura 2.4:** Área y densidad vascular en los adenomas hipofisarios cuantificados con CD31. A partir de inmunohistoquímica para CD31 se estudiaron los siguientes parámetros con un n=4, 15, 5 y 2 para GHoma, NF, PRLoma y los controles respectivamente: A: Densidad vascular (número de vasos/mm<sup>2</sup>), no se observaron diferencias entre los tipos de adenomas (Prueba de Kruskal Wallis, p>0,85). **B** Área vascular (% área de

vasos/área total), los adenomas presentan un menor % de área vascular respecto a las hipófisis controles (Prueba de Kruskal Wallis, \*p<0,048). **C:** Relación del tamaño de vasos (% vasos chicos/ % vasos grandes), se ve una mayor cantidad de vasos chicos en los adenomas respecto a las muestras controles (Prueba de Kruskal Wallis, \*p<0,045). Las barras indican el promedio y las barras de error E.S.M. Las figuras del panel inferior muestran cortes de hipófisis en parafina de 4 µm, inmunoteñidos para CD31 con DAB, de **D**: Ghoma, **E** NF, **F**. PRLoma y **G**: Hipófisis normal. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina y las fotos fueron tomadas con objetivo 40x.

#### **CD34**

Debido a que numerosos autores postulan que dependiendo de la elección del marcador a utilizar podrían variar los resultados, se decidió repetir los experimentos con otro marcador de endotelio, el CD34.

Se encontró una correlación positiva entre ambos marcadores, CD31 y CD34, tanto en la determinación de la densidad vascular (p=4,10E-03) como en el porcentaje de área vascular (p=1,7E-04; Figura 2.5) y por ende, se obtuvieron los mismos resultados, es decir, no se determinaron diferencias en la densidad vascular entre los distintos tipos de adenomas (p=0,90) y se observó una disminución del área vascular en las muestras tumorales respecto a las normales (p=0,05). Esto también correlacionó con un mayor número de vasos grandes respecto a chicos en las hipófisis normales (p=0,023), contrariamente a lo observado en los adenomas (Figura 2.6).



**Figura 2.5: Comelación entre CD31 y CD34.** Se observó una correlación positiva entre ambos marcadores, teniendo en cuenta todos los tipos de adenomas hipofisarios estudiados, n=19 (Correlación de Pearson: Densidad vascular p<4,10E-03 y área vascular p< 1,7E-04)





GHoma

NF

PRLoma Normal



Figura 2.6: Área y densidad vascular en los adenomas hipofisarios cuantificados con CD34. A partir de inmunohistoquímica para CD34 se estudiaron los siguientes parámetros con un n=6, 18, 10 y 3 para GHoma, NF, PRLoma y los controles respectivamente: A: Densidad vascular (número de vasos/mm<sup>2</sup>), no se observaron diferencias entre los tipos de adenomas (Prueba de Kruskal Wallis, p>0,90). B Área vascular (% área de vasos/área total), los adenomas presentan un menor % de área vascular respecto a las hipófisis normales (Prueba de Kruskal Wallis, \*p<0,05). C: Relación del tamaño de vasos (% vasos chicos/ % vasos grandes), se observa una mayor cantidad de vasos chicos en los adenomas respecto a las muestras controles (Prueba de Kruskal Wallis, \*p<0,023). Las barras indican el promedio y las barras de error E. S.M. Las figuras del panel inferior muestran cortes de hipófisis en parafina de 4 µm, inmunoteñidos para CD34 con DAB, de **D**: Ghoma, **E** NF, **F**: PRLoma y **G**: Hipófisis normal. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina y las fotos fueron tomadas con objetivo 40x.

Por otro lado, se evaluó la relación entre el grado de vascularización y la edad del paciente. Se encontró una correlación negativa entre la densidad vascular y la edad tanto con CD34 (p=0,01) como con CD31 (p=0,03), pero no se halló correlación entre la edad y el porcentaje de área vascular (p=0,5 y 0,9 para CD34 y CD31 respectivamente; figura 2.7)



**Figura 2.7: Comelación entre CD34 y CD31 vs edad del paciente.** Se observó una correlación negativa entre CD34 y la edad del paciente (Correlación de Pearson, n=38 p<0,01), y entre CD31 y la edad del paciente (Correlación de Pearson, n=25 p<0,05). En ambos casos se evaluaron todos los tipos de adenomas hipofisarios estudiados.

## Correlación entre proliferación y angiogénesis

Los marcadores de proliferación y angiogénesis no mostraron una correlación en nuestro grupo de muestras. El análisis se hizo tanto para cada tipo de tumor como para la población estudiada en general. La densidad vascular, evaluada por CD31 y por CD34, no correlacionó con Ki-67 (p=0,37 y 0,83, respectivamente). Tampoco se encontró correlación del porcentaje de área vascular medido con CD31 ni con CD34 y el índice de proliferación celular (p=0,46 y 0,66 respectivamente).

#### Nestina

Al analizar expresión de la nestina, encontró se sorprendentemente ausencia de la misma en las hipófisis normales y expresión en un 85% de las hipófisis tumorales (Figura 2.8). La marca de nestina no se observó en las células tumorales endócrinas, sino que fue detectada en los capilares tumorales (Figura 2.9). Es de destacar que no todos los capilares fueron reactivos para nestina, algunos resultaron negativos o presentaron marca en algunas pocas células endoteliales, a diferencia de los marcadores CD31 y CD34 que marcaron prácticamente todos los vasos y células endoteliales.





expresión de nestina entre los distintos tipos de adenomas, pero si de todos los grupos respecto a las hipófisis normales (Prueba de Kruskal Wallis, \*p<0,05).



Figura 2.9: Nestina en adenomas hipofisarios humanos. Se muestran inmunohistiquímicas representativas de tejidos en parafina y marca de nestina con DAB, de **A y B** Nestina en un tumor NF, fotos tomadas con objetivo 40x. Se observa marca alrededor de los vasos. **C**: la misma muestra con más aumento, objetivo 100x. **D**: Nestina en un PRLoma, también se localiza en los vasos, foto tomada con objetivo 100x. **E** 

Nestina en un GHoma, objetivo 100x y **F**. Hipófisis normal, no se observa marca de nestina, objetivo 100x. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina.

No se encontró correlación entre el área marcada con nestina y la edad de los pacientes (p=0,21), ni con el índice de proliferación medido con Ki-67 (p=0,9). La marca de nestina correlacionó de manera negativa con el tiempo de evolución de los adenomas (p=0,03; Figura 2.10).



Figura 2.10: Comelación Nestina vs tiempo de evolución del adenoma hipofisario. Se observó una correlación negativa entre la expresión de nestina y el tiempo de evolución tumoral (Correlación de Pearson, n=10 p<0,03). Se evaluaron todos los tipos de adenomas hipofisarios muestreados.

# Capítulo 2: Discusión

En esta úlima parte de la tesis estudiamos la angiogénesis en adenomas hipofisarios humanos, tomando en consideración nuestros resultados en el modelo experimental, en el cual habíamos descripto un incremento en el área vascular. La angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes, tiene un rol muy importante en diversos procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario, la ovulación y la cicatrización de heridas. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de estos mecanismos, sobre todo en las vías de señalización y su regulación, y se ha profundizado sobre el papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral.

La mayoría de las neoplasias se caracterizan por presentar un alto nivel de DMV, considerando que la vasculatura es esencial para el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. Los adenomas hipofisarios, contrariamente, son en su mayoría benignos, de crecimiento lento con una frecuencia de metástasis extremadamente baja. Sin embargo, su característica de escasa agresividad no excluye la participación de la angiogénesis durante su desarrollo. También en otros tumores en estadíos tempranos, como las lesiones benignas o precancerosas de glándula mamaria y cérvix, se observa un incremento de la vascularización respecto a los tejidos normales, lo que demuestra que la generación de nuevos vasos no es un determinante exclusivo de malignidad (160).

En la literatura se ha descripto que los adenomas hipofisarios tienen menor DMV que la glándula normal, y se sugiere que factores inhibitorios de la angiogénesis podrían estar involucrados (160;161) (128;138).

156

Nuestros resultados indican que no hay una diferencia de la DMV entre los distintos tipos de adenomas hipofisarios, así como tampoco entre los adenomas y las muestras controles, al contrario de lo que otros autores han publicado, en donde se describe una mayor DMV en la glándula normal (141). Este resultado coincide con el obtenido en nuestro modelo experimental, pitD2RKO.

Pero, describimos una diferencia del porcentaje de área vascular, siendo ésta significativamente menor en las hipófisis tumorales respecto a las normales. Contrariamente a lo que ocurrió en los prolactinomas de las hembras pitD2RKO, en donde se observó un aumento de este porcentaje respecto al control. Varias pueden ser las explicaciones para estas diferencias. Por empezar la diferencia de especie, pero, y creemos que más relevante, en los humanos estudiamos adenomas monoclonales, mientras que en los ratones el adenoma responde a un hiperplasia generalizada de la hipófisis.

A raíz de este resultado en los adenomas humanos, decidimos analizar si había una diferencia en el tamaño de los vasos, y encontramos que los adenomas hipofisarios presentan un mayor porcentaje de vasos chicos que de grandes, mientras que en las hipófisis normales ocurre lo opuesto, esto se traduce en un tamaño promedio de vaso superior en las hipófisis normales. A diferencia de otros autores, hemos obtenido los mismos resultados utilizando dos marcadores potentes de vasos, CD31 y CD34.

Concluimos entonces, que si bien no hay una diferencia en la DMV, o sea en la cantidad de vasos por área, el área vascular es inferior en las muestras tumorales en comparación con las normales, y esto es debido a una mayor cantidad de vasos chicos en las hipófisis tumorales. Esta mayor proporción de vasos chicos, sería el indicio de un incremento de angiogénesis en relación a la glándula normal. Estos resultados serían consistentes con la hipótesis de *Tume r* que sugiere que para la formación de adenomas hipofisarios es necesario el proceso de angiogénesis, aun en esta glándula tan vascularizada (162).

Por otro lado, encontramos una correlación negativa entre la DMV y la edad del paciente, tanto con CD31 como con CD34. Esto está de acuerdo con otros trabajos en modelos animales de conejo y rata, en donde se determinó que el desarrollo de nueva vasculatura disminuye significativamente con la edad de los animales (163). *Tume r y col* demostraron también una correlación negativa entre edad y DMV, evaluada con CD31 y con UEAI en tumores secretores de GH (140), mientras que *Nive iro y col* han encontrado una correlación positiva entre edad y DMV en adenomas hipofisarios humanos (160). Finalmente, otros autores describieron una ausencia de correlación entre estos dos parámetros (164). Estos resultados en conjunto demuestran la existencia de una alta heterogeneidad de las muestras de tumores y pacientes.

Existen pocos casos en la literatura que muestren una asociación de la DMV con el sexo (164), nosotros no encontramos diferencias en la DMV entre sexos en nuestro grupo de tumores hipofisarios.

La ausencia de correlación entre el índice de proliferación medido con Ki-67 y la DMV que observamos en las muestras analizadas, está de acuerdo con datos publicados en la literatura (165). Los resultados en conjunto sugieren que la angiogénesis y la proliferación son procesos que ocurren bajo diferentes mecanismos de regulación. Esto significaría que el grado de proliferación de un adenoma no está estrictamente limitado por su irrigación, sino que dependería también de la alteración patogénica que lo originó. En otro tipo de tumores como el de mama y el cáncer colorrectal también ha sido descripta la ausencia de correlación entre estos dos parámetros (131;166). *Tume* r y colaboradores identificaron sin embargo, una relación positiva entre la DMV y la proteína antiapoptótica bcl-2, sugiriendo una relación entre angiogénesis y apoptosis. Es decir que la angiogénesis parecería relacionarse más a la prolongación de la vida del tumor que a su capacidad proliferativa.

Nuestros resultados confirman que la actividad proliferativa de la mayoría de los adenomas hipofisarios es baja, menor al 3%. En nuestro grupo de pacientes, la actividad proliferativa media fue de 2,7% similar a la observada por otros autores (167) (168) (169). Sin embargo un 5,8% de los adenomas hipofisarios pueden considerarse atípicos, con un Ki-67 mayor al 10%.

No hemos hallado una relación entre el índice de proliferación celular y la edad del paciente o el grado de vascularización. Respecto a esto, hay autores que han reportado una relación inversa entre estas dos variables sólo en adenomas secretores (170), y otros autores describen que los adenomas de pacientes menores de 50 años tienen mayor actividad proliferativa. Sin embargo, también se ha publicado una mayor actividad proliferativa en pacientes mayores a 65 años (171). Estos datos en su conjunto revelan nuevamente la heterogeneidad de los adenomas.

No observamos diferencias en el índice de proliferación entre los distintos tipos de adenomas. Si bien observamos un índice superior en PRLomas, éste no fue significativo. En particular debemos mencionar que 12 de los 13 eran macroprolactinomas, lo que podría haber influido en el resultado. Otros autores han reportado un aumento de proliferación significativo en PRLomas. Además, al igual que otros trabajos, no encontramos asociación entre una mayor proliferación en adenomas funcionantes comparada con los no funcionantes (170).

Siguiendo con la búsqueda de un marcador molecular que prediga el comportamiento tumoral evaluamos la expresión de nestina,

proteína expresada en precursores celulares indiferenciados en tejidos en formación. Krylyshina y col reportaron por primera vez expresión de nestina en hipófisis normales e investigaron su expresión en hipófisis de rata, sin demostrar colocalización de esta proteína con ninguna hormona de la pituitaria (150). Sc he ithaue r y col describen resultados similares a los obtenidos en este trabajo, ausencia de nestina en muestras no tumorales, aunque dicen detectar expresión de la misma en algunos corticotropos (172). Nosotros no observamos marca de nestina en células endócrinas, sino en el endotelio vascular y en el intersticio celular. En relación a esto, se ha demostrado expresión de nestina en áreas pericapilares, más específicamente en los pericitos. Marca de nestina en pericitos también fue descripta en el páncreas (173) y recientemente se demostró la importancia de los pericitos en la angiogénesis (174). Nuestros resultados indican que la expresión de nestina en adenomas hipofisarios humanos no es un indicador de la actividad endócrina, ni de la proliferación del tumor, ya que la inmunomarcación de nestina no correlacionó con el índice de Ki-67, y fue similar en los distintos tumores secretantes, sin embargo podemos decir que es un marcador tumoral ya que su expresión es alta en los adenomas respecto a las hipófisis normales, y que tendría relación con el desarrollo de vasos.

A diferencia de lo que ocurre con CD31 y CD34, la marca de nestina no se observó en todos los vasos. Una posible explicación de esto, podría ser que nestina se expresa únicamente en las zonas de angiogénesis y no en el endotelio quiesciente. Apoyando esta teoría, *Sugawara* y col sugieren que nestina se expresa en células endoteliales tumorales durante el crecimiento del tumor, es decir, durante la angiogénesis (175). Asimismo, *Sc he ithaue r* y col proponen a nestina como marcador de la neovascularización en adenomas hipofisarios, basándose en sus resultados en donde describen expresión de nestina en nuevos vasos después de producir un infarto en la glándula pituitaria (176). Por otro lado, es interesante destacar que en nuestro grupo de muestras, la marca de nestina disminuía con los años de evolución del tumor, quizás indicando que la neovascularización era necesaria para la formación del adenoma. Además, nestina es utilizada como marcador de célula madre en diversos tejidos, y su transiente expresión podría significar la presencia de poblaciones celulares progenitoras en la vasculatura de la hipófisis. Hacen falta más investigaciones sobre la neovacularización y las células madres en hipófisis.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra que si bien los adenomas hipofisarios son menos vascularizados que la glándula control, hay un aumento de vasos chicos que podrían estar relacionados a una neovascularización. Este dato se ve apoyado por la expresión diferencial de nestina en adenomas hipofisarios e hipófisis controles. Por otro lado el proceso de angiogénesis de los adenomas no está estrictamente relacionado con su grado de proliferación, sino que podría aumentar la sobreviva celular. Proponemos además que la nestina podría ser un marcador en el estudio de la patología de los adenomas hipofisarios humanos, ya que es una prueba, junto con el aumento del porcentaje de vasos chicos en los tumores, de la presencia de angiogénesis en los adenomas hipofisarios.

# Conclusión general

Los tumores hipofisarios, son adenomas no metastásicos, que poseen diversas características hormonales, citológicas y proliferativas. La incidencia dentro de la población en general, basándonos en el diagnóstico radiológico y postmortem, es de un 15-20%, sin embargo se cree que existe otro porcentaje de adenomas silenciosos no diagnosticados. Dentro de todos los tumores intracraneales, los hipofisarios representan el 10%, y los secretores de PRL o mixtos (secretores de GH y PRL) son las más frecuentes, con una incidencia mayor en mujeres respecto a hombres. Los prolactinomas usualmente se dividen en tres grupos, los microprolactinomas (<10 mm de diámetro), los macroprolactinomas (>10 mm de díametro) los У macroprolactinomas con invasión extraselar. Los prolactinomas invasivos son capaces de comprimir el quiasma óptico y causar daños a la altura del hipótalamo y el tecer ventrículo, muy pocas veces llegan a ser metastásicos y verdaderos carcinomas hipofisarios son muy raros. En general responden a la terapia farmacológica con agonistas dopaminérgicos pero un porcentaje de pacientes es intolerante a las drogas, resistente desde un comienzo o se vuelve resistente con el transcurso del tiempo. En estos casos, una nueva alternativa terapéutica como por ejemplo el bloqueo de factores angiogénicos resultaría alentadora dado que los prolactinomas resistentes se vuelven en su mayoría invasivos y deben ser extirpados.

Existen dos hipótesis que podrían explicar la formación de prolactinomas: una desregulación de la dopamina o una mutación local somática. Diversos trabajos apoyan la teoría de que el desarrollo de prolactinomas resistentes a dopaminérgicos, está causado por la pérdida del control inhibitorio de dopamina. Ejemplo de ello son los ratones transgénicos con deleción del *Drd2* como modelo experimental de prolactinoma.

En el presente trabajo, hemos desarrollado ratones con deleción del Drd2 únicamente en los lactotropos hipofisarios. Es decir, un nuevo y de prolactinomas resistentes original modelo a agonistas dopaminérgicos. Para ello, hemos desarrollado ratones mutantes incapaces de expresar el gen de RD2 (Drd2) selectivamente en lactotropos. Para ello, generamos ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de prolactina de ratón (Prl-Cre) y luego los cruzamos con ratones mutantes condicionales para el gen del RD2 ( $Drd2^{flox/flox}$ ). Esta nueva línea de ratones con mutaciones nulas de Drd2 restringidas a lactotropos fue denominada pitD2RKO.

Por otro lado, estudiamos la participación de la PRL en el metabolismo en nuestro nuevo modelo. Los ratones pitD2RKO no presentaron retardo de crecimiento, contrariamente a lo observado en ratones mutantes totales del RD2 ( $Drd2^{-/-}$ ) y los distintos parámetros asociados al eje de la hormona de crecimiento (GH) fueron normales. Esta observación indica que la ausencia de RD2s de los lactotropos hipofisarios no es responsable del déficit severo presente en el eje de GH de los ratones  $Drd2^{-/-}$ , y responde uno de nuestros objetivos que planteaba determinar si el RD2 hipofisario era el que participaba en el retardo de crecimiento en los  $Drd2^{-/-}$ 

Sin embargo, encontramos sorprendentemente, que las hembras pitD2RKO presentaron un aumento considerable de la ingesta de alimento y de su peso corporal a partir de los 90 días de edad, postulamos la participación de los elevados niveles crónicos de prolactina en este evento.

163

Las hembras pitD2RKO a los 11 meses de edad presentaron una hiperplasia hipofisaria con un mayor índice de proliferación celular (medido con PCNA) y un aumento en el porcentaje del área vascular (vasos marcados con CD31) respecto a las hipófisis de animales controles, determinanado de este modo la validez del modelo experimental como prolactinoma resistene a agonsitas dopaminérgicos.

Finalmente, ampliamos el estudio a adenomas hipofisarios humanos, y de manera interesante, observamos un aumento en la proliferación celular y en la angiogénesis de los adenomas respecto a las hipófisis controles, tema de gran controversia en la literatura, donde se han publicado aumentos o disminución de la vascularidad en los adenomas hipofisarios.

En resumen, hemos disecado fenotipos centrales de hipofisarios para el RD2, mediante la generación de una herramienta biológica novedosa, que a su vez es de gran utilidad para el estudio de prolactinomas y de las funciones de la PRL en el metabolismo. Por otro lado, aportamos nuevos resultados sobre el rol de la angiogénesis en el desarrollo de adenomas hipofisarios que podrían facilitar las decisiones terapeúticas en aquellos pacientes que no responden a la terapia convencional.

# <u>Bibliografía</u>

- 1. **Benes FM** 2001 Carlsson and the discovery of dopamine. Trends Pharmacology Sciences 22:46-47
- 2. Schuldiner S 1994 A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. J Neurochem 62:2067-2078
- 3. Amara SG, Kuhar MJ 1993 Neurotransmitter transporters: recent progress. Annual Review of Neuroscience 16:73-93
- 4. Dickinson SD, Sabeti J, Larson GA, Giardina K, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gerhardt GA, Zahniser NR 1999 Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. J Neurochem 72:148-156
- 5. Diego Redolar Ripoll 2008 Cerebro yadicción.UOC, Barcelona
- 6. **Di Chiara G** 2000 Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. Eur J Pharmacol 393:295-314
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ 1997 Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. Neuron 19:103-113
- 8. **Missale C, Russel Nash S, Robinson S, Jaber M, Caron MG** 1998 Dopamine Receptors: From Structure to Function. Physiological Reviews 78:189-225
- 9. **Ann D.Crocker** 1994 Dopamine-mechanism of action. Australian Prescriber 17:17-21
- 10. **Ben-Jonathan N, Hnasko R** 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. Endocrine reviews 22:724-763
- 11. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC 1990 Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. Nature 347:146-151
- 12. Leibowitz SF 1986 Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. Federation Proceedings 45:1396-1403
- 13. Terry P, Gilbert DB, Cooper SJ 1995 Dopamine receptor subtype agonists and feeding behavior. Obesity Research 3 Suppl 4:515S-523S
- 14. **Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA** 2002 Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. Peptides 23:2283-2306

- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH 1989 The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. EMBO J 8:4025-4034
- 16. **Müller E, Locatelli V, Cocchi D** 1999 Neuroendocrine control of growth hormone secretion. Physiological Reviews 79:511-607
- 17. Sarkar DK, Chaturvedi K, Oomizu S, Boyadjieva NI, Chen CP 2005 Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)-beta1, and TGF-beta type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. Endocrinology 146:4179-4188
- 18. **Guivarc'h D, Vernier P, Vincent JD** 1995 Sex steroid hormones change the differential distribution of the isoforms of the D2 dopamine receptor messenger RNA in the rat brain. Neurosciences 69:159-166
- Iaccarino C, Samad TA, Mathis C, Kercret H, Picetti R, Borrelli E 2002 Control of lactotrop proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs. Proceedings of the National Academy of Science U S A 99:14530-14535
- Libertun C, Becu D, Arakelian MC, Somoza GM, Lux VAR 1982 Neuroendocrine control of prolactin secretion. In: De Nicola A, Blaquier J, Soto RJ (eds). Physiopathology of hypophysial disturbances and diseases of reproduction.Alan R. Liss, Inc., New York:131-152
- 21. 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
- 22. Saiardi A, Bozzi Y, Baik J-H, Borrelli E 1997 Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. Neuron 19:115-126
- 23. Lin C, Lin SC, Chang CP, Rosenfeld MG 1992 Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. Nature 360:765-768
- 24. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiological Reviews 80:1523-1631
- 25. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW 1999 Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. Science 285:418-422
- 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

- 27. Flavell DM, Wells T, Wells SE, Carmignac DF, Thomas GB, Robinson IC 1996 Dominant dwarfism in transgenic rats by targeting human growth hormone (GH) expression to hypothalamic GH-releasing factor neurons. EMBO J 15:3871-3879
- 28. **Moore JP, Jr., Cai A, Hostettler ME, Arbogast LA, Voogt JL, Hyde JF** 2000 Pituitary hormone gene expression and secretion in human growth hormone-releasing hormone transgenic mice: focus on lactotroph function. Endocrinology 141:81-90
- 29. Alba M, Salvatori R 2004 A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. Endocrinology 145:4134-4143
- 30. Low MJ, Otero-Corchon V, Parlow AF, Ramirez JL, Kumar U, Patel YC, Rubinstein M 2001 Somatostatin is required for masculinization of growth hormone-regulated hepatic gene expression but not of somatic growth. Journal of Clinical Investigation 107:1571-1580
- Luque RM, Kineman RD 2007 Gender-dependent role of endogenous somatostatin in regulating growth hormone-axis function in mice. Endocrinology 148:5998-6006
- 32. Herington AC, Cornell HJ, Kuffer AD 1983 Recent advances in the biochemistry and physiology of the insulin-like growth factor/somatomedin family. Int J Biochem 15:1201-1210
- 33. **Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Wees WL** 1996 Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. Endocrinology 137:3717-3728
- 34. **Bishop JO, Clark AJ, Clissold PM, Hainey S, Francke U** 1982 Two main groups of mouse major urinary protein genes, both largely located on chromosome 4. EMBO J 1:615-620
- 35. Clark AJ, Clissold PM, al Shawi R, Beattie P, Bishop J 1984 Structure of mouse major urinary protein genes: different splicing configurations in the 3'-non-coding region. EMBO J 3:1045-1052
- 36. **Zhou Y, Jiang L, Rui L** 2009 Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. J Biol Chem 284:11152-11159
- 37. Hui X, Zhu W, Wang Y, Lam KS, Zhang J, Wu D, Kraegen EW, Li Y, Xu A 2009 Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. J Biol Chem 284:14050-14057
- Seilicovich A, Pisera D, Sciascia SA, Candolfi M, Puntel M, Xiong W, Jaita G, Castro MG 2005 Gene therapy for pituitary tumors. Curr Gene Ther 5:559-572

- 39. **Melmed S** 2003 Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. Journal of Clinical Investigation 112:1603-1618
- 40. Asa SL, Ezzat S 1998 The Cytogenesis and Pathogenesis of Pituitary Adenomas. Endocrine reviews 19:798-827
- 41. **Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A** 2006 Advances in the treatment of prolactinomas. Endocrine reviews 27:485-534
- 42. Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynak CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P, Enjalbert A 1989 Resistance to bromocriptine in prolactinomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 69:500-509
- 43. Bevan JS, Burke CW, Esiri MM, Adams CBT, Ballabio M, Nissim M, Faglia G 1989 Studies of two thyrotrophin-secreting pituitary adenomas: evidence for dopamine receptor deficiency. Clinical Endocrinology (Oxford) 31:59-70
- 44. **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
- 45. Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Perez-Millan MI, Passos VQ, Gianella-Neto D, Bronstein MD, Becu-Villalobos D 2007 PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. Mol Cancer 6:4
- 46. **Cai A, Hayes JD, Patel N, Hyde JF** 1999 Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia. Endocrinology 140:4955-4964
- 47. McAndrew J, Paterson AJ, Asa SL, McCarthy KJ, Kudlow JE 1995 Targeting of transforming growth factor-alpha expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. Endocrinology 136:4479-4488
- 48. **Borrelli E, Sawchenko PE, Evans RM** 1992 Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. Proceedings of the National Academy of Science U S A 89:2764-2768
- 49. Ezzat S, Zheng L, Zhu XF, Wu GE, Asa SL 2002 Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. Journal of Clinical Investigation 109:69-78
- 50. Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL, Low MJ 2002 Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. Journal of Clinical Investigation 110:973-981

- 51. Cristina C, García-Tornadú I, Diaz-Torga G, Rubinstein M, Low MJ, Becu-Villalobos D 2006 The dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. Frontiers of Hormone Research 35:50-63
- 52. Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, Gongora A, Rubinstein M, Low MJ, Becu-Villalobos D 2005 Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. Endocrinology 146:2952-2962
- 53. Asa SL, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ 1999 Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. Endocrinology 140:5348-5355
- 54. Garcia-Tornadu I, Rubinstein M, Gaylinn BD, Hill D, Arany E, Low MJ, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D 2006 GH in the dwarf dopaminergic D2 receptor knockout mouse: somatotrope population, GH release, and responsiveness to GH-releasing factors and somatostatin. Journal of Endocrinology 190:611-619
- 55. Garcia-Tornadu I, Diaz-Torga GS, Risso G, Silveyra P, Cataldi N, Ramirez MC, Low MJ, Libertun C, Becu-Villalobos D 2009 Hypothalamic orexin, OX1, áMSH, NPY and MCRs expression in dopaminergic D2R knockout mice. Neuropeptides 43:267-274
- 56. Wehrenberg W, Giustina A 2000 Neuroendocrine regulation of Growth Hormone secretion. In: Conn M, Freeman ME (eds). Neuroendocrinology in Physiology and Medicine.Humana Press, Totowa, New Jersey:181-195
- 57. Garcia-Tornadu I, OrnsteinA.M., Chamson-Reig A, Wheeler MB, Hill DJ, Arany E, Rubinstein M, Becu-Villalobos D 2009 Disruption of the Dopamine D2 Receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. Endocrinology Aceptado en revisión:
- 58. **Gu H** 1994 Gene targeting and its application to the study of B-cell development. Curr Opin Immunol 6:308-312
- 59. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K 1995 Inducible gene targeting in mice. Science 269:1427-1429
- 60. **Hoess RH, Ziese M, Sternberg N** 1982 P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. Proc Natl Acad Sci U S A 79:3398-3402
- 61. **Abremski K, Hoess R** 1984 Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. J Biol Chem 259:1509-1514
- 62. Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA 1993 Site-specific recombinases: tools for genome engineering. Trends Genet 9:413-421

- 63. **Sternberg N, Hamilton D** 1981 Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol 150:467-486
- 64. Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS, III, . 1986 The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. EMBO J 5:433-440
- 65. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K 1986 The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. Nucleic Acids Res 14:2287-2300
- 66. **Abremski K, Hoess R, Sternberg N** 1983 Studies on the properties of P1 sitespecific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. Cell 32:1301-1311
- 67. **Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH** 2001 Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. Blood 97:324-326
- 68. Ben Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW 2008 What can we learn from rodents about prolactin in humans? Endocr Rev 29:1-41
- Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG 1988 A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. Cell 55:519-529
- 70. Crenshaw EB, III, Kalla K, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG 1989 Cell-specific expression of the prolactin gene in transgenic mice is controlled by synergistic interactions between promoter and enhancer elements. Genes & development 3:959-972
- 71. **Gourdji D, Laverriere JN** 1994 The rat prolactin gene: a target for tissuespecific and hormone-dependent transcription factors. Mol Cell Endocrinol 100:133-142
- 72. Andersen B, Rosenfeld MG 2001 POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. Endocrine reviews 22:2-35
- 73. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G 2000 Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. Physiological Reviews 80:1523-1631
- 74. Baptista T, de Baptista EA, Lalonde J, Plamondon J, Kin NM, Beaulieu S, Joober R, Richard D 2004 Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28:1305-1311

- 75. **Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG, Collier RJ** 1993 Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. Am J Physiol 264:E986-E992
- 76. **Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS, Horwitz BA** 1989 Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. Am J Physiol 256:R276-R280
- 77. **Sauve D, Woodside B** 2000 Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. Brain Research 868:306-314
- 78. Matsuda M, Mori T, Sassa S, Sakamoto S, Park MK, Kawashima S 1996 Chronic effect of hyperprolactinemia on blood glucose and lipid levels in mice. Life Sci 58:1171-1177
- 79. **Freemark M, Fleenor D, Driscoll P, Binart N, Kelly P** 2001 Body weight and fat deposition in prolactin receptor-deficient mice. Endocrinology 142:532-537
- 80. Fleenor D, Oden J, Kelly PA, Mohan S, Alliouachene S, Pende M, Wentz S, Kerr J, Freemark M 2005 Roles of the lactogens and somatogens in perinatal and postnatal metabolism and growth: studies of a novel mouse model combining lactogen resistance and growth hormone deficiency. Endocrinology 146:103-112
- 81. Flint DJ, Binart N, Boumard S, Kopchick JJ, Kelly P 2006 Developmental aspects of adipose tissue in GH receptor and prolactin receptor gene disrupted mice: site-specific effects upon proliferation, differentiation and hormone sensitivity. J Endocrinol 191:101-111
- 82. Ling C, Hellgren G, Gebre-Medhin M, Dillner K, Wennbo H, Carlsson B, Billig H 2000 Prolactin (PRL) receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-transgenic mice. Endocrinology 141:3564-3572
- 83. LaPensee CR, Horseman ND, Tso P, Brandebourg TD, Hugo ER, Ben Jonathan N 2006 The prolactin-deficient mouse has an unaltered metabolic phenotype. Endocrinology 147:4638-4645
- 84. **Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Dieguez C, Casanueva F, Popovic V** 2002 Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. Eur J Endocrinol 147:77-84
- 85. **Greenman Y, Tordjman K, Stern N** 1998 Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. Clinical Endocrinology (Oxford) 48:547-553
- 86. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL 1993 Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. Endocrinology 132:879-887

- 87. **Shao J, Qiao L, Friedman JE** 2004 Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism 286:E304-E310
- 88. Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC 2004 Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. J Endocrinol 183:469-476
- 89. Amaral ME, Ueno M, Carvalheira JB, Carneiro EM, Velloso LA, Saad MJ, Boschero AC 2003 Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. Horm Metab Res 35:282-289
- 90. Bordin S, Amaral ME, Anhe GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC 2004 Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. Mol Cell Endocrinol 220:41-50
- 91. Serri O, Li L, Mamputu JC, Beauchamp MC, Maingrette F, Renier G 2006 The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. Clin Endocrinol (Oxf) 64:366-370
- 92. Yavuz D, Deyneli O, Akpinar I, Yildiz E, Gozu H, Sezgin O, Haklar G, Akalin S 2003 Endothelial function, insulin sensitivity and inflammatory markers in hyperprolactinemic pre-menopausal women. Eur J Endocrinol 149:187-193
- 93. Flint DJ, Binart N, Kopchick J, Kelly P 2003 Effects of growth hormone and prolactin on adipose tissue development and function. Pituitary 6:97-102
- 94. Ling C, Billig H 2001 PRL receptor-mediated effects in female mouse adipocytes: PRL induces suppressors of cytokine signaling expression and suppresses insulin-induced leptin production in adipocytes in vitro. Endocrinology 142:4880-4890
- 95. Lacau-Mengido IM, Mejía M, Diaz-Torga G, Gonzalez Iglesias A, Formía N, Libertun C, Becu-Villalobos D 2000 Endocrine studies in ivermectintreated heifers from birth to puberty. Journal of Animal Science 78:1-8
- 96. **Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG, Collier RJ** 1993 Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. American Journal of Physiology 264:E986-E992
- 97. **Sauve D, Woodside B** 1996 The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding-regimen. Brain Research 729:75-81

- 98. **Shankar PN, Joseph A, Paulose CS** 2007 Decreased [3H] YM-09151-2 binding to dopamine D2 receptors in the hypothalamus, brainstem and pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rats. Eur J Pharmacol 557:99-105
- 99. Johnson D, al Shawi R, Bishop JO 1995 Sexual dimorphism and growth hormone induction of murine pheromone-binding proteins. Journal of Molecular Endocrinology 14:21-34
- 100. Garcia-Tornadu I, Risso G, Perez-Millan MI, Noain D, Diaz-Torga GS, Low MJ, Rubinstein M, Becu-Villalobos D 2010 Neurotransmitter modulation of the GHRH-GH axis. Frontiers of Hormone Research In press:
- Ojeda SR, Castro-Vasquez A, Jameson HE 1977 Prolactin release in response to blockade of dopaminergic receptors and to TRH injection in developing and adult rats: role of estrogen in determining sex differences. Endocrinology 100:427-439
- 102. Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA, Binart N 2003 Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. Reprod Biol Endocrinol 1:12
- 103. Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA 1998 Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. Endocrinology 139:4102-4107
- 104. Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K 1997 Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. EMBO J 16:6926-6935
- 105. Zoli M, Agnati LF, Tinner B, Steinbusch HW, Fuxe K 1993 Distribution of dopamine-immunoreactive neurons and their relationships to transmitter and hypothalamic hormone-immunoreactive neuronal systems in the rat mediobasal hypothalamus. A morphometric and microdensitometric analysis. Journal of Chemical Neuroanatomy 6:293-310
- 106. Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K 1992 Identification of dopamine and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat by combined retrograde tracing and immunohistochemistry. Neuroendocrinology 55:92-96
- 107. Phelps CJ, Romero MI, Hurley DL 2003 Growth hormone-releasing hormoneproducing and dopaminergic neurones in the mouse arcuate nucleus are independently regulated populations. Journal of Neuroendocrinology 15:280-288
- 108. **Tuomisto J, Mannisto P** 1985 Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. Pharmacological Reviews 37:249-332

- 109. **Sheppard MC** 2003 Primary medical therapy for acromegaly. Clinical Endocrinology (Oxford) 58:387-399
- 110. Kitajima N, Chihara K, Hiromi H, Okimura Y, Fujii Y, Sato M, Shakutsui S, Watanabe M, Fufita T 1989 Effects of dopamine on immunoreactive growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion from rat hypothalamic slices perfused *in vitro*. Endocrinology 124:69-76
- 111. Serri O, Deslauriers N, Brazeau P 1987 Dual action of dopamine on growth hormone release *in vitro*. Neuroendocrinology 45:363-367
- 112. Chamero P, Marton TF, Logan DW, Flanagan K, Cruz JR, Saghatelian A, Cravatt BF, Stowers L 2007 Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. Nature 450:899-902
- 113. Garcia-Tornadu I, Arany E, Chamson-Reig A, Rubinstein M, Hill DJ, Wheeler MB, Becu-Villalobos D 2008 Deletion of the Dopamine D2 Receptor: Effect on Pancreatic Islet function. Endocrine Society Meeting Toronto Abstract:
- 114. Gurlek A, Karavitaki N, Ansorge O, Wass JA 2007 What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics. European Journal of Endocrinology 156:143-153
- Molitch ME 2005 Pharmacologic resistance in prolactinoma patients. Pituitary 8:43-52
- 116. Friedman E, Adams HF, Hoog A, Gejman PV, Carson E, Larsson C, De Marco L, Werner S, Fahlbusch R, Nordenskjöld M 1994 Normal structural dopamine type 2 receptor gene in prolactin-secreting and other pituitary tumors. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 78:568-574
- 117. Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, Jaquet P, Kordon C, Enjalbert A 1994 Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. Neuroendocrinology 60:314-322
- 118. Caccavelli L, Morange-Ramos I, Kordon C, Jaquet P, Enjalbert A 1996 Alteration of G alpha subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. J Neuroendocrinol 8:737-746
- 119. **Tyrrell JB, Lamborn KR, Hannegan LT, Applebury CB, Wilson CB** 1999 Transsphenoidal microsurgical therapy of prolactinomas: initial outcomes and long-term results. Neurosurgery 44:254-261
- 120. **Burgess JR, Shepherd JJ, Parameswaran V, Hoffman L, Greenaway TM** 1996 Prolactinomas in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1: clinical features and inheritance pattern. J Clin Endocrinol Metab 81:1841-1845

- 121. Burgess JR, Shepherd JJ, Parameswaran V, Hoffman L, Greenaway TM
  1996 Spectrum of pituitary disease in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN
  1): clinical, biochemical, and radiological features of pituitary disease in a large
  MEN 1 kindred. J Clin Endocrinol Metab 81:2642-2646
- 122. Black PM, Hsu DW, Klibanski A, Kliman B, Jameson JL, Ridgway EC, Hedley-Whyte ET, Zervas NT 1987 Hormone production in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. J Neurosurg 66:244-250
- 123. Maheshwari HG, Prezant TR, Herman-Bonert V, Shahinian H, Kovacs K, Melmed S 2000 Long-acting peptidomimergic control of gigantism caused by pituitary acidophilic stem cell adenoma. J Clin Endocrinol Metab 85:3409-3416
- 124. Pernicone PJ, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Young WF, Jr., Lloyd RV, Davis DH, Guthrie BL, Schoene WC 1997 Pituitary carcinoma: a clinicopathologic study of 15 cases. Cancer 79:804-812
- 125. Melmed S 2002 The pituitary.Blackwell, Second Edition edn
- 126. Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER, Jr., Randall RV 1986 Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. J Neurosurg 65:733-744
- 127. **Sautner D, Saeger W** 1991 Invasiveness of pituitary adenomas. Pathol Res Pract 187:632-636
- 128. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA 2003 Angiogenesis in endocrine tumors. Endocr Rev 24:600-632
- 129. **Folkman J** 1972 Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann Surg 175:409-416
- 130. 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
- 131. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J 1993 Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. American Journal of Pathology 143:401-409
- 132. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G 1992 Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 84:1875-1887
- 133. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL 1992 Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. Lancet 340:1120-1124

- 134. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, 1995 Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. J Clin Oncol 13:477-481
- 135. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW 1995 Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. J Natl Cancer Inst 87:1603-1612
- 136. **Schechter J** 1972 Ultrastructural changes in the capillary bed of human pituitary tumors. American Journal of Pathology 67:109-126
- 137. Jugenburg M, Kovacs K, Stefaneanu L, Scheithauer BW 1995 Vasculature in Nontumorous Hypophyses, Pituitary Adenomas, and Carcinomas: A Quantitative Morphologic Study. Endocrine Pathology 6:115-124
- 138. Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, Wass JA 2000 Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85:1159-1162
- Erroi A, Bassetti M, Spada A, Giannattasio G 1986 Microvasculature of human micro- and macroprolactinomas. A morphological study. Neuroendocrinology 43:159-165
- 140. **Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, Wass JA** 2000 Angiogenesis in pituitary adenomas - relationship to endocrine function, treatment and outcome. Journal of Endocrinology 165:475-481
- 141. Vidal S, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW, Kuroki T, Lloyd RV 2001 Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. Virchows Arch 438:595-602
- 142. McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ 2002 Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87:4238-4244
- 143. **Gorczyca W, Hardy J** 1988 Microadenomas of the human pituitary and their vascularization. Neurosurgery 22:1-6
- 144. Schechter J, Goldsmith P, Wilson C, Weiner R 1988 Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 67:713-719
- 145. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL 1993 Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. Cancer Res 53:4161-4163
- 146. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY 1996 Quantification of
angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. Eur J Cancer 32A:2474-2484

- Mukai K, Rosai J, Burgdorf WH 1980 Localization of factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method. Am J Surg Pathol 4:273-276
- 148. Holthofer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, Miettinen A 1982 Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. Lab Invest 47:60-66
- 149. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H 1983 Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31:13-20
- 150. Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Denef C, Vankelecom H 2005 Nestinimmunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical folliculostellate cells. Endocrinology 146:2376-2387
- 151. **Hockfield S, McKay RD** 1985 Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. J Neurosci 5:3310-3328
- 152. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD 1990 CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60:585-595
- 153. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J 1999 Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96:25-34
- 154. Gleiberman AS, Michurina T, Encinas JM, Roig JL, Krasnov P, Balordi F, Fishell G, Rosenfeld MG, Enikolopov G 2008 Genetic approaches identify adult pituitary stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 105:6332-6337
- 155. **Bonnet D, Dick JE** 1997 Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature Medicine 3:730-737
- 156. Dontu G, Al Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS 2003 Stem cells in normal breast development and breast cancer. Cell Prolif 36 Suppl 1:59-72
- 157. **Jordan CT** 2004 Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. Curr Opin Cell Biol 16:708-712
- 158. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB 2003 Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63:5821-5828
- 159. Massard C, Deutsch E, Soria JC 2006 Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. Ann Oncol 17:1620-1624

- 160. Niveiro M, Aranda FI, Peiro G, Alenda C, Pico A 2005 Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. Hum Pathol 36:1090-1095
- Folkman J, Shing Y 1992 Angiogenesis. Journal of Biological Chemistry 267:10931-10934
- 162. de la Torre NG, Wass JA, Turner HE 2004 Morphologic changes and molecular regulation of angiogenesis in pituitary adenomas. Frontiers of Hormone Research 32:133-145
- 163. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM 1999 Age-dependent impairment of angiogenesis. Circulation 99:111-120
- 164. Pizarro CB, Oliveira MC, Pereira-Lima JF, Leaes CG, Kramer CK, Schuch T, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP 2009 Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. Neuropathology 29:40-44
- 165. **Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Wass JA, Harris AL** 2000 Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behaviour. British Journal of Cancer 82:1441-1445
- 166. Vermeulen PB, Dirix LY, Libura J, Vanhoolst IF, Van Marck E, Van Oosterom AT 1997 Correlation of the fractions of proliferating tumor and endothelial cells in breast and colorectal adenocarcinoma is independent of tumor histiotype and microvessel density. Microvasc Res 54:88-92
- 167. **Kitz K, Knosp E, Koos WT, Korn A** 1991 Proliferation in pituitary adenomas: measurement by MAb KI 67. Acta Neurochir Suppl (Wien ) 53:60-64
- 168. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Maira G 1999 Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. J Clin Pathol 52:107-111
- 169. Wolfsberger S, Wunderer J, Zachenhofer I, Czech T, Bocher-Schwarz HG, Hainfellner J, Knosp E 2004 Expression of cell proliferation markers in pituitary adenomas--correlation and clinical relevance of MIB-1 and antitopoisomerase-IIalpha. Acta Neurochir (Wien ) 146:831-839
- 170. Jaffrain-Rea ML, Di Stefano D, Minniti G, Esposito V, Bultrini A, Ferretti E, Santoro A, Faticanti SL, Gulino A, Cantore G 2002 A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas. Endocr Relat Cancer 9:103-113
- 171. **Mastronardi L, Guiducci A, Puzzilli F, Maira G** 2002 Anterior pituitary adenomas in patients aged more than 65 years: analysis of growth fraction (using the MIB-1 monoclonal antibody) and of clinical features in comparison to younger patients. Clin Neurol Neurosurg 104:44-48

- 172. **Rotondo F, Kovacs K, Horvath E, Bell CD, Lloyd RV, Scheithauer BW** 2006 Immunohistochemical expression of nestin in the non-tumorous hypophysis and in pituitary neoplasms. Acta Neuropathol 111:272-277
- 173. Lardon J, Rooman I, Bouwens L 2002 Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. Histochem Cell Biol 117:535-540
- 174. **Gerhardt H, Betsholtz C** 2003 Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. Cell Tissue Research 314:15-23
- 175. Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, Saito N, Nakazato Y, Sasaki T, Takeuchi T 2002 Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. Lab Invest 82:345-351
- 176. Salehi F, Kovacs K, Cusimano MD, Horvath E, Bell CD, Rotondo F, Scheithauer BW 2008 Immunohistochemical expression of nestin in adenohypophysial vessels during development of pituitary infarction. J Neurosurg 108:118-123