

Tesis Doctoral

# Caracterización del sistema TGF- $\beta$ <sub>1</sub> hipofisario: en búsqueda de un blanco terapéutico para prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos

Recouvreux, María Victoria

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Recouvreux, María Victoria. (2012). Caracterización del sistema TGF- $\beta$ <sub>1</sub> hipofisario: en búsqueda de un blanco terapéutico para prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Recouvreux, María Victoria. "Caracterización del sistema TGF- $\beta$ <sub>1</sub> hipofisario: en búsqueda de un blanco terapéutico para prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Caracterización del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario:  
En búsqueda de un blanco terapéutico para prolactinomas  
resistentes a agonistas dopaminérgicos.**

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

**Lic. María Victoria Recouvreux**

**Director de tesis: Dra. Graciela Díaz-Torga**

**Consejero de estudios: Dr. Dante Paz**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología Hormonal. Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET.

Buenos Aires, 2012

## **Caracterización del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario: En búsqueda de un blanco terapéutico para prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos**

Los prolactinomas son tumores benignos que en general responden bien al tratamiento con agentes dopaminérgicos. Sin embargo alrededor del 15% de estos tumores son resistentes y aún no existen terapias médicas alternativas. TGF- $\beta$ 1 es un inhibidor de las funciones del lactotrofo, y un intermediario de la inhibición que ejerce la dopamina, por lo tanto, resulta un candidato atractivo como blanco terapéutico para prolactinomas resistentes. El objetivo de la presente tesis fue caracterizar el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario y la regulación de sus componentes, incluyendo los niveles de citoquina total y activa, sus proteínas de latencia (LTBPs) y activadores locales, para evaluar su posible utilidad para el desarrollo de nuevas terapias. Utilizamos dos modelos experimentales de prolactinomas: 1) ratones hembra con mutación nula del receptor dopaminérgico D2 (*Drd2*<sup>-/-</sup>); y 2) ratas tratadas crónicamente con estrógenos. Nuestros resultados demuestran que el sistema TGF- $\beta$ 1 se encuentra inhibido en las hipófisis tumorales de ambos modelos. Describimos por primera vez en la literatura una **regulación diferencial de los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario por dopamina y estrógenos** que podría explicar en parte las diferencias sexuales en la formación de prolactinomas. Determinamos la expresión de las tres isoformas de LTBPs capaces de unir TGF- $\beta$ 1, y su regulación frente a estímulos con estrógenos y agentes dopaminérgicos. Por último, identificamos a trombospodina 1 (TSP1) y calicreína 1 (KLK1) como posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 a nivel local. Asimismo, ensayamos la eficacia de un tratamiento con péptidos análogos de TSP1 (ABT-510 y ABT-898) en el modelo de ratas estrogenizadas. Este tratamiento logró disminuir los niveles de prolactina sérica y el tamaño hipofisario incrementados por los estrógenos. Nuestro estudio contribuye al conocimiento del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario y su regulación local. Siendo TGF- $\beta$ 1 un inhibidor de la función del lactotrofo, proponemos que la restauración de su actividad local podría ser efectiva para frenar el crecimiento de prolactinomas resistentes a los tratamientos clásicos.

Palabras Clave: Hipófisis, Prolactinomas, TGF- $\beta$ 1, Dopamina, Estradiol, Prolactina

## **Characterization of pituitary TGF- $\beta$ 1 system: in the search of new therapeutic targets against dopamine agonist resistant prolactinomas.**

Prolactinomas are common benign adenomas that are generally treated with dopaminergic agonists. However, around 15% of these tumors become resistant, and there are still not alternative therapeutical approaches. TGF- $\beta$ 1 is a potent cytokine that inhibits lactotrope function and, that mediates dopamine inhibitory action. Therefore, we postulate TGF- $\beta$ 1 as a candidate for developing new therapies against dopamine - resistant prolactinomas. The aim of this thesis was to characterize the pituitary TGF- $\beta$ 1 system (active and total cytokine levels, latent TGF- $\beta$ 1 binding proteins (LTBPs) and local activators) and its regulation, in order to identify potential therapeutical targets. We used two different experimental models of prolactinoma development: 1) the female dopamine D2 receptor knock-out mice (Drd2<sup>-/-</sup>) and 2) the estrogen-treated rat. We demonstrated that TGF- $\beta$ 1 system is down-regulated in both prolactinoma models. **We described for the first time in the literature a differential regulation of pituitary active TGF- $\beta$ 1 levels by dopamine and estradiol *in vivo*.** These differences may contribute to sexual dimorphism found in prolactinoma development. We found that LTBPs isoforms were differentially expressed in normal vs. tumoral pituitaries in both prolactinoma models, and each isoform was also differentially regulated by dopamine and estradiol. We identified thrombospondin 1 (TSP1) and kallikrein 1 as candidates to mediate pituitary TGF- $\beta$ 1 activation. Finally we explored the efficacy of an *in vivo* treatment with TSP1 mimetic peptides (ABT-510 and ABT-898) in the rat prolactinoma model. TSP1 analogs treatment caused a significant reduction in prolactin serum levels and pituitary weight induced by estrogen after 2-weeks treatment. Our findings provide novel evidence of TGF- $\beta$ 1 system function and regulation in pituitary tumorigenesis. Since TGF- $\beta$ 1 exerts a negative control on lactotrope cells, we postulate that recovering its local activity could be effective in inhibiting tumor growth of dopamine agonist resistant prolactinomas.

Key Words: Pituitary, Prolactinomas, TGF- $\beta$ 1, Dopamine, Estradiol, Prolactin

## Agradecimientos

A **Gra**, GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS e INFINITAS GRACIAS! Por todo, por todo el camino que recorrimos juntas, desde que aceptaste dirigirme, allá lejos hace unos cinco años, hasta revisar conmigo hasta la última coma de esta tesis... No lo puedo creer, qué rápido se pasó! Gracias por confiar ciegamente en mí, lo valoro muchísimo, siempre me apoyaste, me guiaste y me incentivaste en todo lo que emprendimos, y me ayudaste a crecer en lo científico y en lo personal. Gracias por tu generosidad, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por escuchar mis opiniones y respetarlas a pesar de que muchas veces pensemos distinto y te peleé un poco, o bastante... gracias por aguantarme los rayes y el malhumor en esos días que no sale nada y por ayudarme a superar las frustraciones con tu sonrisa y energías positivas! Por último, cabe destacar aquí ☺ que estoy más que feliz de haber compartido con vos todos estos años de trabajo, y que a pesar de algunos altibajos disfruté mucho de esta etapa del doctorado y eso se debe en gran parte la excelente relación que construimos!

A **Dama**, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme formar parte de la "Becu-cueva"! Gracias por estar siempre dispuesta a escucharme y darme consejos, por tus invalorable aportes en la discusión de resultados y en la corrección de los trabajos.

A **todos los del lab**, por hacer que la vida en el lab sea divertida!, por generar un ambiente de trabajo cálido y de buena onda, donde siempre me sentí cómoda. Realmente me siento privilegiada de formar parte de este grupo de gente tan linda, que no es algo fácil de encontrar. Al **LFPH team, Laris y Maru**, HAY EQUIPO chiquiss!!! Mil gracias por bancarme, sobre todo en estos últimos meses de escritura, por darme una mano con todo, desde armar figuras, posters y largar Reals, hasta cebarme mates y hacerme reír! A **Guillota**, mi compañera de mates tardíos y de posters desaparecidos! Gracias por el aguante guillo, por poner siempre la oreja y por compartir tantos buenos momentos! No me imagino un labo sin vos! A **Ceci**, por tu buena onda, por tus salidas recurrentes que me hacen reír tanto, por todo el apoyo que fuiste en esta etapa de escritura, al fin lo logramos ceeee!!! Ahora a festejar!! A **Ana**, qué haríamos en el lab sin vos? Gracias por toda tu dedicación y por estar siempre lista a resolver cualquier problema, y también por los cafecitos siempre tan necesarios y por proveerme de cactus! A **Isa**, por aconsejarme y levantarme el ánimo cuando las cosas no salen, y también por compartir las alegrías de los logros. A **Caro y Bet**, que revolucionan el lab cada vez que vienen y nos aportan esa chispa de energía extra. A **Laucha y Rodri**, por las risas y los mates, viene bien compensar tanto estrógeno que hay en el lab! A los que pasaron por el lab y dejaron su huella, en especial **Marilyn**, te extraño amiga! A **Clarita, Gaby y Adrián**, con quienes compartí muchos lindos momentos y siempre es una alegría reencontrarse.

A **los libertunes**, por sacarnos las papas del fuego siempre y por compartir mucho más que reactivos; y a los vecinos de pasillo y de todo el instituto, por la buena onda que se respira en el ambiente y por estar siempre dispuestos a dar una mano.

A **Daniel Rifkin** por recibirme en su laboratorio y por su colaboración en el proyecto conjunto, por todas sus sugerencias que ayudaron a mejorar el trabajo. A los integrantes de su laboratorio en la NYU, por guiarme cuando llegué por primera vez y no sabía ni donde estaban los tips, en especial a **Vesna**, que se convirtió en una gran compañía durante mi estadía.

A **mis viejos**, por su apoyo incondicional, por todo el amor que me brindaron siempre, por creer en mí, por tirar siempre para adelante, aún cuando parece todo perdido, y por inculcarnos ese espíritu de ir siempre por más, los admiro. A **mis hermanitos del alma, Nacho y Sol**, por ser tan compañeros, por tantas risas, abrazos, y llantos que compartimos, me alegran la vida. Estoy orgullosa de la familia que tengo, los amo con todo mi corazón, esta tesis es también de ustedes!

A toda la familia, a mis abuelos, tios y primos, por preocuparse por mí, por alegrarse conmigo y brindarme tanto cariño.

A mis amigos, simplemente por ser como son. En especial a **Yiyi**, por bancarme todos estos años amigaaa!! por tus locuras que me hacen reir tanto, por estar siempre, por cocinarme rico, por distraerme cuando ando medio loca, gracias totales!

A **Lau**, gracias por escucharme y aconsejarme, por estar pendiente, por aguantarme sobre todo este último tiempo que estuve bastante monotemática y ni yo me soportaba, ya me va a tocar devolverte el favor... A **Cyn**, que me banca vía chat, aunque estes lejos te siento cerca amiga, vuelve!!! A mis amigos neoyorkinos, **Sandrita, Romi y Seba**, que hicieron mis estadías por esas tierras muy divertidas!

*“Esto recién empieza”*

*A mi familia, con amor*

---

Parte de los resultados presentados en esta tesis forman parte del trabajo ganador del **Premio Bernardo A. Houssay 2012**, otorgado por la Sociedad Argentina de Biología:

“Caracterización del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario: en búsqueda de un blanco terapéuticos para prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas”

**Recouvreux M.Victoria**, Lapyckyj Lara, Camilletti M.Andrea, Becu-Villalobos Damasia y Diaz Torga Graciela

**Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:**

- 1- THROMBOSPONDIN-1 (TSP-1) ANALOGS ABT-510 AND ABT-898 INHIBIT PROLACTINOMA GROWTH AND RECOVER ACTIVE PITUITARY TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 (TGF- $\beta$ 1)”. **M. Victoria Recouvreux**, M. Andrea Camilletti, Daniel B. Rifkin, Damasia Becu-Villalobos, Graciela Díaz-Torga. **Endocrinology, 2012, Aug; 153 (8):3861-71**
- 2- ACTIVE AND TOTAL TRANSFORMING GROWTH FACTOR  $\beta$ 1 IS DIFFERENTIALLY REGULATED BY DOPAMINE AND ESTRADIOL IN THE PITUITARY. **Recouvreux V**, Guida C, Rifkin D, Becú-Villalobos D, Díaz-Torga G. **Endocrinology. 2011 Jul; 152 (7):2722-30.**
- 3- NON-CONVENTIONAL ENDOCRINE FUNCTIONS OF DOPAMINE TYPE 2 RECEPTOR: NEW INSIGHTS GAINED FROM TRANSGENIC MICE. Isabel Garcia Tornadú, **M Victoria Recouvreux**, M Cecilia Ramirez, M Guillermina Luque, M Ines Perez-Millan, Rodrigo Lorenzo, María Andrea Camilletti, Ana María Ornstein, Isabel Lacau-Mengido, Carolina Cristina, Graciela Diaz-Torga, Damasia Becu-Villalobos. **Acta Bioquim Clin Latinoamer 45 (4) 699-703:2011**
- 4- NEW INSIGHTS INTO THE ENDOCRINE ROLE OF THE DOPAMINE D2 RECEPTOR GAINED FROM THE *Drd2*<sup>-/-</sup> MOUSE. García Tornadu I, Perez Millán MI, Ramirez C, Luque, G., **Recouvreux V**, Ornstein AM, Cristina, C, Diaz Torga G, Becu-Villalobos. **Neuroendocrinology, 2010 92(4):207-14.**

***Esta tesis se realizó con el apoyo de CONICET y ANPCyT***



# INDICE

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	15
Eje hipotálamo - hipofisario.....	16
Prolactina (PRL).....	18
Regulación de la función de los lactotropos.....	18
Adenomas hipofisarios.....	22
Prolactinomas.....	23
Prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (DARPs).....	24
En búsqueda de terapias alternativas para prolactinomas resistentes.....	25
Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ ).....	27
El sistema TGF- $\beta 1$ .....	28
Descripción del sistema:.....	29
• Síntesis de TGF- $\beta$ y ensamblaje del complejo latente.....	29
• Activación de TGF- $\beta 1$ .....	30
• Receptores y efectores intracelulares.....	32
TGF- $\beta 1$ en hipófisis.....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>MATERIALES &amp; MÉTODOS</b> .....	38
Modelos animales.....	39
Ratones transgénicos con disrupción del receptor de dopamina D2 (Drd2 <sup>-/-</sup> ).....	39
Ratas hembra estrogenizadas (Ratas DES).....	39
Experimentos in vivo.....	40
En ratones:.....	40
• Tratamiento con agonistas y antagonistas dopaminérgicos:.....	40
• Tratamiento con estradiol (E2).....	41
En ratas.....	41
• Tratamiento <i>in vivo</i> con ABT-510 y ABT-898 en ratas DES.....	41

• Tratamiento <i>in vivo</i> con ABT-510 a tiempos cortos.....	42
Modelos <i>in vitro</i> .....	42
Cultivo primario de células adenohipofisarias de ratón .....	42
Cultivo de células de la línea GH3 .....	44
Experimentos <i>in vitro</i> .....	44
Células adenohipofisarias de ratón.....	44
• Efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la proliferación celular y la secreción de PRL:.....	44
Células GH3 .....	45
• Efecto de ABT-898 sobre la secreción de PRL y la activación de TGF- $\beta$ 1:.....	45
• Efecto de ABT-898 sobre el número de células (índice de proliferación):.....	45
Modelo <i>ex vivo</i> en hipófisis de ratas .....	46
Técnicas utilizadas.....	47
Radioinmunoensayo (RIA) para la detección de PRL de rata y de ratón. ....	47
Western Blot (WB) .....	48
ELISA para la detección de TGF- $\beta$ 1 activo y total.....	51
PCR cuantitativa en tiempo real .....	52
Fijación de hipófisis para técnicas histológicas.....	56
Inmunofluorescencia (IF) para el receptor II de TGF- $\beta$ .....	56
Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de CD-31 .....	57
Zimografía .....	59
Estadística .....	60
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Caracterización del sistema TGF-<math>\beta</math>1 en prolactinomas experimentales .....</b>	<b>62</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 1.....	63
Modelos experimentales de prolactinomas .....	63
Ratones knock out para el receptor dopaminérgico D2 (Drd2 <sup>-/-</sup> ) .....	63
Prolactinomas inducidos por tratamiento crónico con estrógenos en ratas .....	64

TGF- $\beta$ 1 en prolactinomas.....	65
OBJETIVOS DEL CAPITULO 1.....	67
RESULTADOS DEL CAPÍTULO 1.....	68
Caracterización de los modelos experimentales de prolactinomas .....	68
Efecto de TGF- $\beta$ 1 in vitro en células adenohipofisarias en cultivo primario .....	69
Expresión del receptor de TGF- $\beta$ tipo II (T $\beta$ RII) en hipófisis <i>Drd2<sup>+/+</sup></i> y <i>Drd2<sup>-/-</sup></i> .....	71
Caracterización de TGF- $\beta$ 1 en prolactinomas experimentales.....	72
Expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1 .....	73
Contenido de TGF- $\beta$ 1 activo y total en hipófisis.....	73
Expresión de las Proteínas de unión a TGF- $\beta$ latente (LTBPs) .....	77
Posibles activadores de TGF- $\beta$ 1: Trombospondina 1 (TSP1) .....	79
DISCUSIÓN DEL CAPITULO 1 .....	80

## Capítulo 2

<b>Diferencias sexuales en el sistema TGF-<math>\beta</math>1 hipofisario. Regulación por dopamina y estradiol. ....</b>	<b>85</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 2.....	86
Diferencias sexuales en la tumorigénesis hipofisaria en el ratón <i>Drd2<sup>-/-</sup></i> .....	86
OBJETIVOS DEL CAPITULO 2.....	89
RESULTADOS DEL CAPÍTULO 2 .....	90
Contenido de TGF- $\beta$ 1 hipofisario en hembras y machos.....	90
Expresión de genes regulados por TGF- $\beta$ 1 .....	92
Expresión de componentes que intervienen en la señalización de TGF- $\beta$ 1 .....	93
Regulación dopaminérgica de TGF- $\beta$ 1 hipofisario .....	95
Regulación estrogénica de TGF- $\beta$ 1 hipofisario .....	98
Regulación de la expresión génica de la convertasa furina .....	102
Expresión y regulación de las Proteínas de unión a TGF- $\beta$ Latente (LTBPs) .....	104
Expresión y regulación de posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 hipofisario.....	108
• Metaloproteasas de la matriz .....	108

• Integrinas .....	111
• Calicreína 1 (KLK1).....	114
• Trombospondina 1 (TSP1).....	117
DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 2 .....	119
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Potencial terapéutico de péptidos análogos de TSP1 en prolactinomas experimentales inducidos por estrógenos.....</b>	<b>131</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 3.....	132
Angiogénesis .....	132
Angiogénesis en adenomas hipofisarios.....	133
Terapias antiangiogénicas.....	135
Trombospondina 1.....	136
Péptidos sintéticos análogos de TSP1.....	138
TSP1 en hipófisis .....	138
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3.....	139
Diseño experimental.....	140
RESULTADOS DEL CAPÍTULO 3 .....	141
Efecto de los análogos sintéticos de TSP-1 sobre el crecimiento tumoral .....	141
Efecto de ABT-510 y ABT-898 sobre la angiogénesis en los prolactinomas .....	143
Efecto de ABT-510 y ABT-898 sobre el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario .....	146
Efecto de ABT-510 a tiempos cortos sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 hipofisario.....	148
DISCUSIÓN DEL CAPITULO 3 .....	152
CONCLUSIONES FINALES.....	157
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	161

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrófica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>ALK</b>	Quinasa similar al receptor de activina (por <i>Activin receptor-like-kinase</i> )
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato ciclica
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta a estrógenos
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>c.p.m.</b>	Cuentas por millón
<b>Caberg</b>	Cabergolina
<b>CD-31</b>	<i>Cluster</i> de diferenciación 31
<b>CT</b>	ciclo umbral
<b>DAB</b>	3, 3'-diaminobenzidina
<b>DES</b>	Dietilestilbestrol
<b>DMEM</b>	Medio mínimo esencial de Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>DMV</b>	Densidad microvascular
<b>dNTP</b>	Deoxirribonucleotidos trifosfato
<b>Drd2<sup>-/-</sup></b>	Ratón <i>knock out</i> para el receptor D2
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EA</b>	Albúmina de huevo
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetra-acético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos
<b>ES</b>	Error estándar
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>FSH</b>	Hormona estimulante de folículos
<b>g</b>	Gramos
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rabanito
<b>hs</b>	Horas
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina gamma

<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>KLK-1</b>	Calicreína 1
<b>ko</b>	<i>Knock out</i>
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>LLC</b>	Complejo Latente mayor ( <i>por Large latent complex</i> )
<b>LTBP</b>	Proteína de unión a TGF- $\beta$ latente ( <i>por Latent TGF<math>\beta</math> binding protein</i> )
<b>mA</b>	Mili Ampere
<b><math>\mu</math>Ci</b>	Micro Curie
<b>ME</b>	Matriz extracelular
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial
<b>mg</b>	Miligramo
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b>min</b>	Minutos
<b><math>\mu</math>l</b>	Microlitro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrómetro
<b>MMP</b>	Metaloproteasa de la matriz
<b>MT1-MMP</b>	MMP con dominio transmembrana 1
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento neural
<b>NIH</b>	Instituto nacional de la salud de los Estados Unidos
<b>NRS</b>	Suero normal de conejo
<b>NS</b>	No significativo
<b>OVX</b>	Ovariectomía
<b>PAI</b>	Inhibidor del activador de plasminógeno
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	<i>Buffer</i> fosfato salino
<b>PBS-T</b>	PBS con <i>Tween</i> 0.05%
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PHDA</b>	Neuronas peri ventricular hipofisarias dopaminérgicas
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PMS</b>	Metosulfato de fenazina
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PSMAD</b>	SMAD fosforilada
<b>RD1</b>	Receptor de dopamina D1
<b>RD2</b>	Receptor de dopamina D2
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto

<b>s.c.</b>	Subcutáneo
<b>SD</b>	Sprague dawley
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SLC</b>	Complejo Latente menor (por <i>small latent complex</i> )
<b>SMAD</b>	<i>small mothers against decapentaplegic</i>
<b>Sulp</b>	Sulpiride
<b>T.amb.</b>	Temperatura ambiente
<b>T<math>\beta</math>RII</b>	Receptor de TGF- $\beta$ tipo II
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>THDA</b>	Neuronas tuberohipofisarias dopaminérgicas
<b>TIDA</b>	Neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas
<b>TMB</b>	3, 3',5 ,5'-Tetrametilbencidina
<b>TMEPAI</b>	Proteína transmembrana activada por andrógenos
<b>TRH</b>	Hormona liberadora de tirotropina
<b>TSP1</b>	Trombospondina 1
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>uPA</b>	Activador de plasminógeno tipo urokinasa
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VIP</b>	Peptido intestinal vasoactivo
<b>Vs.</b>	Versus
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>Wt</b>	<i>Wild-type</i> (salvaje)

# INTRODUCCIÓN GENERAL



## ***Eje hipotálamo - hipofisario***

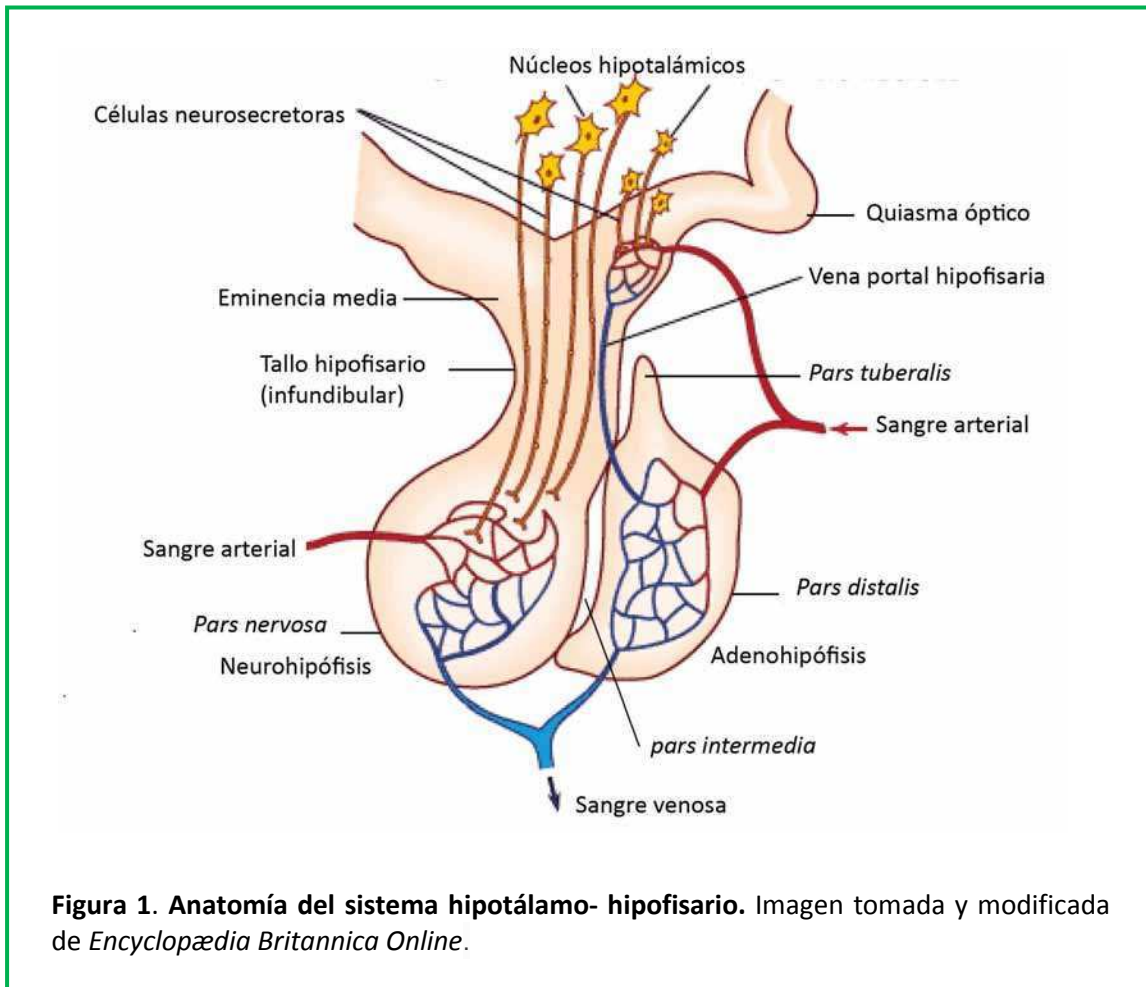
El sistema hipotálamo-hipofisario tiene un papel central en la integración de señales provenientes del medio externo e interno y en la elaboración de respuestas apropiadas, mediante la liberación de hormonas o neurohormonas que regulan, a su vez, la función de los órganos blanco, controlando procesos tan diversos como el crecimiento, la reproducción, el balance hídrico y el metabolismo energético, entre otros.

La hipófisis, en mamíferos, es una pequeña glándula que se encuentra en la base del cerebro, sobre la depresión del hueso esfenoides del cráneo, conocida como “silla turca”, debido a su forma semejante a una silla de montar. Está conformada por dos lóbulos, el lóbulo anterior o adenohipófisis, y el lóbulo posterior o neurohipófisis (Figura 1).

La neurohipófisis incluye la *pars nervosa*, el tallo infundibular y la eminencia media. La *pars nervosa* está formada por el conjunto de terminales axonales de las neuronas secretoras que se encuentran en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo. Estas neuronas sintetizan las neurohormonas oxitocina y vasopresina, las cuales son transportadas por los axones que atraviesan el tallo infundibular terminando en la hipófisis posterior donde son almacenadas y finalmente secretadas frente a estímulos específicos.

El lóbulo anterior puede dividirse en tres partes: la *pars distalis*, que constituye el 80% de la glándula, la *pars intermedia* que, aunque rudimentaria en humanos, en otras especies tiene mayor tamaño y función y la *pars tuberalis*.

Las funciones endócrinas de la glándula son llevadas a cabo por seis tipos celulares ubicados en la adenohipófisis. Estos tipos celulares se encuentran definidos de acuerdo a la hormona que producen y secretan: los corticotropos productores de hormona adrenocorticotrófica (ACTH), los tirotropos que secretan hormona tiroideo-estimulante (TSH), los somatotropos que producen hormona de crecimiento (GH), los lactotropos productores de prolactina (PRL), los gonadotropos secretores de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), y los melanotropos específicos del lóbulo intermedio que secretan la hormona melanocito-estimulante (MSH). Otro tipo celular presente en la glándula son las células folículo estrelladas, no secretoras de hormonas, pero que sintetizan numerosos factores con funciones autócrinas, y parácrinas (1).



El hipotálamo controla la función hormono-secretora de las células adenohipofisarias mediante la liberación de factores, en su mayoría neuropéptidos y monoaminas, que regulan positiva o negativamente la secreción de las diferentes hormonas.

Estos factores son sintetizados en las células neurosecretoras de los distintos núcleos hipotálámicos, y luego son liberados a nivel de la eminencia media, donde las terminales nerviosas se conectan con los capilares de tipo sinusoidales que forman el sistema de circulación portal hipotálamo-hipofisario (Ver esquema en la Figura 1) (2). Este sistema portal permite una comunicación fluida y directa entre el hipotálamo y la hipófisis (3).

De particular interés para esta tesis resultan los lactotopos, las células especializadas en la secreción de PRL, de modo que nos centraremos en el estudio de la regulación de este tipo celular.

## ***Prolactina (PRL)***

La prolactina es una hormona proteica, identificada hacia 1930 por Riddle y colaboradores, quienes le dieron su nombre originalmente debido a su acción de promover la lactación en respuesta a estímulos de succión en animales (4). Si bien su principal función en mamíferos es la de estimular el crecimiento y desarrollo de las glándulas mamarias y la lactogénesis durante la preñez, hoy se sabe que la PRL tiene numerosas y diversas funciones que varían entre las distintas especies. Entre ellas se pueden mencionar funciones reproductivas, control del crecimiento, del balance osmótico y del sistema inmune, entre otras (5).

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 de estos estímulos son traducidos por el hipotálamo, desde donde se regula en gran parte la secreción de esta hormona por parte de los lactotropos.

## ***Regulación de la función de los lactotropos***

Los lactotropos presentan la característica única entre las células endocrinas, de tener una elevada actividad secretoria intrínseca. Es por ello que la regulación hipotalámica de la secreción de PRL es predominantemente inhibitoria, mediada por la **dopamina**.

La principal fuente de dopamina hipotalámica que llega a la adenohipófisis proviene de las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas (TIDA), cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el núcleo arcuato, y sus axones llegan hasta la eminencia media, donde descargan la dopamina sobre los capilares del sistema porta hipofisario. Otra fuente de dopamina la constituyen las neuronas tuberohipofisarias dopaminérgicas (THDA) y periventricular-hipofisarias dopaminérgicas (PHDA), que inervan el lóbulo neural y el lóbulo

intermedio. Desde allí, la dopamina llega a la adenohipófisis a través de los vasos portales cortos.

La dopamina, a través de la unión al receptor dopaminérgico D2 (RD2), ejerce un potente efecto inhibitorio, no sólo sobre la síntesis y secreción de PRL, sino también sobre la proliferación de los lactotopos (6;7). Es así como los ratones *knock-out* (ko) con delección del RD2 (*Drd2*<sup>-/-</sup>) desarrollan hiperplasia de lactotopos e hiperprolactinemia (8).

El RD2 es uno de los 5 subtipos de receptores de dopamina (D1-D5), pertenecientes a la superfamilia de receptores de siete pasos transmembrana, acoplados a proteínas G. En particular el RD2 se acopla a la subunidad G<sub>αi/o</sub> (9).

Existen dos isoformas del RD2 generadas por *splicing* alternativo: la isoforma corta D2S y la larga D2L. Ambas difieren en la secuencia del dominio intracelular, por lo cual utilizan distintas vías de señalización y tendrían diferentes funciones en la hipófisis. Se demostró que los ratones que sobre-expresan la isoforma D2S presentan un drástico descenso de los niveles de PRL, mientras que aquellos que sobre-expresan la isoforma D2L por el contrario, poseen elevados niveles de la hormona (10).

Los mecanismos exactos por los cuales la dopamina inhibe la función lactotropa no se encuentran del todo elucidados, sin embargo, hay varias líneas de evidencias que indican distintos efectos intracelulares de la dopamina a través del RD2:

- Aumento del influjo de K<sup>+</sup>, causando una hiperpolarización de la membrana que inactiva los canales de calcio dependientes de voltaje, y consecuentemente inhibe la secreción de los gránulos conteniendo PRL (11).
- Inhibición de la actividad de la enzima adenilil-ciclasa, causando una disminución de los niveles de AMPc y de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) que regula la síntesis de PRL (12).
- Inhibición de la producción de inositol trifosfato, que conduce también a la disminución de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

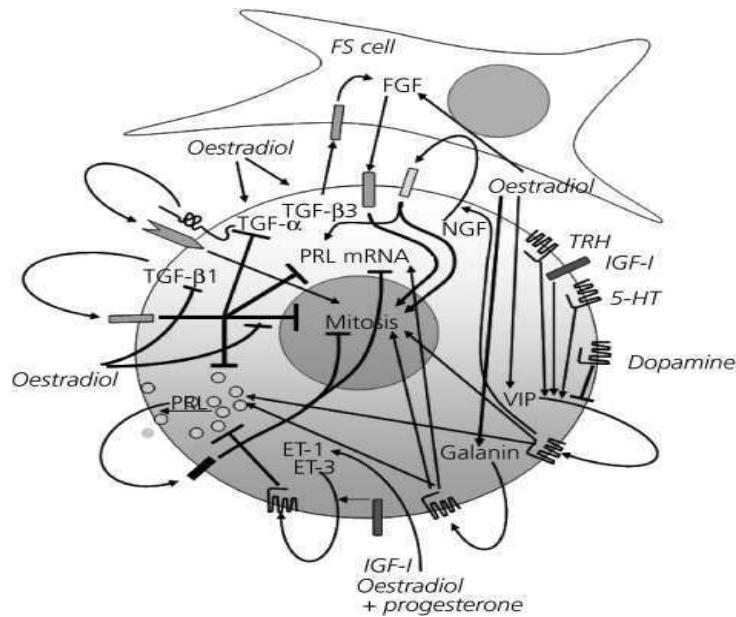
Estas vías de señalización inhiben, en diferentes cursos temporales, la síntesis y secreción de PRL (13).

Por otro lado, la misma PRL ejerce un control negativo sobre su propia secreción, provocando un aumento en el tono dopaminérgico, mediante una retroalimentación sobre las neuronas TIDA, donde altera la expresión y actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de dopamina (14).

Si bien el principal control hipotalámico de la secreción de prolactina es inhibitorio, éste se encuentra balanceado por diversos factores estimuladores, algunos liberados por el hipotálamo, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la oxitocina; y otros provenientes de órganos periféricos, como los estrógenos ováricos.

Los estrógenos (E2) son potentes estimuladores de todas las funciones del lactotrofo actuando a diferentes niveles. A nivel hipofisario: aumentan la proliferación de los lactotrofos, favorecen la conversión de somato-mamotrofos a lactotrofos puros, aumentan la síntesis de prolactina por activación génica, y modifican la sensibilidad a diferentes activadores e inhibidores fisiológicos de la secreción de PRL (*e.g* aumentan la expresión de receptores de TRH y disminuyen la expresión del RD2). A nivel hipotalámico, los estrógenos inhiben la actividad de las neuronas TIDA (5). Las acciones estrogénicas son claramente contrarias a las de la dopamina, y del balance entre ambos factores depende en gran parte la regulación de los lactotrofos.

A su vez, también existe una regulación parácrina y autócrina de la función de los lactotrofos mediada por una gran variedad de factores intrahipofisarios. Alguno de los mecanismos autócrinos reportados corresponden a la PRL misma, VIP, galanina, endotelina y diversos factores de crecimiento tales como: TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 y FGF-2 (Figura 2). Estos mecanismos en muchos casos se encuentran interconectados derivando en una fuerte auto-estimulación que se evidencia en la alta síntesis constitutiva de PRL por los lactotrofos en cultivo, donde los mismos están libres de regulación exógena (15).



**Figura 2:** Representación esquemática de los distintos factores que actúan sobre los lactotiros de manera autocrina o paracrina. →, efecto estimulador; ⊥, efecto inhibitorio; ET, endotelina; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; IGF, factor de crecimiento insulina-simil; NGF, factor de crecimiento neural; PRL, prolactina; TGF, factor de crecimiento transformante; VIP, péptido intestinal vasoactivo. Tomado de C. Deneff, 2008 (15).

Todos estos mecanismos de regulación mencionados convergen simultáneamente sobre los lactotiros, y a su vez son sensibles de ser regulados por otros factores. El balance entre todos ellos determinará la actividad secretora y proliferativa final de estas células en una condición y momentos determinados. Esta regulación fina y la participación de tantos factores no resultan llamativas si se tiene en cuenta que los lactotiros, a diferencia de la mayoría de las células adenohipofisarias que son más bien quiescentes, mantienen en la adultez una alta tasa de proliferación. Ejemplo de ello son el incremento en el número de lactotiros durante el estro, la preñez y la lactancia.

El correcto funcionamiento de estos mecanismos resulta de suma importancia para mantener la homeostasis de la glándula, dado que la proliferación descontrolada de los lactotiros resulta en la formación de prolactinomas, los adenomas hipofisarios más frecuentes.

## ***Adenomas hipofisarios***

Los adenomas hipofisarios son los neoplasmas intracraneales primarios más comunes. Corresponden aproximadamente al 15% de todos los tumores del cerebro y del sistema nervioso central (SNC) (16), presentan un pico de incidencia más temprano en mujeres (20-45 años) respecto de hombres (35-60 años), y son muy poco frecuentes en niños (17). A partir de estudios realizados en autopsias se ha visto que alrededor del 20% de la población presenta evidencias patológicas de un adenoma hipofisario, y alrededor de un 40% de estos tejidos presentan un elevado porcentaje de lactotropos (18).

La mayoría de los tumores hipofisarios crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos porque muy raramente desarrollan metástasis. En general permanecen dentro de la silla turca aunque también pueden crecer en forma expansiva hacia los tejidos vecinos, y estos tumores, aunque invasivos, no se consideran malignos, incluso cuando hay invasión de duramadre. Se definen como verdaderos carcinomas sólo en presencia de metástasis cráneo-espinal y/o sistémica, y éstas son raras, con una incidencia de menos del 0,5% de los tumores hipofisarios (19).

A pesar de ser benignos, estos tumores traen aparejadas severas complicaciones clínicas, debido al desbalance de la secreción hormonal o al efecto de masa del tumor que puede causar daño por compresión en los tejidos adyacentes. Esto último puede generar cefaleas, problemas visuales y neurológicos, así como también un hipopituitarismo debido a la disrupción de la comunicación hipotálamo-hipofisaria. Estos síntomas dependen, en gran medida, del tamaño del tumor, parámetro utilizado como criterio de clasificación en microadenomas (< 10 mm) o macroadenomas (> 10 mm) (20).

Los adenomas hipofisarios pueden derivar de la proliferación descontrolada de cualquiera de los tipos celulares secretores de la hipófisis anterior, y también se clasifican según el tipo de hormona que producen. Dentro de esta clasificación se encuentran los prolactinomas, adenomas secretores de prolactina, (21), cuyas características se describen en la próxima sección, dado que son el motivo de estudio de esta tesis. Otros adenomas hipofisarios secretores de hormonas (o funcionantes), son los corticotropinomas,

somatotropiomas, gonadotropinomas, tiotropinomas. Además se pueden presentar adenomas no funcionantes, es decir, aquellos que no presentan secreción hormonal, que, en general son gonadotropinomas.

### ***Prolactinomas***

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes en la clínica (alrededor de un 40%), y se caracterizan por presentar una hiperplasia e hipertrofia de lactotrofos, y una secreción excesiva de PRL.

La incidencia de los prolactinomas varía con la edad y entre los sexos, siendo más frecuentes en mujeres que en hombres en la segunda y tercera década de edad (período fértil), mientras que luego de los 50 años, no hay diferencias entre los sexos (22).

En general las mujeres presentan microprolactinomas al momento del diagnóstico, mientras que en los hombres es más frecuente la presentación de macroprolactinomas que tienden a ser más agresivos. Se cree que estas diferencias están relacionadas con la detección precoz en las mujeres, debido a que las manifestaciones clínicas de la hiperprolactinemia (amenorrea, galactorrea, infertilidad) son más evidentes y llevan a una consulta médica temprana. En los hombres en cambio, la galactorrea es rara y los síntomas de hipogonadismo como consecuencia de la secreción excesiva de PRL, tales como impotencia y disminución de libido, son en general ignorados o de consulta médica más tardía.

### **Tratamientos**

Los prolactinomas conservan en general, la capacidad de respuesta a la acción inhibitoria de la dopamina, por lo cual son tratados efectivamente con agonistas dopaminérgicos del RD2, y en la mayoría de los casos no hace falta la extirpación quirúrgica (23). Los agonistas dopaminérgicos se han convertido en la droga estándar y representan el tratamiento de primera línea para todos los prolactinomas, incluso para macroprolactinomas que presentan efectos de masa.



La bromocriptina, un derivado de la ergolina que actúa como agonista del RD2 y antagonista del RD1, fue la primera droga utilizada clínicamente con buenos resultados. Recientemente se ha reemplazado por la cabergolina, un agonista específico del RD2, de mayor potencia y duración. Comparando ambos agonistas dopaminérgicos, la cabergolina resulta más eficiente en cuanto a la recuperación de los niveles de PRL normales y de ciclos ovulatorios, y posee efectos secundarios menos frecuentes y menos severos que la bromocriptina (24).

Otros agonistas dopaminérgicos utilizados en la clínica son el pergolide y el quinagolide, este último no derivado de la ergolina. Estas drogas parecen tener la misma eficacia que la bromocriptina, pero aún se tiene poca experiencia en su uso (25).

### ***Prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (DARPs)***

A pesar de que, en general existe una buena respuesta a los agonistas dopaminérgicos, aproximadamente un 10-15% de los tumores no responden al tratamiento, y se consideran prolactinomas resistentes. Para estos casos **no existen terapias médicas alternativas** al día de la fecha, siendo la única alternativa de tratamiento la extirpación del tumor mediante cirugía transeptoefenoidal o transcraneal (dependiendo el tamaño del tumor). En el caso de tumores con elevado índice de crecimiento, en los cuales falla la cirugía o presentan recidivas post quirúrgicas, se lleva a cabo un tratamiento con radioterapia.

No hay un claro consenso en la literatura sobre la definición de los verdaderos DARPs. En general la respuesta de los tumores a los diferentes agonistas dopaminérgicos es bastante variable, e incluso algunos tumores pueden ser resistentes a una clase de agonista y no a otra. La resistencia puede estar definida en términos de la incapacidad de normalizar los niveles de PRL sérica, o de reducirlos a niveles que permitan la ovulación, o bien a la incapacidad de reducir el tamaño tumoral en diferentes porcentajes. Tampoco hay consenso sobre cuál es la dosis máxima de agonista a la cual considerar a los tumores como resistentes (26).

Los mecanismos moleculares relacionados con el escape al control dopaminérgico en los DARPs no se encuentran del todo caracterizados. El principal candidato a encontrarse alterado es el RD2, sin embargo, hasta el momento no se encontraron mutaciones puntuales en este gen en los prolactinomas resistentes estudiados.

Existen evidencias de una reducción en la densidad del RD2, a través de la determinación del número de sitios de unión de dopamina (27), y de una reducción de 4 veces de la expresión del RD2 en prolactinomas resistentes a bromocriptina (28). Otros mecanismos reportados asociados a las vías de señalización de dopamina incluyen la reducción en la expresión de ARNm de la subunidad de la proteína G inhibitoria  $G_{\alpha i2}$  (29); y la reducción en la expresión del receptor del factor de crecimiento neural (NGFR) que afecta indirectamente la señalización del RD2 (30). Por último, se han realizado varios estudios histológicos en los DARPs en los que se observó un incremento en la angiogénesis (31), presencia de atipia celular (células agrandadas multinucleares o con núcleos irregulares), aumento en la proliferación celular y una mayor invasividad (32).

**La ausencia de terapias alternativas para estos tumores resistentes pone en evidencia la necesidad de profundizar el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la formación de los prolactinomas y a la pérdida del control dopaminérgico, en búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.**

### ***En búsqueda de terapias alternativas para prolactinomas resistentes***

Desde hace muchos años se postula que los tumores hipofisarios resultan de defectos genéticos intrínsecos, seguidos de un crecimiento monoclonal (33). Sin embargo, sólo han sido identificadas mutaciones puntuales en un bajo porcentaje de los mismos, y los mecanismos involucrados en el proceso de tumorigénesis hipofisaria aún no se conocen en profundidad.

Por otro lado, al igual que en el desarrollo de otros tumores, durante la formación de los prolactinomas se produce, en forma concomitante, una marcada angiogénesis y profundos cambios en la estructura de los componentes de la matriz extracelular. Al

respecto ha sido reportado que las fibronectinas, las integrinas y la laminina se encuentran diferencialmente expresadas en hipófisis normales y tumorales, y que, en adenomas hipofisarios humanos, es alta la expresión y actividad de las metaloproteasas (MMPs) en correlación con la baja expresión de sus inhibidores endógenos (34-36). Estas características resultan llamativas si se considera que en general los tumores hipofisarios son tumores benignos y no metastásicos, dado que la alta expresión de MMPs se correlaciona con un fenotipo invasivo y metastásico en distintos tipos tumorales.

En el último tiempo ha cobrado mayor interés el estudio de la desregulación de factores de crecimiento locales y su relación con distintos componentes de la matriz extracelular como responsables del aumento en la proliferación celular en adenomas hipofisarios (34;37).

En este contexto, el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) resulta de particular interés debido a su efecto inhibitorio sobre la función de los lactotrofos y a su capacidad de responder frente a perturbaciones de la ME.

Recientemente se ha descrito que la inhibición de la proliferación de lactotrofos, ejercida por la dopamina a través del RD2, **es mediada en parte por TGF- $\beta 1$**  (38). Siendo la dopamina el principal inhibidor de la actividad de los lactotrofos, y TGF- $\beta 1$  un candidato a mediar dicha acción, **nuestra hipótesis de trabajo postula al sistema TGF- $\beta 1$  hipofisario como posible blanco terapéutico para el tratamiento de prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas.**

## ***Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)***

La superfamilia TGF- $\beta$  engloba un gran número de factores de crecimiento y diferenciación, relacionados estructuralmente entre sí y conservados a lo largo de la evolución (39). Los miembros de esta familia incluyen a los factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ s), las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), activinas, inhibinas, los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y la hormona antimulleriana (AMH), entre otros. Están involucrados en una gran variedad de funciones celulares durante la embriogénesis, el desarrollo y en la homeostasis de tejidos adultos, razón por la cual los distintos miembros de esta familia han sido ampliamente estudiados (40).

Existen tres isoformas de TGF- $\beta$  en mamíferos, codificadas por genes diferentes: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Si bien presentan un alto grado de homología en sus secuencias (entre un 60 y 80%) y tienen efectos similares *in vitro*, las tres isoformas difieren en sus funciones *in vivo*, solapándose solo parcialmente. La importancia de los TGF- $\beta$ s durante el desarrollo embrionario queda claramente evidenciada en los fenotipos letales de los ratones *knock-out* para cada una de las isoformas, lo cual indica que sus funciones no son redundantes (41-43).

TGF- $\beta$ 1 es el miembro prototípico de la familia y es la isoforma más abundante en mamíferos. Esta potente citoquina participa en la regulación del ciclo celular, en la apoptosis, la angiogénesis, la biosíntesis de componentes de la matriz extracelular, en la modulación del sistema inmune y respuesta inflamatoria, entre otros procesos (44). Su acción es muy dependiente del tipo celular, del estado de diferenciación celular y de la interacción con otras citoquinas (45). Es así como se le han descrito funciones contrapuestas en distintos modelos o en diferentes estadios de la misma enfermedad. En general TGF- $\beta$ 1 actúa como un inhibidor de la proliferación en células epiteliales normales y en los primeros estadios de la progresión tumoral. Sin embargo, debido a la importancia de los procesos que regula, pequeñas perturbaciones sobre la acción de TGF- $\beta$ 1 han sido asociadas a procesos tumorigénicos, inflamatorios y autoinmunes (46;47). Por todo lo mencionado, TGF- $\beta$ 1 resulta un atractivo blanco terapéutico en el tratamiento de estos desórdenes (48).

## ***El sistema TGF- $\beta$ 1***

La regulación de la actividad biológica de TGF- $\beta$ 1 involucra un mecanismo intrincado, y esto probablemente se deba a que tanto la citoquina como sus receptores se encuentran ampliamente expresados en tejidos muy diversos. Por lo tanto un ajustado control local de la actividad y de la especificidad de acción resulta de suma importancia en este sistema.

TGF- $\beta$ 1, al igual que las otras isoformas de TGF- $\beta$ , es secretado por la mayoría de las células en forma latente y permanece inactivo almacenado en la matriz extracelular (ME). Se denomina “activación” de TGF- $\beta$  al proceso por el cual la citoquina es liberada de sus complejos latentes para poder ejercer su acción biológica al unirse a sus receptores en las células blanco.

**El mecanismo de activación de TGF- $\beta$  en la matriz extracelular es un proceso finamente regulado del cual depende en gran parte, la adecuada función biológica de la citoquina.**

A lo largo de esta tesis nos referiremos al “sistema TGF- $\beta$ 1” como al conjunto de los distintos componentes que participan en la regulación de la actividad biológica de esta citoquina, incluyendo su síntesis, ensamblaje en complejos latentes, secreción, activación en la ME, sus receptores y efectores intracelulares.

Descripción del sistema:

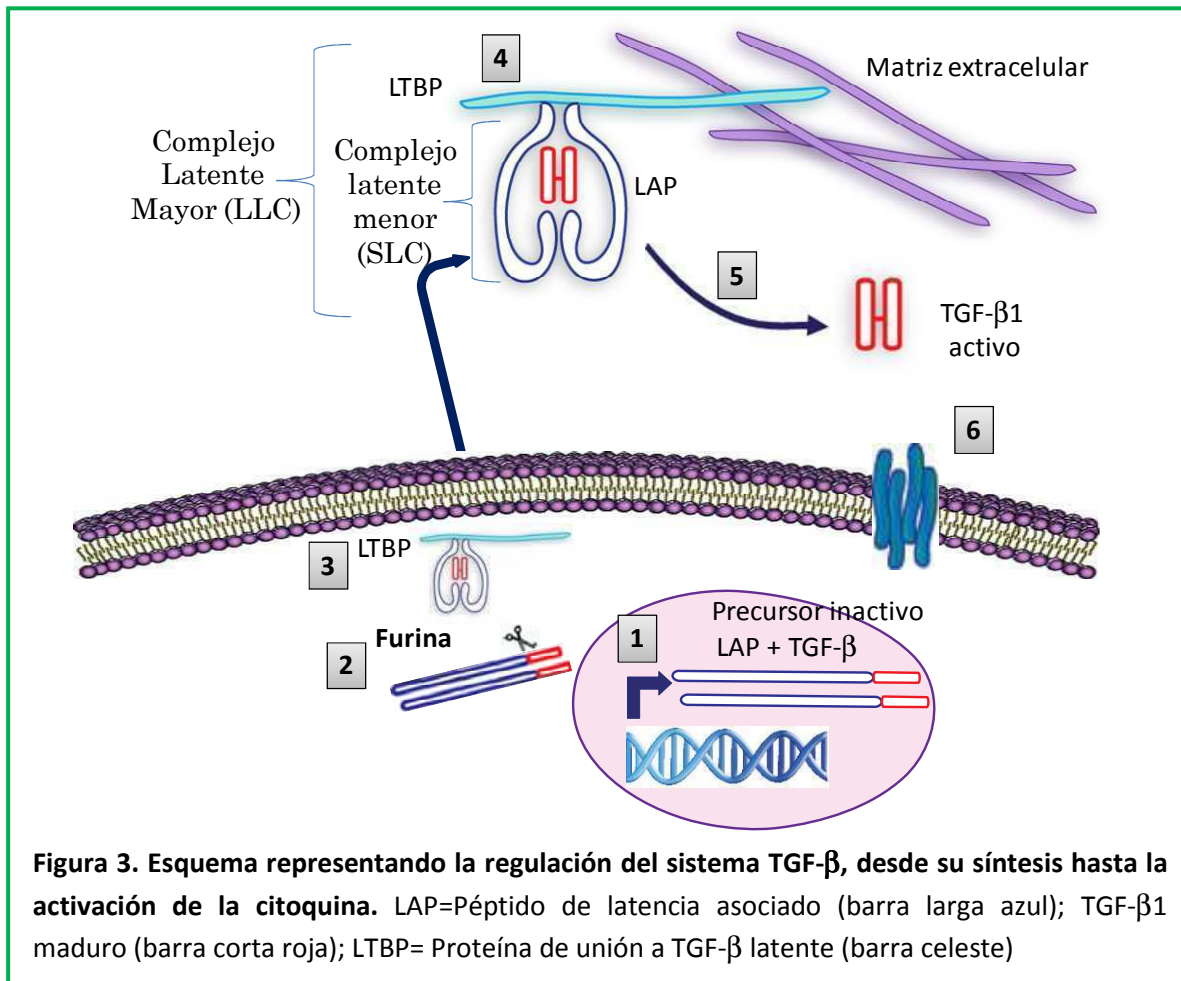
- **Síntesis de TGF- $\beta$  y ensamblaje del complejo latente**

Las diferentes isoformas de TGF- $\beta$  son sintetizadas como precursores inactivos que contienen el péptido de latencia asociado (LAP) unido a la citoquina madura (Figura 3, 1). Esta unión es procesada por la enzima furina en el aparato de Golgi (49) (Figura 3, 2); sin embargo, luego del clivaje, TGF- $\beta$  se mantiene fuertemente unido a LAP mediante interacciones no covalentes, formando el complejo latente menor o SLC (por *small latent complex*) (50). **La unión a LAP es suficiente para conferirle latencia a TGF- $\beta$ .**

A su vez, antes de ser secretado, el SLC se asocia a otra proteína, producto de un segundo gen, llamada proteína de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBP). Esta unión se da a través de puentes disulfuro entre residuos cisteína presentes en LAP y en LTBP (51), y se forma así el denominado complejo latente mayor o LLC (por *Large Latent Complex*) (Figura 3, 3). El LLC, una vez secretado por las células permanece almacenado en la ME a través de uniones covalentes entre las LTBPs y distintas fibras de la matriz (Figura 3, 4).

En mamíferos hay cuatro isoformas de LTBPs (LTBP1-4), de las cuales sólo LTBP1, LTBP3 y LTBP4 se asocian a LAP. Estas proteínas pertenecen también a la familia de las fibrilinas, otras proteínas de la ME con las cuales comparten homología de secuencias (52). Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la interacción de LTBP con TGF- $\beta$  latente es fundamental para el correcto plegamiento y secreción del complejo (53). Además son importantes mediadoras de la disponibilidad extracelular de TGF- $\beta$ , favoreciendo no sólo su secreción sino también su localización en la ME y participando también de su activación (54-57).

Como mencionamos, luego de su secreción TGF- $\beta$  permanece inactivo, anclado a la ME, y la liberación de la citoquina de sus complejos latentes representa un paso clave en la regulación de su actividad biológica (Figura 3, 5) (50;52). Es así como en la mayoría de los tejidos, sólo una pequeña proporción de TGF- $\beta$  se encuentra en estado activo.



- **Activación de TGF- $\beta$ 1**

Han sido descriptos diversos mecanismos de activación de TGF- $\beta$ 1, que involucran a un variado grupo de moléculas “activadoras”, es decir, capaces de disociar a TGF- $\beta$  de sus complejos latentes (50), (58). La característica común a todas ellas es que, en general, responden a perturbaciones en la ME. De esta manera, el proceso de remodelación de la matriz se auto-regularía, dado que TGF- $\beta$ 1 tiene un rol crucial en el mantenimiento de la integridad y estabilidad de la ME (59).

Entre los mecanismos de activación reportados se pueden mencionar:

- Activación por proteasas: tanto las LTBP como LAP presentan secuencias sensibles de ser procesadas proteolíticamente y este mecanismo favorece la desestabilización de los complejos latentes. Varias proteasas se identificaron *in vitro* como activadoras

de TGF- $\beta$ 1 latente, entre ellas la plasmina (60), MMP2 (61), MMP9 (62), MT1-MMP, ADAMTS1, calicreínas (KLK) y catepsina D.

- Activación por Trombospondina 1 (TSP1): este es uno de los pocos mecanismos identificados *in vivo*. TSP1 interactúa directamente con LAP modificándole su conformación, permitiendo así la liberación de TGF- $\beta$ 1 (63). Los ratones con depleción del gen TSP1 presentan una superposición parcial de fenotipos con los ratones ko para TGF- $\beta$ 1, reforzando la idea de que TSP1 es un activador de TGF- $\beta$ 1 *in vivo* (64).
- Activación por integrinas: también identificado *in vivo*, este mecanismo involucra una interacción directa de las integrinas con LAP por reconocimiento de una secuencia específica, RGD, presente en este último. La mutación del sitio de unión a RGD en las integrinas recapitula el fenotipo causado por la mutación de TGF- $\beta$ 1, indicando una importante función de estas moléculas en la activación de la citoquina (65). Dos de las integrinas identificadas como capaces de activar TGF- $\beta$ 1 son la  $\alpha$ v $\beta$ 6 (66) y la  $\alpha$ v $\beta$ 8 (67).
- Otros mecanismos: las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas durante el estrés oxidativo, son también capaces de activar TGF- $\beta$ 1. En particular se estudió más en detalle el efecto de la radiación ionizante sobre la activación de la citoquina en la glándula mamaria (68;69). Por otro lado, la acidificación del pH (pH < 4) *in vitro* libera a TGF- $\beta$  de sus complejos latentes, posiblemente debido a la desnaturalización de LAP. Este mecanismo podría ser relevante en la activación del TGF- $\beta$ 1 latente depositado en la matriz ósea por los osteoblastos, ya que durante el proceso de resorción ósea por parte de los osteoclastos se genera un pH ácido en este tejido (70;71).

De todos estos mecanismos mencionados se desconoce en general la relevancia relativa de cada uno *in vivo*. En cada tejido la activación parece darse por mecanismos diferentes, tejido-específicos, y no se conoce tampoco cómo se encuentran regulados.

En particular en la hipófisis, si bien la expresión y función de TGF- $\beta$ 1 han sido investigadas durante varias décadas, hasta el momento ningún trabajo aborda el estudio de



los mecanismos de activación a nivel local, ni la relevancia de los mismos en la patogénesis hipofisaria.

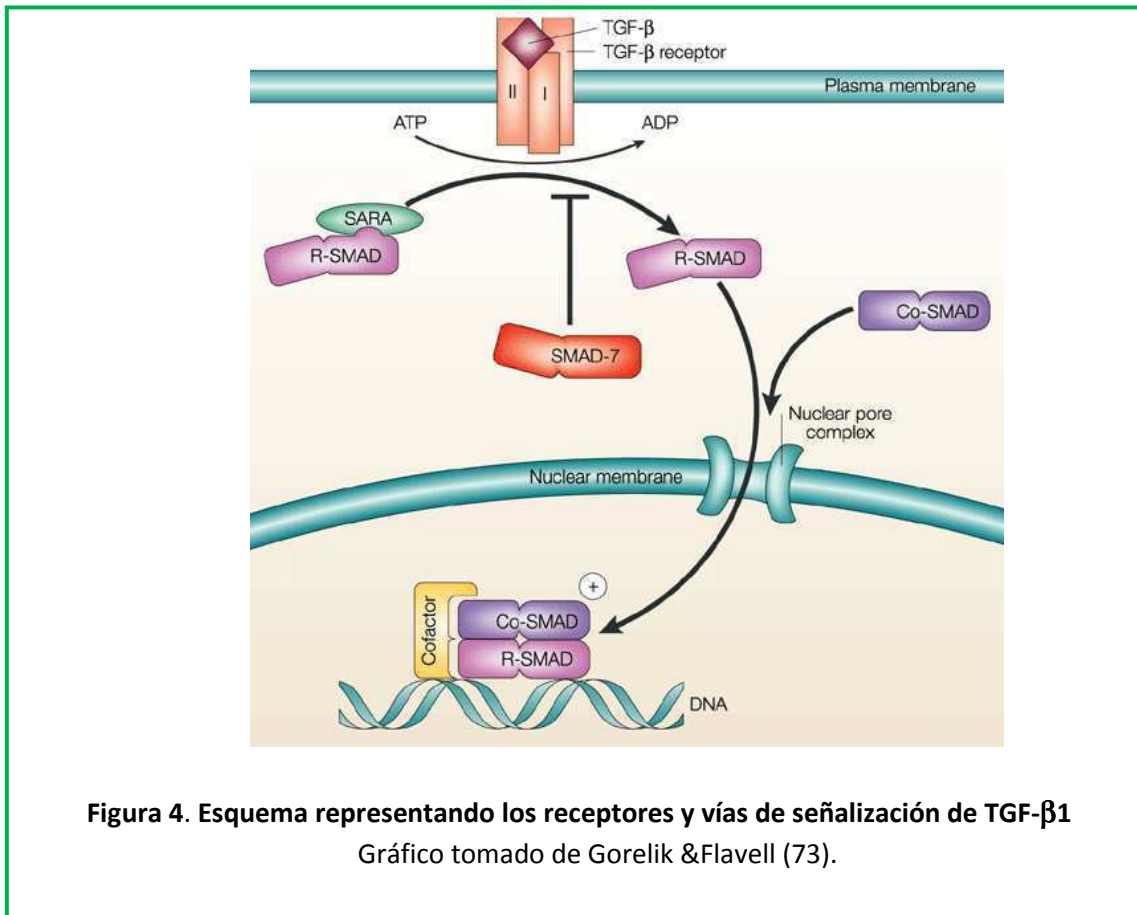
- **Receptores y efectores intracelulares**

Una vez liberado de sus complejos latentes, TGF- $\beta$ 1 se une a sus receptores de membrana para ejercer su efecto biológico en las células blanco (Figura 3, 6).

El receptor de TGF- $\beta$ 1 es un complejo heterodimérico compuesto por dos tipos de receptores transmembrana con actividad serin/treonin quinasa: el receptor tipo I (T $\beta$ RI), también llamado ALK (por *Activin receptor-like kinase*) y el receptor tipo II (T $\beta$ RII) (ver revisión en (44)). TGF- $\beta$ 1 activo se une primero al T $\beta$ RII, que se encuentra constitutivamente fosforilado, y éste luego recluta al T $\beta$ RI (ver esquema en Figura 4). Esta unión permite que el T $\beta$ RII trans-fosforile y active al T $\beta$ RI en su dominio citoplasmático confiriéndole la actividad quinasa que inicia la vía de señalización hacia el núcleo a través de la fosforilación de las proteínas SMAD (por *small mothers against decapentaplegic*) que regulan la transcripción de los genes blanco de TGF- $\beta$ 1.

La vía de las SMADs es compartida por los miembros de la familia TGF- $\beta$ , la especificidad de acción está dada por la activación de distintos tipos de SMADs según el tipo de receptor que se active. Hay diferentes clases de proteínas SMAD: las R-SMADs (SMADs activadas por receptor) que son fosforiladas en respuesta a la activación de los receptores, a esta clase pertenecen SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8. Las R-SMADs se asocian a una única co-SMAD, **SMAD4**, formando un complejo que transloca al núcleo y recluta otros factores necesarios para la activación de la transcripción. La tercera clase de SMADs son las inhibitorias, o I-SMADs (SMAD6 y SMAD7), las cuales compiten con las R-SMAD por la unión a SMAD4, impidiendo la formación del complejo que activa a los genes blanco (Figura 4).

En la mayoría de las células, el subtipo de T $\beta$ RI al cual se une TGF- $\beta$ 1 es ALK5, y señala a través de la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 (72). Específicamente, en células endoteliales, TGF- $\beta$ 1 puede activar tanto a ALK5 como a ALK1, éste último señala a través de SMAD1.



**Figura 4. Esquema representando los receptores y vías de señalización de TGF-β1**  
Gráfico tomado de Gorelik & Flavell (73).

Además, existen otros receptores accesorios denominados tipo III: betaglicano y endoglina. Los receptores tipo III no poseen dominios quinasa, pero son capaces de unirse a los TβRI y TβRII y regular la señalización del TGFβ (74).

### ***TGF-β1 en hipófisis***

TGF-β1 ha sido descrita como un factor inhibitorio de la proliferación de los lactotopos y de la secreción de PRL *in vitro* (75). Tanto la citoquina como su receptor tipo II (TβRII) se expresan en los lactotopos (76). Las células folículo estrelladas son otra fuente de TGF-β1 hipofisario (77).

De particular interés resulta que, dopamina y estradiol, los principales factores reguladores de la función del lactotopo, modulan también la síntesis hipofisaria de TGF-β1:

**- Dopamina y TGF- $\beta$ 1:**

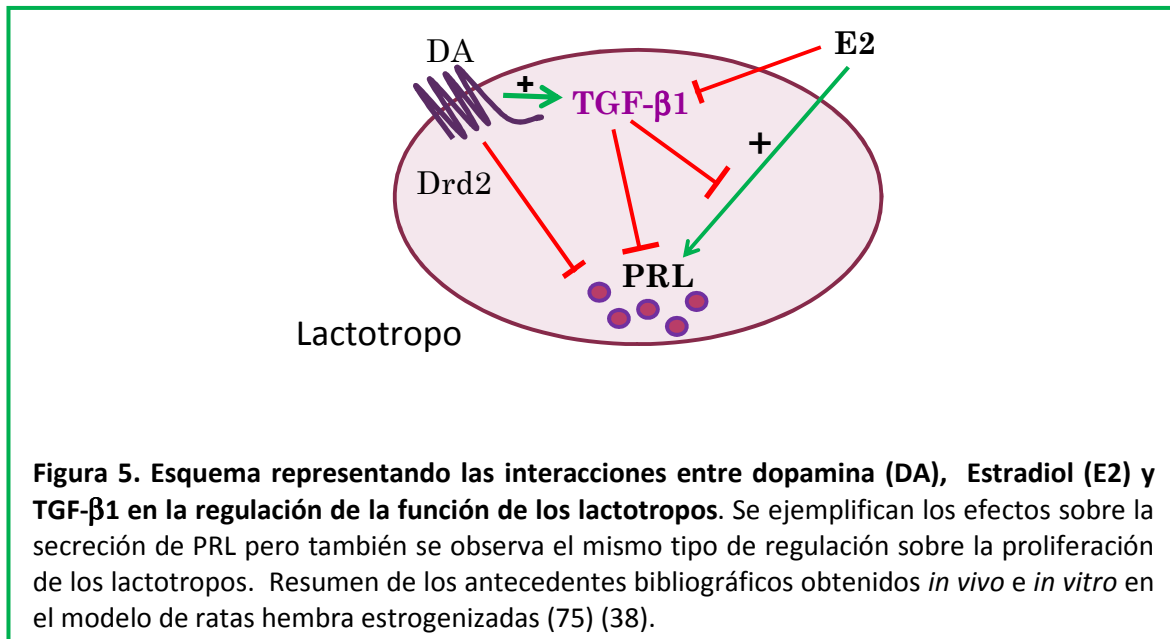
Sarkar y colaboradores (38), demostraron que el agonista dopaminérgico bromocriptina induce de manera dosis dependiente la secreción de TGF- $\beta$ 1 al medio de cultivo en células adenohipofisarias. También en estudios *in vivo* un tratamiento con bromocriptina incrementa la expresión de TGF- $\beta$ 1 hipofisario, así como la síntesis de ARNm de TGF- $\beta$ 1 y la de su receptor T $\beta$ RII.

Además, en el mismo trabajo, los autores sugieren que la inhibición de la proliferación de lactotrofos inducida por dopamina a través del RD2, **estaría mediada por TGF- $\beta$ 1**, dado que al utilizar anticuerpos que neutralizan TGF- $\beta$ 1 el efecto inhibitorio de bromocriptina deja de evidenciarse (38).

Apoyando estos resultados se describió también que las líneas celulares PR1 y GH3, derivadas de prolactinomas de ratas, con escasa o ausente presencia de RD2, son menos sensibles al efecto inhibitorio de TGF- $\beta$ 1 respecto de las células normales. Ambas líneas celulares presentan asimismo bajos niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 y de T $\beta$ RII (78).

**- Estradiol y TGF- $\beta$ 1:**

Ha sido descrito que, en hipófisis de ratas tratadas crónicamente con estrógenos, existe una marcada disminución de la síntesis y expresión de TGF- $\beta$ 1 y T $\beta$ RII (79), efecto que podría estar contribuyendo a la formación del prolactinoma en este modelo. Por otro lado también se demostró que los E2 inducen la expresión de TGF- $\beta$ 3, otra isoforma de TGF- $\beta$  que tendría funciones opuestas a TGF- $\beta$ 1, incrementando la proliferación celular de los lactotrofos (80).



Tal como se describió previamente, TGF-β1 requiere un complejo mecanismo de activación para liberarse de sus complejos latentes y ejercer su función biológica. Hasta el momento, los estudios realizados sobre la citoquina en hipófisis se enfocaron sobre el contenido total de TGF-β1, sin disociarlo del porcentaje de citoquina activa. Por otro lado, no ha sido estudiado cómo la desregulación del proceso de activación de la citoquina podría afectar la homeostasis de la glándula.

**En base a estos antecedentes proponemos que TGF-β1 cumple un papel fundamental en la homeostasis hipofisaria, posiblemente modulando los efectos estrogénicos y dopaminérgicos sobre la función de los lactotrofos. Postulamos que las alteraciones en los distintos componentes del sistema TGF-β1 (niveles de TGF-β1 total *versus* activo, sus activadores locales y sus complejos latentes) podrían participar en el proceso de tumorigénesis hipofisaria.**

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Nuestro laboratorio está abocado al estudio de los procesos involucrados en la tumorigénesis hipofisaria, y la búsqueda de blancos terapéuticos para el tratamiento de prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos.

Como objetivo principal de esta tesis, nos centramos en la caracterización de los distintos componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario y su regulación en hipófisis normales y modelos experimentales de prolactinomas.

### Objetivos específicos

**Capítulo 1:** En la primer parte de esta tesis nos propusimos estudiar el sistema TGF $\beta$ -1 comparativamente en hipófisis normales y tumorales en dos modelos de prolactinomas experimentales: los ratones hembra con mutación nula del receptor de dopamina tipo 2 (Drd2<sup>-/-</sup>) y las ratas tratadas crónicamente con estrógenos.

**Capítulo 2:** A raíz de los resultados obtenidos en el capítulo 1, quisimos profundizar el estudio de la regulación del sistema TGF- $\beta$ 1 por dos de los principales moduladores de la función del lactotrofo: la dopamina y los estrógenos. Para ello estudiamos los distintos componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 comparativamente en ratones hembras y machos en el modelo Drd2<sup>-/-</sup>; y evaluamos el efecto de tratamientos *in vivo* con estrógenos y con agonistas y antagonistas dopaminérgicos.

**Capítulo 3:** Por último evaluamos la efectividad de un tratamiento *in vivo* con péptidos sintéticos, análogos de TSP1, como terapia para prolactinomas en el modelo de ratas estrogenizadas.

# MATERIALES & MÉTODOS

## **Modelos animales**

### Ratones transgénicos con disrupción del receptor de dopamina D2 ( $Drd2^{-/-}$ )

Los ratones knockout (ko) para el RD2 ( $Drd2^{-/-}$ ), designación oficial de la cepa: *B6;129S2-Drd2<sup>tm1low/J</sup>* a cargo del *Induced Mutant Resource* en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME), fueron generados por mutagénesis dirigida del gen RD2 en células embrionarias (8). La cepa híbrida original (129S2/Sv X C57BL/6J) con el alelo mutado para el RD2 fue retrocruzada por ocho generaciones con ratones salvajes (wt por *wild-type*) C57BL/6J. Los ratones mutantes y los wt fueron en general producto de cruces entre ratones heterocigotas.

Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET), en condiciones ambientales reguladas: temperatura de 22°C, un fotoperíodo de 12 horas de luz (7:00 – 19:00 hs) y 12 horas de oscuridad, y ventilación permanente. Se les permitió libre acceso al agua y alimento balanceado en forma de pellets (Gepsa Feeds, Grupo Pilar).

El genotipo de los animales fue determinado por PCR a partir de ADN genómico (81). En todos los experimentos se utilizaron ratones de entre 6 y 9 meses de edad de ambos sexos y genotipos.

Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el comité de Ética del IByME.

### Ratas hembra estrogenizadas (Ratas DES)

Se utilizaron ratas hembra adultas (60 días) de la cepa Sprague Dawley (SD) criadas en el bioterio del IByME. Las ratas fueron ovariectomizadas (OVX), bajo anestesia general (ketamina 50mg/kg, xilacina 10mg/kg, i.p.) y se les aplicó en forma subcutánea un pellet de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES, Sigma) en la zona dorsal. Luego de **4 semanas** de exposición al pellet DES, las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación con guillotina. Se recolectó la sangre troncal para la determinación de PRL por RIA y se extrajo cuidadosamente la hipófisis anterior, descartando la neurohipófisis. El tratamiento por cuatro semanas con DES resultó



en el desarrollo de una hiperplasia hipofisaria acompañada de un concomitante incremento en los niveles circulantes de PRL (82;83).

En los tratamientos *in vivo* con los análogos de TSP1, se utilizaron ratas con **2 semanas** de exposición al pellet DES, para evaluar si el tratamiento contrarrestaba la inducción de los tumores. Para los tratamientos a tiempos cortos se utilizaron ratas DES con **4 semanas** de exposición.

Como grupo control se utilizaron ratas de la misma cepa y edad, en diestro al momento del sacrificio, a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento. Se eligió este estadio para disminuir la variabilidad en los controles, debido a que es el momento del ciclo estral de menor concentración hormonal (E2, PRL, progesterona). El estadio del ciclo fue determinado mediante el análisis de las proporciones de los distintos tipos celulares presentes en muestras de frotis vaginal.

## ***Experimentos in vivo***

### En ratones:

- **Tratamiento con agonistas y antagonistas dopaminérgicos:**

Se utilizaron ratones hembras y machos wt de entre 6 y 9 meses de edad. Los animales fueron divididos en diferentes grupos:

- Grupo Sulp: se les inyectó el antagonista del RD2 de larga duración Sulpiride (10 mg/Kg, i.p., Vipral Ivax.);
- Grupo Caberg: se les inyectó el agonista del RD2 Cabergolina (2 mg/Kg, i.p., Laboratorios Beta);
- Grupo Control: se les inyectó solución fisiológica.

Los tratamientos se realizaron a tiempos cortos, 30 minutos, para evaluar efectos rápidos sobre la activación de TGF- $\beta$ 1, o a tiempos largos, 24hs, para evaluar el efecto sobre la síntesis de ARNm y sobre el contenido de TGF- $\beta$ 1 total.

- **Tratamiento con estradiol (E2)**

Se utilizaron ratones hembras y machos wt y *Drd2<sup>-/-</sup>*. Los animales fueron inyectados en forma subcutánea con valerato de E2 (Progynon® Depot, Schering), un conjugado de estrógenos de efecto prolongado (84), en una dosis de 0,2 mg/kg, o bien con el vehículo: aceite de ricino, en los grupos control. El tratamiento tuvo una duración de 24hs.

En todos los casos, luego del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina. Se recolectó la sangre troncal para la medición de PRL por RIA, y se extrajo la hipófisis. Se removió la neurohipófisis y se recolectó la adenohipófisis en los distintos *buffers* detallados para cada procedimiento.

#### En ratas

- **Tratamiento *in vivo* con ABT-510 y ABT-898 en ratas DES**

Los péptidos sintéticos análogos de TSP1, ABT-510 y ABT-898, fueron provistos por los Laboratorios Abbott en el marco de los siguientes convenios:

- ABBOTT LABORATORIES, Pre-Clinical Study, Oncology group  
Extracellular matrix and pituitary tumorigenesis I  
MTA 20537, 2007-2008 Investigational Product: ABT 510  
Directora del convenio: Dra. Graciela Díaz-Torga
- ABBOTT LABORATORIES, Pre-Clinical Study, Oncology group  
Extracellular matrix and pituitary tumorigenesis II  
MTA 37310, 2010-2011 Investigational Product: A-428898  
Directora del convenio: Dra. Graciela Díaz-Torga

Siguiendo las instrucciones de Abbott, las drogas fueron disueltas en dextrosa al 5% en una concentración de 70mg/ml.

Se evaluó el efecto del tratamiento con ambos péptidos en el modelo de ratas DES. Las inyecciones con los péptidos se realizaron a partir de la segunda semana de la exposición de las ratas al pellet DES, para evaluar un posible efecto de reversión de los parámetros

tumorales inducidos por el estrógeno sintético. Un grupo de ratas DES fue tratado con ABT-510 (100mg/kg, i.p.); otro grupo fue tratado con ABT-898 (100mg/kg, i.p.) y el tercer grupo fue tratado con el vehículo dextrosa 5% (Grupo DES control). El tratamiento consistió en la administración de 3 inyecciones semanales durante dos semanas. Pasadas 48 hs luego de la última inyección, se sacrificaron las ratas, se recolectó sangre troncal y se extrajo la adenohipófisis para su posterior análisis (Ver esquema explicando el protocolo en la Figura 37, Capítulo 3). En simultáneo con estos experimentos se sacrificaron ratas hembras de la misma camada sin ningún tratamiento que se encontraban en diestro al momento del sacrificio.

- **Tratamiento *in vivo* con ABT-510 a tiempos cortos**

Estos experimentos se realizaron para estudiar el efecto del análogo de TSP1 sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 y la secreción de PRL a distintos tiempos. Se inyectaron ratas hembra adultas en el estadio diestro del ciclo estral con una única dosis de 100mg/kg de ABT-510 y se sacrificaron luego de 30 minutos, 2 horas ó 24 horas. También se determinó el efecto de ABT-510 a tiempos cortos (2 horas) en ratas DES con 4 semanas de exposición al pellet. Las hipófisis se procesaron para la determinación de TGF- $\beta$ 1 por ELISA. Los niveles de PRL se midieron en suero por RIA.

## ***Modelos in vitro***

### Cultivo primario de células adenohipofisarias de ratón

#### *Obtención de células*

Las adenohipófisis extraídas de ratones hembras wt y ko se colocaron en cámaras con medio Dulbecco-glut (Dulbecco madre con 1% glutamina). Las hipófisis se lavaron 3 veces en el mismo medio y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>. Posteriormente, se incubaron por 30 minutos en estufa a 37°C con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> en Dulbecco-glut conteniendo 0,5% de tripsina. Luego fueron tratados con 1 mg/ml de ADNasa I (Worthington Biochemical Corp.) por dos minutos más y la digestión enzimática se detuvo con el agregado de suero fetal bovino (SFB) en exceso y posteriores lavados con Dulbecco-

glut. Los fragmentos tisulares fueron colocados en el *buffer* Krebs-Ringer, preparado fresco, sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  previamente filtrado y gaseado durante 15 minutos. El tejido se dispersó en células individuales por trituración suave utilizando pipetas Pasteur. La suspensión resultante fue filtrada con una malla de nylon (160  $\mu\text{m}$ ) y centrifugada 10 minutos a 1000 rpm. Previo a la centrifugación, se tomó una alícuota de la suspensión celular para cuantificar el rendimiento celular del tejido, que se realizó por conteo en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Azul Tripán, y fue siempre mayor del 90%.

### *Cultivo de las células*

El pellet celular fue re-suspendido en medio de cultivo DMEM completo. Las células se sembraron en placas de cultivo estériles de 96 pocillos a una densidad de 35.000 células/pocillo y se incubaron en estufa a 37°C con 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Cumplidas 96 hs. en cultivo, las células se lavaron dos veces con BIC-BSA y fueron pre-incubadas en este medio libre de suero durante 3 hs antes del agregado de los estímulos correspondientes.

**Tabla 1.** Composición de los *buffers* y medios utilizados para el cultivo primario de células adenohipofisarias de ratón.

<i>Buffer</i> Krebs-Ringer		DMEM completo	
Componente	Concentración	Componente	Concentración
Glucosa	14mM	Dulbecco madre	84%
BSA	1%	Suero de caballo	10%
MEM amino ácidos	2%	Suero fetal bovino	2.50%
MEM vitaminas	1%	MEM no esenciales	1%
glutamina	2mM	Penicilina/estreptomicina	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Hepes	10mM	Fungizone	0.1%
$\text{NaHCO}_3$	13.5mM	Glutamina	2mM
NaCl	162mM		
KaCl	32.5mM		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	16.25mM		
pH ajustado a 7.4		BIC-BSA	
		Componente	Concentración
		BIC madre	97%
		BSA	0.1%
		Glutamina	2mM
		Penicilina/estreptomicina	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
		Fungizone	0.10%

### Cultivo de células de la línea GH3

El clon GH3 fue establecido en 1965 por A.H. Tashjian, Jr. a partir de un tumor hipofisario de una rata hembra de 7 meses de edad de la cepa Wistar-Furth (85). Las células están adaptadas para crecer en medio F12 completo (ver tabla 2) incubadas en estufa a 37°C con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se conservan en nitrógeno líquido en criotubos conteniendo  $3.5 \times 10^6$  células en 1 ml de medio F12 completo, con DMSO al 20%. Al momento de realizar los experimentos, un vial de células es descongelado rápidamente en abundante medio F12 completo. Luego de centrifugar se re-suspenden las células en el mismo medio y, luego de 2 lavados para eliminar restos de DMSO, se siembran en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> en una densidad de  $5 \times 10^5$  células / 8ml. El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días, y se realizan pasajes una vez por semana, levantando las células suavemente con 2,5 mg/ml de tripsina preparada en PBS estéril. Los experimentos se realizan luego del cuarto pasaje a partir del descongelado de las células.

**Tabla 2.** Componentes del Medio F12 completo para el cultivo de las células GH3.

Medio F12 completo	
Componente	Concentración
Ham's F12K (Gibco)	82.3%
Suero de caballo	15%
Suero fetal bovino	2.5%
Penicilina/estreptomina	20µg/ml
Fungizone	0.1%

### ***Experimentos in vitro***

#### Células adenohipofisarias de ratón

- **Efecto de TGF-β1 sobre la proliferación celular y la secreción de PRL:**

Las hipófisis fueron extraídas y procesadas para cultivo celular como se describió anteriormente. Se sembraron 35000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medio BIC-BSA con o sin el estímulo: TGF-β1 1ng/ml. Se determinó la proliferación celular mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>[H]-Timidina).

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

### Células GH3

- **Efecto de ABT-898 sobre la secreción de PRL y la activación de TGF- $\beta$ 1:**

Las células GH3 fueron sembradas en placas de cultivo de 12 pocillos ( $5 \times 10^5$  células por pocillo) en 200  $\mu\text{l}$  medio F12 completo. Luego de 24 hs se descartó el medio y las células fueron lavadas e incubadas en el medio experimental (F12, SFB 5%, glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 3 hs. Se descartó el medio y se agregó medio fresco con o sin el estímulo ABT-898 1  $\mu\text{M}$ . Se evaluó el efecto a los 5, 15 y 30 minutos. A cada tiempo se recolectó el medio para la medición de PRL por RIA y se lisaron las células en 100  $\mu\text{l}$  de buffer de extracción (ver tabla 3). Se determinó el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo por ELISA en el lisado celular.

- **Efecto de ABT-898 sobre el número de células (índice de proliferación):**

Las células GH3 se sembraron en placas de 96 pocillos (20000 células por pocillo) en medio F12 completo. Al día siguiente se lavaron las células y se incubaron con medio experimental (F12, glutamina 2mM, penicilina/estreptomicina 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y SFB 5% para evitar el arresto de la proliferación) durante 3 hs. Las células se lavaron y se agregaron los estímulos: ABT-898 1  $\mu\text{M}$  y EGF 10 ng/ml utilizado como control positivo de proliferación. El medio con los estímulos fue reemplazado cada 24 hs. Luego de 3 días desde el primer

estímulo, se evaluó la proliferación celular por medio de un ensayo colorimétrico, utilizando un kit comercial (Ensayo de proliferación celular no radioactivo, CellTiter96 AQueous, Promega). El medio de cultivo fue descartado y las células se incubaron con la solución provista por el kit: 333mg/l MTS y 25µM PMS durante 30 min, 1 hs y 2 hs a 37°C en la estufa de cultivo. El ensayo detecta las células metabólicamente activas capaces de reducir el MTS. El producto de esta reacción, el formazan, se detecta midiendo la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA. Por lo tanto, la absorbancia a 490 nm es un indicador del número de células viables.

### ***Modelo ex vivo en hipófisis de ratas***

Este modelo tiene la ventaja de conservar la estructura tridimensional del tejido, manteniendo intacta la matriz extracelular, lo cual no ocurre en los cultivos celulares. Luego de extraer la hipófisis de ratas hembra controles en diestro, las mismas se separaron en hemi-hipófisis para la incubación de muestras apareadas, (una hemi-hipófisis se utilizó como control y la otra recibió el estímulo). Las hemi-hipófisis fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup> y se incubaron en placas de cultivo de 96 pocillos (una hemi-hipófisis por pocillo) con 150 µl de medio F12 completo. Se dejaron estabilizar durante 30 minutos, se descartó el medio y se colocó medio fresco sin suero conteniendo los estímulos.

- Efecto de ABT-898 sobre la activación de TGF-β1 ex vivo:

Las hemi-hipófisis fueron incubadas como se detalló anteriormente. Se colocó el estímulo (ABT-898 1µM) en medio fresco y luego de 30 minutos se recolectó el medio y se juntaron los fragmentos de hipófisis en 100 µl de *buffer* de extracción (ver tabla 3). Se midió el contenido de TGF-β1 activo por ELISA en el homogenato del tejido.

## ***Técnicas utilizadas***

### *Radioinmunoensayo (RIA) para la detección de PRL de rata y de ratón.*

#### Muestras

Se determinaron los niveles de PRL de ratón en 10µl de suero. También se midió la PRL secretada al medio de cultivo por las células adenohipofisarias en 20µl de medio diluido 1/200 en *buffer* EA: PBS (*buffer* fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0.01% azida sódica, pH 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA, por *egg albumin*).

Los niveles de PRL de rata se midieron en 10µl de suero. En todos los grupos que recibieron el pellet DES, la determinación hormonal se realizó en una dilución 1/10 del suero, debido a la alta concentración de PRL inducida por el tratamiento. También se midió la PRL de rata secretada por las células GH3 al medio de cultivo, en 10 µl de medio diluido 1/30 en *buffer* EA.

#### Reactivos

Los anticuerpos y estándares de referencia fueron provistos por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK), Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos (NIH, USA). Anticuerpos primarios: anti-PRL de ratón hecho en conejo y anti-PRL de rata hecho en conejo (dilución final 1/100000). Anticuerpo secundario: suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo (dilución de trabajo 1:100).

#### Protocolo

El protocolo fue idéntico para la detección de PRL de rata o de ratón, pero en cada caso, tanto el anticuerpo primario como la hormona marcada radiactivamente con [<sup>125</sup>I] y la curva estándar, fueron especie-específicos.

La curva de concentraciones del estándar de referencia y la dilución de las muestras fueron preparadas por duplicado en un volumen final de 200µl de *buffer* EA. Se agregaron 100µl del primer anticuerpo preparado en *buffer* PBS, EDTA 50mM, Suero normal de conejo (NRS) 0.05% y 100µl de la hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm/tubo, diluida en *buffer* EA) a los tubos patrones y de muestra, y se incubaron a temperatura ambiente



durante 24 hs. Al día siguiente, cada tubo recibió 100µl del segundo anticuerpo diluido en PBS y 400µl de PBS con 15% de polietilenglicol y se incubó a temperatura ambiente por 2,5 hs y luego a 4°C durante 30 minutos. La fracción conteniendo la hormona libre fue separada de la fracción unida al anticuerpo por centrifugación a 4°C (centrífuga Beckman Instruments) a 2000 rpm durante 30 min. Se aspiró el sobrenadante y se midió la radioactividad asociada al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador  $\gamma$  Hewlett Packard (eficiencia: 82%). Los resultados se expresaron de acuerdo a la preparación de referencia RP<sub>3</sub> de rata o de ratón. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron 7,2 y 12,8%, respectivamente para el RIA de PRL de ratón; y 6.9 y 11.6% para el RIA de PRL de rata.

## Western Blot (WB)

### Preparación de las muestras

Las adenohipófisis enteras de ratón y las hemi-hipófisis de ratas se homogeneizaron con un homogeneizador manual en 80µl y 120µl, respectivamente, de buffer de extracción, al cual se le agregó en el momento una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, TPCK, TAME, ZPCK y TLCK). El homogenato se centrifugó a 10000g durante 5 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se descartó el pellet. En una alícuota del sobrenadante se determinó la cantidad de proteínas con un fluorómetro *Qubit*<sup>TM</sup> según protocolo detallado por el *kit Quant-it*<sup>TM</sup> Assay de Invitrogen. Se tomó de cada muestra el volumen correspondiente a 30 µg de proteína (ratones) o 50µg de proteína (ratas) y se agregó buffer de carga 5X y DTT 50mM (volumen final 30µl). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

**Tabla 3:** Composición de los *buffers* utilizados para la preparación de las muestras para WB

<i>Buffer de extracción</i>		<i>Buffer de carga 5x</i>	
Componente	Concentración	Componente	Concentración
Tris-base	50mM	Tris-HCl	150mM
CaCl <sub>2</sub>	10mM	SDS	10%
MgCl <sub>2</sub>	1mM	Azul de bromofenol	0.02%
Tritón-X-100	1%	pH 6.8	
pH ajustado a 7.6			

### Separación de proteínas

Las muestras y los marcadores de peso molecular (preteñidos y biotinilados) se sembraron en geles de poliacrilamida 10%. Se realizó la electroforesis en una cuba conteniendo buffer de corrida, conectada a una fuente de poder a amperaje constante (56mA, voltaje máximo 170V) durante aproximadamente 90 minutos. A continuación las muestras fueron transferidas de los geles a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en buffer de transferencia durante 75 minutos a voltaje constante (100V), en frío.

**Tabla 4.** Composición de los buffers utilizados para la electroforesis

<i>Buffer de corrida de WB</i>		<i>Buffer de transferencia de WB</i>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>	<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Tris-base	0.30%	Tris-base	0.30%
Glicina	1.44%	Glicina	1.44%
SDS	0.1%	Metanol	20%
pH 8.3		pH 8.3	

### Incubación de las membranas

- 1) Bloqueo de sitios inespecíficos: leche en polvo descremada 5% preparada en PBS Tween 0.05% (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente.
- 2) Anticuerpo primario, diluido en BSA 1% preparado en PBS-T, toda la noche a 4°C.
- 3) Anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rabanita (HRP), y anticuerpo anti-biotina HRP, diluidos en PBS-T-BSA 1%.

Luego de cada incubación se lavó la membrana 3 veces por 10 min con PBS-T.

**Tabla 5.** Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en WB

Anticuerpos primarios				
Antígeno	IgG	Dilución	Nº catalogo	Proveedor
TβRII	conejo	1/200	sc 17791	Santa Cruz
β-actina	ratón	1/5000	ab 6276	Abcam
pSMAD2/3	conejo	1/300	sc 11769	Santa Cruz
PCNA	conejo	1/500	sc 7907	Santa Cruz

Anticuerpos secundarios acoplados a HRP			
	Dilución	Nº catalogo	Proveedor
anti-IgG de ratón	1/5000	sc 2314	Santa Cruz
anti- IgG de conejo	1/6000	sc 2004	Santa Cruz
anti-biotina	1/3000		Santa Cruz

**Revelado de las membranas:**

Las bandas inmunorreactivas se revelaron mediante la detección de la quimioluminiscencia liberada por la oxidación del sustrato luminol (250mM), en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta reacción es catalizada por la enzima HRP que se encuentra acoplada al anticuerpo secundario. La quimioluminiscencia emitida por las membranas en contacto con el reactivo de revelado se detectó en el equipo Gbox chemi HR16 (Syngene). La intensidad de las bandas (en píxeles) se cuantificó por medio del programa Image J.

Los valores de intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas de interés se relativizaron al valor de intensidad de la banda de β-actina (control de carga) en la misma muestra y dicha relación se expresó en unidades arbitrarias (u.a.). Entre incubaciones con distintos anticuerpos primarios se realizó sobre la membrana una incubación con *buffer* de *stripping* (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 100 mM, pH 6,7) durante 40 min a 50°C, y luego se repitió el proceso de incubación de las membranas descrito anteriormente

## *ELISA para la detección de TGF- $\beta$ 1 activo y total*

### Preparación de las muestras

Las adenohipófisis enteras de ratón y las hemi hipófisis de ratas se recolectaron y homogeneizaron de la misma manera descrita para WB. El buffer de extracción utilizado no contiene agentes reductores y lleva un detergente no iónico (Tritón X 100) para minimizar la activación de TGF- $\beta$ 1 durante el procesamiento de las muestras.

Para la detección de **TGF- $\beta$ 1 activo**, se sembraron 100  $\mu$ l (toda la muestra) por pocillo. Para la detección de **TGF- $\beta$ 1 total** (TGF- $\beta$ 1 activo + latente) se utilizaron 10 $\mu$ l de homogenato, al cual se le agregó 4 volúmenes del *buffer* diluyente provisto por el kit y se realizó una extracción ácida de las muestras llevándolas a pH 3 con HCl 1N por 20 minutos. Luego se normalizó el pH a 7,6 con NaOH 1N y se agregó el *buffer* correspondiente para cada kit hasta completar los 100 $\mu$ l que fueron sembrados en cada pocillo. La acidificación de la muestra produce la liberación de todo el contenido de TGF- $\beta$ 1 que se encontraba en estado latente almacenado en la matriz extracelular.

### Detección de TGF- $\beta$ 1

Se utilizaron dos ensayos comerciales diferentes para la detección de TGF- $\beta$ 1 por ELISA. Todas las determinaciones en muestras de ratón se realizaron con el ensayo comercial *TGF- $\beta$ 1 Emax<sup>®</sup> ImmunoAssay System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mínima dosis detectable con este kit es de 32 pg/ml y presenta menos de un 3% de reacción cruzada con TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3.

Posteriormente se utilizó otro ensayo, debido a una mejor relación costo/beneficio. Todas las determinaciones en muestras de rata, incluyendo la línea GH3, se realizaron con el ensayo comercial *TGF- $\beta$ 1 Duo Set ELISA development system* (DY1679, R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mínima dosis detectable con este *kit* es de 7.3 pg/ml y no muestra reactividad cruzada con otros péptidos.

Ambos *kits* utilizan el mismo sistema “sándwich” de detección utilizando dos anticuerpos anti-TGF- $\beta$ 1 que reconocen distintos epitopes de la molécula. Con el primer anticuerpo (monoclonal) se recubren los pocillos de la placa y se “capturan” las moléculas de TGF- $\beta$ 1 presentes en las muestras, y en los estándares de referencia. Luego el segundo anticuerpo (policlonal) reconoce las moléculas de TGF- $\beta$ 1 que ya estaban unidas al primer anticuerpo. Por último se utiliza un sistema de detección basado en una reacción colorimétrica catalizada por la enzima HRP, utilizando como sustrato TMB (Sigma-Aldrich, T4444). El producto de la reacción, proporcional a la cantidad de TGF- $\beta$ 1 en la muestra, se detecta por absorbancia a 450nm en un lector de ELISA. Se utilizó una curva estándar de referencia confeccionada a partir de una solución madre de TGF- $\beta$ 1 provista por el kit, para determinar la concentración de TGF- $\beta$ 1 presente en las muestras. El contenido de TGF- $\beta$ 1 activo y total fue expresado como pg de TGF- $\beta$ 1/mg proteína.

### *PCR cuantitativa en tiempo real*

#### Obtención de ARN total hipofisario

Las adenohipófisis provenientes de los distintos grupos experimentales se recolectaron en RNA later (Ambion) para su conservación hasta el momento de uso. Se extrajo el ARN total del tejido mediante la utilización del kit comercial RNeasy Protect mini kit (QUIAGEN, #número de catálogo 74124) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se cuantificó la cantidad de ARN total mediante la detección de la absorbancia a 260nm en 1 $\mu$ l de muestra en un espectrofotómetro nanodrop. La calidad y pureza del ARN extraído se determinó mediante la relación de absorbancias a 260nm/280nm (en todos los casos fue mayor a 1,8).

#### Obtención de ADN copia (ADNc)

Se realizó un ensayo de retrotranscripción para obtener ADNc a partir de 750 $\mu$ g de ARN (diluido en agua desionizada libre de ARNasas en 11 $\mu$ l de volumen final), incubados con 100ng de *primers* aleatorios (*random primers*) y con una mezcla de dNTPs (0.5 $\mu$ M cada uno). Esta preparación se colocó en la termocicladora y se calentó a 65 $^{\circ}$ C por 5min. Luego

se colocaron los tubos en hielo y se agregó a cada muestra 1µl de la enzima Superscript III RT (200 unidades/µl, Invitrogen, #número de catálogo 18080-93), 4µl del *buffer* de la enzima (*First-Strand buffer* 5X), 1µl de DTT 0.1M y 1µl de inhibidor de ARNasa (*RNase inhibitor*, Roche). La reacción se llevó a cabo según el siguiente programa: 25°C por 5min; 50°C por 45 min y 75°C por 15 min. El ADNc obtenido se mantuvo a -20°C hasta el momento de la utilización.

### Diseño de los primers

Para el ensayo de PCR en tiempo real se utilizaron *primers* sentido y anti-sentido específicos para la amplificación de los genes de interés, detallados en las tablas 6 y 7. Los primers fueron diseñados en base a las secuencias nucleotídicas publicadas en GenBank (NIH), utilizando el programa *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se tuvieron en cuenta las siguientes características para la elección de los *primers*: el producto amplificado debe tener entre 50 y 200 pb; el porcentaje de nucleótidos GC de los *primers* debe ser alrededor del 50%; la temperatura de disociación cercana a 60°C; se chequeó que los primers no formaran dímeros entre sí y siempre que fue posible se diseñó al menos uno de los primers complementario a una secuencia de unión entre diferentes exones en el gen de interés, para evitar la amplificación de ADN genómico. En todos los casos se constató que los primers fueran complementarios específicamente a la secuencia de interés.

**Tabla 6.** Secuencias de los pares de *primers* de rata utilizados

Gen	<i>Primer</i> sentido 5'-3'	<i>Primer</i> antisentido 5'-3'
<b>β-Actina</b>	CCACCAGTTCGCCATGGATGAC	GAGCATCGTCGCCCCGCGAA
<b>TGF-β1</b>	CAACAATTCCTGGCGTTACC	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
<b>LTBP1</b>	AGCACCGTCACCTCTGCTCT	ATCCTCGCAGTGGTCTCCAA
<b>LTBP3</b>	ATGGCCTCAGTTGCATAGAC	AAGGAGCCTGGTGTGTTTCGT
<b>LTBP4</b>	CTGCGCGGAAGCGAATGTGC	TCCGCGCACGGGTGACAATC
<b>TSP1</b>	GTGCGCACCCCTGTGGCATGA	ACCGGTCTTTGGCCTGTGGC

**Tabla 7.** Secuencias de los pares de *primers* de ratón utilizados.

Gen	<i>Primer sentido 5'-3'</i>	<i>Primer antisentido 5'-3'</i>
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	AGCCTTCCTTCTGGGTATGG	GCCACCGATCCACACAGAGTA
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	CAACAATTCCTGGCGTTACC	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
<b>TMEPAI</b>	TGTCCTCGGAAGGATGCCTCTGG	CAGCGAGTCGGTCAGTGGGC
<b>PAI-1</b>	CGGGGGTGGTGAACCTCAGTGT	ACGCCTGGTGCTGGTGAATG
<b>LTBP1</b>	AGCACCATCACCTCTGCTCT	CAGACACTGCTGCTCCAA
<b>LTBP3</b>	ACGGCCTCAGTTGCATAGAC	AAAGAGCCTGGTGTGTTTCGT
<b>LTBP4</b>	TGACCTCCGATACAAACCA	AGGCAGAAAGCCTGTAGGTG
<b>TSP1</b>	AGCGCGGAGCTGGATGTACC	CACATTCTGCAGCACCCCCTGAA
<b>Smad4</b>	CACCCGCCAAGTAATCGCGCA	CTGGCCGGCTGACTTGTGGAAG
<b>Smad7</b>	AACCCCGAGCTGGTGTGCTG	TGGACAGCCTGCAGTTGGTTTGA
<b>Furina</b>	TCCTAGAGATTGAAAATACCAGTGAAG	GGCTGTGCCATACAGAACGA
<b>MMP2</b>	GAATGCCATCCCTGATAACC	TTGGTTCTCCAGCTTCAGGT
<b>MT1-MMP</b>	TCATGGGCAGTGATGAAGTC	ACTTGGGATACCCTGGCTCT
<b>Integrina <math>\beta</math>6</b>	TCTAAGGCCAAGTGGCAAAC	TGCTTCTCCCTGTGCTTGTA
<b>Integrina <math>\beta</math>8</b>	ACTGGGCCAAAGTGAACACAA	GAACACACCATCCGCATTCC
<b>Kallikrein 1</b>	GCCCATCGACCTGCCCACTG	CACTGGAGCTCATCTGGGTATTCA

Reacción de PCR en tiempo real

El ADNc fue diluido 1/10 en agua libre de ARNasas, se tomaron 5  $\mu$ l de cada muestra y se mezclaron con 6.25 $\mu$ l de *QuantiFast SYBR green PCR kit* (QIAGEN, #204056) y 1.25 $\mu$ l de una mezcla de los *primers* sentido y anti-sentido 1.25 $\mu$ M cada uno, en placas de 96 pocillos cubiertas por un film óptico adherente. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad), utilizando un programa estándar detallado en la tabla 8. Se utilizó como control endógeno  $\beta$ -actina, detectado en las mismas muestras que los genes de interés, en

la misma placa de PCR. Se analizaron los datos utilizando el programa Bio-Rad IQ5, mediante el cual se fue monitoreando el incremento en la fluorescencia (proporcional al número de copias de ADN) a lo largo de la reacción de PCR. Se estableció un valor umbral de fluorescencia en el cual el incremento es lineal y se determinó para cada muestra el número de ciclos en el que se alcanza el umbral (denominado CT). Para determinar la expresión relativa de los genes se utilizó el método delta-delta CT, donde se comparó el CT del gen de interés respecto del CT del gen endógeno (delta CT) y este valor a su vez se comparó con un calibrador interno (delta-delta CT). El calibrador interno fue la hembra wt cuando se compararon muestras de ratones hembras y machos wt y ko para el RD2; el grupo wt control de cada sexo cuando se comparó el efecto del tratamiento con agonistas o antagonistas dopaminérgicos o el tratamiento con E2; las ratas hembra en diestro cuando se comparó el efecto de DES y de los tratamientos con ABT-510 y ABT-898. El método delta-delta CT toma como supuesto que la eficiencia de la reacción de PCR es igual para el gen de interés y para el gen de referencia. Se determinó la eficiencia de reacción para cada uno de los genes utilizando una curva de concentraciones crecientes de ARN inicial. Las eficiencias fueron similares para los genes de interés y para los de referencia.

**Tabla 8.** Programa de PCR en tiempo real

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Ciclo 1 (1x) Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Ciclo 2 (40x) Desnaturalización, apareamiento de <i>primers</i> y extensión	95°C 60°C	10 segundos 30 segundos
Ciclo 3 (71x) Curva de disociación	60°C - 95°C *	10 segundos

\* incremento de temperatura de 0.5°C a partir del ciclo 2



### *Fijación de hipófisis para técnicas histológicas*

Inmediatamente después de la recolección del tejido, las hipófisis enteras en el caso de los ratones, o hemi hipófisis en el caso de las ratas, se colocaron en el fijador formalina (formol 4% en PBS). Luego de la fijación y deshidratación por pasajes en alcoholes de gradación creciente, el tejido fue incluido en moldes con parafina derretida a 60°C.

Los tacos de parafina se enviaron a cortar en micrótopo en secciones de 4 µm de espesor y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados con poli-lisina. En el mismo portaobjetos se colocaron secciones de hipófisis wt y ko (modelo de ratón) o controles y tratadas (modelo de rata), para su comparación. Los vidrios se utilizaron posteriormente para detectar la expresión y localización de las proteínas de interés mediante inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.

### *Inmunofluorescencia (IF) para el receptor II de TGF-β*

Los portaobjetos conteniendo cortes histológicos de hipófisis de ratones hembra wt y *Drd2<sup>-/-</sup>* se utilizaron en el protocolo de IF para la detección del receptor de TβRII que se detalla en la tabla 9. Como control negativo se omitió el anticuerpo primario en, al menos, un corte de cada animal. En todos los casos observamos ausencia de la marca de fluorescencia. Se analizaron al menos 3 cortes de cada animal, de 3 animales diferentes para cada genotipo. El análisis fue cualitativo. Las fotos se tomaron en un microscopio confocal Nikon C1 Plan Apo. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm para el FITC.

**Tabla 9.** Protocolo de IF

<b><i>Desparafinización e hidratación</i></b>	
Xilol	2 pasajes de 10 min
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 96°	10 min
Alcohol 90°	10 min
Alcohol 70°	10 min
PBS	2 pasajes de 10 min
<b><i>Recuperación antigénica:</i></b>	
Se calentó el <i>Buffer</i> Citrato 0.01M pH 6 en horno microondas	Pre calentamiento del buffer 3 min Se agregan los portaobjetos y se calienta 10 min Se deja enfriar 20 min
Lavado con PBS	2 pasajes de 10 min
<b><i>Bloqueo de uniones inespecíficas:</i></b>	
Leche en polvo descremada 5% en PBS	1 h a temperatura ambiente
<b><i>Anticuerpo primario:</i></b>	
anti-T $\beta$ R $\text{II}$ hecho en conejo, dilución 1/50	toda la noche
Santa Cruz sc 1700	en cámara húmeda, a 4°C
Lavado con PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Anticuerpo secundario:</i></b>	
anti IgG de conejo conjugado con FITC, hecho en burro, dilución 1/100, Santa Cruz sc 2090	1:30 hs (en cámara húmeda) en oscuridad
Lavado con PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b><i>Montaje en Mowiol</i></b>	

### *Imunohistoquímica (IHQ) para la detección de CD-31*

Mediante esta técnica se estudió la vasculatura en secciones de adenohipófisis de ratas control en diestro, ratas DES y DES tratadas con ABT-510 o ABT-898. Se utilizó un anticuerpo específico para la detección del marcador de células endoteliales CD-31. Este marcador es comúnmente utilizado para la evaluación de parámetros angiogénicos. Combinando la técnica de IHQ para CD-31 y el análisis de imágenes mediante el programa Image J (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) se determinaron los siguientes parámetros de angiogénesis:

- Área vascular relativa: calculada como el área ocupada por los vasos respecto del área total de tejido.
- Densidad Microvascular (DMV): calculada como el número de vasos por  $\text{mm}^2$
- Área promedio de los vasos

El protocolo de IHQ utilizado se detalla en la tabla 10.

Una vez realizada la inmunomarcación con CD31, se obtuvieron imágenes utilizando una cámara digital Canon PowerShot G6 acoplada a un microscopio Zeiss Axiostar plus con objetivos de aumento 40x. Se tomaron al menos 4 imágenes (de distintos campos) de cada sección, y se analizaron al menos 3 secciones de tejido por cada animal. En el programa Image J se fijó una escala para relacionar los píxeles con  $\mu\text{m}^2$ . En cada imagen obtenida se delimitó manualmente el perímetro de cada vaso y luego se calculó el área comprendida por los mismos. Por último, se calculó el área total ocupada por el tejido en cada campo.

El **área vascular relativa** se determinó dividiendo el área vascular absoluta (definida como la suma de las áreas de todos los vasos correspondientes a una foto) por el área total de cada foto. Luego se promediaron las áreas relativas correspondientes a cada animal. La **densidad microvascular** se determinó contando el número de vasos presentes en cada imagen, y se expresó como número de vasos/ $\text{mm}^2$ . Se promedió la DMV de las distintas imágenes del mismo tejido. Por último, el **área promedio de los vasos** se calculó dividiendo el área vascular absoluta, es decir, la suma de las áreas de todos los vasos correspondientes a una foto, por el número de vasos totales de cada foto.

Tabla 10. Protocolo básico de IHQ

<b>Desparafinización e hidratación</b>	
Xilol	2 pasajes de 10 min c/u
Alcohol 100°	10 min
Alcohol 96°	10 min
Alcohol 90°	10 min
Alcohol 70°	10 min
PBS	2 pasajes de 10 min c/u
<b>Recuperación antigénica:</b>	
Se calentó el <i>Buffer</i> Citrato 0.01M pH 6 en horno microondas	Pre calentamiento del buffer 3 min Se agregan los portaobjetos y se calienta 10 min Se deja enfriar 20 min
Lavado con PBS	2 pasajes de 10 min
<b>Inhibición de peroxidasas endógenas:</b>	
Agua oxigenada 3% en PBS	30 min
PBS	2 pasajes de 10 min
<b>Bloqueo de uniones inespecíficas:</b>	
Leche en polvo descremada 5% en PBS	1 h
<b>Anticuerpo primario:</b>	
Diluciones preparadas en PBS en aproximadamente 30µl por corte	toda la noche en cámara húmeda, a 4°C
Lavado con PBS	2 pasajes de 10 min
<b>Anticuerpo secundario:</b>	
Anticuerpo secundario biotinilado	1 h (en cámara húmeda)
PBS	2 pasajes de 10 min
<b>Sistema de revelado:</b>	
Streptavidina-avidina ABC (1/50 A + 1/50 B en PBS)	30 min (en cámara húmeda)
PBS	2 pasajes de 10 min
Sustrato enzimático ( 5 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + cromógeno (2,5 mg de DAB disuelto en 10 ml de PBS)	3 min
Agua	2 pasajes de 10 min
<b>Contratinción</b>	
Hematoxilina	20 segundos
Agua	2 pasajes de 10 min
<b>Deshidratación y montaje</b>	

### Zimografía

Las adenohipófisis de ratones hembras y machos wt y *Drd2<sup>-/-</sup>*, se homogeneizaron en *buffer* de extracción como se indica en la sección de preparación de las muestras para WB. Se tomaron 30µg de proteínas y se agregó el *buffer* de carga 5X. Para conservar la actividad de las proteínas NO se agregó DTT ni otros agentes reductores, ni se calentó la muestra. Las

proteínas se sembraron en un gel de poliacrilamida 8% preparado con 1.5mg/ml de gelatina (sustrato de MMP2 y MMP9). Luego de la corrida electroforética, los geles fueron lavados en una solución con Tritón X100 2.4% (2 veces por 30min) para eliminar el SDS del buffer de corrida y permitir la re-naturalización de las proteínas. A continuación se incubaron los geles en el buffer de activación (Tris Base 50mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM, NaN<sub>3</sub> 3mM) y se dejaron 48 hs a 37°C (a las 24 hs se renovó el *buffer*). Los geles fueron teñidos de azul con la solución de tinción (Coomassie Blue 0.1%, Metanol 30%, Acetona 10%) durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación. El exceso de colorante se lavó con la solución desteñidora (Metanol 30%, Acetona 10%) en agitación hasta que se observó la aparición de bandas blancas debido a la degradación de gelatina en las zonas donde hubo actividad de gelatinasa (MMPs). Se lavaron los geles con agua corriente y se escanearon para el análisis de la intensidad de las bandas utilizando el programa ImageJ. Las MMP2 y MMP9 se distinguieron por sus pesos moleculares. Mediante esta técnica también se detectan las pro-MMPs que son inactivas, pero durante la electroforesis se activan por acción del SDS.

### *Estadística*

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES). Las pruebas estadísticas utilizadas en cada caso se describen en la leyenda de la figura correspondiente. Se consideraron diferencias significativas cuando el  $P < 0.05$ . En todos los casos se verificó que se cumplieran los supuestos de los modelos estadísticos utilizados: normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk ( $P > 0.05$ ) y homogeneidad de varianzas, mediante el test de Levene ( $P > 0.05$ ). El programa estadístico utilizado fue el Statistics 8.

Capítulo 1: se utilizó la Prueba T de Student para muestras independientes cuando se compararon las medias entre dos grupos experimentales (e.g. ratones hembra wt vs. ko, ratas DES vs. ratas control en diestro).

Capítulo 2: Para las variables TGF- $\beta$ 1 activo, TGF- $\beta$ 1 total y PRL sérica se realizó ANOVA de dos factores cuando se comparó entre sexos y genotipos, o entre sexos y tratamientos con agentes dopaminérgicos. En el caso del tratamiento con estrógenos se realizó ANOVA de 3 factores para comparar entre sexos, genotipos y tratamientos. Cuando la interacción entre

los factores fue significativa, se analizaron los efectos simples y se realizaron comparaciones a posteriori aplicando el Test de Tukey.

Los resultados de expresión de ARNm de los distintos genes estudiados se analizaron mediante ANOVA de dos factores cuando se comparó entre sexos y genotipos. Las diferencias entre tratamientos se analizaron por separado en cada sexo.

La correlación entre TGF- $\beta$ 1 y PRL se analizó mediante el test de Spearman.

Capítulo 3: Las comparaciones entre los distintos tratamientos en ratas se analizaron por ANOVA de un factor. En el caso de las hemi-hipófisis incubadas *ex vivo* (Capítulo 3, Figura 45), se utilizó la Prueba T de Student para muestras pareadas.

# Capítulo 1

## **Caracterización del sistema TGF- $\beta$ 1 en prolactinomas experimentales**

## INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 1

### *Modelos experimentales de prolactinomas*

Existen varios modelos animales en los que se puede estudiar el desarrollo de los prolactinomas. Entre ellos, las ratas seniles representan un modelo fisiológico (86). Pero los prolactinomas también pueden ser inducidos experimentalmente en distintos modelos, entre los cuales se puede mencionar: la aplicación crónica de estrógenos en ratas (87), ratones transgénicos que sobre-expresan galanina (88), TGF alfa (89), el factor de crecimiento neural (NGF) (90) o el receptor tipo 4 truncado del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (91) en los lactotopos; ratones transgénicos que sobre expresan la subunidad  $\beta$  de hCG en forma sistémica (92), ratones *knock-out* para el receptor de prolactina (93) y los ratones hembra con delección del receptor de dopamina D2 (RD2) (94).

En particular en el desarrollo de esta tesis utilizamos dos de estos modelos, los cuales describimos en detalle a continuación.

### *Ratones knock out para el receptor dopaminérgico D2 ( $Drd2^{-/-}$ )*

Estos ratones fueron generados por los doctores Malcolm Low y Marcelo Rubinstein en Portland, Oregon, E.E.U.U. (8) a través de la delección completa del exón 7 y la mitad 5' del exón 8 del gen del receptor dopaminérgico D2 murino mediante recombinación homóloga. Dichos exones codifican para los últimos dos dominios transmembrana del RD2, el tercer lazo extracelular y la cola carboxi-terminal intracitoplasmática, por lo cual estos ratones genéticamente modificados carecen de RD2 funcionales.

En nuestro laboratorio demostramos que los ratones  $Drd2^{-/-}$  de ambos sexos desarrollan hiperprolactinemia ya a partir de la sexta semana de vida (81), y que en las hembras los niveles séricos de PRL son siempre mayores que en los machos.



A partir de los 6 meses de edad únicamente las hembras  $Drd2^{-/-}$  desarrollan una hiperplasia hipofisaria de lactotopos con un aumento del peso de la hipófisis de 2 a 3 veces respecto a las hembras  $Drd2^{+/+}$ . A los 17-18 meses de edad las hembras  $Drd2^{-/-}$  desarrollan 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  $Drd2^{+/+}$  y destrucción de las fibras de reticulina, característica típica de los adenomas. Los machos de la misma edad presentan pequeños nódulos multifocales también con ruptura de la red de reticulina indicando desarrollo de múltiples microadenomas focales sin el desarrollo de una hiperplasia marcada (94).

Debido a la ausencia del receptor dopaminérgico D2, este modelo resulta ideal para la búsqueda de terapias alternativas a prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos.

### *Prolactinomas inducidos por tratamiento crónico con estrógenos en ratas*

El modelo experimental de prolactinomas inducidos por estrógenos ha sido ampliamente desarrollado en varias cepas de rata, tanto en machos como en hembras (95-97). La cepa de rata más utilizada para este modelo es la Fisher 344, debido a que presenta una mayor sensibilidad a los estrógenos respecto de otras cepas (98) (99). El tratamiento estrogénico crónico induce una hiperplasia, hipertrofia y desgranulación de los lactotopos, acompañada de hiperprolactinemia y pérdida en la proporción de otros tipos celulares hipofisarios. Estudios bioquímicos señalan que alrededor de la cuarta semana, esta hiperplasia deriva en un adenoma de lactotopos o prolactinoma.

El crecimiento continuo de este tipo de tumores, al menos en las primeras etapas, es dependiente de la presencia estrogénica (100), y la aplicación de dopamina o sus agonistas pueden bloquear hasta cierto punto este efecto y producir la regresión del tumor (101) (102).

En nuestro laboratorio, este modelo, consiste en la aplicación de un pellet subcutáneo de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), en la zona dorsal de hembras adultas de la cepa Sprague Dawley. Si bien esta cepa es menos sensible a la acción de los estrógenos que la F344, en el laboratorio demostramos que luego de 4 semanas de

tratamiento se verifica un incremento en el tamaño de la hipófisis que puede duplicar o triplicar a las hipófisis normales; y un aumento en los niveles séricos de PRL (82;83); (103) y Figura 6B.

El efecto tumorigénico de los estrógenos se debe a diferentes acciones: en el hipotálamo, el E2 disminuye la actividad de neuronas dopaminérgicas (14); en los lactotopos, inhibe la actividad de los receptores RD2 (104) y estimula directamente la expresión génica de PRL, su almacenamiento y secreción (5;7); estimula factores de crecimiento proliferativos y pro-angiogénicos como VEGF, bFGF, EGF, entre otros (105;106) e inhibe factores anti-proliferativos como TGF- $\beta$ 1 (107). Además se demostró que los estrógenos tienen capacidad de promover el desarrollo de nueva vasculatura con suministro directo de sangre arterial a la hipófisis (105). Por lo tanto, los tumores hipofisarios secretores de prolactina inducidos por estradiol, son altamente angiogénicos.

### *TGF- $\beta$ 1 en prolactinomas*

Tal como mencionamos en la introducción general, TGF- $\beta$ 1 y su receptor tipo II (T $\beta$ RII) se expresan en los lactotopos (76) y la citoquina ha sido descrita como un factor inhibitorio de la proliferación de los lactotopos y de la secreción de PRL *in vitro* (75).

En los prolactinomas experimentales generados en ratas tratadas crónicamente con estrógenos se reportó una marcada disminución de la síntesis y expresión de TGF- $\beta$ 1 y del receptor T $\beta$ RII (79), efecto que podría estar contribuyendo a la tumorigénesis. Congruentemente con esta hipótesis se demostró que los ratones T $\beta$ RII<sup>+/-</sup> presentan una acelerada formación de prolactinomas en respuesta a un tratamiento con estrógenos respecto de sus pares T $\beta$ RII<sup>+/+</sup> (108).

En cambio, no hay en la bibliografía muchos antecedentes sobre la expresión de TGF- $\beta$ 1 en adenomas hipofisarios humanos. En algunos trabajos se ha detectado la expresión de TGF- $\beta$ 1 y del T $\beta$ RII por inmunohistoquímica y a nivel de ARNm en hipófisis normales y en distintos subtipos de adenomas, incluidos prolactinomas, y en carcinomas hipofisarios (109;110).

Por otro lado, aún no se ha estudiado la contribución de esta citoquina en el desarrollo de tumores en los ratones  $Drd2^{-/-}$ ; así como tampoco se ha estudiado, en ningún modelo de prolactinoma, cómo se encuentra afectado el proceso de ACTIVACIÓN de TGF- $\beta$ 1 ni la identidad y regulación de los activadores locales.

## OBJETIVOS DEL CAPITULO 1

En base a los antecedentes mencionados, en este primer capítulo nos propusimos caracterizar los distintos componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario y determinar si existen alteraciones de los mismos en dos modelos de prolactinomas experimentales: ratones hembra *Drd2*<sup>-/-</sup> y ratas hembra estrogenizadas.

### *Objetivos específicos:*

- 1) Determinar el efecto de TGF- $\beta$ 1 *in vitro* en el modelo de ratón *Drd2*<sup>-/-</sup>
- 2) Evaluar el contenido hipofisario de TGF- $\beta$ 1 activo, total y la expresión de ARN mensajero, comparativamente en hipófisis normales y tumorales de los dos modelos.
- 3) Estudiar la expresión de componentes del procesamiento y ensamblaje del complejo latente TGF- $\beta$ 1: LTBPs
- 4) Estudiar la expresión y regulación de posibles activadores de TGF- $\beta$ 1: Trombospondina 1 (TSP1)

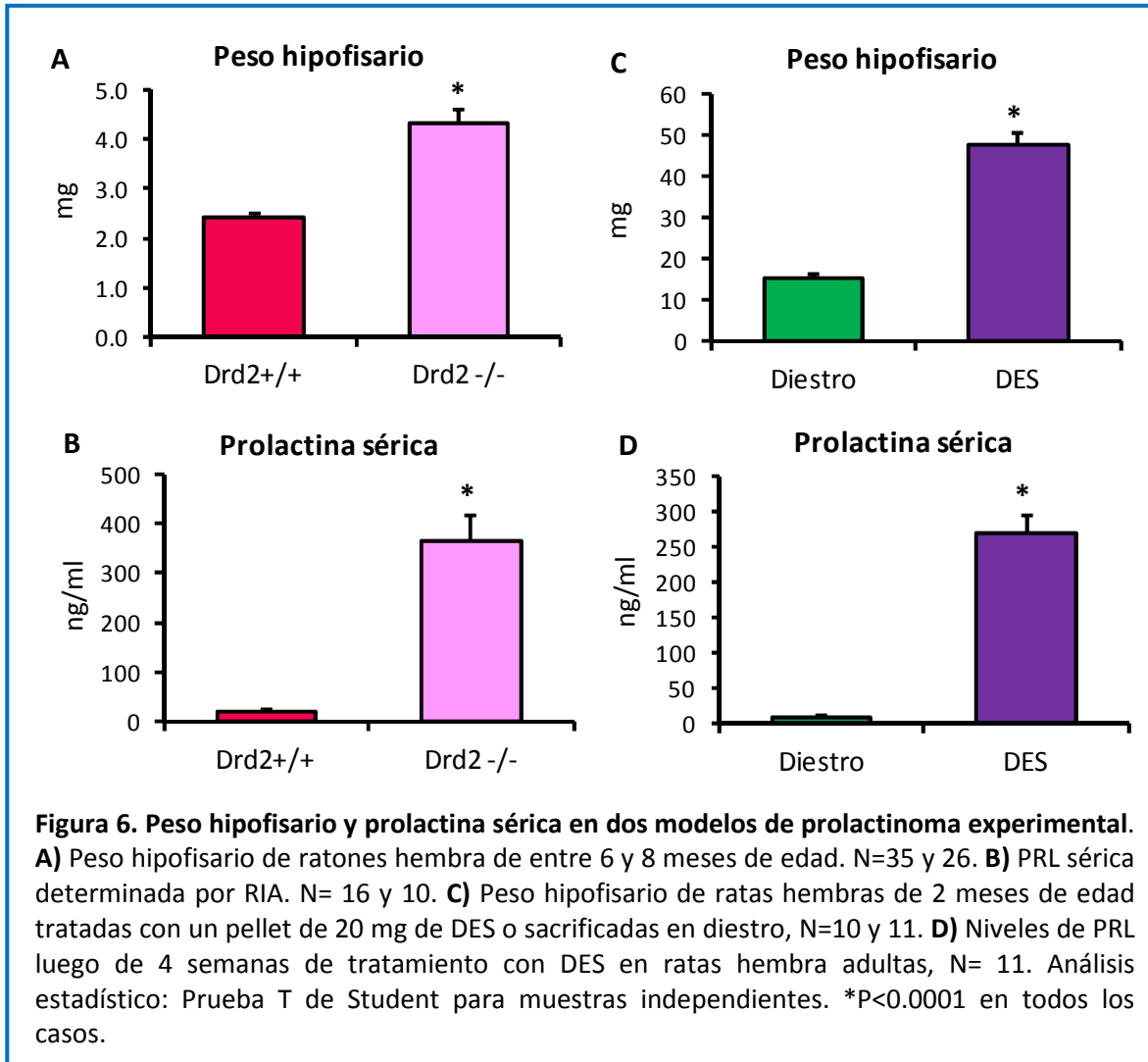
## RESULTADOS DEL CAPÍTULO 1

### ***Caracterización de los modelos experimentales de prolactinomas***

Los dos modelos animales de prolactinomas descritos en la introducción de este capítulo son utilizados desde hace varios años en nuestro laboratorio para el estudio de los mecanismos de tumorigénesis hipofisaria. Ambos modelos comparten características relacionadas con la formación de adenomas hipofisarios secretores de prolactina, tales como un incremento en el tamaño de la hipófisis, hiperprolactinemia e hiperplasia de lactotropos.

En el modelo de ratón, habíamos demostrado previamente en el laboratorio que la ausencia del receptor dopaminérgico RD2 en hembras ( $Drd2^{-/-}$ ) causa un incremento en el peso de la hipófisis respecto de las hembras salvajes ( $Drd2^{+/+}$  o *wt* por *wild-type*) (Figura 6A), con un concomitante aumento en los niveles de PRL sérica. En la Figura 6B se grafican los valores de prolactina sérica del sub-grupo de ratones hembras  $Drd2^{+/+}$  y  $Drd2^{-/-}$  que posteriormente se utilizaron en este trabajo para determinar los niveles de TGF- $\beta$ 1.

El otro modelo de prolactinomas utilizado en esta tesis es el de las ratas tratadas crónicamente con estrógenos. Luego de tan solo cuatro semanas de exposición al DES, se verifica un aumento de entre 3 y 4 veces del peso hipofisario en comparación a una hipófisis normal de ratas sacrificadas en diestro (Figura 6C) y un incremento significativo de los niveles de PRL sérica (Figura 6D).



### *Efecto de TGF-β1 in vitro en células adenohipofisarias en cultivo primario*

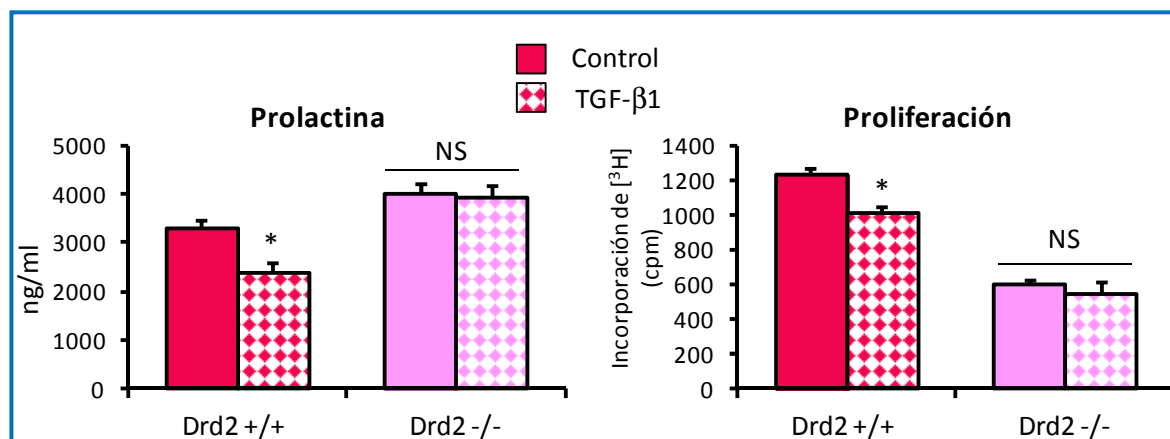
Nuestro interés en el estudio de TGF-β1 y su regulación a nivel hipofisario radica en la capacidad de esta citoquina de ejercer un control inhibitorio sobre la proliferación celular y la secreción de prolactina, características que la posicionan como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de prolactinomas que no responden a terapias convencionales.

El efecto inhibitorio de TGF-β1 ha sido demostrado en el modelo de ratas tratadas con estradiol, tanto *in vivo* como *in vitro*, pero en estos trabajos siempre fue estudiado en contraposición a los efectos estrogénicos sobre el lactotrofo.

Realizamos estudios *in vitro* en el modelo de ratón  $Drd2^{-/-}$  para determinar si el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre células hipofisarias en cultivo era similar al descrito en bibliografía en el modelo de rata, y si dicho efecto se veía alterado en ausencia de control dopaminérgico.

En la Figura 7 se muestra el efecto de un estímulo con TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml, 24 hs) sobre la secreción de PRL (Figura 7A) y la proliferación celular (Figura 7B) en cultivo primario de células adenohipofisarias provenientes de ratones hembra  $Drd2^{+/+}$  y  $Drd2^{-/-}$ . Basalmente las células  $Drd2^{-/-}$  secretaron mayores niveles de PRL respecto a las  $Drd2^{+/+}$ , probablemente debido al incremento en la población de lactotropos en hipófisis tumorales respecto a otros tipos celulares y respecto a la población celular en hipófisis controles.

Se encontró una diferencia en la respuesta evocada por el estímulo con TGF- $\beta$ 1 en los distintos genotipos. Tanto la secreción de PRL como la proliferación celular se vieron inhibidas por el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 únicamente en las células provenientes de ratones  $Drd2^{+/+}$ , mientras que en las células  $Drd2^{-/-}$  esta respuesta fue abolida por completo.



**Figura 7: Efecto *in vitro* de TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml, 24 hs) en cultivo primario de células adenohipofisarias de ratones  $Drd2^{+/+}$  y  $Drd2^{-/-}$  sobre: A) Secreción de PRL medida por RIA en el medio de cultivo. ( $P < 0,03$ ). ANOVA de dos factores, interacción genotipo x tratamiento ( $P = 0,047$ ), Test de Tukey,  $*P = 0,008$   $Drd2^{+/+}$  control vs.  $Drd2^{+/+}$  TGF- $\beta$ 1;  $Drd2^{-/-}$  control vs.  $Drd2^{-/-}$  TGF- $\beta$ 1 (NS, no significativo). B) Proliferación celular evaluada por incorporación de [ $^3$ H] timidina. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con interacción entre genotipo y tratamiento ( $P = 0,033$ ), seguido de Test de Tukey.  $*P = 0,004$   $Drd2^{+/+}$  control vs.  $Drd2^{+/+}$  TGF- $\beta$ 1.  $Drd2^{-/-}$  control vs.  $Drd2^{-/-}$  TGF- $\beta$ 1 (NS). También se encontraron diferencias entre genotipos con el mismo tratamiento ( $P = 0,0002$ ). N= 4 cultivos independientes con muestras por cuadruplicado.**

Estos resultados demuestran que, al igual que en el modelo de rata, TGF- $\beta$ 1 presenta una acción anti-proliferativa e inhibitoria sobre la secreción de PRL en hipófisis de ratón y, más aún, que dicha acción es dependiente de la presencia del RD2 ya que el efecto no se observa en las células  $Drd2^{-/-}$ .

### *Expresión del receptor de TGF- $\beta$ tipo II ( $T\beta RII$ ) en hipófisis $Drd2^{+/+}$ y $Drd2^{-/-}$*

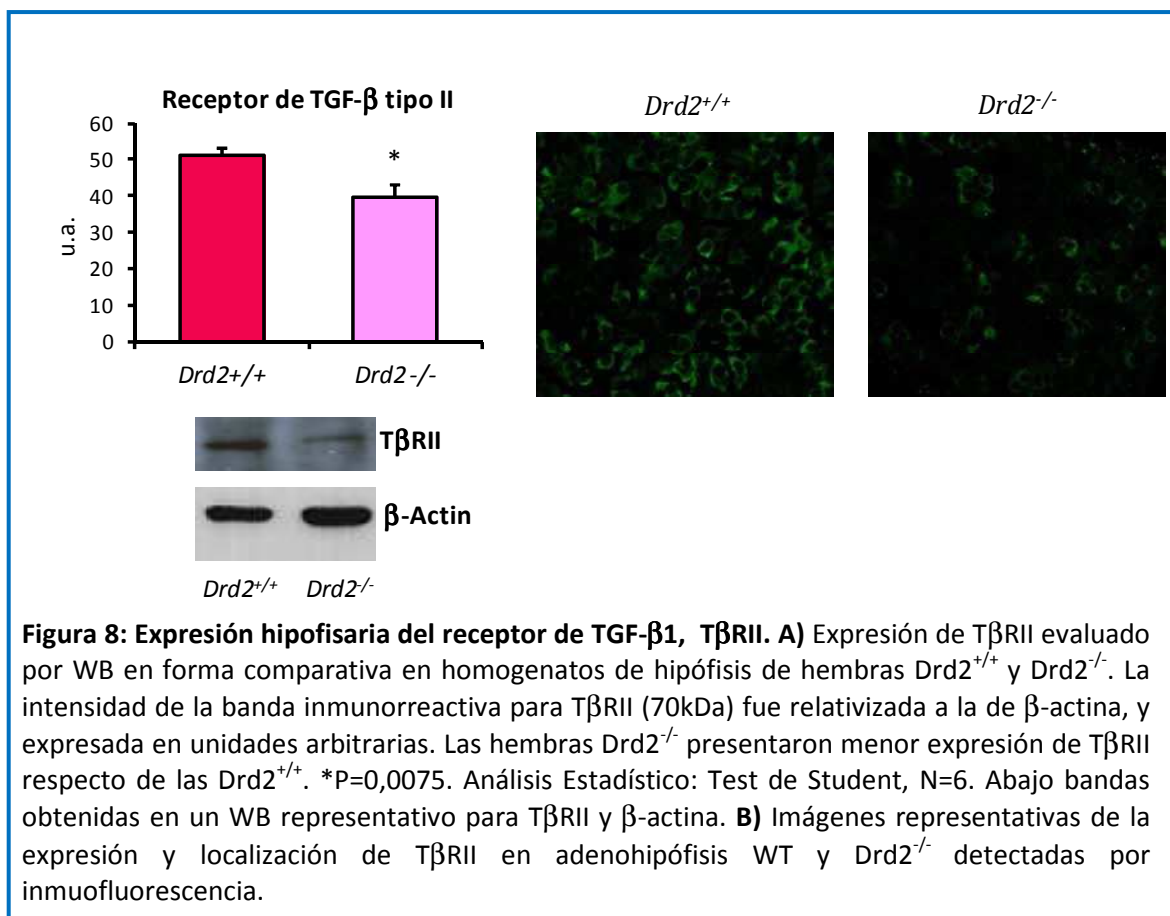
Dado que ha sido descrito que la dopamina estimula la expresión del receptor  $T\beta RII$  hipofisaria (38), nos preguntamos si la ausencia de respuesta a TGF- $\beta$ 1 en las células  $Drd2^{-/-}$  podría estar relacionada con una alteración en la expresión de este receptor provocada por la disrupción de la regulación dopaminérgica en este modelo.

Efectivamente, al evaluar la expresión proteica del receptor  $T\beta RII$  por Western Blot en homogenatos de hipófisis de ambos genotipos, encontramos que las hembras  $Drd2^{-/-}$  presentan una menor expresión respecto de sus pares  $Drd2^{+/+}$  (Figura 8A).

Asimismo, evaluamos la expresión de este receptor mediante inmunohistoquímica de fluorescencia y también observamos una reducción en la marca correspondiente al  $T\beta RII$  en cortes histológicos de hipófisis  $Drd2^{-/-}$  (Figura 8B).

La menor expresión del receptor  $T\beta RII$  en hipófisis hiperplásicas de ratones  $Drd2^{-/-}$  podría explicar, en parte, la ausencia de respuesta en las células adenohipofisarias  $Drd2^{-/-}$  frente al estímulo con TGF- $\beta$ 1.



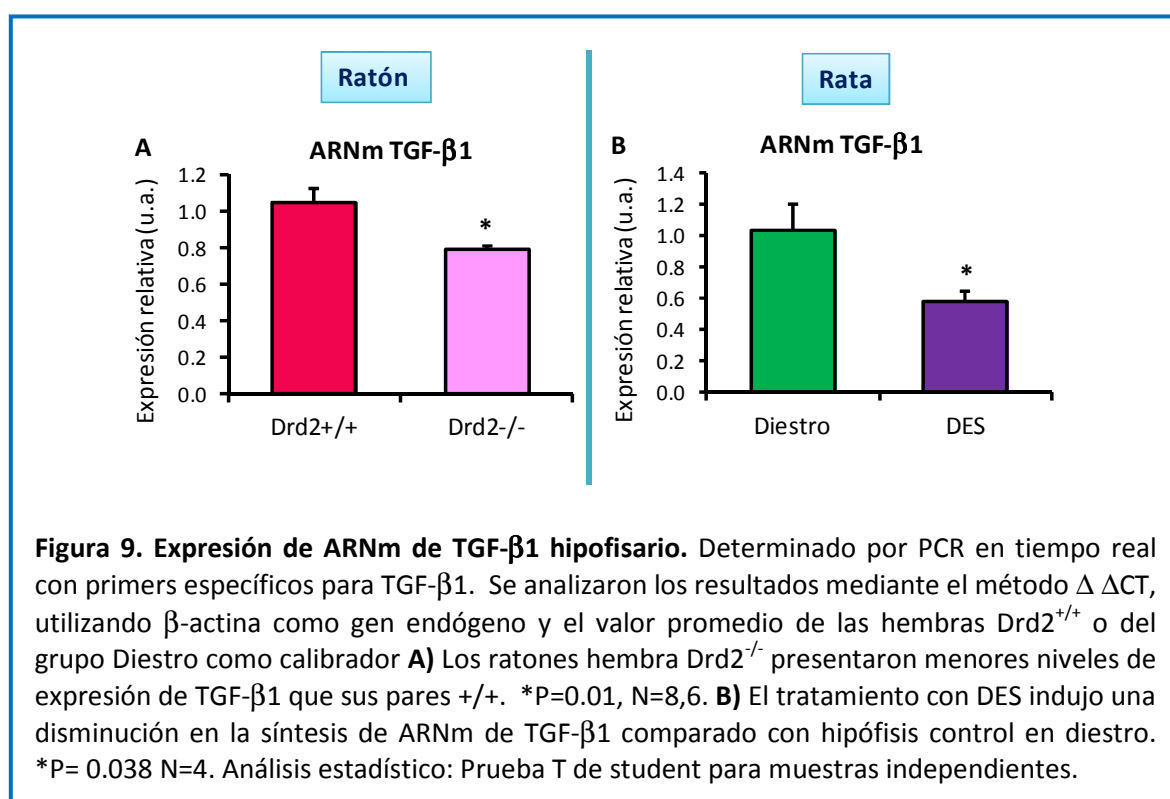


### ***Caracterización de TGF- $\beta$ 1 en prolactinomas experimentales***

Hasta aquí los resultados presentados y los antecedentes bibliográficos, nos dan la pauta de que la acción de TGF- $\beta$ 1 se encuentra alterada en los modelos de prolactinoma y podría estar contribuyendo a la formación del tumor. En esta sección nos propusimos profundizar este estudio, evaluando distintos componentes y puntos de regulación del sistema TGF- $\beta$ 1, comparativamente en hipófisis normales y tumorales, con el fin de identificar a qué nivel se encuentra alterada la regulación de la citoquina.

## Expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1

Comenzamos evaluando si había alteraciones a nivel de la síntesis de TGF- $\beta$ 1 en los modelos de prolactinomas. Se cuantificaron los niveles de expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 1 mediante PCR en tiempo real en adenohipófisis de ratones  $Drd2^{+/+}$  y  $Drd2^{-/-}$ , y de ratas control en diestro o tratadas con DES durante 4 semanas. En la Figura 9 se observa que las hipófisis tumorales, tanto en el modelo de inducción de prolactinoma inducido por tratamiento crónico con estrógenos (ratas DES) como en los prolactinomas inducidos por ausencia de inhibición dopaminérgica (ratones hembra  $Drd2^{-/-}$ ), presentaron menores niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1.

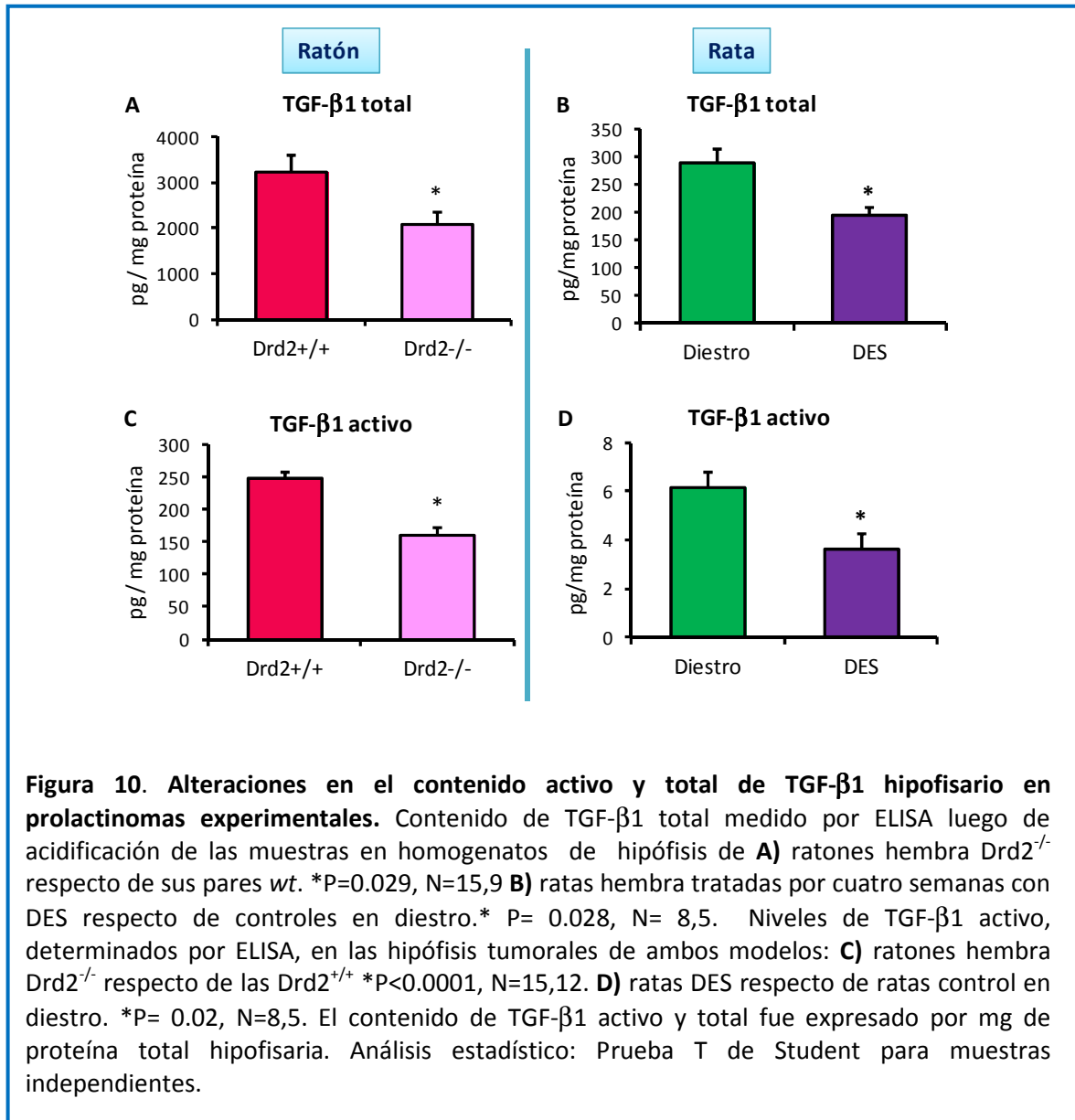


## Contenido de TGF- $\beta$ 1 activo y total en hipófisis

A continuación analizamos la expresión de TGF- $\beta$ 1 a nivel proteico en homogenatos de hipófisis en ambos modelos. En este punto cabe recordar que TGF- $\beta$ 1 se secreta en estado latente y permanece anclado en la matriz extracelular hasta que algún estímulo específico facilita la liberación de sus complejos latentes, proceso denominado activación de TGF- $\beta$ 1.

Previamente se había demostrado que en las hipófisis de ratas estrogenizadas los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 se encuentran disminuidos. Pero hasta el momento estos estudios no habían diferenciado los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y latente, sino que siempre se medía el contenido total de la citoquina utilizando una metodología de extracción que la liberaba de sus complejos latentes. Dado que consideramos que la activación de TGF- $\beta$ 1 representa un punto clave en la regulación de esta potente citoquina, nos interesó estudiar especialmente si los niveles de **TGF- $\beta$ 1 activo** se encontraban alterados en las hipófisis hiperplásicas. Para ello utilizamos un ensayo comercial de ELISA lo suficientemente sensible como para medir la citoquina libre (en estado **activo**) al momento de recolectar el tejido. Mediante este ensayo también pudimos determinar el contenido total de TGF- $\beta$ 1 (activo + latente) realizando un tratamiento ácido en las muestras, que libera artificialmente todas las moléculas de TGF- $\beta$ 1 que se encuentran en estado latente secuestradas en la matriz extracelular.

Mediante este análisis, encontramos en ambos modelos de prolactinoma una disminución significativa del contenido hipofisario, no solo de TGF- $\beta$ 1 total (Figura 10A y B), sino también de TGF- $\beta$ 1 activo en las hipófisis tumorales respecto de sus respectivos controles (Figura 10C y D).



Analizando comparativamente los valores del contenido hipofisario de TGF-β1 se desprende que únicamente el 8% de la citoquina total se encontró en estado activo en las hipófisis de ratones hembra *Drd2*<sup>+/+</sup> y *Drd2*<sup>-/-</sup>, y sólo el 3% se encontró en estado activo en las hipófisis de ratas hembra en diestro o tratadas con DES. Esta baja proporción de TGF-β1 activo/total pone en evidencia la importancia de la regulación de la activación a nivel local de la citoquina.

Con el objetivo de verificar si la disminución en los niveles de TGF-β1 activo en las hipófisis tumorales se veía reflejado efectivamente en una reducción del efecto biológico de la citoquina, estudiamos algunos de los eventos intracelulares desencadenados por la unión

de TGF- $\beta$ 1 a su receptor, tales como la fosforilación de SMAD2/3 (pSMAD2/3) y la activación de genes blanco.

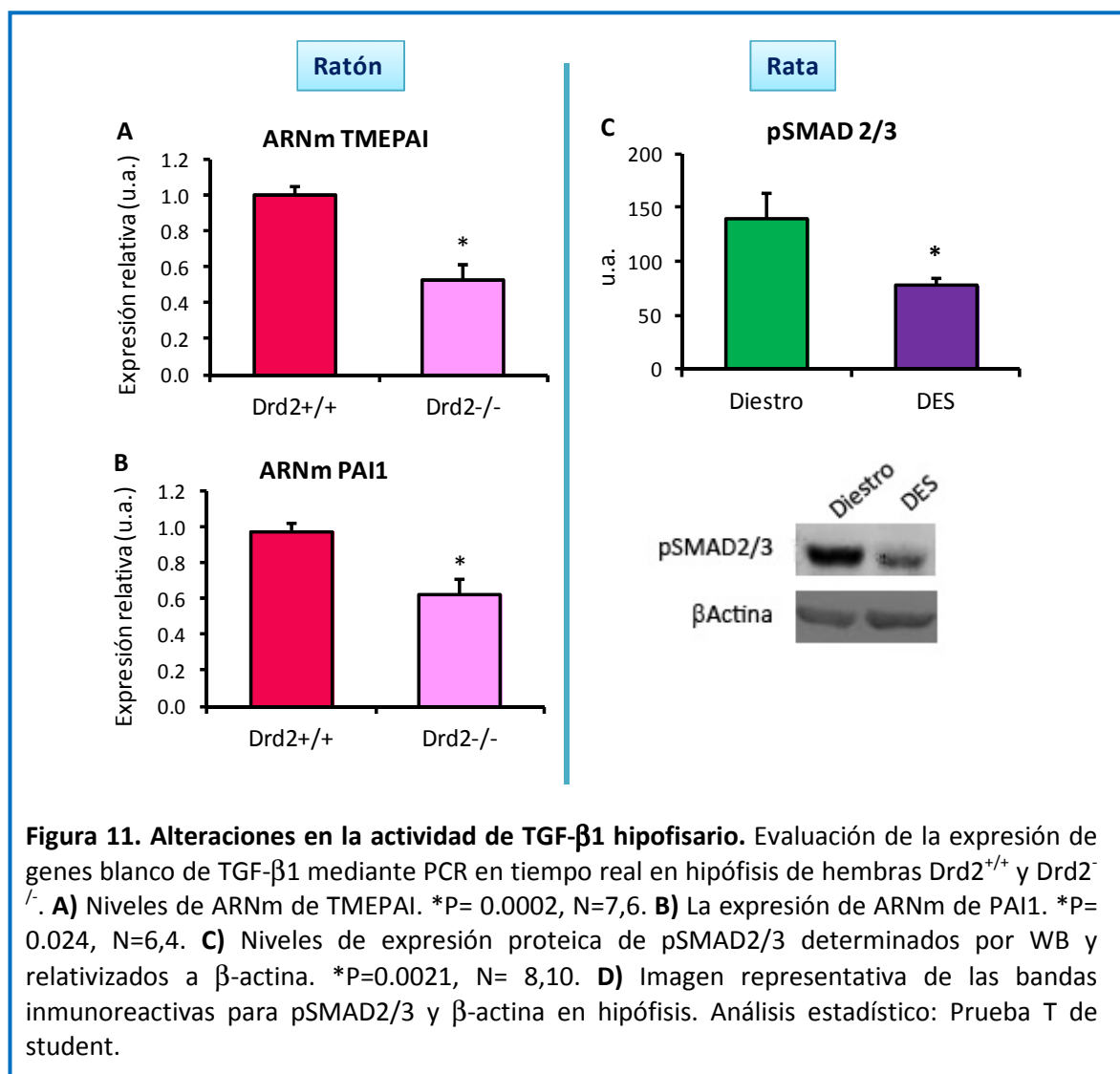
En el modelo de ratón evaluamos por PCR en tiempo real la expresión de ARNm de dos genes que se encuentran regulados positivamente por la citoquina: el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) (111) (112) y la proteína transmembrana inducida por andrógenos (TMEPAI, por *transmembrane prostate androgen-induced RNA*) (113;114).

Una vez inducida por TGF- $\beta$ 1, TMEPAI, actúa ejerciendo un *feedback* negativo sobre la actividad de la citoquina, inhibiendo la fosforilación y translocación al núcleo de las proteínas SMAD2 y 3 (115).

PAI-1 presenta en su promotor un elemento de respuesta al factor de transcripción SMAD3, activado por TGF- $\beta$ 1 luego de su unión al receptor ALK5 (116). PAI-1 regula la activación de plasmina en la matriz extracelular, inhibiendo el activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA).

En la Figura 11A y B se observa como ambos genes se encontraron disminuidos en las hipófisis de hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>, en concordancia con el menor contenido de TGF- $\beta$ 1 activo hallado en este genotipo comparado con las hipófisis *Drd2*<sup>+/+</sup>.

En el modelo de ratas estrogenizadas, estudiamos por WB la expresión de pSMAD2/3 y encontramos una inhibición en esta vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 en las hipófisis tratadas con DES en comparación con las hipófisis controles en diestro (Figura 11C). También en este modelo se observa una concordancia en la reducción del contenido de TGF- $\beta$ 1 activo y de sus efectos biológicos.

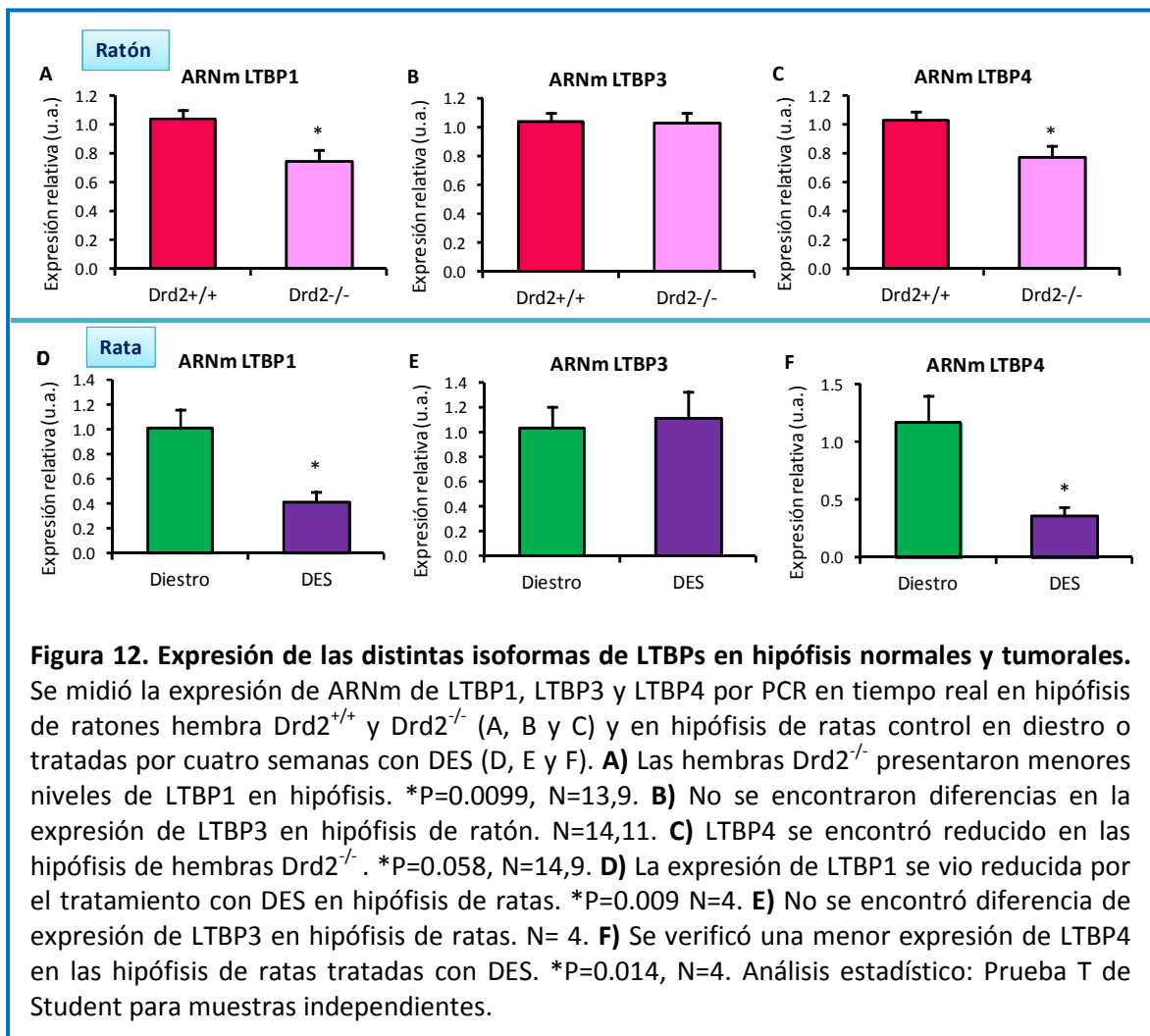


### Expresión de las Proteínas de unión a TGF-β latente (LTBPs)

Como mencionamos en la introducción general de esta tesis, las LTBPs son necesarias para el correcto plegamiento y secreción del complejo TGF-β latente, así como para su incorporación a la matriz extracelular. Se propone que estas proteínas tendrían también un rol en la regulación de la activación de TGF-β. Las isoformas LTBP1, LTBP3 y LTBP4 son capaces de unir TGF-β1. Hasta la actualidad no habían sido descritas las isoformas de LTBPs presentes en hipófisis normales y tumorales, y la función de las mismas en la regulación de la disponibilidad de TGF-β1.

Evaluamos la expresión del ARNm de LTBP1, LTBP3 y LTBP4 en hipófisis normales y tumorales en el modelo de disrupción de la función dopaminérgica en los ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> y en el modelo de ratas estrogenizadas (Figura 12).

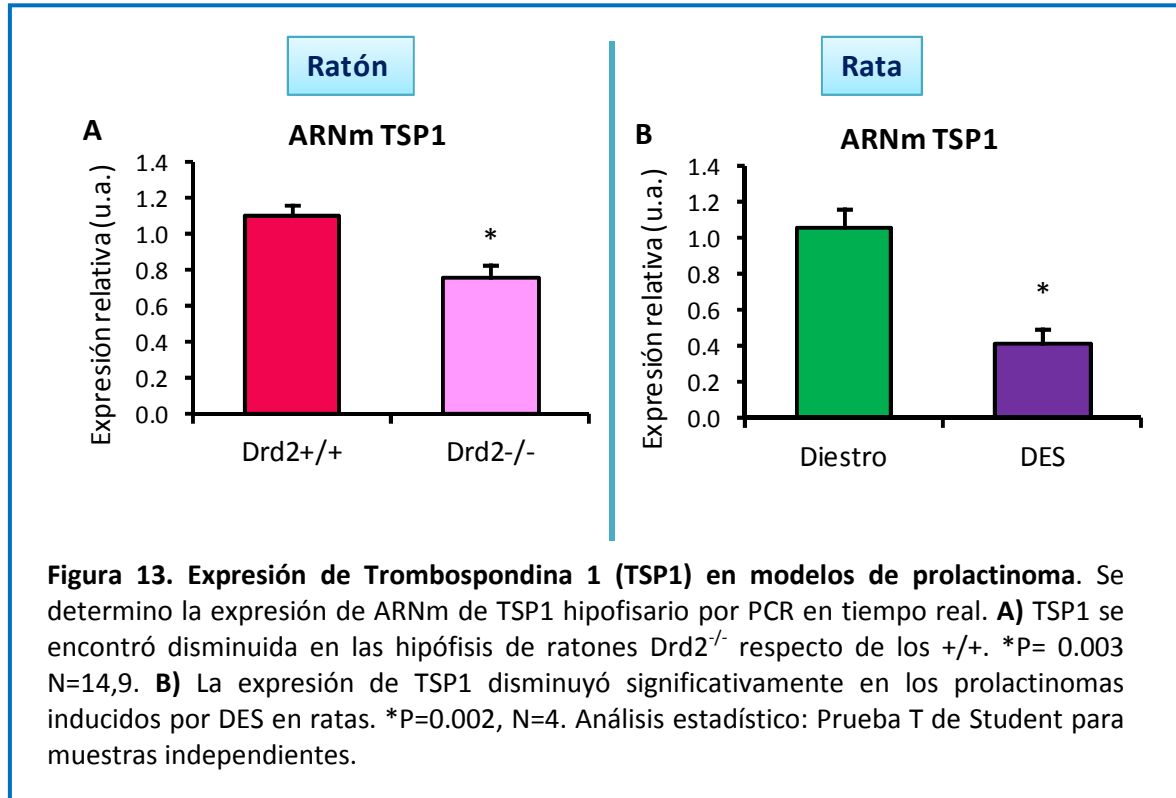
Demostramos por primera vez que las tres isoformas de LTBP's capaces de unir TGF- $\beta$ 1 se expresan en hipófisis y, más aún, encontramos una expresión diferencial de las mismas entre hipófisis normales e hiperplásicas. En los prolactinomas de ambos modelos experimentales hallamos menores niveles de expresión de LTBP1 y LTBP4 respecto a sus controles. La expresión de LTBP3 no presentó diferencias entre los grupos controles y los tumorales.



### Posibles activadores de TGF- $\beta$ 1: Trombospondina 1 (TSP1)

Hasta aquí demostramos que en los dos modelos de prolactinomas hay una inhibición de la activación de TGF- $\beta$ 1 y de sus proteínas de latencia. Para completar la caracterización del sistema TGF- $\beta$ 1 nos preguntamos si habría alteraciones también en la expresión de los posibles activadores de TGF- $\beta$ 1. Nos interesó particularmente estudiar la expresión de TSP1, una glicoproteína de la ME descrita como uno de los principales activadores de TGF- $\beta$ 1 *in vitro* e *in vivo*. Sarkar y col. ya habían demostrado la disminución de la expresión de esta TSP1 mediante inmunomarcación en hipófisis de rata luego de un tratamiento crónico con estrógenos (117).

Determinamos la expresión del ARNm de TSP1 mediante PCR en tiempo real en hipófisis normales y tumorales en nuestros modelos experimentales. En la Figura 13 se observa que la expresión de este posible activador local de TGF- $\beta$ 1 se encuentra disminuida significativamente en las hipófisis de hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> y en las de ratas tratadas con DES respecto de sus controles.





## DISCUSIÓN DEL CAPITULO 1

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes en humanos, y en general responden bien a la terapia farmacológica con agonistas de la dopamina. Sin embargo, para los pacientes que exhiben resistencia a los fármacos dopaminérgicos, es necesario encontrar terapias alternativas.

Dado que hay varios antecedentes en la literatura describiendo un efecto inhibitorio de TGF- $\beta$ 1 sobre la función de los lactotrofos (38;107;118), consideramos que esta citoquina podría ser un buen candidato para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de prolactinomas.

Para verificar esto, en primer lugar nos propusimos caracterizar en hipófisis normales y tumorales el “sistema TGF- $\beta$ 1”, al cual definimos como los distintos componentes implicados en la compleja regulación que presenta esta citoquina, que participan de su síntesis, formación de complejos latentes, secreción, anclaje en la ME, activación, unión a sus receptores y señalización.

En este primer capítulo de la tesis nos abocamos a estudiar distintos componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 en dos modelos experimentales de prolactinomas: los ratones hembra con disrupción del receptor dopaminérgico D2, y las ratas hembra estrogenizadas. Estos modelos, si bien tienen una etiología bien diferente, presentan características comunes al desarrollo de prolactinomas, principalmente el incremento en el peso hipofisario y los elevados niveles de prolactina sérica.

Las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>, al carecer de receptor RD2, representan un modelo ideal de prolactinomas resistentes a fármacos dopaminérgicos. La desventaja que presenta este modelo es el lento desarrollo de los tumores (a partir de los 6 meses de edad) y la dificultad en la obtención de los ratones *ko* debido a los problemas de fertilidad que presentan. En cambio, en las ratas estrogenizadas, el desarrollo de los prolactinomas se debe a la exposición a un exceso de estrógenos de niveles farmacológicos, con lo cual es un modelo un poco más alejado de lo que ocurre normalmente en humanos. La ventaja de este modelo es que presenta un desarrollo más rápido de los tumores (a partir de la cuarta semana de tratamiento) y que se encuentra muy bien caracterizado dado que se ha utilizado ampliamente en la bibliografía.

En este sentido, el grupo de Sarkar y col. describió que varios componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 se encuentran disminuidos en el modelo de ratas Fischer 344 estrogenizadas, tales como los niveles de ARNm y de proteína total de TGF- $\beta$ 1 y de su receptor T $\beta$ RII (107).

En este trabajo nos basamos en estos antecedentes, verificamos algunos de esos resultados en un modelo similar utilizado ampliamente en nuestro laboratorio generado en ratas de la cepa Sprague Dawley (82;83), y profundizamos el estudio comparándolo con el modelo de prolactinomas generados por ausencia de RD2 en ratón.

TGF- $\beta$ 1 es un potente inhibidor de la proliferación en diversos tipos celulares, y se ha demostrado que reduce la proliferación celular basal e inducida por estrógenos, así como también la secreción de PRL en cultivo primario de adenohipófisis de rata (118). En nuestros estudios *in vitro* demostramos también en el modelo de ratón que TGF- $\beta$ 1 inhibe la proliferación celular y la secreción de prolactina en células hipofisarias de hembras *Drd2*<sup>+/+</sup>. Sin embargo, en las células *Drd2*<sup>-/-</sup> no se observa el efecto inhibitorio de TGF- $\beta$ 1. Esta ausencia de respuesta puede estar relacionada con la reducida expresión del receptor de TGF- $\beta$  tipo II hallada en las hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup>. De manera similar, la resistencia a la inhibición del crecimiento celular mediado por TGF- $\beta$ 1 se vio asociada a una disminución en la expresión de los receptores tipo I y tipo II de TGF- $\beta$  en la línea celular PR1, derivada de un prolactinoma de rata (78) y en células epiteliales de cáncer de próstata humano (119). Estos resultados corroboran la existencia de una interacción entre TGF- $\beta$ 1 y el receptor dopaminérgico RD2 en la inhibición de la función de los lactotopos, tal como había sido propuesto por Sarkar y col. en prolactinomas de ratas (38).

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos, verificamos que los prolactinomas inducidos por tratamiento con estrógenos en ratas presentaron menores niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 y una reducción en el contenido total de la citoquina. Estos resultados fueron idénticos en los prolactinomas generados por ausencia de control dopaminérgico en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. Sin embargo el aporte más novedoso de este trabajo consistió en extender el estudio a la regulación de la activación de la citoquina. Demostramos que tanto las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> como las ratas tratadas con DES presentaron menores niveles hipofisarios de **TGF- $\beta$ 1 activo** que sus respectivos controles. Más aún, esto se vio acompañado por una reducción en la

actividad biológica de la citoquina, evidenciada por la disminución de la expresión de los genes blanco PAI1 y TMEPAI y de los niveles de PSMAD2/3.

Es interesante destacar que sólo encontramos entre un 3 y un 8% de la citoquina total hipofisaria en estado biológicamente activo. Es decir, la mayor proporción de la citoquina se encuentra en estado latente, **como reserva en la matriz extracelular**, donde debe sufrir un proceso de activación altamente regulado para ejercer su función biológica. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de medir los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo, y no sólo el contenido total cuando se realizan estudios sobre la acción del sistema TGF- $\beta$ 1 en diferentes tejidos.

Por otro lado, es sabido que las diferentes LTBP3 también participan en la regulación de la biodisponibilidad y función de TGF- $\beta$  a diferentes niveles: aseguran el correcto plegamiento y secreción, regulan el anclaje temporal y espacial de TGF- $\beta$  en la matriz extracelular y la interacción con otras proteínas de la matriz, y participan en la activación de TGF- $\beta$  (52;120). En este trabajo describimos, por primera vez en la literatura, que las tres isoformas de LTBP3 capaces de unirse a TGF- $\beta$ 1 se encuentran expresadas en hipófisis normales y tumorales. La expresión local de LTBP1 y LTBP4 se vio disminuida en los prolactinomas respecto de las hipófisis normales tanto en el modelo de rata como el de ratón, lo cual nos sugiere que la alteración en la expresión de estas proteínas podría estar relacionada a las alteraciones observadas en la actividad de TGF- $\beta$ 1 local, y por lo tanto, participando en la formación del tumor. En cambio LTBP3 no presentó diferencias en su expresión en ninguno de los dos modelos, indicando que esta isoforma no tendría un papel relevante en el desarrollo de los prolactinomas.

Al presente existen pocos datos en la bibliografía acerca de la alteración en los niveles de LTBP3 durante el proceso de tumorigénesis o carcinogénesis, pero en general se observa una marcada disminución en la expresión de estas proteínas de latencia en tejidos transformados respecto al tejido adyacente normal (121;122); y se ha postulado que la menor expresión de LTBP3 en tumores malignos limita la disponibilidad local de TGF- $\beta$ 1 conduciendo a la falta de efecto supresor sobre la proliferación de células epiteliales (123).

Por último evaluamos la expresión de TSP1 en ambos modelos de prolactinomas. El rol de TSP1 como activador de TGF- $\beta$ 1 se encuentra bien documentado en la bibliografía, siendo una de las pocas moléculas cuya capacidad de activar TGF- $\beta$ 1 latente ha sido

demostrada tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (63). Previamente había sido descrito que TSP1 se encuentra inhibida en las hipófisis de ratas tratadas crónicamente con estrógenos (117). En esta tesis verificamos una disminución en la expresión del ARNm de TSP1 en las ratas estrogenizadas de la cepa Sprague Dawley y también lo hallamos reducido en las hipófisis de hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>. TSP1 presenta numerosas funciones además de la capacidad de activar TGF- $\beta$ 1, siendo una de las más importantes la supresión de la angiogénesis (124).

La similitud de los resultados obtenidos en ambos modelos experimentales de prolactinoma, a pesar de su diferente etiología nos sugiere que la alteración de la regulación del sistema TGF- $\beta$ 1 sería una característica común de los adenomas hipofisarios que podría estar participando en la génesis del tumor.

La reducción en los niveles de expresión de TSP1 encontrada en ambos modelos de prolactinomas experimentales nos indican que esta proteína cumpliría un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis hipofisaria, ya sea manteniendo los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y/o manteniendo el equilibrio entre factores pro y anti-angiogénicos en la glándula. En base a esto proponemos que la restauración de los niveles locales de TSP1 podría constituir una terapia eficiente para este tipo de tumores. En el tercer capítulo del presente trabajo ensayamos, la eficacia de un tratamiento *in vivo* con péptidos sintéticos análogos de TSP1 (ABT510 y ABT898), en el modelo de prolactinoma inducido por estrógenos en rata hembra, obteniendo resultados promisorios.

Resumiendo los resultados expuestos en este capítulo, podemos concluir que los dos modelos de prolactinomas estudiados, uno generado por exceso de estimulación estrogénica, y el otro, por deficiencia de inhibición dopaminérgica, presentaron múltiples alteraciones en el sistema TGF- $\beta$ 1. Encontramos disminuida la síntesis de la citoquina, el contenido total y activo de la misma; una reducida respuesta *in vitro* y menores niveles de expresión del receptor tipo II; así como también observamos una disminución en la expresión de las proteínas de latencia LTBP1 y LTBP4 y de TSP1, uno de los posibles activadores de TGF- $\beta$ 1.

La inhibición general en el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario que encontramos por igual en los dos modelos de prolactinoma nos sugiere que esta citoquina juega un rol fundamental

en el mantenimiento de la homeostasis hipofisaria. Nuestros resultados **posicionan a TGF- $\beta$ 1 y a los distintos componentes de este sistema como blancos terapéuticos para el tratamiento de aquellos prolactinomas resistentes a las terapias convencionales.**

Por otro lado, de estos resultados también se desprende que tanto la dopamina como los estrógenos, los principales moduladores de la función del lactotrofo (proliferación y secreción de PRL), presentan una fuerte influencia sobre el sistema TGF- $\beta$ 1, y este, a su vez, impacta en la regulación de los mismos lactotrofos, conformando una intrincada red regulatoria.

## Capítulo 2

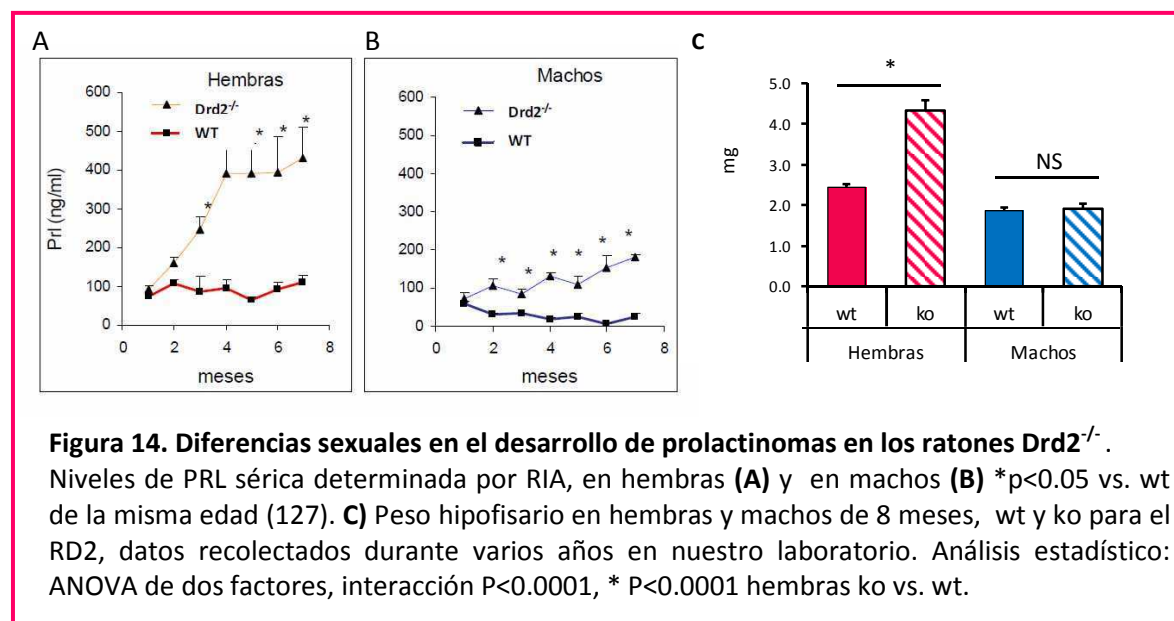
**Diferencias sexuales en el  
sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario.  
Regulación por dopamina y estradiol.**

## INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 2

### *Diferencias sexuales en la tumorigénesis hipofisaria en el ratón $Drd2^{-/-}$*

Como mencionamos en el capítulo anterior al describir el modelo del ratón  $Drd2^{-/-}$ , la pérdida de control dopaminérgico impacta de manera mucho más pronunciada en las hipófisis de hembras que en la de los machos (81;125;126).

Si bien en ambos sexos se aprecia una hiperprolactinemia a partir del segundo mes de vida, los niveles de PRL sérica son siempre mayores en las hembras que en los machos (Figura 14A y B) (127), y únicamente las hembras desarrollan una hiperplasia de los lactotropos a partir del sexto mes de vida. Alrededor del octavo mes de vida, las hipófisis de las hembras  $Drd2^{-/-}$  duplican o triplican el tamaño respecto a las hembras  $Drd2^{-/-}$ , mientras que sus congéneres masculinos no presentan aumento de peso hipofisario (Figura 14C). En cambio, a los 17-20 meses de edad, tanto hembras como machos desarrollan adenomas, evidenciados por la ruptura de la red de reticulina. En los machos, estos adenomas se presentan como pequeños nódulos multifocales, mientras que en las hembras se presentan como macroadenomas, con agrandamiento de la glándula de hasta unas 30-50 veces (94).



Es evidente que la falta de tono dopaminérgico es el principal evento que induce la hiperplasia de lactotopos en los ratones ko para el RD2. Sin embargo esto resulta aparentemente insuficiente como único inductor ya que los machos  $Drd2^{-/-}$  no generan hiperplasia hipofisaria. Por lo tanto la acción de otros factores debe ser necesaria para explicar el desarrollo diferencial entre sexos de los prolactinomas.

Se encuentra ampliamente descrito en la literatura que el tono dopaminérgico sobre los lactotopos es mayor en las hembras que en los machos. En 1981 Gudelsky y Porter reportaron que la concentración de dopamina en la eminencia media de ratas hembra en diestro era aproximadamente 7 veces mayor que la de machos (128). A su vez, las neuronas TIDA (principal fuente de dopamina hipotalámica) presentan una mayor actividad basal en las hembras respecto de los machos (129) y esto parece deberse a la acción de los estrógenos, dado que la ovariectomía suprime la actividad TIDA, y el reemplazo estrogénico la recupera. En los machos, por el contrario, la castración incrementa la actividad de estas neuronas y la testosterona la inhibe (130).

Por otro lado, ya mencionamos que el E2 es un importante estimulador de los lactotopos, contraponiéndose al efecto inhibitorio de la dopamina. Más aún, se ha visto que la inhibición por dopamina de la secreción de PRL y de la proliferación de los lactotopos es menos potente en presencia de estrógenos (104).

En base a estos antecedentes, los estrógenos fueron pensados como los primeros candidatos a mediar las diferencias sexuales en el desarrollo de prolactinomas en los ratones  $Drd2^{-/-}$ . Es así como el grupo del Dr. Malcom Low demostró que al castrar las hembras  $Drd2^{-/-}$  al nacer se impide el desarrollo de la hiperplasia hipofisaria. Sin embargo, el reemplazo sólo con estrógenos no logró restablecer el tamaño hipofisario que desarrolla una hembra  $Drd2^{-/-}$  intacta. En el mismo trabajo, los autores proponen que el desarrollo de la hiperplasia hipofisaria en estos ratones no se debería a un efecto directo de la falta de señalización de dopamina, sino más bien a la acción de factores estimulatorios sobre el lactotrofo, que encuentran un ambiente permisivo frente a la ausencia de oposición dopaminérgica (131).



Por lo expuesto, los mecanismos implicados en las diferencias sexuales en los ratones deficientes en RD2 no se encuentran del todo identificados. La interacción entre los efectos dopaminérgicos y estrogénicos sobre la regulación de los lactotropos y la modulación de factores locales podrían ser responsables de estas diferencias.

Tal como describimos en la introducción general, TGF- $\beta$ 1 es un buen candidato como mediador de los efectos dopaminérgicos y estrogénicos sobre el lactotropo, ya que regula la actividad de este tipo celular y a su vez es regulado positivamente por dopamina y negativamente por estradiol. Apoyando esta hipótesis, en el capítulo anterior demostramos que el sistema TGF- $\beta$ 1 se encuentra inhibido en dos modelos diferentes de prolactinomas experimentales: por ausencia de control dopaminérgico en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> y por exceso de estimulación estrogénica en las ratas DES.

Por lo tanto, en este capítulo nos propusimos profundizar el estudio de la regulación hipofisaria de TGF- $\beta$ 1, poniendo énfasis en las diferencias sexuales y en la regulación del sistema por dopamina y estradiol.

Dado que se observan diferencias entre los sexos en el desarrollo de los prolactinomas, tanto en humanos como en los modelos experimentales, nos preguntamos también si esto puede estar relacionado con una diferente participación sexo-específica del sistema TGF- $\beta$ 1 en el desarrollo de estos tumores.

## OBJETIVOS DEL CAPITULO 2

En base a los antecedentes presentados, nos propusimos estudiar las diferencias sexuales en los diferentes componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario y la regulación de los mismos *in vivo* por dopamina y estradiol.

### *Objetivos específicos:*

- 1) Evaluar el contenido hipofisario de TGF- $\beta$ 1 activo, total y del ARNm
- 2) Estudiar la expresión de componentes que participan en el ensamblaje de TGF- $\beta$ 1 latente: la enzima furina y las LTBP5.
- 3) Determinar la expresión de posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 a nivel hipofisario.

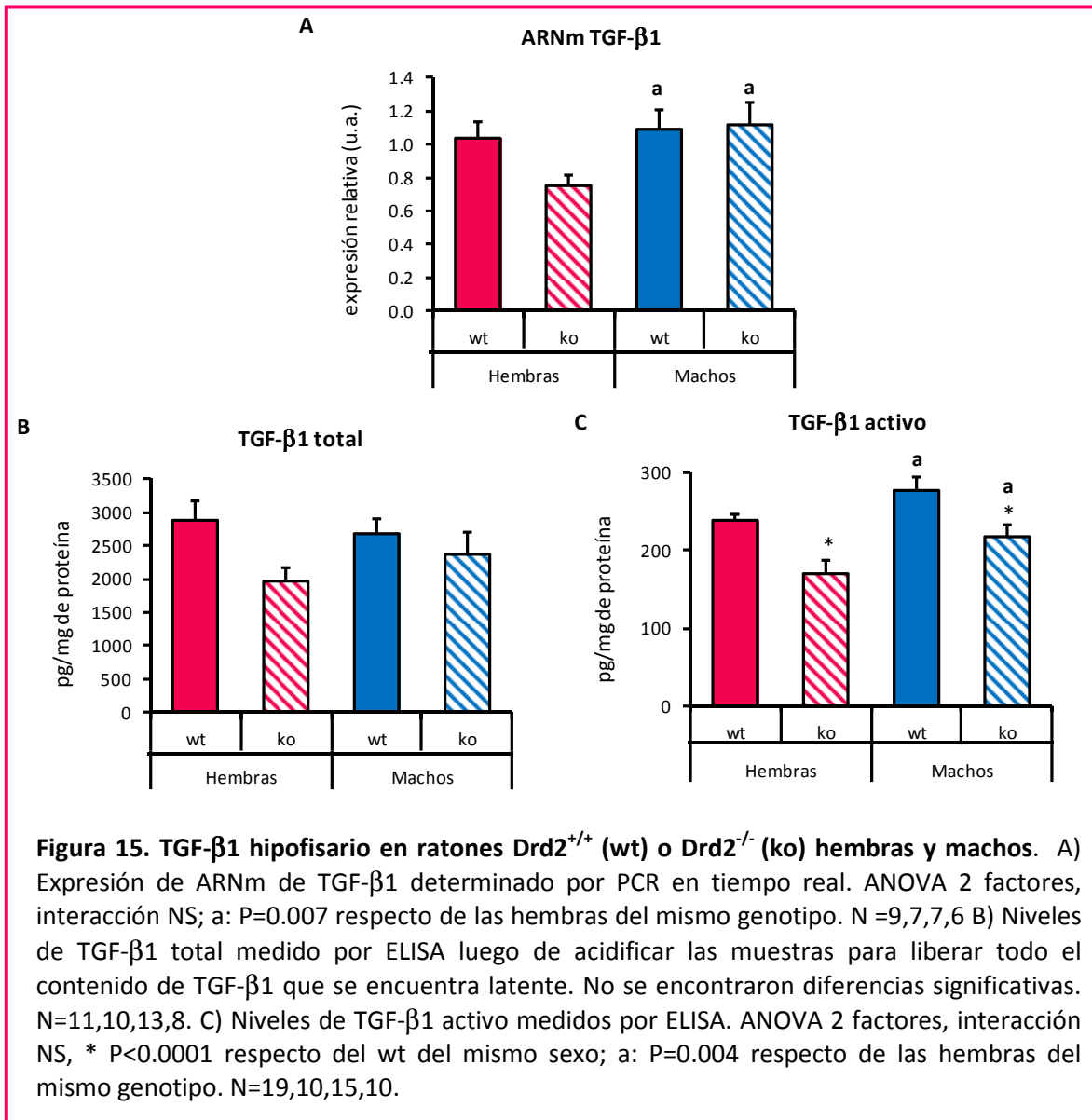
## RESULTADOS DEL CAPÍTULO 2

### *Contenido de TGF- $\beta$ 1 hipofisario en hembras y machos*

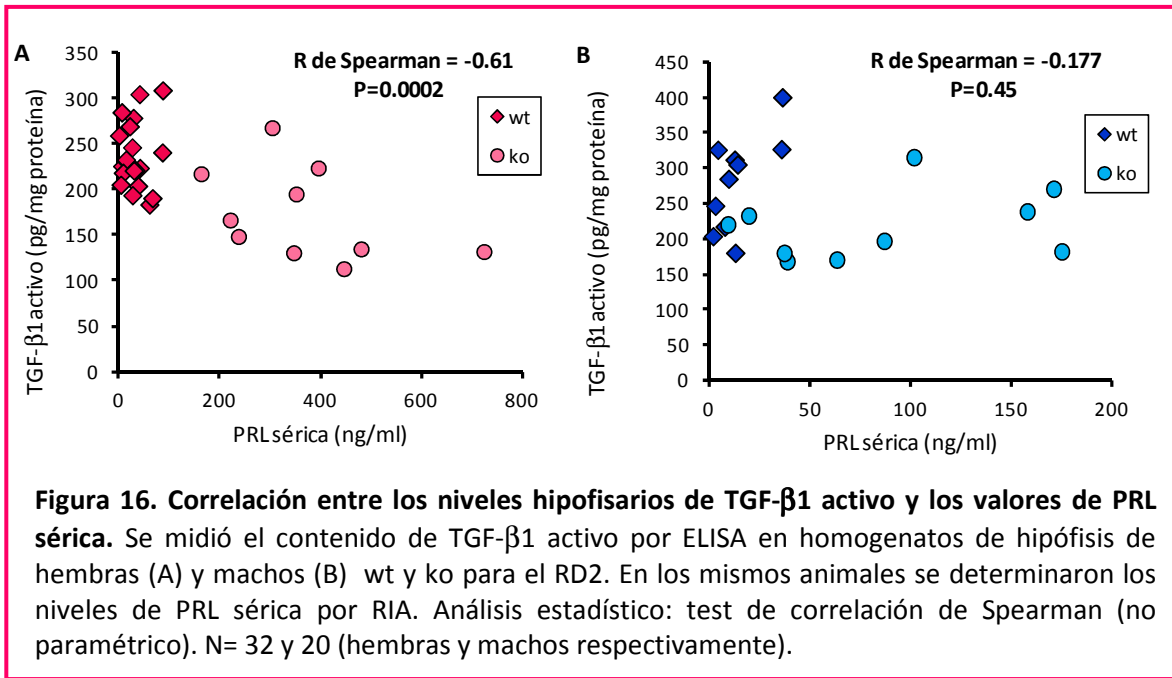
Comenzamos estudiando las diferencias sexuales en el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario comparando los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 medidos por PCR en tiempo real y el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo y total determinados por ELISA, en hipófisis de hembras y machos *wt*. Evaluamos también el impacto que sufren estos parámetros frente a la ausencia de control dopaminérgico en los ratones *ko* para el receptor D2.

Los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 resultaron mayores en machos respecto de hembras (Figura 15A), mientras que no se observaron diferencias entre genotipos en ninguno de los sexos. Sin embargo, se observa en las hembras *ko* una tendencia a una menor expresión respecto de las *wt*. En cuanto al contenido de TGF- $\beta$ 1 total, no se encontraron diferencias entre sexos ni genotipos, aunque, nuevamente se ve una tendencia en las hembras *ko* a presentar menores niveles que las *wt*.

A pesar de no observar diferencias sexuales en el contenido total de citoquina hipofisaria, cuando evaluamos el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo, encontramos mayores niveles en las hipófisis de machos respecto de las hembras del mismo genotipo. Por otro lado, la pérdida de control dopaminérgico causó una disminución de TGF- $\beta$ 1 activo en ambos sexos por igual (Figura 15C).



TGF-β1 es un factor inhibitorio de la secreción de PRL *in vitro*, por lo tanto, la disminución en los niveles de la citoquina activa observados en los ratones  $Drd2^{-/-}$  de ambos sexos, podría estar afectando la función de los lactotrofos. Apoyando esta hipótesis, encontramos una correlación inversa entre los niveles de TGF-β1 activo y la PRL sérica en las hembras (Figura 16 A). Sin embargo los machos no presentaron correlación entre estos parámetros (Figura 16 B); y tampoco se encontró correlación entre TGF-β1 total y los niveles de PRL sérica en ninguno de los sexos (resultados no mostrados).



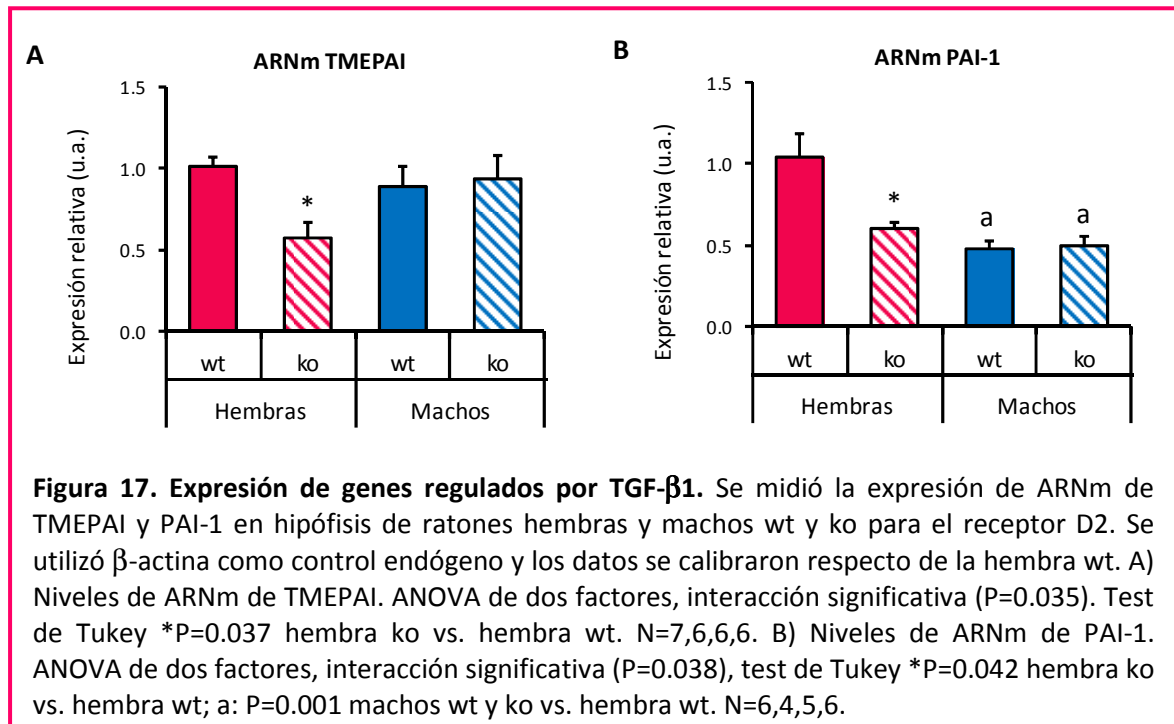
### Expresión de genes regulados por TGF-β1

Los menores niveles de TGF-β1 activo en hipófisis ko podrían verse reflejados en menores niveles basales de pSMAD2/3 hipofisarios. Sin embargo no pudimos detectar por western blot la expresión de pSMAD2/3, posiblemente debido a la baja fosforilación basal de estas proteínas sumado a la baja cantidad de proteínas que se obtiene a partir de una hipófisis de ratón. Por lo tanto, para verificar la alteración en la actividad biológica de TGF-β1 en las hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup>, decidimos evaluar en ambos sexos y genotipos la expresión de dos de los genes blanco inducidos por la acción de esta citoquina: TMEPAI y PAI1.

Analizamos la expresión hipofisaria de estos genes inducidos por TGF-β1 mediante PCR en tiempo real y encontramos que ambos se encontraron inhibidos en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>, en concordancia con el menor contenido de TGF-β1 hipofisario. Sin embargo, en los machos no observamos diferencias en la expresión de TMEPAI y PAI-1 entre genotipos, a pesar de que los machos ko para el RD2 también presentan menores niveles de TGF-β1 activo (Figura 17A). Estos resultados podrían estar indicando una diferente sensibilidad de

ambos sexos en respuesta a la disminución de TGF- $\beta$ 1 activo, que parecería tener mayores consecuencias en las hembras que en los machos.

Por otro lado, los niveles de PAI-1 fueron menores en los machos respecto de las hembras wt (Figura 17B).

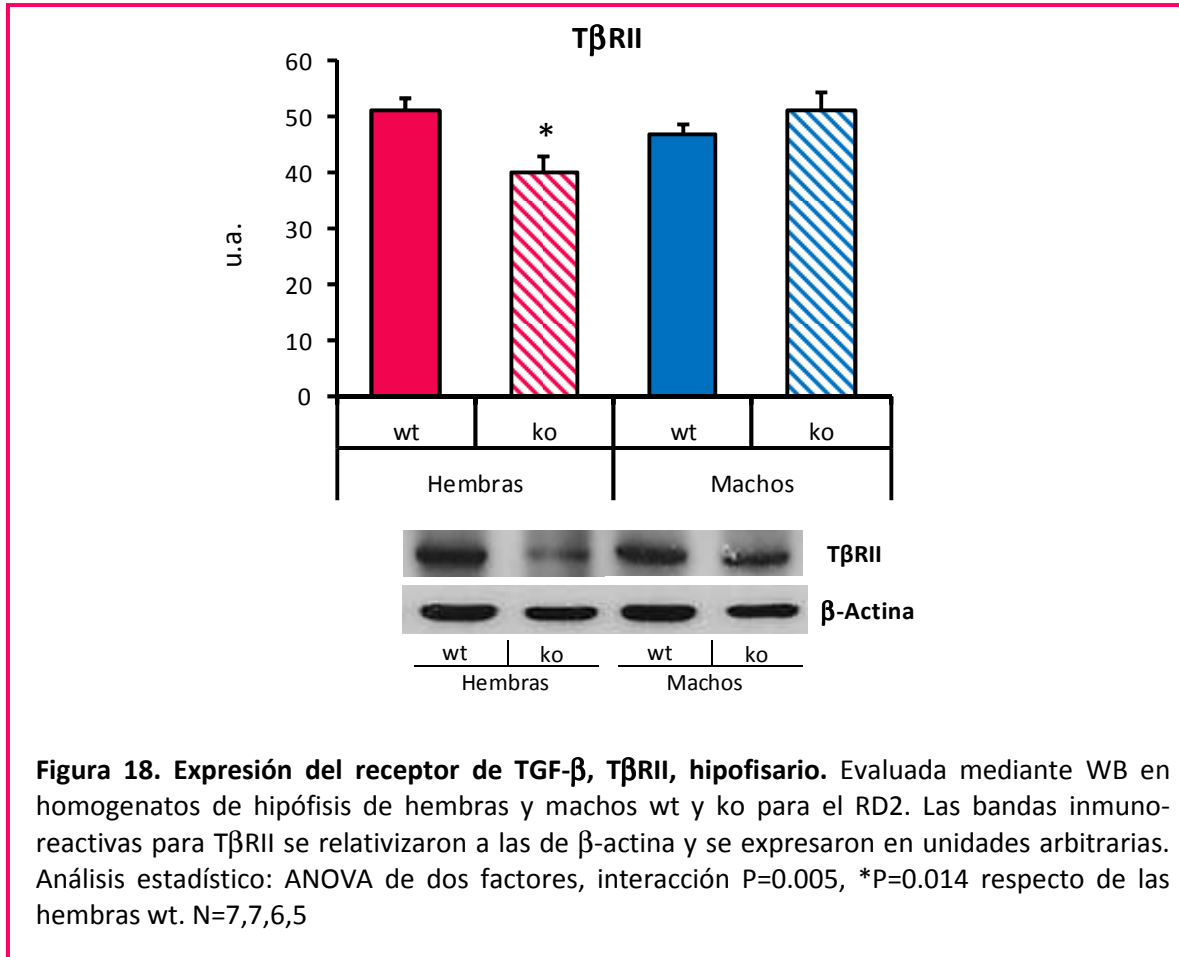


### *Expresión de componentes que intervienen en la señalización de TGF- $\beta$ 1*

Para determinar si la ausencia de respuesta en la expresión de los genes blanco de TGF- $\beta$ 1 en los machos puede deberse a alteraciones en la señalización intracelular, analizamos la expresión del receptor T $\beta$ RII hipofisario.

Previamente se describió que la dopamina induce la expresión de este receptor en hipófisis de ratas, y en concordancia con este antecedente, en el capítulo anterior verificamos una disminución en la expresión de T $\beta$ RII en las hembras ko para el RD2. Cuando analizamos los datos comparativamente en hembras y machos, se observa que sólo las

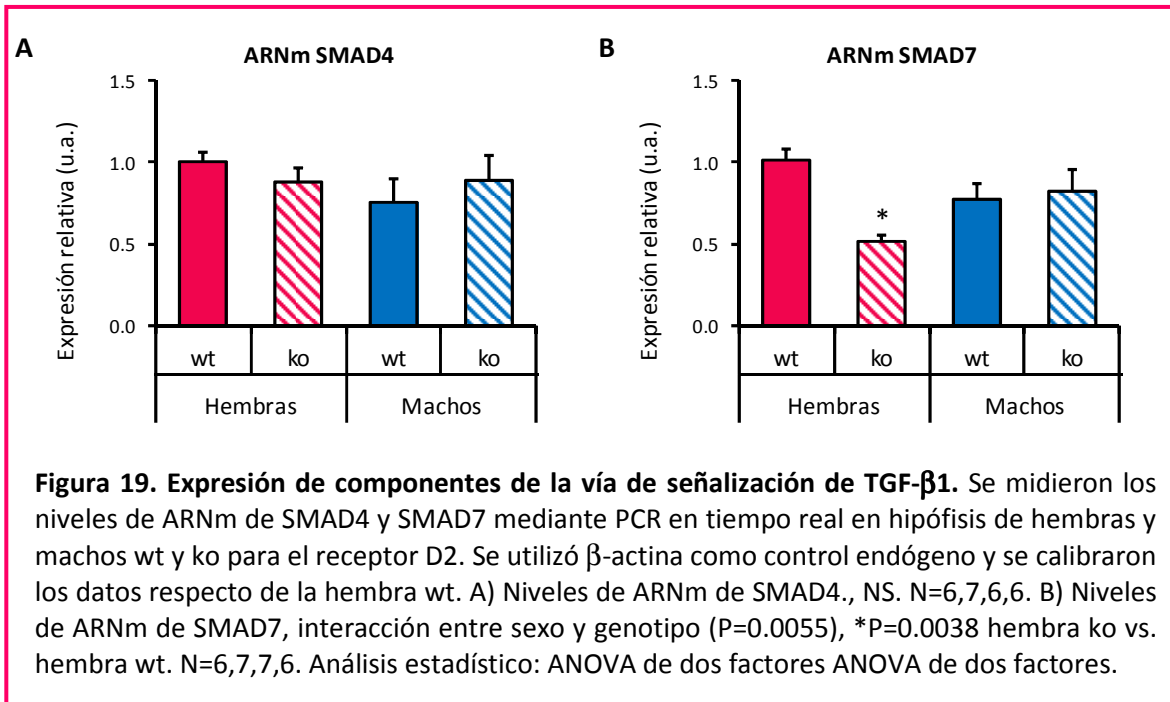
hembras presentan menores niveles de expresión proteica del T $\beta$ RII, mientras que en los machos no hay diferencias entre genotipos (Figura 18). Esto podría estar explicando, en parte, la diferente sensibilidad a la disminución de TGF- $\beta$ 1 activo en ambos sexos.



**Figura 18. Expresión del receptor de TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, hipofisario.** Evaluada mediante WB en homogenatos de hipófisis de hembras y machos wt y ko para el RD2. Las bandas inmunoreactivas para T $\beta$ RII se relativizaron a las de  $\beta$ -actina y se expresaron en unidades arbitrarias. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, interacción  $P=0.005$ ,  $*P=0.014$  respecto de las hembras wt.  $N=7,7,6,5$

A continuación estudiamos la expresión génica de SMAD4 y SMAD7, proteínas relacionadas con la regulación de la señal intracelular que dispara TGF- $\beta$ 1 luego de unirse y activar a su receptor. SMAD4 es la co-SMAD que se une a pSMAD2 y pSMAD3 para formar el complejo transcripcional que transloca al núcleo y regula síntesis de genes blanco de TGF- $\beta$ 1. Por otro lado, SMAD7, compete con las pSMADs por los sitios de unión a SMAD4, impidiendo la formación del complejo regulador de la transcripción.

No encontramos diferencias entre machos y hembras, ni entre genotipos, en la expresión hipofisaria de SMAD4, (Figura 19A). En cambio la expresión SMAD7 se vio reducida en las hipófisis de hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>, sin encontrarse diferencias entre genotipos en los machos (Figura 19B).



### Regulación dopaminérgica de TGF-β1 hipofisario

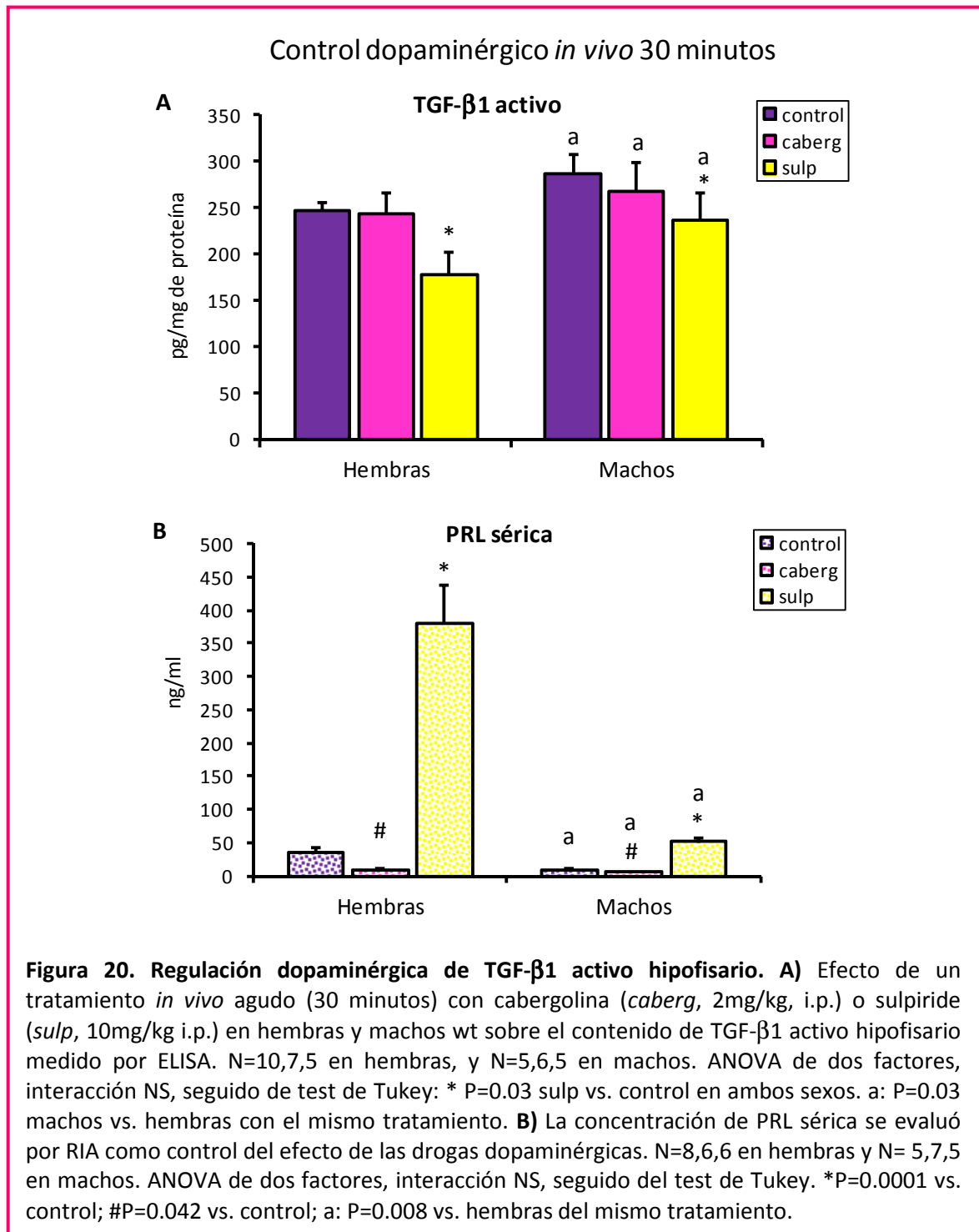
Dado que la ausencia crónica de control dopaminérgico en nuestro modelo causó una disminución en TGF-β1 activo hipofisario en ambos sexos, decidimos estudiar en mayor profundidad la participación de la dopamina y del RD2 en la regulación local de la activación de TGF-β1. Para ello analizamos el efecto *in vivo*, a tiempo corto (30 minutos) del agonista del RD2, cabergolina (2mg/kg, i.p.) y del antagonista sulpiride (10mg/kg, i.p.) sobre los niveles hipofisarios de citoquina activa en ratones hembras y machos wt adultos. Utilizamos este tratamiento agudo para evaluar efectos específicamente sobre la activación de TGF-β1, distinguiéndolo de algún efecto a nivel de la síntesis, evaluada a tiempos más largos.

El tratamiento agudo con sulpiride disminuyó los niveles locales de TGF-β1 activo en ambos sexos (Figura 20A), indicando un efecto estimulador de la dopamina a través del RD2 sobre la activación de la citoquina. En cambio, no se observó efecto del agonista cabergolina, lo cual puede deberse a que la acción tónica de dopamina sobre la hipófisis podría estar ejerciendo la máxima estimulación sobre la activación de TGF-β1.

Una vez más se observaron mayores niveles de TGF-β1 activo en los machos respecto de las hembras.

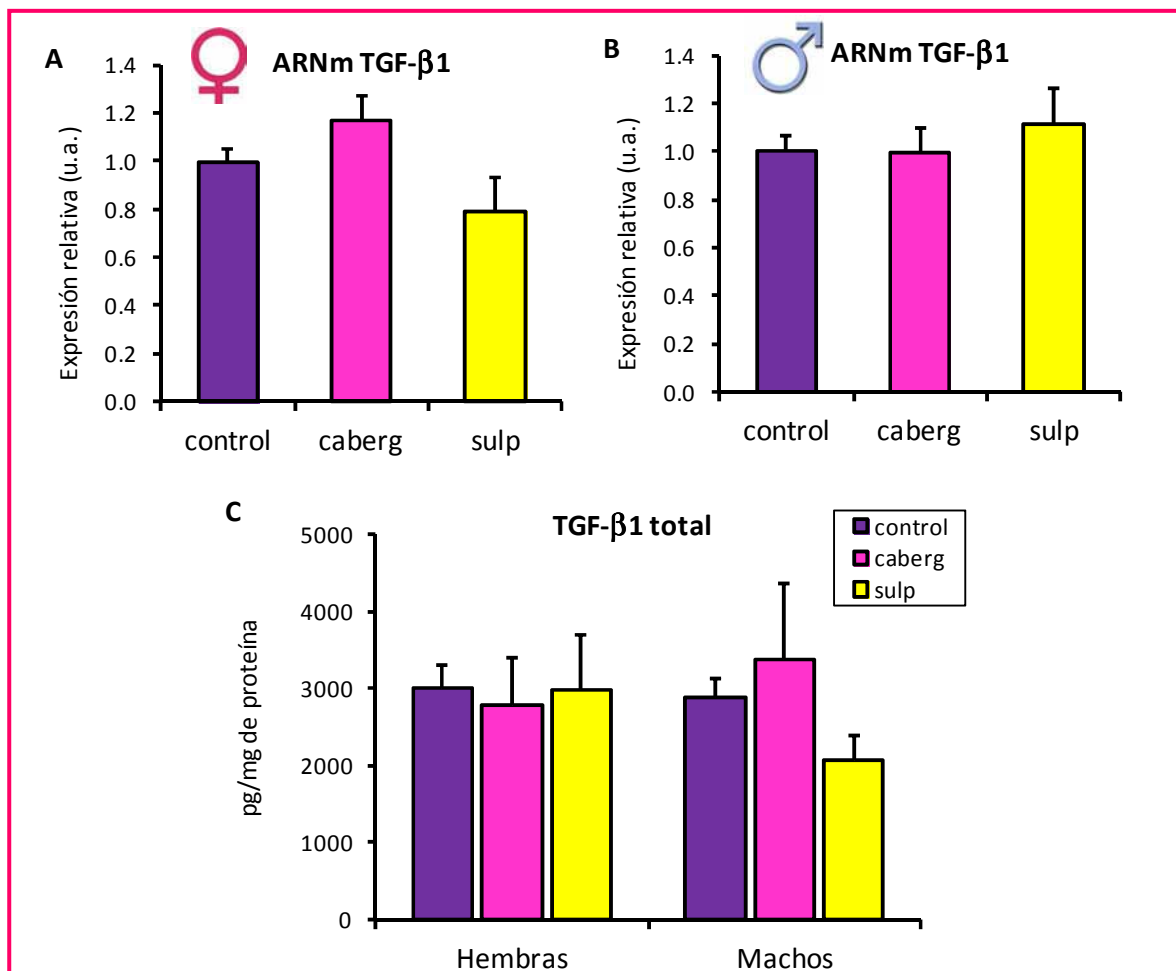


Se midieron los niveles de PRL séricos como control positivo del efecto de las drogas. El agonista cabergolina disminuyó la PRL sérica, y el antagonista sulpiride los incrementó luego de 30 minutos de tratamiento, en ambos sexos, tal como se esperaba. Los machos presentaron menores niveles de PRL sérica que las hembras (Figura 20B).



Estos resultados demuestran por primera vez que existe una regulación dopaminérgica de la activación de TGF- $\beta$ 1 hipofisario, lo cual concuerda con los bajos niveles de TGF- $\beta$ 1 activo hallados en los ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>.

Evaluamos también la regulación por dopamina sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 total y la síntesis de ARNm luego de 24 hs de un tratamiento *in vivo* con cabergolina (2mg/kg) o sulpiride (10mg/kg) en hembras y machos wt. No encontramos diferencias significativas en ninguno de estos parámetros con los tratamientos realizados (Figura 21A y B).



**Figura 21. Regulación dopaminérgica de ARNm y TGF- $\beta$ 1 total hipofisario.** Efecto de un tratamiento *in vivo* por 24hs con cabergolina (*caberg*, 2 mg/kg, i.p.) o sulpiride (*sulp*, 10mg/kg i.p.) sobre los niveles del ARNm de TGF- $\beta$ 1 (A y B) determinados por PCR en tiempo real y sobre el contenido de TGF- $\beta$ 1 total determinado por ELISA (C). Los datos de ARNm se calcularon por el método  $\Delta\Delta$ CT utilizando el promedio de los valores del grupo control como calibrador. A) Niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 hipofisario en hembras. N=8,6,5. B) Niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 en machos, N=6,7,6. (C) Contenido de TGF- $\beta$ 1 total hipofisario en hembras y machos. N=10,8,8 en hembras; N= 6,6,8 en machos. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores en A y B; ANOVA de tres factores en C.

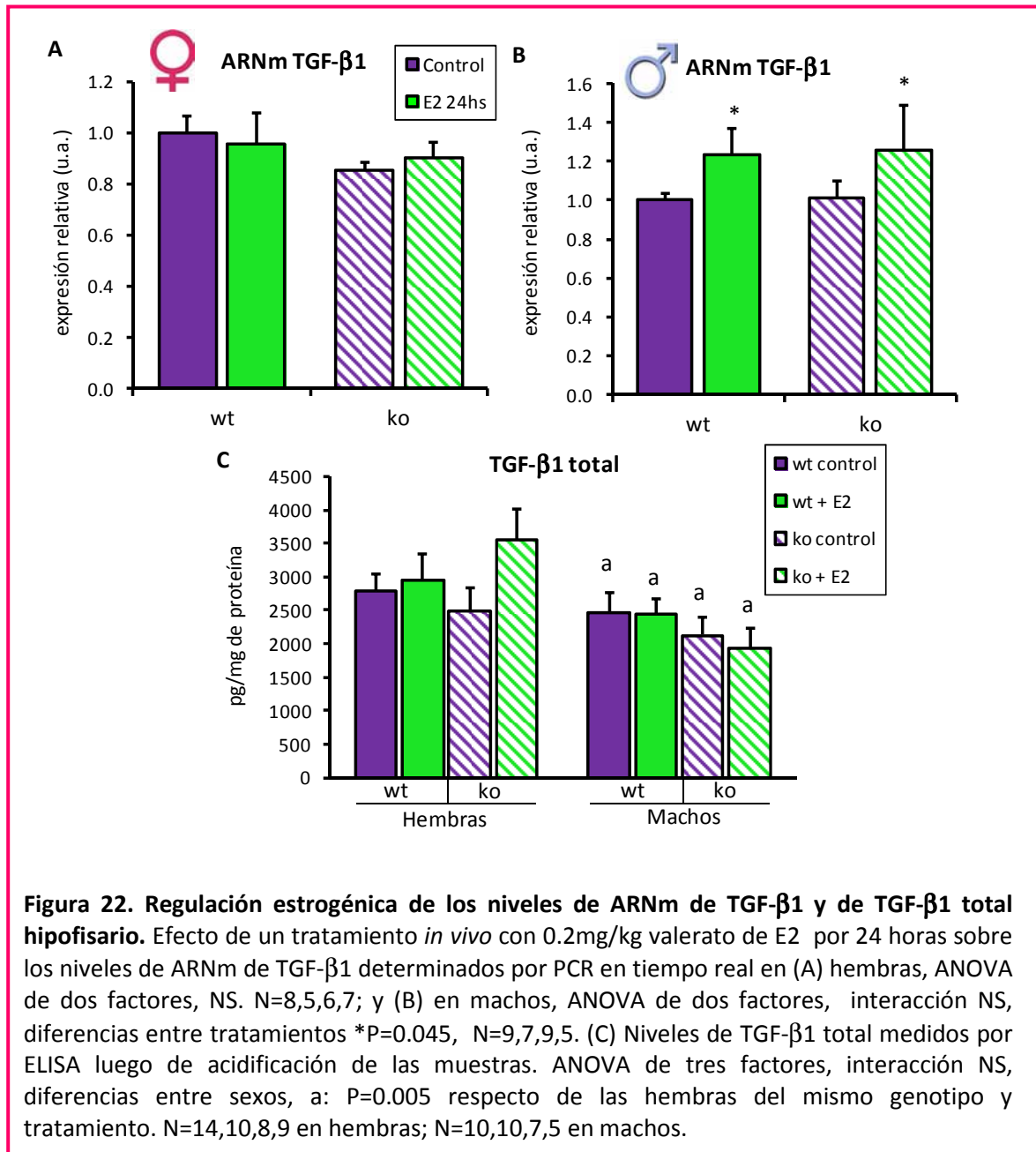
### *Regulación estrogénica de TGF- $\beta$ 1 hipofisario*

A continuación estudiamos si el sistema TGF- $\beta$ 1 se encuentra modulado también por otro de los principales reguladores de la función de los lactotropos, con acciones opuestas a las de dopamina: **el estradiol (E2)**. Es sabido que un tratamiento crónico con estrógenos inhibe la síntesis de TGF- $\beta$ 1 en ratas (79). Sin embargo, no hay antecedentes sobre la participación de los estrógenos en la activación de TGF- $\beta$ 1.

Para estudiar los efectos *in vivo* de E2 en nuestro modelo, inyectamos en forma subcutánea (s.c.) 0.2 mg/kg valerato de E2, o aceite de ricino (control) en ratones hembra y machos adultos wt y ko para el receptor D2 y analizamos los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 y el contenido de citoquina total y activa por ELISA en las hipófisis de los distintos grupos. Con estos experimentos quisimos evaluar no sólo la regulación estrogénica del sistema TGF- $\beta$ 1, sino también cómo se ve afectada la respuesta a los estrógenos por la ausencia de receptor D2.

Observamos que el tratamiento de 24hs con estradiol no alteró los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1 en las hembras, mientras que, en los machos produjo un incremento significativo en ambos genotipos (Figura 22A y B). Es decir, machos y hembras respondieron diferencialmente al tratamiento con estrógenos.

El contenido de TGF- $\beta$ 1 total (activo + latente) no se vio modificado por el tratamiento con estradiol a las 24 hs en ninguno de los sexos o genotipos (Figura 22C). El análisis estadístico por ANOVA factorial arrojó diferencias significativas entre los sexos, presentando, en este caso, los machos menores niveles de TGF- $\beta$ 1 total respecto de las hembras, probablemente debido a la tendencia del estradiol a un aumento en los niveles de citoquina total en hembras que no resultó significativo (interacción NS, efectos principales entre sexos: P=0.005).



Sin embargo, los resultados más interesantes se obtuvieron al analizar la regulación estrogénica de **TGF-β1 activo** hipofisario (Figura 23). Hembras y machos respondieron de manera diferente al tratamiento con valerato de E2 y también encontramos una dependencia del control dopaminérgico a través del RD2 (ANOVA de tres factores con interacción sexo\*tratamiento\*genotipo P=0.005).

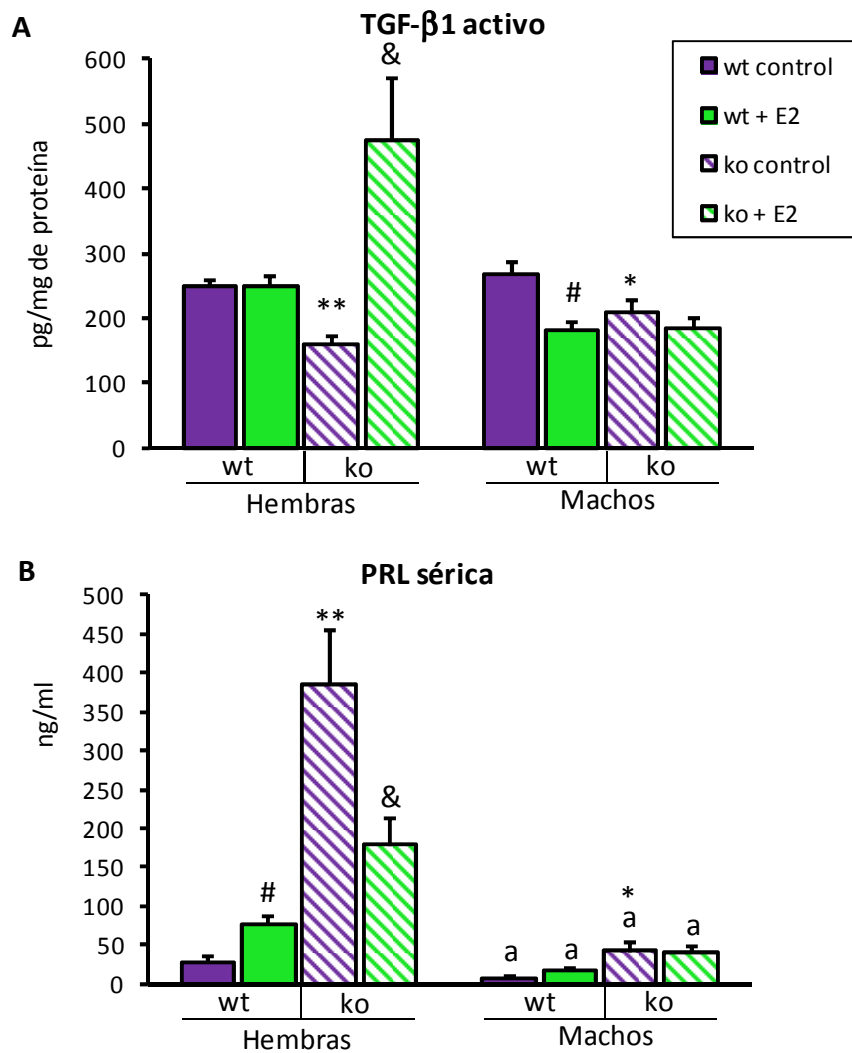
Cuando analizamos por separado el efecto del tratamiento en las hembras, encontramos que el E2 no modificó los niveles de la citoquina activa en las hipófisis de hembras wt, pero, sorpresivamente, **indujo un marcado incremento de TGF-β1 activo en**

**las hembras ko para el receptor D2** (Figura 23A). Más interesante aún, este aumento fue concomitante con la disminución en los niveles de PRL sérica en este grupo (Figura 23B), y nuevamente encontramos una correlación negativa significativa entre los valores de PRL sérica y los de TGF- $\beta$ 1 activo, en las hembras ko para el RD2 (R de Spearman= -0.612, P=0.011).

En los machos, a diferencia de las hembras, el tratamiento con E2 causó una **disminución** en los niveles de TGF-  $\beta$ 1 activo en los animales wt, sin observarse efecto en los machos ko para el RD2 (Figura 23A). No se observó efecto de los estrógenos sobre la PRL sérica en ninguno de los genotipos.

**Estos resultados indican una fuerte dependencia del tono dopaminérgico en las respuestas evocadas por E2**, principalmente en las hembras, y ponen en evidencia la compleja interrelación, entre dopamina y estradiol, en la regulación de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario y de la secreción de PRL.

Hasta aquí demostramos que las principales diferencias en la regulación del sistema TGF- $\beta$ 1 entre sexos, genotipos y tratamientos (tanto dopaminérgicos como estrogénicos), se observaron sobre el contenido de **TGF- $\beta$ 1 activo**. Mientras que los niveles de TGF- $\beta$ 1 total y de ARNm no presentan mayores variaciones por los factores estudiados y en los tiempos estudiados. Estos resultados resaltan la importancia que tiene la regulación de los mecanismos de activación que permiten la liberación de la citoquina de sus complejos latentes.



**Figura 23. Regulación estrogénica de los niveles de TGF-β1 activo hipofisario.** Efecto de un tratamiento *in vivo* con 0.2mg/kg valerato de E2 por 24 horas sobre los niveles de TGF-β1 activo determinados por ELISA. ANOVA de tres factores, interacción sexo x genotipo x tratamiento  $P=0.005$ . ANOVA de dos factores en hembras, interacción genotipo x tratamiento  $P<0.0001$ , test de Tukey,  $**P=0.001$  vs. wt control. &:  $P<0.0001$  vs ko control.  $N=11,11,9,7$ ; ANOVA de dos factores en machos, interacción genotipo x tratamiento  $P=0.03$ , test de Tukey  $*P=0.016$  vs wt control,  $\#P=0.0002$  vs wt control.  $N=11,9,7,6$ . (B) Niveles de PRL sérica medidos por RIA. ANOVA de tres factores, interacción triple NS, efecto sexo a:  $P<0.0001$  vs hembras del mismo tratamiento y genotipo. Interacción genotipo x tratamiento, test de Tukey  $\#P=0.006$ , vs hembra wt control;  $**P=0.0001$  vs. hembra wt control;  $\&P=0.0001$  vs. hembra ko control;  $*P=0.003$ ;  $N=14,10,8,9$  en hembras;  $N=10,10,7,5$  en machos.

Dado que, ni la dopamina ni el estradiol son *per se* capaces de provocar la activación de TGF- $\beta$ 1, la regulación que observamos sobre este proceso por ambas hormonas, debe estar mediada por la acción de las mismas sobre otros componentes del sistema TGF- $\beta$ , ya sea sobre aquellos involucrados en la formación del complejo latente de TGF- $\beta$ , o a través de un efecto sobre los activadores locales.

Con el objetivo de identificar los mediadores de los efectos de dopamina y estradiol observados, estudiamos a continuación la regulación local de otros componentes del sistema TGF- $\beta$ 1.

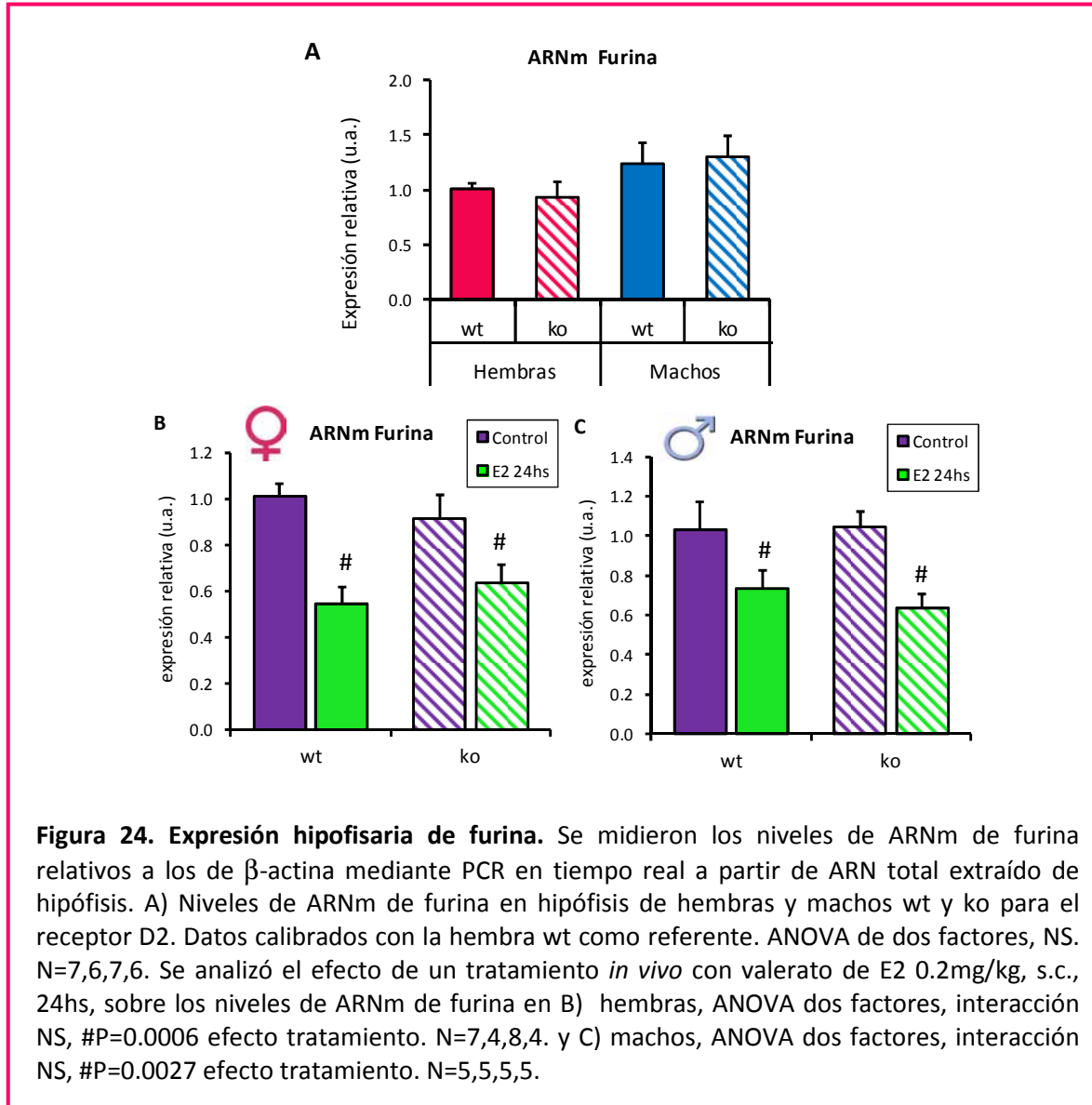
### *Regulación de la expresión génica de la convertasa furina*

Como mencionamos en la introducción general, TGF- $\beta$ 1 es sintetizado como un precursor inactivo formado por la citoquina biológicamente activa fusionada a un péptido que le confiere latencia, denominado LAP. Este precursor inactivo contiene una secuencia consenso que es reconocida por la enzima convertasa furina, la cual se encarga de escindir el precursor LAP, separándolo de TGF- $\beta$  maduro, en el aparato de Golgi. Sin embargo, luego del clivaje por furina, LAP y TGF- $\beta$ 1 permanecen unidos por fuerzas no covalentes y adquieren una conformación tridimensional que es suficiente para mantener inactiva a la citoquina (50) (132).

Por lo expuesto, la enzima furina constituye el primer paso necesario para la formación del complejo latente de TGF- $\beta$ 1 y por lo tanto alteraciones en la expresión o función de la misma podrían repercutir en un desbalance en la acumulación de precursor inactivo y en la correcta secreción y posterior activación de TGF- $\beta$ 1.

Al evaluar la expresión hipofisaria del ARNm de furina, no encontramos diferencias significativas entre sexos ni genotipos (Figura 24A), sugiriendo que no habría una regulación dopaminérgica sobre la síntesis de esta enzima.

Sin embargo el tratamiento de 24hs con estradiol disminuyó los niveles de ARNm de furina en la hipófisis de hembras y machos de ambos genotipos (Figura 24B y C).





## *Expresión y regulación de las Proteínas de unión a TGF- $\beta$ Latente (LTBPs)*

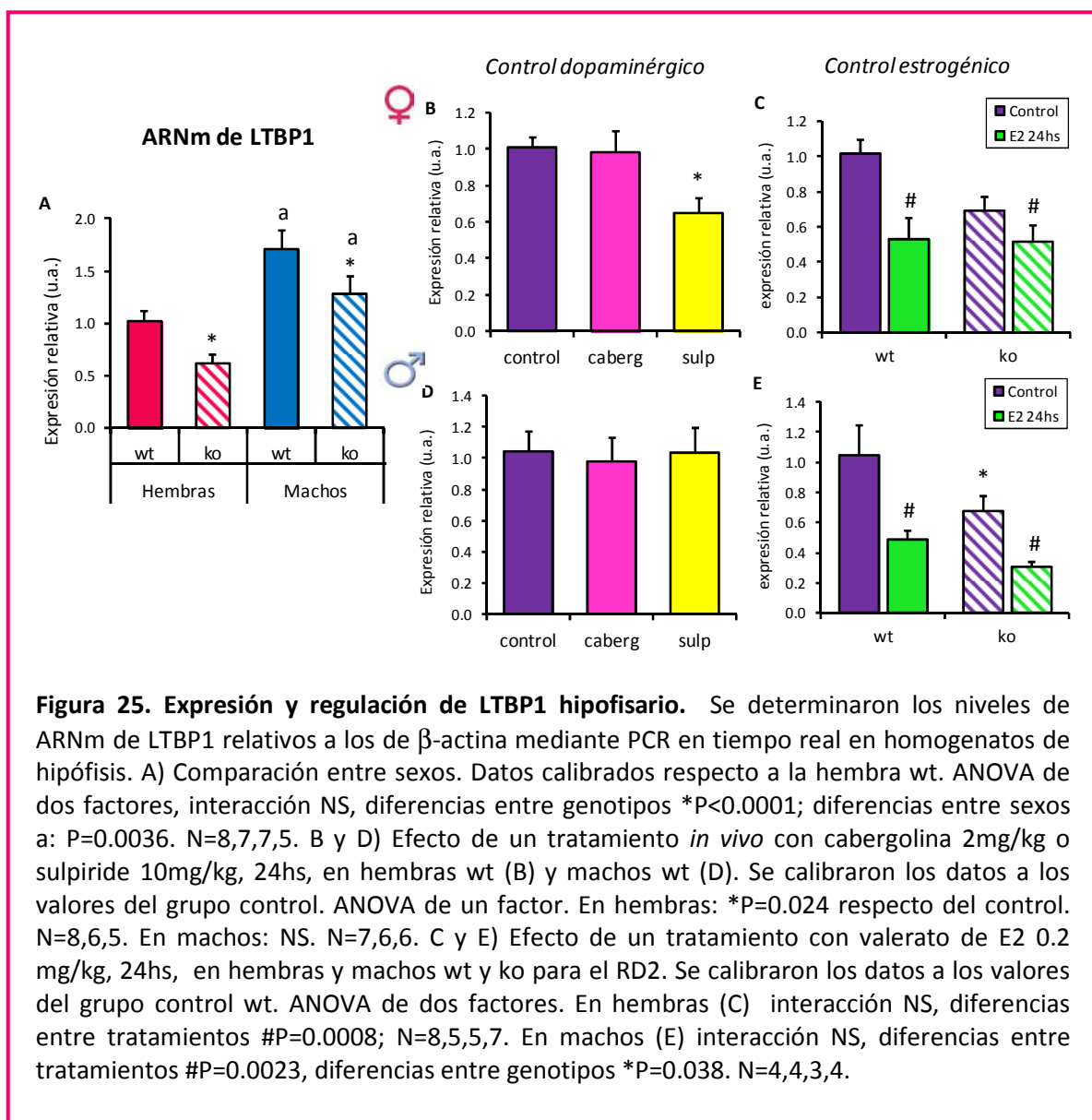
Al ser componentes importantes del sistema TGF- $\beta$ 1 en el control de la reserva de la citoquina en matriz extracelular y su posterior activación, continuamos el estudio analizando las diferencias sexuales y la regulación dopaminérgica y estrogénica de las proteínas que forman parte del complejo latente mayor de TGF- $\beta$ 1: las LTBPs.

En el capítulo 1 de esta tesis demostramos que LTBP1, LTBP3 y LTBP4 se expresan en hipófisis normales, y que LTBP1 y LTBP4 se encuentran disminuidas en ambos modelos experimentales de prolactinomas. Estas alteraciones en la expresión de las isoformas de las LTBPs nos llevaron a pensar que su síntesis podría estar regulada por dopamina y estrógenos.

Para evaluar esta posibilidad, determinamos los niveles de expresión de ARNm de LTBP1, LTBP3 y LTBP4 en hipófisis de ratones wt y *Drd2*<sup>-/-</sup> de ambos sexos y estudiamos la regulación de la expresión de estos genes *in vivo* por agentes dopaminérgicos y por estrógenos.

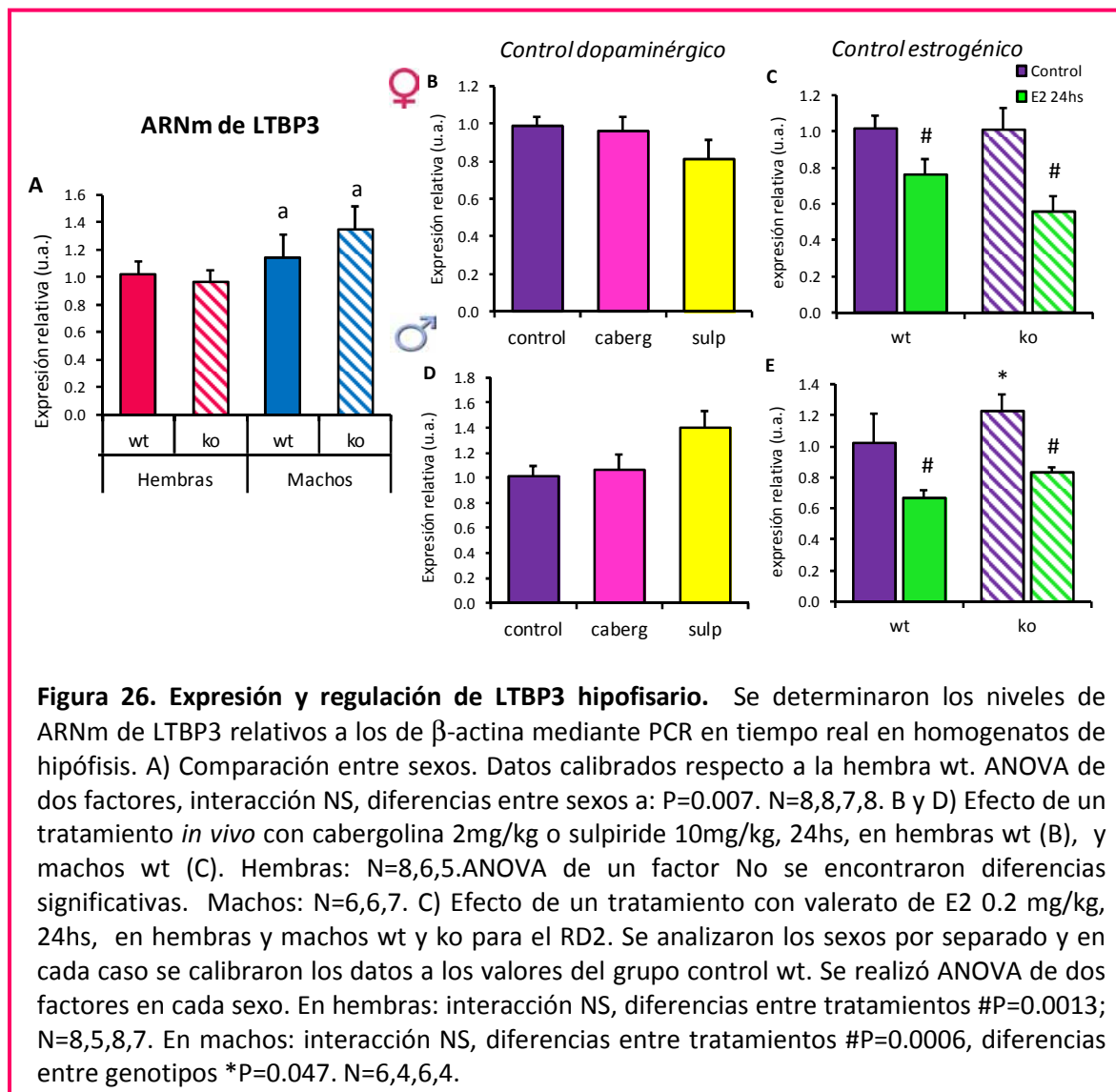
Al comparar la expresión de ARNm de LTBP1 hipofisaria entre sexos y genotipos encontramos mayores niveles en machos respecto de hembras y una disminución en los ratones ko respecto de los wt en ambos sexos (Figura 25A). Sin embargo, sólo en las hembras la expresión de LTBP1 se vio regulada negativamente por el antagonista del RD2 sulpiride (10mg/kg, 24hs), (Figura 25B).

El tratamiento con valerato de E2 0.2mg/kg, 24hs, causó una inhibición en la expresión de ARNm de LTBP1 tanto en hembras como en machos, en ambos genotipos por igual (Figura 25C y E).



En cuanto a la regulación de LTBP3, encontramos, al igual que lo observado para LTBP1, que los machos presentan mayores niveles que las hembras, mientras que no se observaron diferencias entre genotipos en ninguno de los sexos (Figura 26A). En concordancia con la ausencia de diferencias entre genotipos, el tratamiento con agentes dopaminérgicos no modificó los niveles de LTBP3 en ninguno de los sexos (Figura 26B).

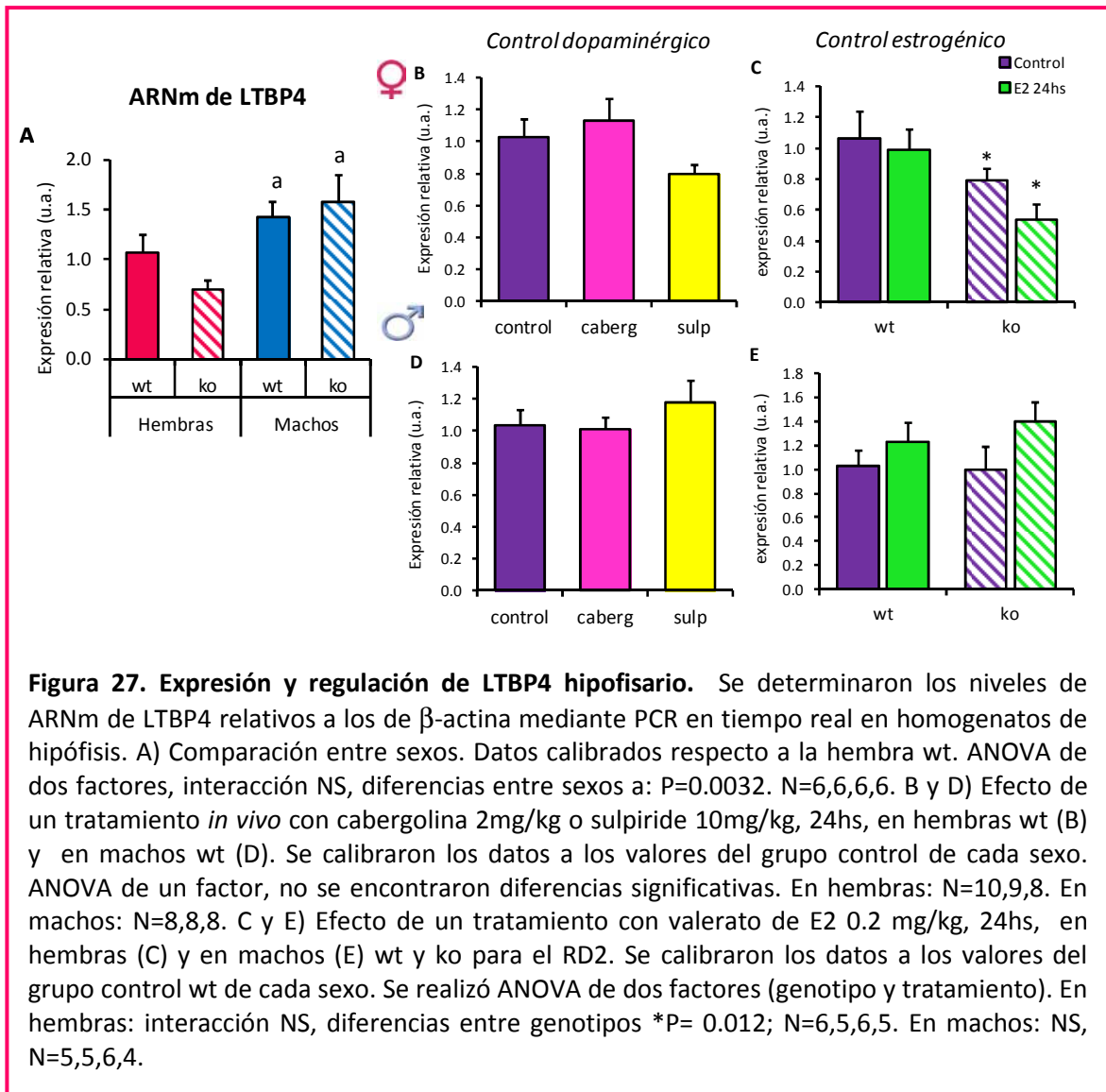
Por otro lado, la regulación por estrógenos de LTBP3 fue similar a la observada para LTBP1. Tanto en machos como hembras, el tratamiento con valerato de E2 disminuyó la expresión hipofisaria de LTBP3 en ambos genotipos (Figura 26C).



Por último, los niveles de expresión de LTBP4 también fueron mayores en machos respecto de hembras (Figura 27A).

No se observó una regulación dopaminérgica de la expresión de este gen en ninguno de los sexos (Figura 27B) y tampoco se encontró una regulación por estrógenos en ninguno de los sexos sin importar el genotipo (Figura 27C).

Se observó una tendencia, en las hembras ko, a presentar menores niveles de LTBP4 respecto de las hembras wt cuando se realizó la comparación entre sexos y genotipos. Estas diferencias entre hembras wt y ko resultaron significativas estadísticamente cuando se compararon los efectos del tratamiento con estrógenos en ambos genotipos.



**Figura 27. Expresión y regulación de LTBP4 hipofisario.** Se determinaron los niveles de ARNm de LTBP4 relativos a los de  $\beta$ -actina mediante PCR en tiempo real en homogenatos de hipófisis. A) Comparación entre sexos. Datos calibrados respecto a la hembra wt. ANOVA de dos factores, interacción NS, diferencias entre sexos a:  $P=0.0032$ .  $N=6,6,6,6$ . B y D) Efecto de un tratamiento *in vivo* con cabergolina 2mg/kg o sulpiride 10mg/kg, 24hs, en hembras wt (B) y en machos wt (D). Se calibraron los datos a los valores del grupo control de cada sexo. ANOVA de un factor, no se encontraron diferencias significativas. En hembras:  $N=10,9,8$ . En machos:  $N=8,8,8$ . C y E) Efecto de un tratamiento con valerato de E2 0.2 mg/kg, 24hs, en hembras (C) y en machos (E) wt y ko para el RD2. Se calibraron los datos a los valores del grupo control wt de cada sexo. Se realizó ANOVA de dos factores (genotipo y tratamiento). En hembras: interacción NS, diferencias entre genotipos  $*P=0.012$ ;  $N=6,5,6,5$ . En machos: NS,  $N=5,5,6,4$ .

Resumiendo estos resultados, encontramos una mayor expresión de las 3 isoformas de LTBP4 estudiadas en machos respecto de hembras. Las mismas presentan regulación diferencial por dopamina y estrógenos en ambos sexos. Las dos isoformas que se unen con mayor afinidad a TGF- $\beta$ 1, LTBP1 y LTBP3, son inhibidas por los estrógenos en ambos sexos y genotipos.

Dado que las LTBP4 participan, no sólo en el correcto plegamiento, secreción y almacenamiento en la ME, sino también en la activación de TGF- $\beta$ 1, las alteraciones hipofisarias observadas en la expresión génica de estas proteínas en los ratones ko podrían contribuir a los menores niveles de TGF- $\beta$ 1 activo observados en este genotipo.

### ***Expresión y regulación de posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 hipofisario***

El hecho de haber encontrado una disminución en el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo en hipófisis de hembras y machos con delección del receptor D2, sin observar diferencias en los niveles de citoquina total, nos llevó a suponer que uno o varios de los activadores locales podrían encontrarse alterados en las hipófisis de los ratones ko. Por otro lado, la regulación de los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo por dopamina y estradiol, nos sugieren que estas hormonas deben estar modulando la acción de activadores locales que medien esa activación.

Son numerosos los activadores de TGF- $\beta$ 1 descritos en diferentes tejidos, y en general son tejido-específicos. Hasta el momento, no se han estudiado los mecanismos involucrados en la activación de TGF- $\beta$ 1 a nivel hipofisario.

Como una primera aproximación, estudiamos las diferencias sexuales y entre genotipos de la expresión de distintas proteínas, en su mayoría proteasas, e integrinas, que han sido descritas como activadores de TGF- $\beta$ 1 en diferentes tejidos. Por otro lado, nos interesó también estudiar la regulación de los posibles activadores por dopamina y estrógenos, con el fin de evaluar si alguno de ellos podría estar mediando los efectos observados sobre TGF- $\beta$ 1 activo. Basándonos en antecedentes bibliográficos, elegimos estudiar las metaloproteasas MMP2, MMP9 y MT1-MMP, las integrinas  $\beta$ 6 y  $\beta$ 8, trombospondina 1 (TSP-1) y la proteasa calicreína (KLK1) (50).

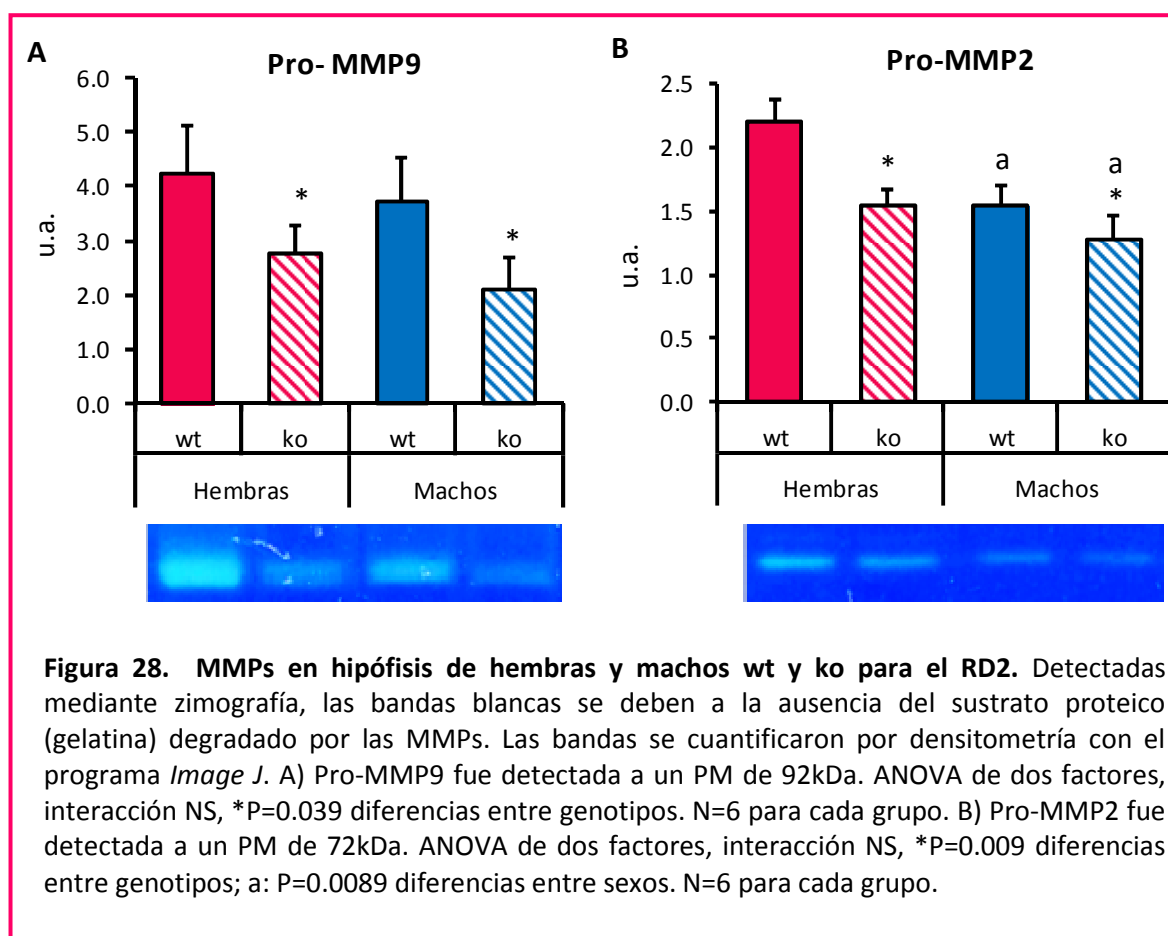
- **Metaloproteasas de la matriz**

MMP2 y MMP9 son componentes de la matriz extracelular importantes en los procesos angiogénicos y tumorigénicos. Debido a su actividad proteolítica, han sido descritas como activadores de TGF- $\beta$ 1 en distintos modelos (62). Por otro lado, su expresión y elevada actividad se vio correlacionada con la agresividad en tumores hipofisarios humanos.

Estudiamos la actividad de estas enzimas por zimografía, ensayo basado en la capacidad de las MMPs de degradar gelatina, utilizada como sustrato en geles de poliacrilamida, que son luego teñidos con *Coomassie Blue*. La actividad de MMP2 y MMP9

se evidencia como bandas blancas por degradación de gelatina sobre el gel teñido de azul. Las MMPs son sintetizadas y secretadas como zimógenos inactivos (Pro-MMPs), que requieren el clivaje de sus pro-dominios para activarse. La zimografía permite también detectar bandas de actividad de las Pro-MMPs, ya que las mismas son activadas durante el procedimiento. MMP2 y MMP9 se pueden distinguir entre sí y de sus zimógenos por sus respectivos pesos moleculares (Pro-MMP2 72kDa, MMP2 68/66 KDa; Pro-MMP9 92kDa, MMP9 80kDa)

Analizando mediante esta técnica muestras de homogenatos de hipófisis de hembras y machos wt y ko para el receptor D2, únicamente pudimos detectar bandas correspondientes a las Pro-MMPs, sugiriendo una muy baja o ausente actividad basal de MMP2 y MMP9 hipofisarios. Mediante un análisis semi-cuantitativo por densitometría de las bandas de degradación encontramos que tanto Pro-MMP9 como Pro-MMP2 se encontraron disminuidas en hembras y machos ko respecto de los wt. Los machos presentaron menores niveles de Pro-MMP2 que las hembras, mientras que no observamos diferencias en Pro-MMP9 entre los sexos (Figura 28A y B).

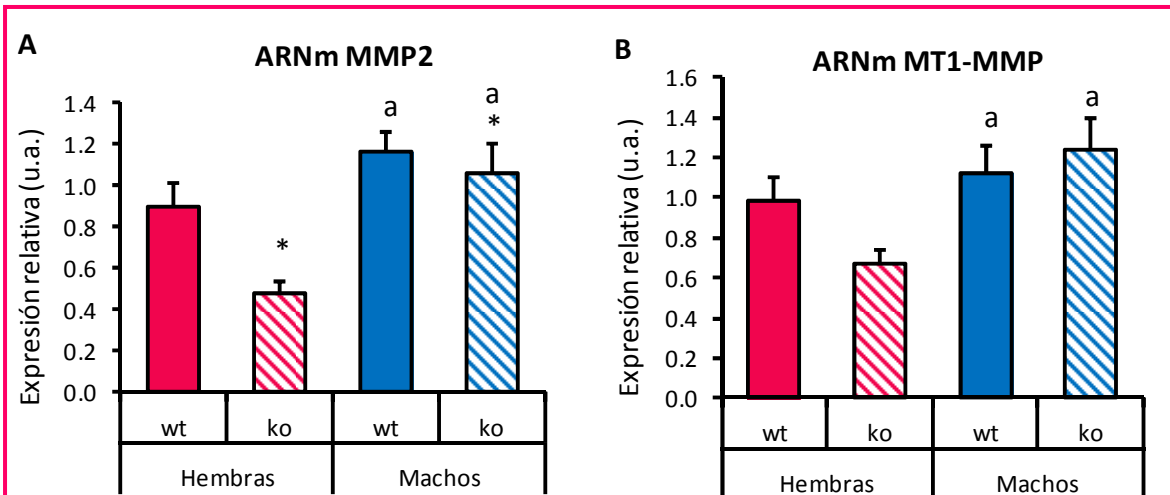


A continuación estudiamos la expresión génica de MMP2 mediante PCR en tiempo real en hipófisis de hembras y machos wt y *Drd2*<sup>-/-</sup>. Encontramos una disminución de la expresión de ARNm de MMP2 en las hipófisis de los ratones ko, tanto hembras como machos. Al contrario de lo observado por zimografía, los machos presentaron mayor expresión de ARNm que las hembras (Figura 29A).

Como mencionamos anteriormente, las Pro-MMPs requieren la remoción de su pro péptido para adquirir actividad biológica. Hay varios mecanismos de activación de Pro-MMPs descritos, entre ellos la activación por agentes químicos *in vitro*, y la activación por proteasas como furina, plasmina e incluso otras MMPs (133).

En el caso particular de Pro-MMP2, su activación tiene lugar en la superficie celular y está mediada principalmente por MT-MMPs, una subfamilia de MMPs con dominio transmembrana, entre ellas la MT1-MMP. La activación de Pro-MMP2 por MT1-MMP conlleva varios pasos, y requiere la presencia del inhibidor de MMPs, TIMP2, que actúa como “receptor” de Pro-MMP2, formando un complejo entre Pro-MMP2/TIMP2 y MT1-MMP (134;135).

Para nuestro interés, MT1-MMP no sólo es necesaria para la activación de MMP2, sino que también participa en la activación de TGF- $\beta$ 1. Por lo tanto, estudiamos también la expresión de ARNm de MT1-MMP en nuestro modelo, y encontramos mayores niveles de expresión en los machos respecto de las hembras en ambos genotipos; y una disminución en las hembras ko respecto de las wt (Figura 29B).



**Figura 29. Expresión de ARNm de MMP2 y MT1-MMP en hipófisis.** Se determinaron los niveles de ARNm por PCR en tiempo real a partir de ARN total extraído de hipófisis de hembras y machos wt y ko para el receptor D2. A) ARNm de MMP2. ANOVA de dos factores, interacción NS, a:  $P=0.0008$  diferencias entre sexos;  $*P=0.025$ , diferencias entre genotipos.  $N=6,6,7,6$  B) ARNm de MT1-MMP. ANOVA de dos factores, interacción NS, a:  $P=0.01$ , diferencias entre sexos.  $N=5,6,6,6$ . Se realizó una Prueba T para comparar entre hembras wt y ko:  $*P=0.043$ .

- **Integrinas**

Las  $\alpha\beta$  integrinas forman una familia de moléculas de adhesión y receptores heterodiméricos transmembrana mediante los cuales se establece una rápida comunicación entre los diferentes componentes de la matriz extracelular y el interior de las células. Estas interacciones juegan un papel muy importante en la regulación de la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular(136;137).

La capacidad de las integrinas de acoplar señales intra y extracelulares, las posicionan como buenas candidatas para mediar la activación de TGF- $\beta$ 1 en la matriz extracelular, en respuesta a estímulos que causen alteraciones en el medio intracelular, como es el caso de los tratamientos con agentes dopaminérgicos y con estrógenos. Por esta razón nos interesó evaluar la expresión y regulación de las integrinas que activan TGF- $\beta$  latente, que, hasta el momento, no habían sido estudiadas en hipófisis.

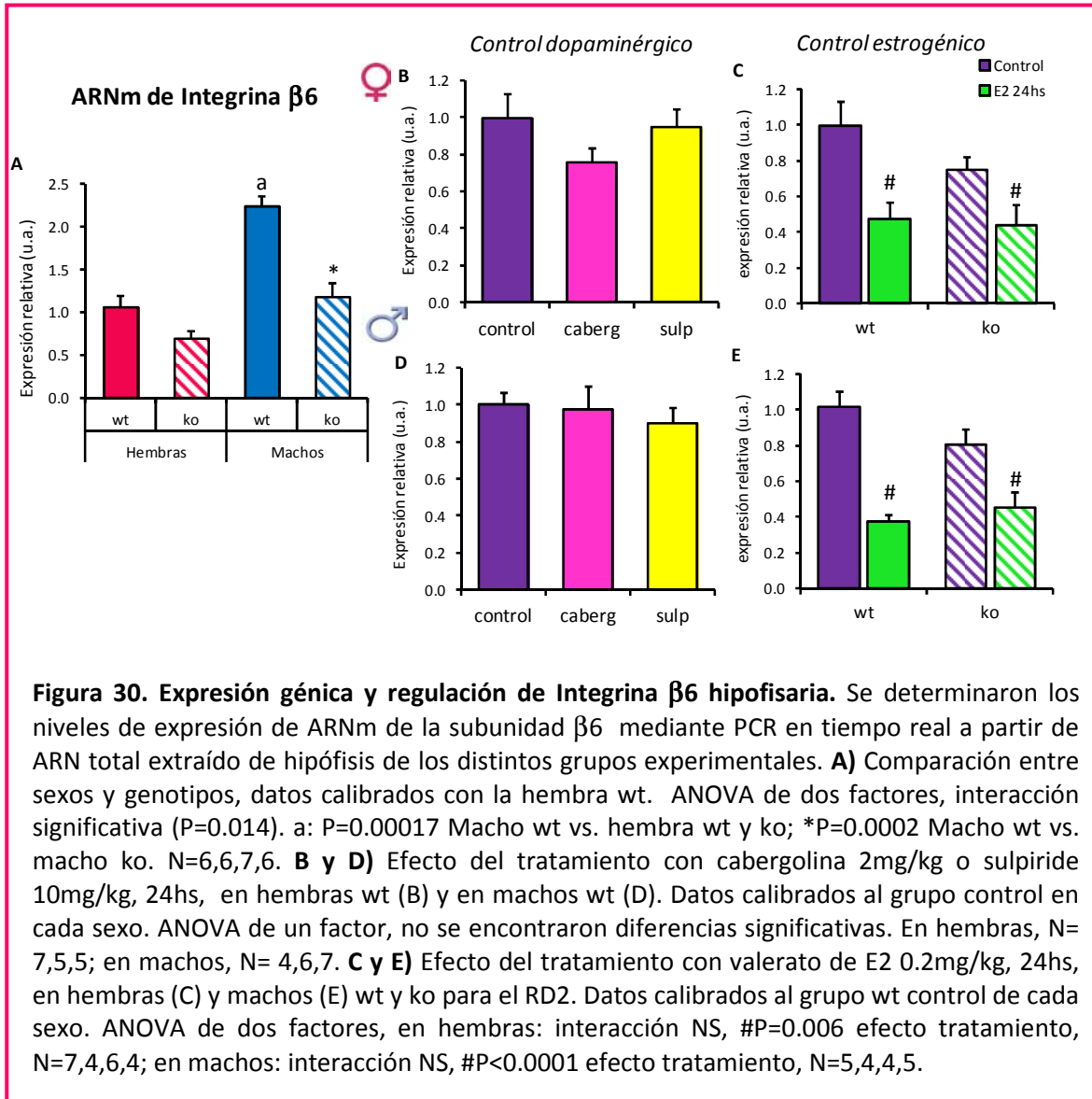
La activación de TGF- $\beta$ 1 mediada por integrinas se produce por la interacción de las mismas con la secuencia aminoacídica RGD presente en LAP. Dentro de la gran cantidad de



integrinas que reconocen esta secuencia RGD, se demostró que las integrinas  $\alpha\nu\beta 6$  y  $\alpha\nu\beta 8$  son capaces de unirse y activar eficientemente a TGF- $\beta 1$  latente (66;67) (138).

Curiosamente, ambas integrinas estudiadas presentaron diferente patrón de expresión en las hipófisis de hembras y machos wt y ko para el receptor D2; y también presentaron una regulación diferencial por dopamina y estrógenos.

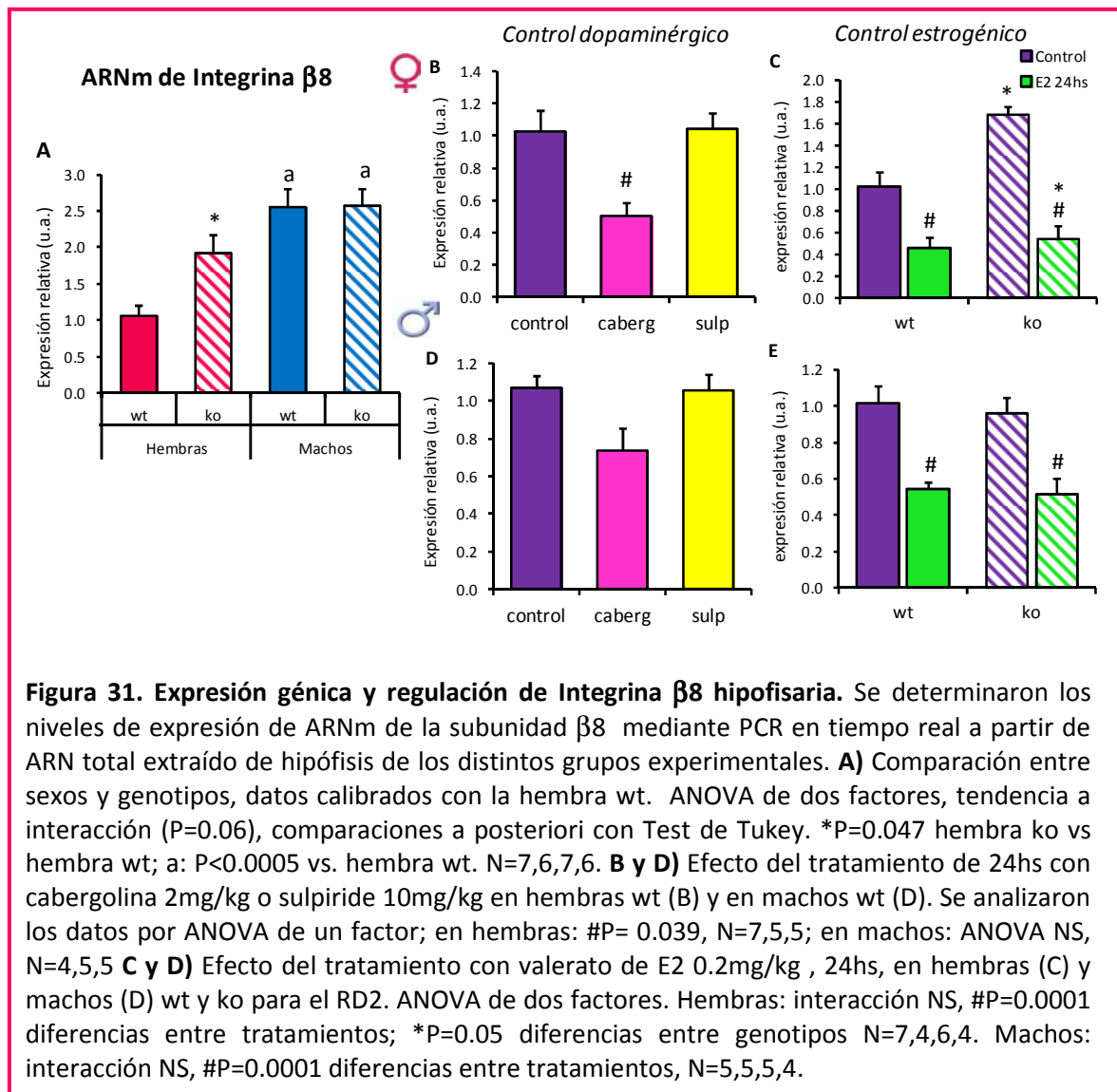
En el caso de la integrina  $\beta 6$ , observamos que los machos wt expresan mayores niveles que las hembras, y sólo en los machos se observaron diferencias entre genotipos, con menores niveles de expresión en ausencia del receptor D2. En las hembras se ve una tendencia a una menor expresión en las hipófisis ko, que no llega a ser significativa cuando se analizaron los datos por ANOVA (Figura 30A). A pesar de presentar menores niveles los animales  $Drd2^{-/-}$ , no se observó regulación dopaminérgica luego de 24hs de tratamiento con cabergolina o sulpiride en ninguno de los sexos (Figura 30B). En cambio sí encontramos una regulación negativa de la expresión de integrina  $\beta 6$  por estrógenos, tanto en machos como en hembras de ambos genotipos (Figura 30C).



Por otro lado, la integrina  $\beta 8$  se encontró sobre-expresada en las hembras ko respecto de las wt, sin observarse diferencias entre genotipos en los machos. Los machos de ambos genotipos presentaron mayores niveles que las hembras wt (Figura 31A).

Sólo las hembras presentaron regulación dopaminérgica, viéndose inhibida la síntesis de integrina  $\beta 8$  en respuesta al tratamiento con el agonista del RD2, cabergolina. Estos resultados sugieren un control dopaminérgico negativo sobre este gen, que concuerda con los altos niveles de integrina  $\beta 8$  presentes en las hipófisis de las hembras  $Drd2^{-/-}$ .

Nuevamente el tratamiento con estradiol produjo una disminución de los niveles de ARNm de integrina  $\beta 8$  en ambos sexos y genotipos.



- **Calicreína 1 (KLK1)**

Las calicreínas constituyen una familia de serin-proteasas de similar estructura entre sí, encontradas en diversos tejidos y fluidos biológicos, involucradas en el procesamiento específico de pro-péptidos precursores hacia sus productos bioactivos. Específicamente la KLK1, o también llamada calicreína renal/pancreática, ha sido implicada en la digestión de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento.

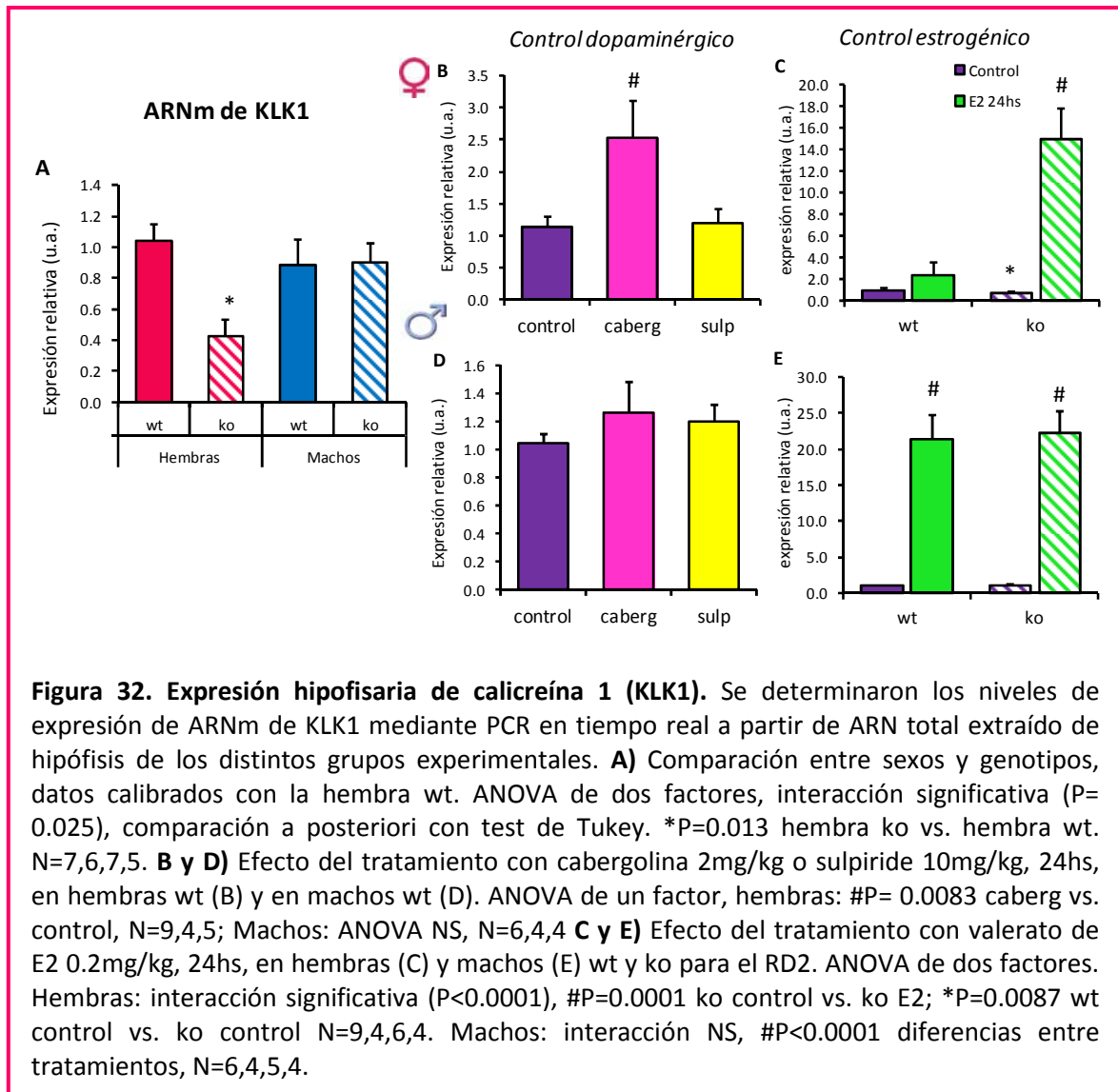
Ha sido descrito que su expresión en hipófisis de rata presenta una marcada diferencia sexual, siendo la misma 20 veces mayor en hembras que en machos (139) y mediante inmunohistoquímica se detectó su presencia en células secretoras de prolactina (140).

Sin embargo el papel local de esta proteasa es aún desconocido. Esto, sumado a que se encontraron evidencias de una acción directa de varios miembros de la familia de calicreínas sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 (141;142), nos llevó a estudiar la expresión y regulación de KLK1 en nuestro modelo.

La expresión de KLK1 hipofisaria medida por PCR en tiempo real, se encontró disminuida significativamente en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> respecto de las wt, sin presentar diferencias entre genotipos en los machos. Llamativamente, no observamos diferencias sexuales en la expresión de esta proteasa en las hipófisis de nuestro modelo en ratón (Figura 32A).

Los reducidos niveles de KLK1 en las hembras ko sugieren una regulación dopaminérgica positiva sobre la síntesis de este gen, lo cual corroboramos con el tratamiento con agentes dopaminérgicos, donde cabergolina, el agonista del RD2 causó un marcado incremento en la expresión de KLK1 sólo en las hembras (Figura 32B).

Por otro lado, el tratamiento *in vivo* con estrógenos provocó una notable inducción de la expresión de KLK1 en las hipófisis de machos de ambos genotipos, pero en las hembras este marcado efecto se observó únicamente en ausencia de control dopaminérgico, es decir, en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> (Figura 32C y E).



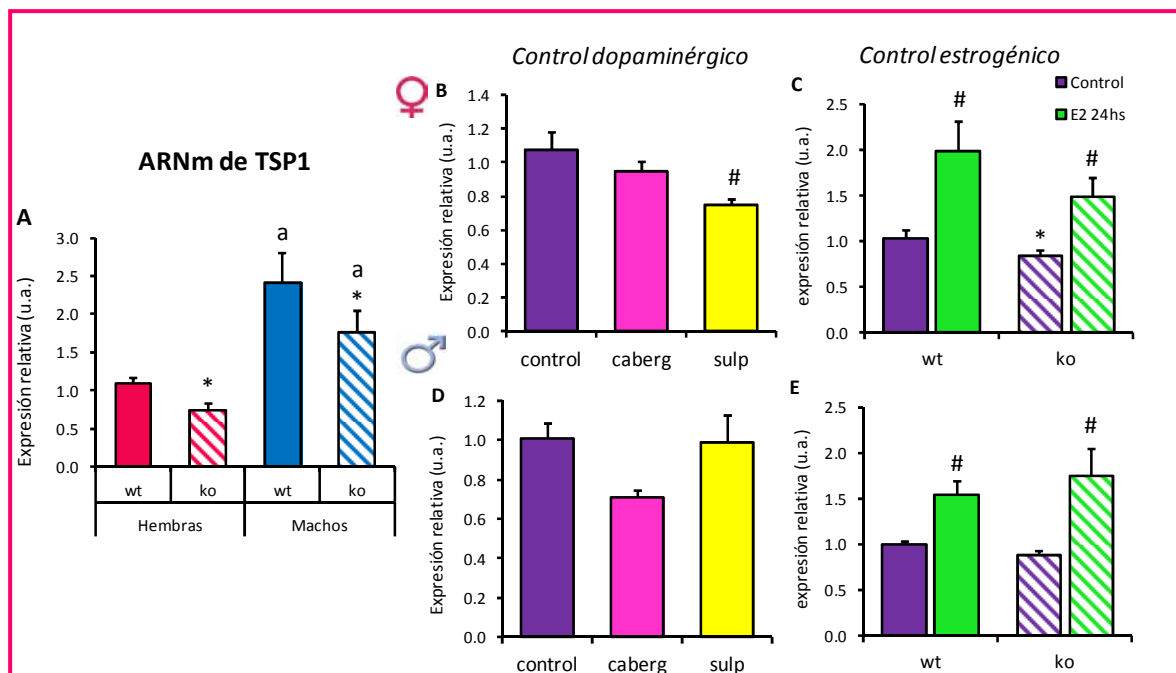
El patrón de regulación de KLK1 por agentes dopaminérgicos y estrogénicos en las hipófisis de hembras, concuerda con la regulación que observamos previamente sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo en este sexo. En particular resulta llamativo que los estrógenos produzcan la misma marcada inducción de KLK1 y de TGF- $\beta$ 1 activo únicamente en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>. Estos resultados nos sugieren que KLK1 podría estar mediando la activación de TGF- $\beta$ 1 en respuesta a estrógenos en este sexo.

- **Trombospondina 1 (TSP1)**

Como mencionamos anteriormente, TSP1 es uno de los principales activadores de TGF- $\beta$ 1 descrito en la bibliografía, en varios modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. En el primer capítulo demostramos que su expresión está disminuida en los dos modelos de prolactinomas, en las ratas tratadas con DES y en ratones hembra *Drd2*<sup>-/-</sup>.

Continuamos la caracterización de TSP1 estudiando la expresión de ARNm hipofisaria comparativamente entre sexos y su regulación por dopamina y estrógenos.

Tanto los machos como las hembras presentaron menores niveles de ARNm de TSP1 en las hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup> respecto de sus pares wt, observándose también que los machos expresan mayores niveles de TSP1 que las hembras (Figura 33).



**Figura 33. Expresión hipofisaria de TSP1.** Se midió la expresión hipofisaria de ARNm de TSP1 por PCR en tiempo real, utilizando  $\beta$ -actina como control endógeno. **A)** Comparación entre sexos y genotipos, datos calibrados con la hembra wt. ANOVA de dos factores, interacción NS, \* $P=0.025$  diferencias entre genotipos; a:  $P<0.0001$  diferencias entre sexos.  $N=7,7,8,9$ . **B y D)** Efecto del tratamiento con cabergolina 2mg/kg o sulpiride 10mg/kg, 24hs, en hembras wt (B) y machos wt (D). ANOVA de un factor. Hembras:  $\#P=0.041$  sulp vs. control,  $N=8,6,5$ ; Machos: ANOVA NS,  $N=6,9,7$ . **C y E)** Efecto del tratamiento con valerato de E2 0.2mg/kg, 24hs, en hembras (C) y machos (E) wt y ko para el RD2. ANOVA de dos factores, en hembras: interacción NS,  $\#P<0.0001$  diferencias entre tratamientos; \* $P=0.046$  diferencias entre genotipos  $N=8,5,7,6$ . Machos: interacción NS,  $\#P<0.0001$  diferencias entre tratamientos,  $N=8,7,9,4$ .

Las diferencias observadas entre genotipos indican una posible regulación dopaminérgica de la expresión de TSP1. Mediante el tratamiento *in vivo* con agonistas y antagonistas del RD2, verificamos que únicamente las hembras presentaron una regulación dopaminérgica positiva sobre la síntesis de TSP1, evidenciada por el efecto inhibitorio inducido por el antagonista sulpiride. En cambio los machos no presentaron diferencias frente al tratamiento con los agentes dopaminérgicos.

Por otro lado, el tratamiento con estradiol luego de 24hs, sorpresivamente causó un incremento en los niveles de TSP1 tanto en machos como en hembras y en ambos genotipos por igual.

Estos resultados posicionan también a TSP1, al igual que KLK1, como posible mediador de los efectos estrogénicos y dopaminérgicos sobre la activación de TGF- $\beta$ 1.

## DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 2

La dopamina y el estradiol son los principales reguladores de la función de los lactotrofos, y modulan también, de manera antagónica, la expresión de TGF- $\beta$ 1. En el capítulo anterior demostramos que no sólo la síntesis, sino también la activación de TGF- $\beta$ 1 y la expresión de varios componentes del sistema, se encuentran alterados en los modelos de hiperplasia hipofisaria causados por la ausencia de control dopaminérgico o por el exceso de estrógenos circulantes.

En base a esos antecedentes, en este capítulo nos dedicamos a estudiar en mayor profundidad la regulación del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario por dopamina y estradiol comparativamente en hembras y machos. Para ello aplicamos tratamientos *in vivo* con drogas dopaminérgicas y con estrógenos, en ratones *wt* y en un modelo en el cual la acción dopaminérgica se encuentra impedida debido a la ausencia del receptor RD2 (ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>). De esta forma, pudimos evaluar los efectos por separado del estradiol y la dopamina, y la interacción entre ambos.

Mediante este abordaje intentamos dar respuesta a dos interrogantes que se encuentran relacionados entre sí:

- ¿Cómo interactúan la dopamina y el estradiol en la regulación del sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario, y cómo esto afecta el control de la función de los lactotrofos (proliferación, secreción de PRL)?
- ¿Existe una diferencia entre los sexos en la regulación del sistema TGF- $\beta$ 1 que pueda explicar las diferencias en el desarrollo de los prolactinomas entre hembras y machos observadas en nuestro modelo?

Ya habíamos determinado que la ausencia de control dopaminérgico en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> ocasiona una disminución en los niveles de ARNm de TGF- $\beta$ 1, y del contenido de TGF- $\beta$ 1 total y activo en hipófisis, sugiriendo que estos parámetros se encuentran bajo una regulación dopaminérgica positiva.



Al realizar el mismo análisis en los machos observamos que únicamente los niveles de **TGF- $\beta$ 1 activo** se encontraron afectados negativamente frente a la pérdida del RD2, sugiriendo que la activación de la citoquina y no así los procesos de síntesis y almacenamiento en la ME, podría estar regulada por dopamina en este sexo.

A diferencia de lo que ocurre en las hembras, la disminución del contenido de TGF- $\beta$ 1 activo en las hipófisis de los machos *Drd2*<sup>-/-</sup> no parecería tener correlato con una disminución de los efectos biológicos de la citoquina, dado que no observamos modificaciones en los niveles de expresión de los genes blanco PAI-1 ni TMEPAI, que en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> sí se encontraron disminuidos. Esto podría deberse a una menor sensibilidad de los machos frente a las variaciones en los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo, o bien a la presencia de mecanismos que compensen los efectos de la disminución de la citoquina. En relación a esto vimos que la expresión del receptor T $\beta$ RII y del factor inhibitorio SMAD7 no se encuentran alterados en los machos *Drd2*<sup>-/-</sup>. Por otro lado, es sabido que la transcripción de TMEPAI es inducida también por testosterona (143), por lo tanto esto podría estar marcando la diferencia observada entre los sexos en cuanto a la regulación de este gen, más allá de su regulación por TGF- $\beta$ 1.

Respecto a las SMADs evaluadas, no encontramos alterados los niveles de SMAD4, en ninguno de los sexos ni genotipos, mientras que la menor expresión de SMAD7, sólo en las hembras ko, podría estar compensando, en parte, la caída en la señalización de TGF- $\beta$ 1 observada en este grupo.

Entre las diferencias sexuales que encontramos en este estudio comparativo del sistema TGF- $\beta$ 1, describimos por primera vez en la literatura que únicamente en las hembras los niveles de PRL sérica correlacionaron negativamente con el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario, incluso frente a un tratamiento agudo con estradiol. Este hallazgo resulta de gran relevancia debido a la implicancia fisiológica de una regulación sexo-específica de la secreción de PRL por parte de TGF- $\beta$ 1 activo.

Cabe destacar que el incremento de PRL en los machos ko respecto de los wt es mucho menor, en proporción, que el aumento de PRL que presentan las hembras frente a la ausencia de control dopaminérgico. Sin embargo, las diferencias entre genotipos en los

niveles de TGF- $\beta$ 1 activo son de la misma magnitud en ambos sexos. Además, llamativamente, **los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y de ARNm resultaron ser mayores en los machos respecto de las hembras** sin importar el genotipo. Por lo tanto no podemos descartar que los mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 hipofisario en los machos, en conjunto con los menores niveles de E2 que presentan, estén frenando un aumento mayor en los niveles de PRL en ausencia del RD2. Por otro lado tampoco podemos descartar la hipótesis inversa, es decir, que la misma prolactina pueda estar modulando los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo.

Recientemente se identificaron varios elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en la secuencia del promotor de TGF- $\beta$ 1. Algunos de estos AREs regulan positivamente y otros negativamente la transcripción, lo cual explicaría los efectos contradictorios de la testosterona sobre la síntesis de TGF- $\beta$ 1 en distintos modelos (144). En la hipófisis no se ha estudiado la regulación de TGF- $\beta$ 1 por andrógenos, mecanismo que podría estar mediando las diferencias sexuales observadas entre hembras y machos, en conjunto con el efecto inhibitorio que ejercen los estrógenos sobre la síntesis de la citoquina (107).

Esto podría explicar las diferencias observadas a nivel de ARNm de TGF- $\beta$ 1 entre sexos y genotipos. En cambio poco se sabe sobre la regulación de la actividad de TGF- $\beta$ 1 en la hipófisis. La inhibición o estimulación de la síntesis podría estar afectando la actividad de la citoquina, pero este no parece ser un mecanismo de regulación adecuado, dado que al mantenerse almacenada la citoquina en estado latente en la ME luego de su secreción, los procesos de síntesis y activación de TGF- $\beta$ 1 se encuentran desacoplados temporalmente.

### Regulación de los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo

En este trabajo describimos por primera vez que los niveles de **TGF- $\beta$ 1 activo** se encuentran regulados por dopamina y por estrógenos en hipófisis de ambos sexos.

Dos resultados evidencian una regulación positiva de la dopamina sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo: los menores niveles observados en los ratones hembras y machos carentes de receptor D2; y la reducción de TGF- $\beta$ 1 activo frente al bloqueo del RD2 con el antagonista sulpiride *in vivo* en ambos sexos. Esto último se observó luego de tan solo 30

minutos de tratamiento, tiempo insuficiente para que ocurra la síntesis *de novo* de proteínas. Desconocemos aún cuáles son los intermediarios de esta regulación sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 por dopamina. Sin embargo sí podemos afirmar que el mecanismo involucra al RD2 y se trataría de un efecto no genómico, posiblemente modulando alguno de los activadores locales de TGF- $\beta$ 1. Más adelante discutimos en mayor profundidad los posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 en hipófisis y la regulación local de los mismos.

Por otro lado, la regulación de TGF- $\beta$ 1 activo por estrógenos resultó ser más compleja. En ambos sexos el efecto de los estrógenos fue dependiente del tono dopaminérgico, pero el sentido y la magnitud de la respuesta fueron diferentes. En los machos wt, los estrógenos inhibieron los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo, lo cual concuerda con el efecto negativo previamente reportado de E2 sobre la síntesis de la citoquina en ratas. En cambio en los machos ko este efecto se pierde por completo. Por el contrario, en las hembras, observamos que únicamente en ausencia del RD2, los estrógenos causaron un marcado incremento en los niveles de la citoquina activa, sin observarse efecto en las hembras wt.

Este sorprendente aumento de TGF- $\beta$ 1 activo en las hembras ko evidencia la compleja interacción entre dopamina y estradiol en la regulación del proceso de activación de la citoquina. Demostramos que el estradiol tiene un potente efecto positivo sobre la activación de TGF- $\beta$ 1, y dicho efecto se encuentra contrarrestado por el tono dopaminérgico, evidenciado por la ausencia de respuesta a E2 en las hembras wt. Está demostrado en las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> que los niveles de estrógenos circulantes son menores que en las wt y esto es compensado por un incremento en la expresión del receptor de estrógenos (ER) (106), por lo tanto el pulso de E2 aplicado en las hembras ko tendría un mayor sustrato de acción y eso podría explicar la fuerte respuesta observada.

Resulta interesante destacar que el aumento de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario ocasionado por el estradiol correlacionó con una disminución de los niveles de prolactina sérica en las hembras ko. Previamente en nuestro laboratorio se había descrito una inesperada inhibición estrogénica de los niveles de prolactina en el mismo modelo, desconociéndose las causas (106). Nuestro actual hallazgo nos permite hipotetizar que este

efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la PRL sérica podría estar mediado por la inducción de TGF- $\beta$ 1 activo.

Si bien estos resultados parecen contradictorios con el conocido rol de los estrógenos estimulando la síntesis y secreción de PRL, existen otros antecedentes en la literatura, en donde se describe la utilización de dosis agudas de estrógenos para disminuir los niveles de PRL sérica. Por ejemplo, en la clínica se ha utilizado una aplicación de estradiol para finalizar la lactancia, observándose una disminución de los altos valores de prolactina sérica en mujeres lactantes, condición en la cual el tono dopaminérgico es bajo (145;146).

Nuestros resultados, en conjunto, sugieren una participación de TGF- $\beta$ 1 como mediador de los efectos de dopamina y estrógenos sobre la secreción y/o síntesis de PRL *in vivo*.

Resulta de gran interés estudiar en mayor profundidad este efecto de los estrógenos en ausencia del RD2, dado que al disminuir los niveles de PRL podría representar también una alternativa terapéutica para los tumores que no responden a dopamina.

### Regulación de componentes que forman el complejo latente

Continuamos con la caracterización de distintos componentes del sistema TGF- $\beta$ 1 para intentar explicar las diferencias observadas en los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo entre sexos y genotipos y su regulación diferencial por dopamina y estrógenos.

Es sabido que para que ocurra la activación de TGF- $\beta$ 1 se requiere la correcta presentación de la citoquina en la ME, proceso en el cual tienen un papel fundamental los componentes del complejo latente. Posteriormente, frente a algún estímulo específico, la citoquina es liberada de estos complejos latentes por medio de la acción de distintos activadores locales, para poder ejercer sus funciones biológicas.

Uno de los primeros pasos en la formación del complejo latente es el clivaje del péptido LAP del TGF- $\beta$ 1 maduro mediante la acción de la enzima furina. Nuestros resultados descartan que las diferencias encontradas en la regulación de TGF- $\beta$ 1 entre genotipos se deban a alteraciones en la expresión de furina, dado que en nuestro modelo no

encontramos diferencias en la síntesis de esta enzima. Sin embargo encontramos una inhibición de la expresión de furina hipofisaria frente al tratamiento con estrógenos, hecho que podría estar relacionado con los bajos niveles de TGF- $\beta$ 1 descritos en el modelo de prolactinoma inducido por tratamiento crónico con estrógenos en ratas.

Otros importantes componentes en la formación del complejo latente son las LTBP, que, como ya mencionamos, se unen a LAP a través de residuos cisteína y permiten el correcto plegamiento del complejo TGF- $\beta$ 1-LAP, su secreción y disponibilidad en la matriz extracelular. En el capítulo 1 discutimos acerca de la expresión hipofisaria de estas proteínas en los prolactinomas experimentales. En el presente capítulo describimos, por primera vez en la literatura, que las tres isoformas de LTBP capaces de unir TGF- $\beta$ 1 **se encuentran diferencialmente reguladas por dopamina y estradiol**, los principales moduladores de la función del lactotrofo y de TGF- $\beta$ 1 hipofisario.

Encontramos que los machos presentan una mayor expresión hipofisaria de las tres isoformas de LTBP respecto de las hembras, en concordancia también con los mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 activo. Estas diferencias entre los sexos podrían deberse a los menores niveles de estrógenos circulantes en los machos, dado que LTBP1 y LTBP3, las isoformas que unen TGF- $\beta$ 1 con mayor afinidad, se vieron inhibidas por el tratamiento con estrógenos en ambos sexos y genotipos. Sería interesante estudiar si la expresión de estas isoformas se encuentra también regulada por la testosterona.

Por otro lado, LTBP1 fue la única isoforma cuya expresión se encontró disminuida en hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup> de hembras y machos. Esto sugiere una regulación dopaminérgica positiva sobre su síntesis, que únicamente pudo evidenciarse en las hembras mediante el efecto inhibitorio del antagonista sulpiride. Se ha comprobado que TGF- $\beta$ 1 induce su propia expresión y la de LTBP1 en fibroblastos normales y transformados de pulmón (147); por lo tanto la inhibición de TGF- $\beta$ 1 activo podría estar causando los bajos niveles de LTBP1 en las hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup>.

### Regulación de los posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 hipofisario

En esta tesis describimos una regulación novel de la activación de TGF- $\beta$ 1 *in vivo* por dopamina y estradiol. Dado que ninguno de los mecanismos de activación de TGF- $\beta$ 1 descritos hasta el momento involucra una participación directa de dopamina y estradiol en la liberación de la citoquina, proponemos que la dopamina y los estrógenos deben estar regulando la función de activadores locales de TGF- $\beta$ 1.

La baja proporción de TGF- $\beta$ 1 activo/total que encontramos en hipófisis y que ha sido descrita también en otros tejidos, refleja la importancia de la regulación local sobre la actividad de esta potente citoquina. La identificación de los mecanismos de activación de TGF- $\beta$ 1 tejido-específicos es de gran relevancia en pos de facilitar la obtención de herramientas terapéuticas que permitan incrementar o inhibir la actividad de TGF- $\beta$ 1 según la necesidad de la patología, sin afectar la homeostasis del sistema en otros tejidos.

Hasta el momento no se había estudiado la regulación de la actividad de TGF- $\beta$ 1 en hipófisis, y por lo tanto no se conocen cuáles son los activadores que actúan a nivel local. Como una primera aproximación para la identificación de estos mecanismos de activación de TGF- $\beta$ 1 hipofisario, estudiamos la expresión del ARNm y su regulación por dopamina y estrógenos, de algunos de los activadores previamente descritos en otros modelos: MMP2, MMP9, MT1-MMP, integrinas  $\beta$ 6 y  $\beta$ 8, TSP1 y KLK1.

Del análisis de los resultados en su conjunto, en hembras y machos de ambos genotipos surgen algunos patrones de expresión de los activadores evaluados:

- **Los machos presentaron mayores niveles de expresión de la mayoría de los activadores respecto de las hembras.**

Este fue el caso de MMP2, MT1-MMP, Integrinas  $\beta$ 6 y  $\beta$ 8, y TSP1. El incremento de la expresión de estos posibles activadores podría estar relacionado con los mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 activo en los machos respecto de las hembras. Particularmente, en el caso de las integrinas, las diferencias entre los sexos podrían deberse a un efecto estrogénico, dado que estos genes se vieron regulados negativamente por el tratamiento con E2. Hacen falta más estudios para determinar cuál o cuáles de estas moléculas son en efecto capaces de activar TGF- $\beta$ 1 *in vivo* en la hipófisis.

- **El impacto de la ausencia del RD2 sobre la expresión de los activadores fue más marcado en las hembras.**

En general la pérdida del control dopaminérgico disminuyó la expresión de la mayoría de los activadores locales de TGF- $\beta$ 1 en las hembras *Drd2<sup>-/-</sup>* respecto de sus pares *Drd2<sup>+/+</sup>*. Este fue el caso de MMP2, MMP9, MT1-MMP, KLK1 y TSP1, y la inhibición de estos posibles activadores fue concordante con la disminución en el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo en las hipófisis de hembras *Drd2<sup>-/-</sup>*. Por el contrario, los machos no presentaron diferencias entre genotipos para estos activadores, con excepción de TSP1.

En el caso de MMP2 y TSP1, si bien la estadística indica que los animales ko presentan menor expresión sin importar el sexo (no hay interacción entre sexo y genotipo en el ANOVA), no queda claro si realmente hay diferencias o si se trata de un artefacto estadístico. De hecho ninguno de los activadores estudiados presentó una regulación dopaminérgica por sulpiride o cabergolina en machos. Únicamente la integrina  $\beta$ 6 presentó una clara disminución en los machos *Drd2<sup>-/-</sup>* respecto de los wt, aunque tampoco en este caso se observó regulación de la expresión por las drogas dopaminérgicas.

Esta falta de efecto dopaminérgico sobre los activadores en los machos concuerda con el menor tono dopaminérgico que en general presentan respecto de las hembras, evidenciado por una menor actividad de las neuronas TIDA (129), menor concentración de dopamina en la eminencia media (128), y el menor impacto de la pérdida de RD2 en el desarrollo de los prolactinomas .

A continuación analizamos en mayor detalle la regulación de los distintos activadores y su posible función en la tumorigénesis de los prolactinomas.

### MMPs

Si bien no pudimos detectar por zimografía la banda de MMP2 y MMP9 correspondiente a las proteasas activas en hipófisis sí se detectó la expresión de los zimógenos inactivos, Pro-MMP2 y Pro-MMP9. En estudios previos en distintos tipos de tumores hipofisarios humanos tampoco se detectó actividad de MMP2 y MMP9 (128;148), mientras que en otros trabajos se relacionó una alta actividad de MMPs con la agresividad e invasividad de los tumores hipofisarios (149-151). Por lo tanto, la baja actividad de MMP2 y

MMP9 que encontramos podría estar relacionada con el carácter benigno de los prolactinomas en nuestro modelo experimental. Por otro lado, se ha postulado un rol de las MMPs en el control de la proliferación y secreción hormonal en la hipófisis. Estos autores sugieren que la actividad de las MMPs se encontraría restringida por áreas o ante condiciones fisiológicas específicas, y esto permitiría la activación local de factores de crecimiento que actuarían en forma parácrina o autócrina sobre las células vecinas (148). Teniendo en cuenta esta hipótesis, la menor expresión de las Pro-MMPs en las hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup> podría estar relacionada a los niveles de activación de TGF- $\beta$ 1 en este genotipo.

### Integrinas

En nuestro modelo experimental encontramos diferente patrón de expresión en las integrinas capaces de activar TGF- $\beta$ 1. La expresión de ambas integrinas,  $\beta$ 6 y  $\beta$ 8, es mayor en las hipófisis de machos respecto a las hembras del mismo genotipo. Sólo en los machos la integrina  $\beta$ 6 fue afectada por la ausencia del RD2, observándose una menor expresión en hipófisis *ko*, mientras que en las hembras no se observan diferencias.

En cambio, la integrina  $\beta$ 8 fue el único gen de todos los posibles activadores de TGF- $\beta$ 1 evaluados que se encontró **sobre-expresado** en las hipófisis hiperplásicas de las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup>, sin observarse diferencias entre genotipos en los machos.

Ha sido demostrado que los mecanismos de activación de TGF- $\beta$ 1 por diferentes integrinas cumplen diferentes funciones biológicas. La integrina  $\beta$ 8 se encuentra normalmente expresada en células epiteliales, donde controla negativamente la proliferación, y se postula que la activación de TGF- $\beta$ 1 mediada por  $\alpha$  $\beta$ 8 es un mecanismo inhibitorio normal en este tipo celular. Es más, se ha demostrado que en células transformadas disminuye la expresión de esta integrina (67;152). En cambio, la activación de TGF- $\beta$ 1 por integrina  $\alpha$  $\beta$ 6 ha sido demostrada sólo en situaciones de inflamación o injuria, procesos relacionados a alteraciones mayores de la matriz extracelular con elevados niveles de activación de TGF- $\beta$ 1 (67;152).

Estos antecedentes en conjunto, nos sugieren que la alta expresión de integrina  $\beta$ 8, sin notables cambios en la expresión de la integrina  $\beta$ 6 en las hipófisis *ko* para el RD2 podría representar un mecanismo de restricción del crecimiento tumoral y la transformación



maligna en este modelo de prolactinoma. Más aún, los altos niveles de integrina  $\beta 8$  en machos podrían estar también involucrados en la ausencia de generación de prolactinomas en este sexo.

### TSP1 y KLK1

Entre todos los activadores estudiados, **únicamente TSP1 y KLK1, presentaron un patrón de regulación similar al que habíamos descrito para los niveles de TGF- $\beta 1$  activo en las hembras.** Es decir, TSP1 y KLK1 responden a un control dopaminérgico positivo, y a un incremento de expresión frente a un estímulo con estrógenos tal como observamos en las hipófisis de hembras ko. Estos hallazgos nos hacen sospechar que estas proteínas podrían estar involucradas en la activación hipofisaria de TGF- $\beta 1$

Estudios previos demostraron una regulación dopaminérgica y estrogénica de KLK1 a nivel hipofisario en ratas hembra (139;153;154). Pero las alteraciones inducidas por dopamina y estradiol sobre esta proteasa no habían sido, hasta el momento, relacionadas con la posible activación local de TGF- $\beta 1$ . Son más recientes en bibliografía los estudios que demuestran una activación directa de TGF- $\beta 1$  por calicreínas. Se ha demostrado *in vitro* y *ex vivo* que KLK1, 2 y 5 interactúan tanto con LAP, provocando un cambio conformacional rápido en el complejo latente, como con LTBP1, provocando en ambos casos la liberación de la citoquina activa (141;142). Pero no existen antecedentes sobre la activación de TGF- $\beta 1$  por KLKs en hipófisis.

Contrario a lo descrito en hipófisis de ratas hembra, encontramos una clara regulación positiva dopaminérgica de KLK1, en nuestros ratones, evidenciada, no sólo por los menores niveles de expresión en las hipófisis de las hembras ko, sino también por una estimulación frente al tratamiento con el agonista cabergolina. Demostramos además una fuerte respuesta de esta proteasa a los estrógenos en ambos sexos. Si bien en los machos la respuesta a estrógenos fue igual en ambos genotipos, en las hembras, el incremento en el ARNm de KLK1 sólo se evidenció en ausencia de control dopaminérgico, en las hipófisis *Drd2*<sup>-/-</sup>. La fuerte respuesta de KLK1 frente al estímulo con estradiol (un aumento de 23 veces en los niveles) en hipófisis de hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> concuerdan con la marcada activación de TGF- $\beta 1$  que encontramos frente a este estímulo (ver Figuras 23A y 32C).

Nuestros resultados sugieren por primera vez una posible función de KLK1 como activador local de TGF- $\beta$ 1 en hipófisis, modulando los efectos de dopamina y estradiol sobre la activación de esta potente citoquina. Actualmente nos encontramos profundizando estudios *in vivo* e *in vitro* sobre la acción hipofisaria de esta proteasa para verificar esta hipótesis.

En cuanto a TSP1, su rol como activador de TGF- $\beta$ 1 se encuentra bien documentado en la bibliografía, siendo una de las pocas moléculas cuya capacidad de activación ha sido demostrada tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (63).

Previamente había sido descrito que TSP1 se encuentra inhibida en las hipófisis de ratas tratadas crónicamente con estrógenos (117) y nosotros pudimos verificar este resultado en nuestro modelo de ratas DES. En el capítulo anterior demostramos que los niveles de TSP1 se encuentran también disminuidos en otro modelo de prolactinomas experimentales, los ratones hembra *Drd2*<sup>-/-</sup>. De acuerdo con esta regulación positiva por dopamina, vimos que el tratamiento con sulpiride inhibió la expresión de TSP1 hipofisario. Mientras que el tratamiento con valerato de E2 indujo un marcado aumento en la expresión de TSP1 en ambos genotipos. El efecto positivo del estradiol es contradictorio respecto de lo reportado en la bibliografía y respecto a lo que observamos en nuestro modelo de ratas estrogenizadas. Sin embargo estas diferencias pueden deberse a que los efectos opuestos se vieron a diferentes tiempos de tratamiento (24hs en los ratones, efecto agudo; y 4 semanas en las ratas, efecto crónico), y con diferentes drogas y dosis.

El hecho de que tanto E2 como dopamina incrementaran simultáneamente los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y la expresión génica de TSP1 nos lleva a proponer también a TSP1 como posible mediador de los efectos de dopamina y estradiol observados sobre la activación local de TGF- $\beta$ 1.

Como conclusión de los resultados de este capítulo, y volviendo a los interrogantes que nos planteamos al comienzo de la discusión, podemos decir que:

- Demostramos que efectivamente hay una regulación conjunta de dopamina y estradiol sobre el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario, específicamente sobre el proceso de

activación de la citoquina y esto se evidenció también en los niveles de PRL sérica, que presentaron una correlación inversa con la citoquina activa en las hembras. Estos resultados nos llevan a proponer a TGF- $\beta$ 1 activo como mediador de los efectos dopaminérgicos y estrogénicos sobre la función del lactotrofo.

- Encontramos diferencias sexuales en el sistema TGF- $\beta$ 1 y en su regulación por dopamina y estradiol. Al ser más fuerte el control tónico dopaminérgico en las hembras, la pérdida del RD2 causó un mayor impacto en el sistema TGF- $\beta$ 1 en las hembras que en los machos. En general en los machos la mayoría de los componentes del sistema presentaron elevados niveles de expresión respecto de las hembras, en concordancia con el efecto inhibitorio de los estrógenos sobre muchos de estos componentes. Es decir, los menores niveles de estrógenos circulantes en machos favorecerían la presencia de un sistema TGF- $\beta$ 1 más potente en este sexo, y esto **podría explicar, al menos en parte la protección frente al desarrollo de prolactinomas en los machos, aún frente a la pérdida del control dopaminérgico.**

## Capítulo 3

**Potencial terapéutico de péptidos análogos  
de TSP1 en prolactinomas experimentales  
inducidos por estrógenos**

## INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO 3

### *Angiogénesis*

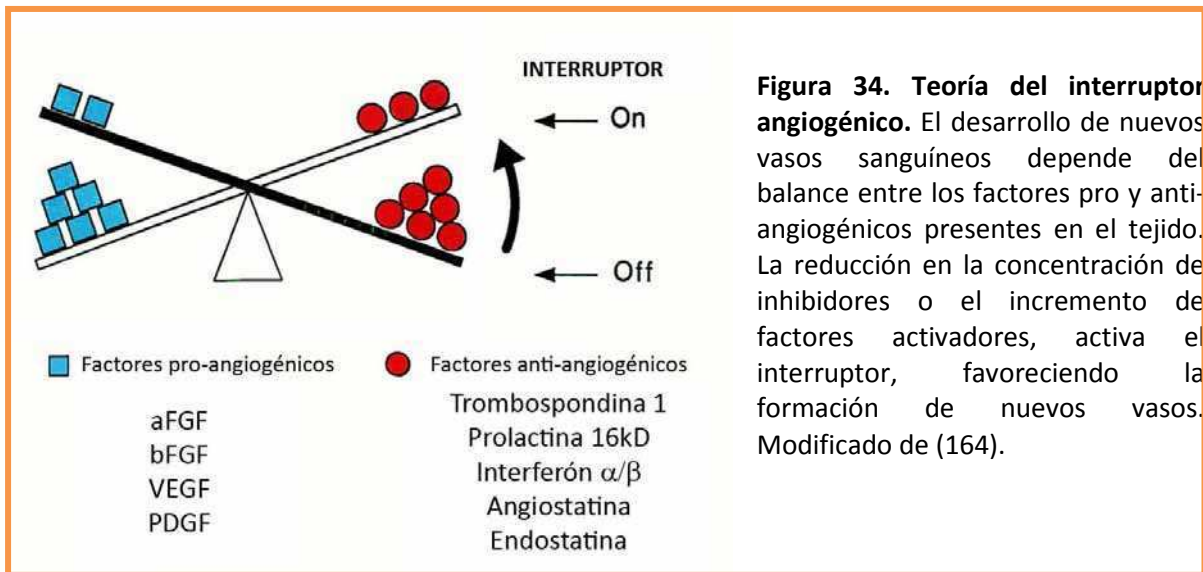
Se denomina angiogénesis al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. La angiogénesis tiene un rol fundamental durante el desarrollo embrionario, y en diferentes procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual (155). Sin embargo también está involucrada en la patogénesis de varias enfermedades, como la aterosclerosis, artritis, retinopatía diabética y psoriasis (156;157).

Un área de investigación muy desarrollada en las últimas décadas, y de gran interés debido a su potencial terapéutico, es el rol de la angiogénesis en el desarrollo de tumores. Folkman fue el primero en proponer que el crecimiento de tumores sólidos depende del proceso angiogénico, basándose en experimentos en los cuales, si implantaba tumores en órganos aislados, éstos eran incapaces de crecer, mientras que los mismos tumores implantados sobre vasos sanguíneos, no sólo crecían e inducían angiogénesis sino que también producían metástasis (158).

El aumento del tamaño tumoral, requiere un aumento en su vascularización para satisfacer las demandas crecientes de oxígeno y nutrientes. En muchos tumores humanos (mama, próstata, vejiga, estómago, entre otros), el incremento de la angiogénesis se vio correlacionado con el desarrollo de metástasis (159;160), mal diagnóstico y disminución de la supervivencia (161;162).

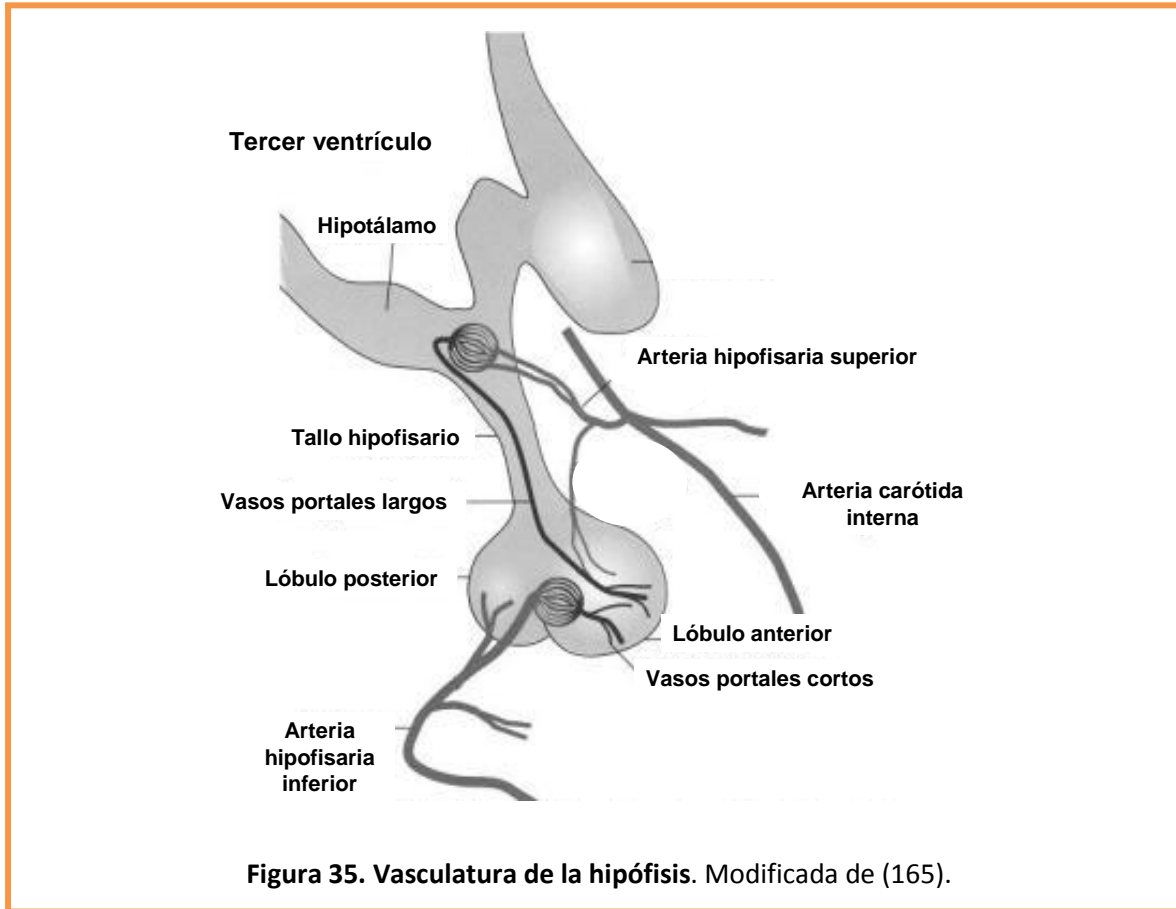
La angiogénesis es un proceso complejo que se encuentra altamente regulado e involucra la interacción entre células tumorales, células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y la matriz extracelular. Todos estos actores son capaces de liberar una variedad de factores que pueden influenciar positiva o negativamente el mecanismo de angiogénesis, actuando sobre la vasculatura, que en general se encuentra en estado quiescente en el adulto. El balance final entre los factores pro-angiogénicos (VEGF, FGF, etc.) y anti-angiogénicos (TSP1, angiostatina, entre otros) es el que determinará el fenotipo angiogénico

del tumor. Esta hipótesis del *switch* o “interruptor angiogénico” se ejemplifica en la Figura 34 y es considerada uno de las condiciones necesarias para el desarrollo de tumores (163)



### Angiogenesis en adenomas hipofisarios

La glándula pituitaria, a diferencia de otros tejidos en donde se ha estudiado la angiogenesis, tiene doble aporte sanguíneo. El principal está dado por los vasos portales largos, que proveen un medio de comunicación entre el hipotálamo y la adenohipofisis, llevando neurotransmisores y otros péptidos hipotalámicos estimuladores e inhibidores de la secreción y proliferación de las células de la hipófisis anterior. Los capilares del sistema porta hipofisario son fenestrados, lo que favorece el intercambio de sustancias con las células endócrinas de la glándula. Además, hay un sistema adicional arterial directo: la hipófisis recibe oxígeno y nutrientes a partir de las arterias hipofisarias superior e inferior que son ramas directas de la arteria carótida interna. Por su parte, la secreción adenohipofisaria alcanza el lóbulo posterior a través de los vasos portales cortos (Figura 35).



Debido a la alta vascularización que presenta la glándula normal, el papel de la angiogénesis en el desarrollo de tumores hipofisarios ha sido motivo de controversias. Varios estudios señalan que los adenomas hipofisarios humanos presentan una menor vascularización respecto de la hipófisis no tumoral (166;167). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la angiogénesis en los tumores hipofisarios está relacionada con el comportamiento y la respuesta tumoral. En particular, se demostró que los microprolactinomas son menos vascularizados que los macroprolactinomas (168); los prolactinomas invasivos son significativamente más vasculares que los no invasivos (169) y los niveles de ARNm para VEGF, factor pro-angiogénico por excelencia, son mayores en los adenomas que en las hipófisis normales (170).

Estos antecedentes sugieren que el desarrollo de prolactinomas está asociado un proceso angiogénico.

Estudios en modelos animales de prolactinomas refuerzan esta hipótesis. En particular, en nuestro laboratorio hemos observado un incremento en la expresión de VEGF

en las hipófisis de ratones  $Drd2^{-/-}$ , modelo de prolactinoma resistente a agonistas dopaminérgicos (106), en el cual también demostramos que un tratamiento con terapias anti-VEGF fueron efectivas en reducir no sólo la densidad vascular, sino también el crecimiento de los prolactinomas (171).

Por otro lado, Elías y Weiner (172) propusieron que la angiogénesis es necesaria para la inducción y el crecimiento de los prolactinomas inducidos por estrógenos en ratas Fisher 344. Estos mismos autores demostraron que la acción tumorigénica del estradiol correlaciona con su capacidad de inducir un suministro de sangre arterial directo sobre la hipófisis (173). Además es sabido que los estrógenos regulan positivamente los niveles hipofisarios de potentes factores pro-angiogénicos como VEGF y FGF (87), mientras que inhiben la producción de factores anti-angiogénicos como TSP1 (117). Por lo tanto, los prolactinomas inducidos por estrógenos presentan una elevada angiogénesis y representan un buen modelo para evaluar tratamientos terapéuticos que tengan como blanco el proceso angiogénico.

### *Terapias anti-angiogénicas*

Debido a que la mayoría de los tumores requieren de la formación de nuevos vasos sanguíneos para su crecimiento, y que la inducción de este proceso es un evento temprano en el desarrollo del cáncer y de otros tumores no malignos, el bloqueo de la angiogénesis resulta un blanco terapéutico más que atractivo en la búsqueda de tratamientos contra el crecimiento tumoral.

Desde que Folkman lo propuso por primera vez en la década del '70 (174), se han dedicado numerosos esfuerzos para el desarrollo de estrategias anti-angiogénicas. La mayoría de ellas apuntan al bloqueo de VEGF, el más potente promotor de la angiogénesis. En este sentido se han desarrollado varios agentes contra VEGF que se encuentran en distintas fases preclínicas de experimentación (175). Entre ellos se puede mencionar anticuerpos contra VEGF (Avastin o Bevacizumab, mAb G6-31) o contra sus receptores;



receptores solubles que unen VEGF en circulación (VEGF-TRAP), pequeñas moléculas inhibidoras de los receptores de VEGF, entre otros (Revisión en (176)).

A pesar de que estas estrategias anti-VEGF demostraron ser eficientes en muchos modelos murinos y humanos de cáncer, en varios estudios preclínicos y clínicos se observó que estos efectos benéficos resultan ser transitorios, y luego de un corto tiempo los tumores vuelven a crecer y la enfermedad progresa (177-179).

Más recientemente se postuló la idea de que las terapias anti-angiogénicas en realidad cooperarían en la normalización de la vasculatura tumoral (180), la cual es típicamente aberrante, presentando vasos tortuosos, flujo sanguíneo errático y alta permeabilidad (181), características que impiden el acceso de las drogas antitumorales. La normalización de la vasculatura permitiría un mejor acceso de las drogas utilizadas en quimioterapia y es por eso que muchas veces las terapias anti-angiogénicas sólo actúan como complemento al tratamiento clásico quimioterapéutico.

Debido a la falta de respuesta en muchos tratamientos preclínicos con antagonistas de VEGF, la búsqueda de otros tratamientos anti-angiogénicos se hizo inminente. Entre ellos se encuentran actualmente en estudio tratamientos con péptidos análogos de trombospondina 1 (TSP1). Esta estrategia resulta de particular interés en este trabajo y se detalla a continuación.

### *Trombospondina 1*

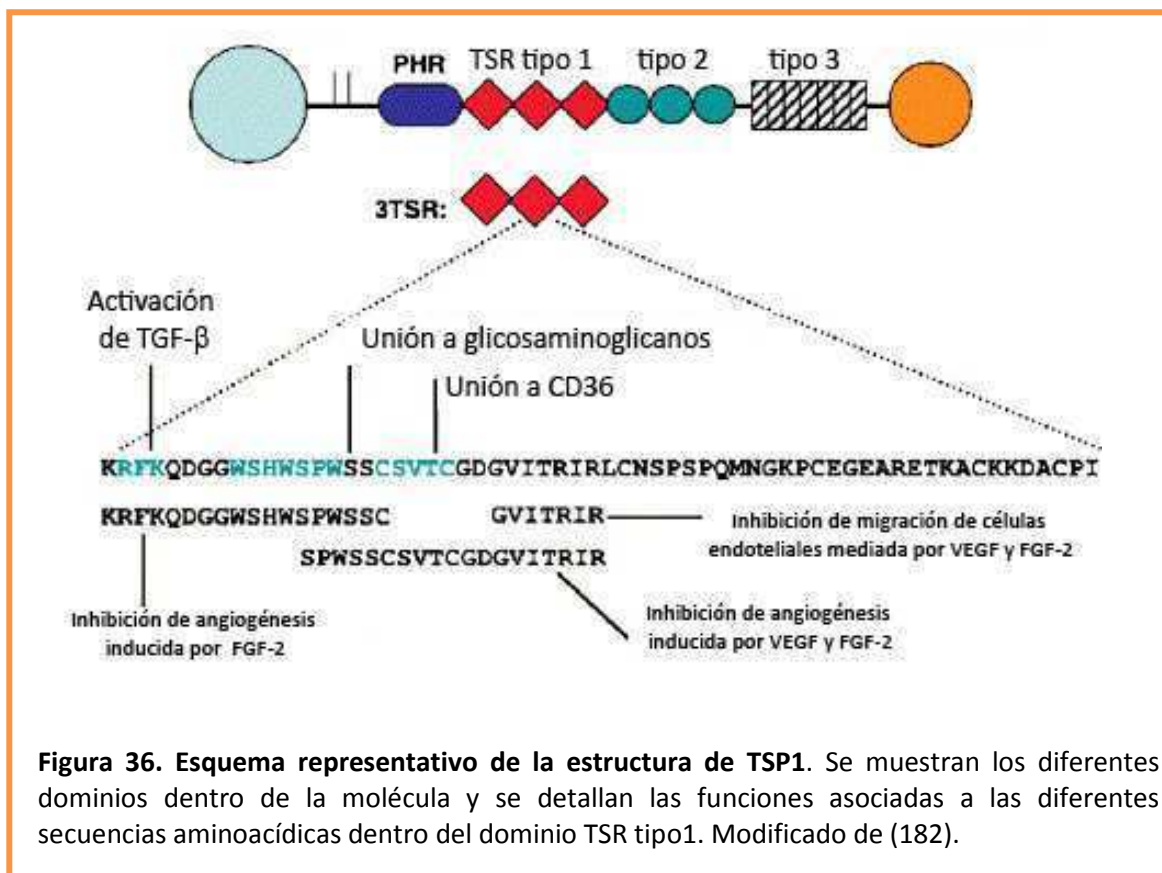
Trombospondina 1 (TSP-1) es una glicoproteína trimérica de 450 KDa, de estructura compleja. Está compuesta por tres cadenas homólogas que contienen diferentes dominios estructurales, dentro de los cuales se encuentran diversos sitios de unión a proteoglicanos, factores de crecimiento, integrinas, entre otros, capacidad que le confiere múltiples funciones biológicas (124). La estructura de cada cadena posee 3 dominios, denominados secuencias repetitivas (TSRs), tipo 1, 2 o 3 (ver esquema en la Figura 36)

Los TSR tipo 1 funcionan como:

A- **inhibidores de angiogénesis:** TSP-1 fue la primera proteína reconocida como potencial supresor endógeno de angiogénesis *in vivo* (124).

B- **activadores de TGF-β1**: ha sido reportada la capacidad de TSP-1 de inhibir el crecimiento tumoral, directamente por inhibición de proliferación de ciertos tipos de tumores, y no de otros. Esta capacidad se da en aquellos tumores cuyo tipo celular es aún responsivo a TGF-β1, ya que TSP-1 es capaz de activar TGF-β1 *in vivo* en numerosos tejidos (63).

Los principales efectos anti-angiogénicos de TSP-1 son, en su mayoría, mediados por las secuencias repetitivas TSR tipo1. Las TSR-1 contienen un sitio de unión a la proteína CD36 de la membrana celular endotelial, con la cual interactúa, desencadenando una serie de eventos anti-proliferativos y apoptóticos que involucran la activación de la cascada fyn-caspasa3- p38MAPK y JUNK1, entre otros. Este sitio de unión a CD36 es el responsable de la inhibición de la angiogénesis causada tanto por FGF-2 como por VEGF, por impedir el acceso a sus receptores al desplazarlos de los proteoglicanos de superficie que los mantienen unidos a las células endoteliales, y/o interferir en la señalización intracelular (124).



**Figura 36. Esquema representativo de la estructura de TSP1.** Se muestran los diferentes dominios dentro de la molécula y se detallan las funciones asociadas a las diferentes secuencias aminoacídicas dentro del dominio TSR tipo1. Modificado de (182).

### *Péptidos sintéticos análogos de TSP1*

Dado que TSP1 es una proteína muy grande y con múltiples funciones, se han desarrollado péptidos sintéticos que mimetizan específicamente la actividad anti-angiogénica de esta compleja glicoproteína (183). Estos péptidos fueron sintetizados basándose en la secuencia activa GVITRIR presente en la segunda TSR tipo 1 de TSP1. Esta región de la molécula es necesaria para la unión y activación del receptor CD-36 presente en las células endoteliales (184).

ABT-510 fue uno de los primeros péptidos miméticos de TSP-1, tiene una potente actividad pro-apoptótica sobre células endoteliales en cultivo y es bien tolerado clínicamente (185). Este compuesto fue evaluado en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, linfoma y carcinoma renal (186);(185;187-190). En una segunda generación de análogos de TSP-1 surge otro péptido, el ABT-898, cuya ventaja respecto de su predecesor ABT-510, es que presenta una menor tasa de *clearance*, con lo cual se espera que este péptido sea más potente que los anteriores (191;192).

### *TSP1 en hipófisis*

El rol de TSP1 en la tumorigénesis hipofisaria no se encuentra del todo dilucidado. En trabajos previos se demostró que TSP1 se encuentra ampliamente distribuida en la hipófisis, particularmente co-localizando con marcadores de células endoteliales (76), y que un tratamiento crónico con estradiol disminuye la expresión de TSP1 hipofisaria determinada mediante inmunohistoquímica (117). En concordancia con estos resultados, encontramos menores niveles de ARNm de TSP1 en las hipófisis tumorales de ratas tratadas con DES y en los ratones hembra *Drd2*<sup>-/-</sup> (ver Figura 13, Capítulo 1). En base a estos resultados postulamos que la disminución local de este factor anti-angiogénico podría estar involucrada en el desarrollo de los prolactinomas y que, por lo tanto, la restitución de los niveles de TSP1 podría presentar efectos benéficos para detener el crecimiento de estos tumores.

## OBJETIVOS DEL CAPÍTULO 3

Dado que el modelo de prolactinoma inducido por estradiol en ratas presenta bajos niveles de TSP-1, alteraciones en la expresión de TGF- $\beta$ 1 hipofisario y un aumento en la angiogénesis (factores que estarían contribuyendo a la formación del tumor), nuestra hipótesis postula que tratamientos con compuestos que mimetizan la acción anti-angiogénica de TSP-1 podrían ser efectivos como terapia antitumoral en este modelo.

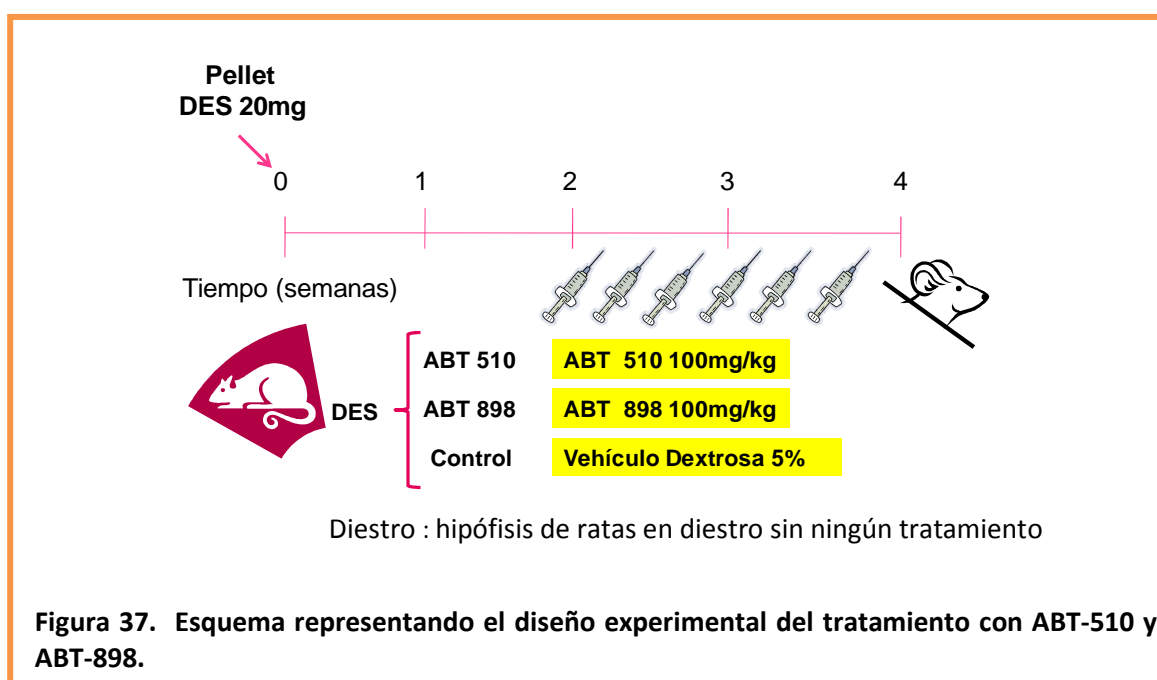
El objetivo de esta segunda parte del trabajo fue estudiar el efecto *in vivo* de un tratamiento con los análogos sintéticos de TSP-1: ABT-510 y ABT-898, en prolactinomas inducidos por estrógenos en ratas hembra.

### *Objetivos específicos:*

- 1) Evaluar el impacto del tratamiento con ABT-510 y ABT-898 sobre los parámetros de crecimiento tumoral (tamaño hipofisario, niveles de prolactina sérica, proliferación celular) en prolactinomas inducidos por DES.
- 2) Analizar el efecto de estos tratamientos sobre la vasculatura en los prolactinomas inducidos por DES.
- 3) Estudiar el efecto de los análogos de TSP1 sobre el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario.

## Diseño experimental

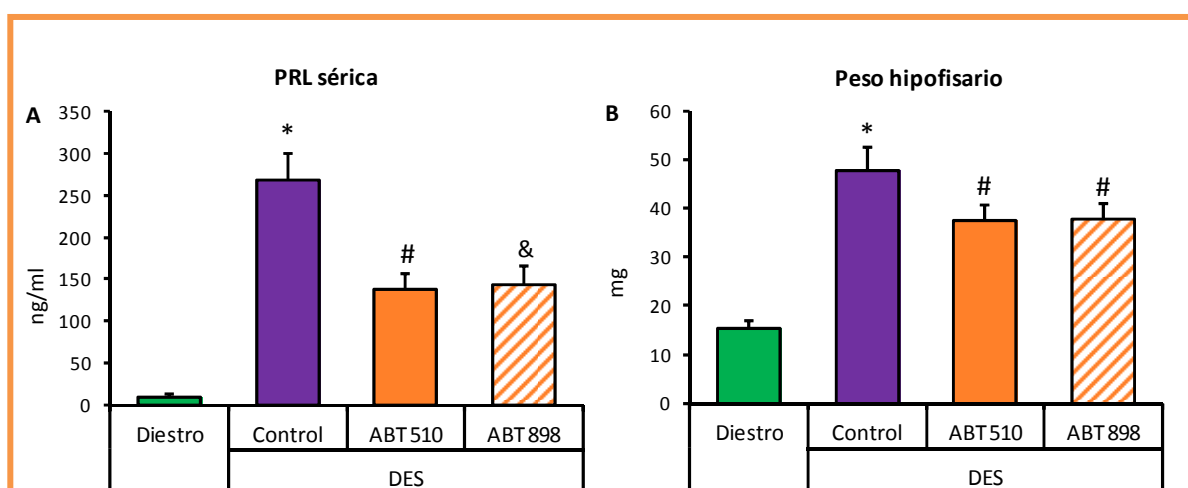
Para evaluar si los análogos de TSP1 tienen capacidad de revertir la tumorigénesis hipofisaria en el modelo de prolactinomas inducidos por DES, se utilizó el siguiente protocolo experimental (ejemplificado en la Figura 37): dos semanas luego de la implantación del pellet DES, las ratas fueron divididas en tres grupos, un grupo fue tratado con ABT-510 (100 mg/kg, i.p., Laboratorios Abbott); otro grupo fue tratado con ABT-898 (100 mg/kg, i.p., Laboratorios Abbott) y el tercer grupo fue tratado con el vehículo Dextrosa 5% (Grupo DES control). El tratamiento consistió en la administración de 3 inyecciones semanales durante dos semanas. Pasadas 48 hs luego de la última inyección, se sacrificaron las ratas y se recolectó sangre troncal y la adenohipófisis para su posterior análisis. Los tres grupos experimentales descriptos fueron comparados con hipófisis normales obtenidas de ratas hembra adultas en diestro al momento del sacrificio.



## RESULTADOS DEL CAPÍTULO 3

### *Efecto de los análogos sintéticos de TSP-1 sobre el crecimiento tumoral*

Analizamos, en primer lugar, el efecto del tratamiento con los péptidos ABT-510 y ABT-898 sobre dos parámetros del crecimiento tumoral en este modelo: los niveles de PRL sérica y el peso de las hipófisis. En la Figura 38A, se observa que luego de dos semanas de tratamiento, ambos péptidos redujeron de manera significativa los elevados niveles de PRL sérica inducidos por DES, sin observarse diferencia entre el efecto de ambos péptidos. De la misma manera los análogos de TSP1, lograron disminuir el peso de la hipófisis incrementado luego del tratamiento con DES (Figura 38B).

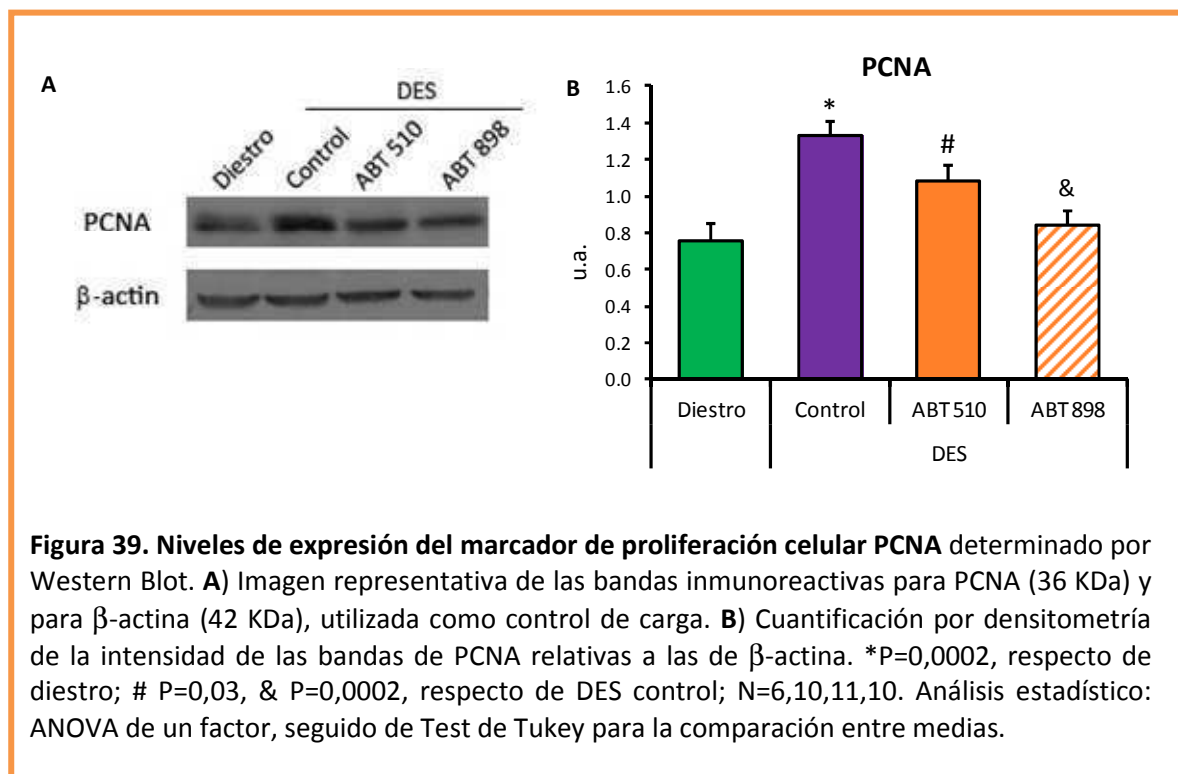


**Figura 38. Efecto de un tratamiento con ABT-510 y ABT-898 durante 2 semanas sobre parámetros del crecimiento tumoral.** A) Niveles de PRL sérica medidos por RIA en los diferentes grupos experimentales. \*P=0,0002 respecto de diestro; #P=0,036 y & P=0.028 respecto de DES control. N=11,12,14,15. B) Peso de las hipófisis luego del tratamiento *in vivo* con los análogos de TSP1. \*P=0,0002 respecto de diestro; #P=0,03 respecto de DES control. N =11,12,14,15. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido de Test de Tukey para la comparación entre medias.

Finalizado el tratamiento medimos por *western blot*, en los homogenatos de hipófisis de todos los grupos experimentales, los niveles de expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), proteína utilizada comúnmente como marcador de proliferación

celular. PCNA es una proteína de 36 KDa, de localización nuclear, que participa en los procesos de síntesis y reparación del ADN. Su expresión es máxima cuando las células se encuentran en la fase S del ciclo celular (193).

La expresión proteica de PCNA hipofisaria fue significativamente mayor en el grupo DES en comparación con el grupo de ratas normales en diestro, congruente con la acción mitogénica de los estrógenos sobre los lactotropos y las células endoteliales. En la Figura 39 se observa que los tratamientos con ABT-510 y ABT-898 lograron disminuir, en parte, el efecto mitogénico del DES, evidenciado por una disminución de la expresión de PCNA. De los dos péptidos utilizados, el ABT898 fue más potente en reducir los niveles de PCNA.



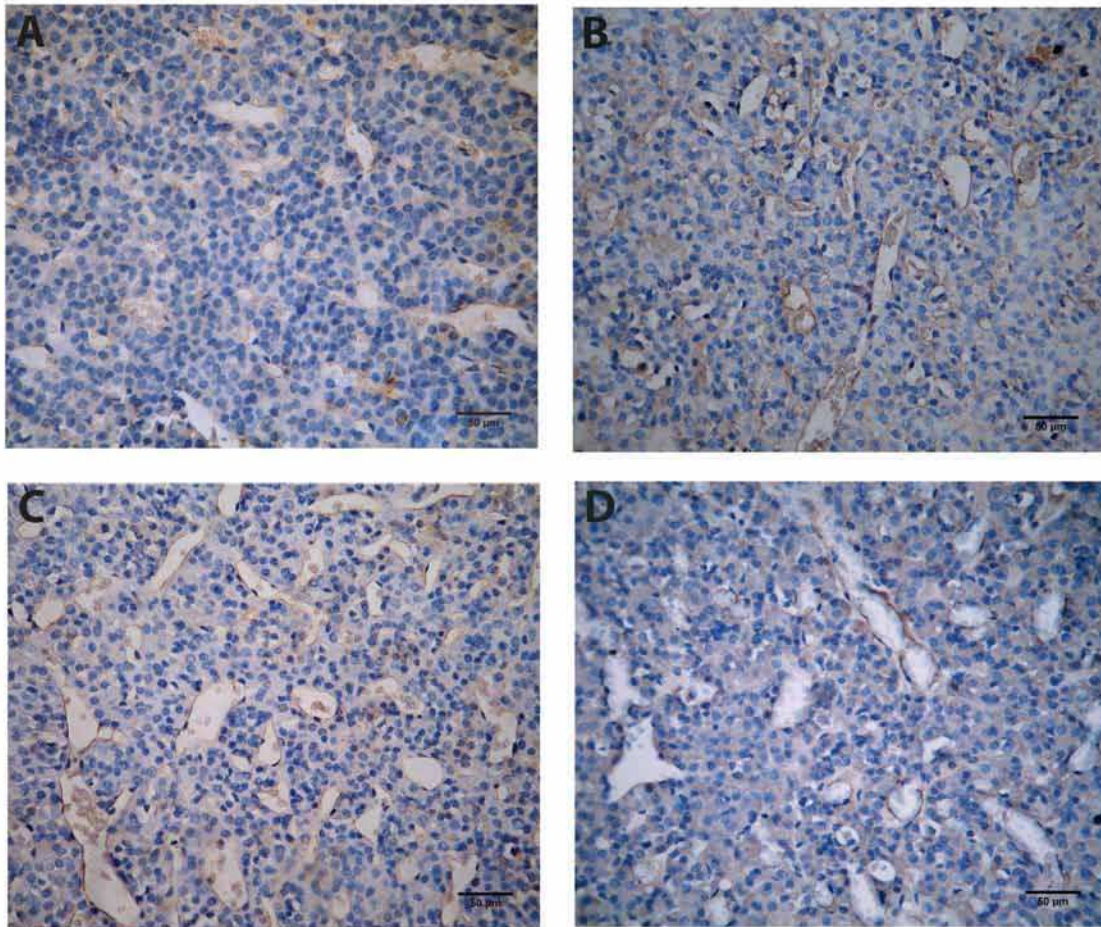
### *Efecto de ABT-510 y ABT-898 sobre la angiogénesis en los prolactinomas*

Como mencionamos en la introducción de este capítulo, los péptidos ABT-510 y ABT-898 fueron diseñados en base a la región de TSP1 identificada como responsable de la actividad anti-angiogénica de esta compleja glicoproteína, y la capacidad de estos péptidos de inhibir el proceso de angiogénesis ha sido demostrada en varios estudios (188;192;194).

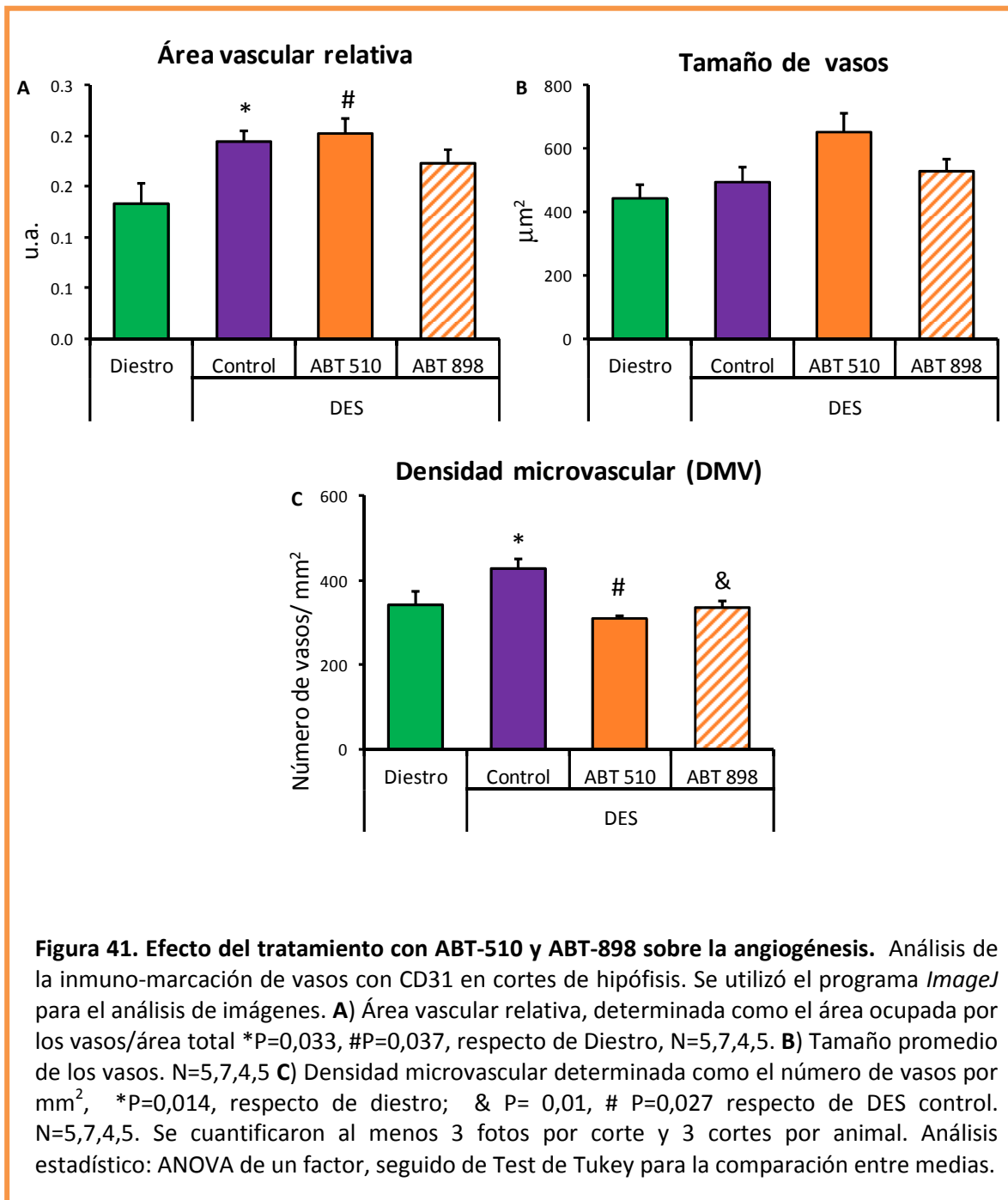
En base a estos antecedentes, evaluamos si la inhibición que ejercen estos análogos sobre el desarrollo de los prolactinomas inducidos por DES podría atribuirse al efecto anti-angiogénico local de los mismos. Para ello realizamos un estudio inmunohistoquímico de la vasculatura en cortes de hipófisis de los distintos grupos experimentales. Cuantificamos el área y la densidad vascular, dos parámetros muy utilizados como indicadores de angiogénesis, utilizando como marcador de endotelio un anticuerpo específico para CD31. Con ayuda del *software* Image J analizamos las imágenes y calculamos el *área vascular relativa* (suma de áreas de todos los vasos sobre el área total del tejido), el tamaño promedio de los vasos expresado en  $\mu\text{m}^2$ , y la *densidad microvascular* (DMV) determinada por el número de vasos por área de tejido. En la Figura 40 se muestran imágenes representativas de la inmuno-marcación con CD31.

Mediante este análisis observamos que tanto la DMV como el área vascular relativa se encontraron incrementadas en las hipófisis tumorales (DES) respecto de los controles en diestro, sin registrarse cambios en el tamaño promedio de los vasos. **El tratamiento con ABT-510 y ABT-898 disminuyó significativamente el número de vasos por área en los tumores** (Figura 41C) sin modificar el tamaño de los vasos (Figura 41B). En cuanto al área vascular total, no se observó un efecto de los péptidos.





**Figura 40. Inmuno-marcación de vasos con el marcador endotelial CD31.** Las secciones de hipófisis de los distintos grupos experimentales fueron incubadas con anticuerpo anti CD31 y reveladas con DAB (color marrón): Diestro (A), DES control (B), DES + ABT-510 (C) y DES + ABT-898 (D). Los núcleos fueron contra-teñidos con hematoxilina (color azul) y las imágenes fueron tomadas con aumento 40X. La longitud de la barra representa 50µm.



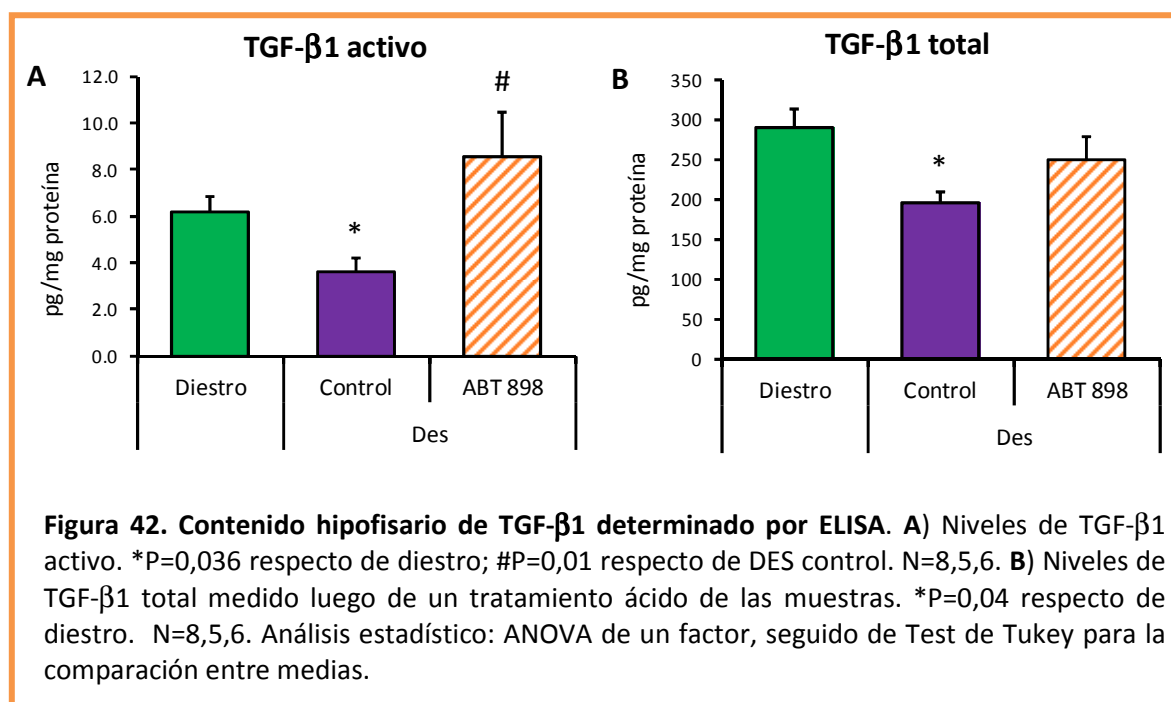
Estos resultados corroboran un efecto inhibitorio de ABT-510 y ABT-898 sobre la vascularización en los tumores inducidos por DES, efecto que seguramente participa en la disminución del tamaño tumoral y de la PRL sérica causado por el tratamiento con estos análogos de TSP1.

### Efecto de ABT-510 y ABT-898 sobre el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario

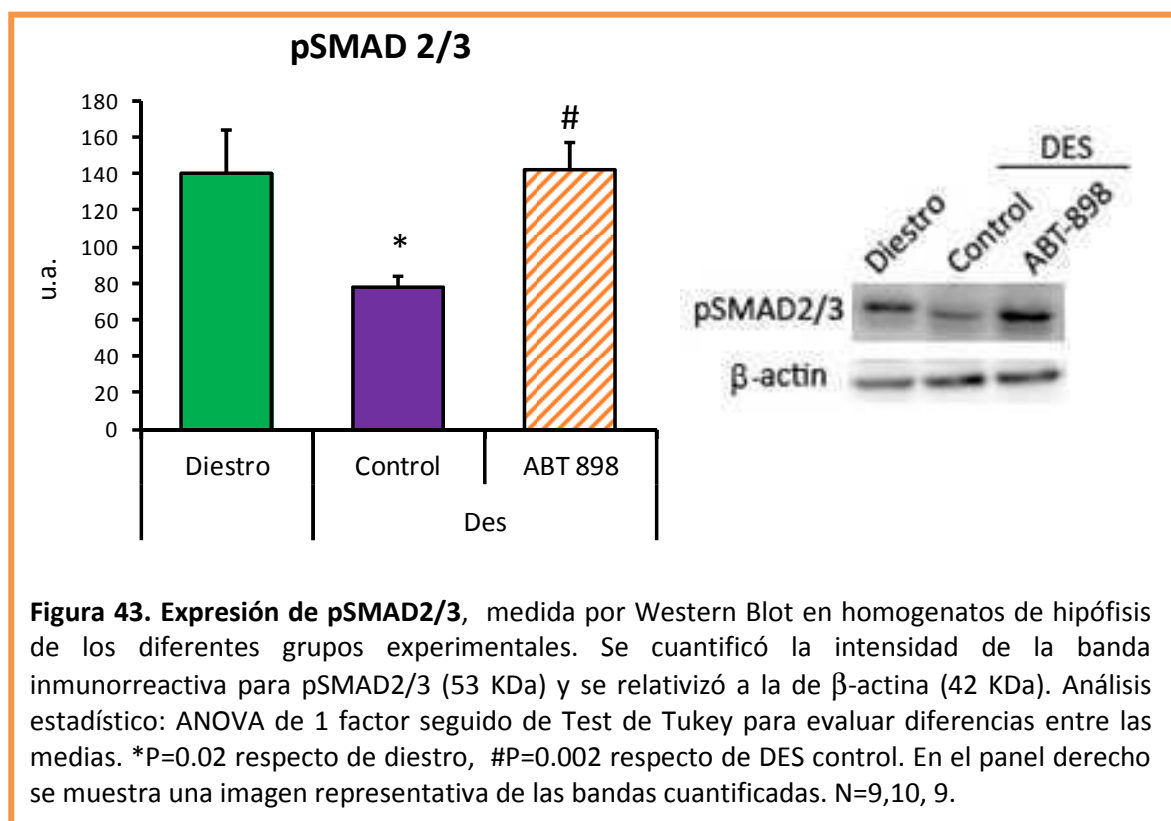
Ha sido previamente descrito que, en los prolactinomas inducidos en ratas hembra por un tratamiento crónico con estrógenos, los niveles de TGF- $\beta$ 1 se encuentran disminuidos (107;117;118;195). En el primer capítulo de esta tesis demostramos que no sólo la síntesis y expresión, sino también la **activación** de TGF- $\beta$ 1 se encuentra reducida en las hipófisis de nuestros modelos experimentales de prolactinomas: ratas tratadas con DES y ratones hembra *Drd2*<sup>-/-</sup>.

Basándonos en estos antecedentes, y teniendo en cuenta que TSP1 es uno de los principales activadores de TGF- $\beta$ 1, nos interesó evaluar si el efecto inhibitorio de ABT-510 y ABT-898 sobre el desarrollo del prolactinoma inducido por DES modificaba también la regulación local de TGF- $\beta$ 1.

Determinamos los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y total por ELISA en homogenatos de hipófisis de los grupos controles y tratados. Encontramos, sorpresivamente, que el tratamiento con ABT-898 indujo un marcado incremento en los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo, recuperando, e incluso superando, los niveles observados en las hipófisis normales (Figura 42A). No se evidenció alteración de los niveles totales de TGF- $\beta$ 1 (Figura 42B), sugiriendo una regulación específica del péptido sobre el proceso de activación de la citoquina.



Los niveles de expresión de la proteína SMAD2/3 fosforilada (pSMAD 2/3), principal vía de señalización activada por TGF- $\beta$ 1 una vez que se une a su receptor, también fueron inducidos por el tratamiento con ABT-898, revirtiendo el efecto inhibitorio del DES sobre la expresión de esta proteína, y confirmando el incremento en la activación de la citoquina (Figura 43).



**El aumento local de los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo inducido por ABT-898 podría estar participando en la inhibición de la proliferación tumoral, y la disminución del tamaño hipofisario inducidos por el péptido.**

### *Efecto de ABT-510 a tiempos cortos sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 hipofisario*

Previamente había sido descrito que TSP1 es capaz de activar TGF- $\beta$ 1 *in vitro* e *in vivo* en diferentes tejidos. Sin embargo, los análogos sintéticos de TSP1 utilizados en el presente trabajo (ABT-510 y ABT-898) fueron diseñados en base a la secuencia de TSP1 capaz de unir a CD36 y provocar efectos anti-angiogénicos, y **no a las secuencias de esta glicoproteína conocidas como responsables de la activación de TGF- $\beta$ 1**. A pesar de esto, además del mencionado efecto angiogénico, nosotros observamos por primera vez en la literatura que un tratamiento de 2 semanas con estos péptidos induce un aumento en los niveles locales de TGF- $\beta$ 1 activo.

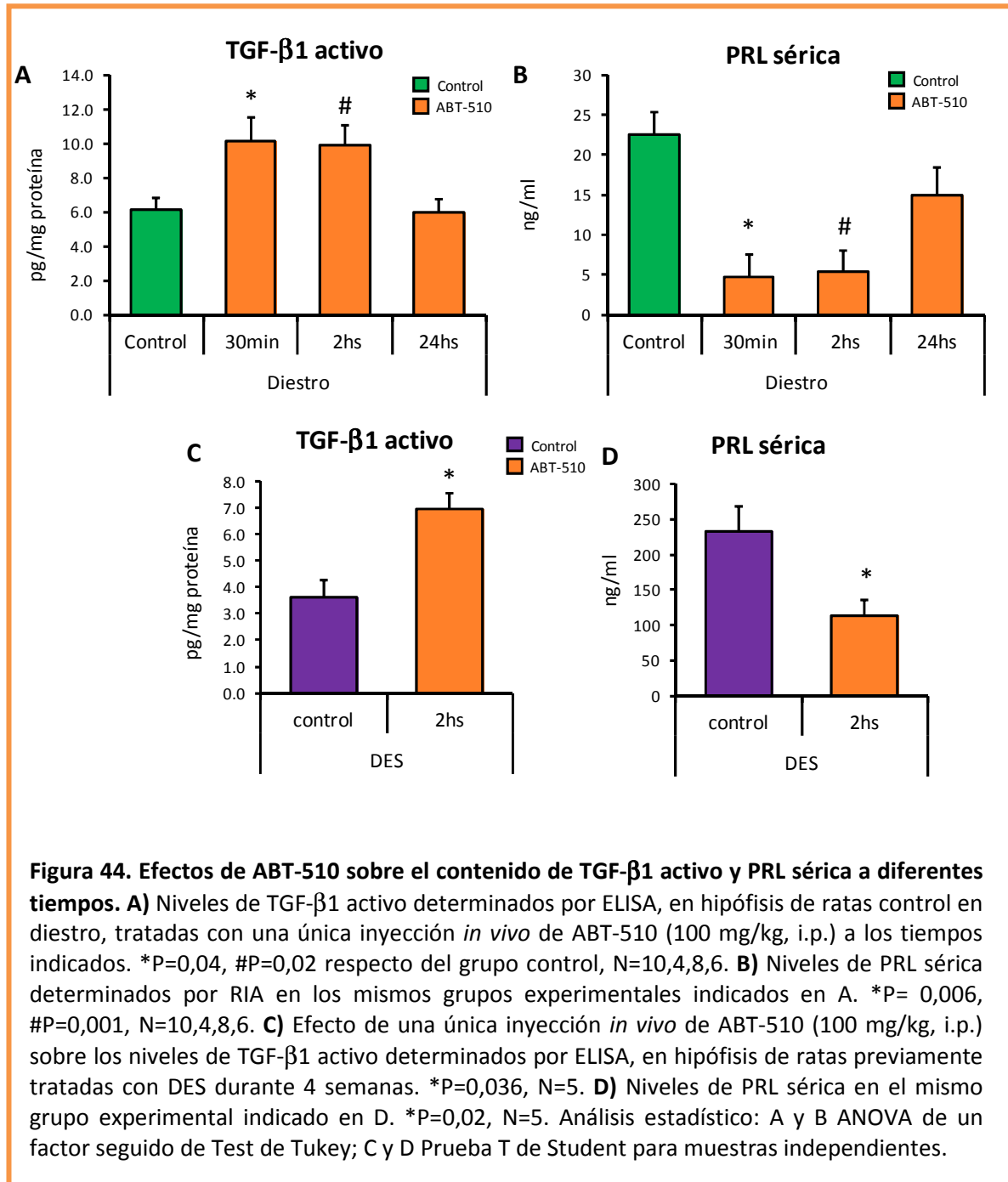
Para corroborar y profundizar el efecto de los análogos de TSP1 sobre la activación de la citoquina realizamos tratamientos *in vivo* a tiempos cortos (30 minutos, 2 hs y 24 hs), con una única dosis de ABT-510 (100 mg/kg, i.p.) en ratas hembra controles en diestro y evaluamos posteriormente el impacto sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario medidos por ELISA.

El tratamiento con ABT-510 incrementó significativamente los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo en hipófisis normales luego de 30 min y 2 hs de aplicación, mientras que a las 24 hs esta respuesta desaparece (Figura 44A).

Evaluamos también el efecto de ABT-510 a tiempos cortos sobre los niveles de PRL sérica. Observamos un efecto muy rápido y drástico de inhibición de la PRL basal luego de 30 minutos y 2 horas de tratamiento con ABT-510, concordante con el incremento en TGF- $\beta$ 1 activo (Figura 44B). Nuevamente el efecto del análogo se perdió a las 24 horas, tiempo al cual tampoco encontramos diferencias en los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo ni total (datos no mostrados).

Estos resultados corroboran un efecto rápido de ABT-510 sobre los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y PRL en hipófisis normales. A continuación analizamos si este mismo efecto a tiempos cortos se observaba en hipófisis tumorales, en las cuales los niveles de la citoquina se encuentran disminuidos. Para ello, inyectamos ABT-510 en ratas previamente tratadas, por 4 semanas, con un pellet de 20 mg DES y las sacrificamos luego de 2 hs de inyección del péptido. Al igual que lo observado en las ratas control, ABT-510 incrementó a las 2 horas los

niveles de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario y redujo significativamente los valores de PRL sérica en las ratas DES (Figura 44C y D).



La rápida activación de TGF- $\beta$ 1 y la concomitante inhibición de la PRL sérica causada por ABT-510 nos llevaron a preguntarnos si estos péptidos podrían estar ejerciendo un

efecto directo sobre los lactotopos, independientemente del efecto anti-angiogénico sobre las células endoteliales que evidentemente requiere tiempos más prolongados.

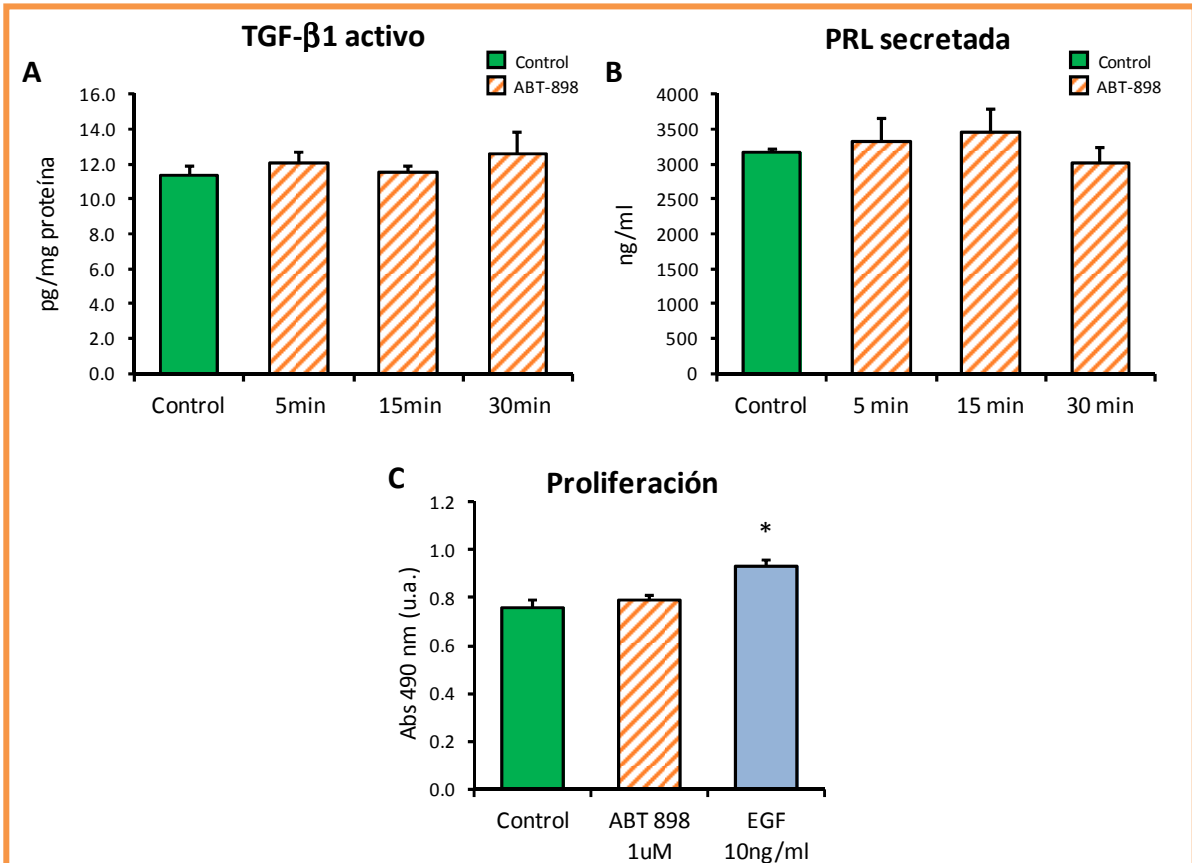
Esto mismo fue cuestionado por uno de los revisores del manuscrito que enviamos para su publicación en la revista *Endocrinology* conteniendo estos resultados, quien nos sugirió realizar experimentos en la línea celular GH3 para esclarecer este interrogante.

La línea GH3 deriva de un tumor hipofisario somatolactotrofo de rata y secreta hormona de crecimiento y prolactina (85).

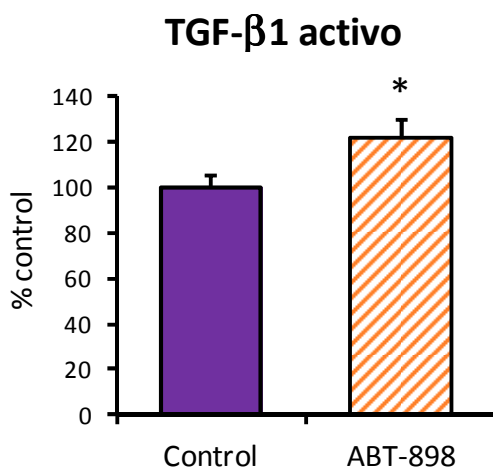
Para determinar si los análogos de TSP1 tienen un efecto directo sobre la secreción de PRL y la activación de TGF- $\beta$ 1 en esta línea celular, incubamos las células con un estímulo de ABT-898 1 $\mu$ M y medimos ambos parámetros luego de 5, 15 y 30 minutos post-estímulo (Figura 45A y B). No observamos variaciones en los niveles de TGF- $\beta$ 1 ni en la secreción de PRL luego del estímulo a ninguno de los tiempos evaluados. Tampoco se vio un efecto del estímulo con ABT-898 sobre la proliferación de las células GH3 (Figura 45C).

A pesar de no haber encontrado efectos sobre la línea GH3, no podemos descartar que los péptidos actúen directamente sobre los lactotopos en las hipófisis *in situ*. La respuesta obtenida *in vivo* es muy diferente de la que puede observarse en un cultivo celular, en especial cuando los estímulos utilizados modifican procesos que ocurren en la matriz extracelular, como es el caso de la activación de TGF- $\beta$ 1. En estos casos es de fundamental importancia mantener la estructura tisular.

Para corroborar esta hipótesis, decidimos utilizar otro abordaje experimental, utilizando un modelo *ex vivo*, es decir, incubando hemi-hipófisis en cultivo provenientes de ratas controles en diestro, en presencia o ausencia de ABT-898 1 $\mu$ M durante 30 minutos. En este modelo corroboramos el incremento de TGF- $\beta$ 1 activo en las hemi-hipófisis tratadas con ABT-898 respecto de las controles (Figura 46). Estos resultados, sugieren que la integridad de la matriz extracelular y probablemente la interacción con otros tipos celulares es fundamental y necesaria para la activación de TGF- $\beta$ 1 inducida por ABT-898, aunque no determinan si el efecto de ABT es directo o indirecto sobre el lactotrofo.



**Figura 45. Efecto de ABT-898 en la línea celular GH3.** Se sembraron 500.000 células GH3 por pocillo en placas de 12 pocillos y se estimularon con ABT-898 1 $\mu$ M por los tiempos indicados en las Figuras. **A)** Niveles de TGF- $\beta$ 1 activo cuantificados por ELISA en el lisado celular. **B)** Niveles de PRL secretados al medio de cultivo por las células, determinados por RIA. **C)** Se sembraron 20.000 células GH3 por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer durante 72 hs en presencia de los estímulos indicados. Los estímulos fueron renovados con medio de cultivo fresco cada 24 hs. Se midió la actividad metabólica de las células mediante el ensayo colorimétrico MTS/PMS. Se utilizó EGF 10ng/ml como control positivo de proliferación. \*P=0.007. Todos los ensayos fueron repetidos 3 veces con muestras por cuadruplicado. Análisis estadístico: ANOVA de un factor.



**Figura 46. Efecto de ABT-898 en hipófisis incubadas *ex vivo*.** Las hemi-hipófisis provenientes de ratas controles en diestro fueron incubadas en placas P96 en 150  $\mu$ l de medio de cultivo suplementado con o sin el estímulo ABT-898 1 $\mu$ M. Luego de 30 minutos de incubación se recolectó el tejido y se homogeneizó para la detección de TGF- $\beta$ 1 activo mediante ELISA. Se expresaron los resultados como porcentaje respecto del grupo control. \*P=0.002. N=9,9. Análisis estadístico: Prueba T de Student para muestras pareadas.



## DISCUSIÓN DEL CAPITULO 3

En este último capítulo exploramos el potencial terapéutico de los análogos sintéticos de TSP1, ABT-510 y ABT-898, como tratamiento en prolactinomas experimentales inducidos por estrógenos.

Demostremos que un tratamiento de tan solo dos semanas con estos péptidos fue suficiente para contrarrestar el aumento en los niveles de prolactina sérica, en el peso hipofisario, y en la tasa de proliferación hipofisaria inducidos por la exposición al estrógeno sintético DES. El efecto inhibitorio de ABT-510 y ABT-898 sobre estos parámetros de crecimiento tumoral fue mediado, al menos en parte, por las propiedades anti-angiogénicas de los fármacos. Esto se evidenció en la disminución del número de vasos por área en los prolactinomas inducidos por DES. Llamativamente, además del efecto anti-angiogénico esperado para estas drogas, encontramos también que el tratamiento incrementó los niveles locales de TGF- $\beta$ 1 activo.

Los dos péptidos sintéticos utilizados en nuestro estudio fueron desarrollados por Laboratorios Abbott, en base a la secuencia activa GVITRIR, presente en la región TSR tipo 1. Esta secuencia de TSP1 es la que le confiere a la molécula sus propiedades anti-angiogénicas, debido a su capacidad de unirse al receptor CD36 y activar las vías de señalización apoptóticas en las células endoteliales (184). Si bien se describió que el análogo de segunda generación, ABT-898, debería ser más potente que su antecesor ABT-510, no observamos grandes diferencias entre ambos sobre la reducción de peso hipofisario o los niveles séricos de PRL, sin embargo ABT-898 fue más eficaz en reducir la expresión del marcador de proliferación celular PCNA en los prolactinomas.

En relación a las características anti-angiogénicas de los péptidos, encontramos que el tratamiento, tanto con ABT-510 como con ABT-898, fue capaz de contrarrestar el aumento en la densidad microvascular inducido por DES. Este efecto probablemente se deba a la acción pro-apoptótica descrita para estos péptidos sobre la microvasculatura (196).

La DMV intra-tumoral es un parámetro comúnmente utilizado para evaluar la angiogénesis en diferentes tumores. En general una elevada DMV correlaciona con un mal pronóstico en tumores sólidos, y con una alta concentración y expresión de factores de crecimiento pro-angiogénicos como FGF-2 y VEGF en varios tipos de cáncer (197). Al respecto, ha sido descrito un aumento significativo en la DMV en adenomas hipofisarios invasivos en comparación con prolactinomas no invasivos (169). En particular, estudios de nuestro laboratorio y otros grupos, han demostrado una aumentada expresión de VEGF en tumores hipofisarios respecto a hipófisis normales, (170;198), con niveles más elevados aún en los macroprolactinomas (31;106;199), y especialmente en los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (26;31;200).

Uno de los efectos asociados a la disminución de la irrigación sanguínea del tumor a causa de las terapias anti angiogénicas, es la limitación del suministro de oxígeno, generando una situación de hipoxia en el tejido. No podemos descartar que el estrés generado por la hipoxia pueda ocasionar apoptosis de las células secretoras, colaborando así con la reducción del tamaño de la hipófisis y de la secreción de PRL observados en el tratamiento con ABT-510 y ABT-898.

Sin embargo, existen discrepancias en la literatura respecto a las consecuencias de las terapias anti-angiogénicas sobre la hipoxia tumoral, ya que recientemente se demostró que estos agentes pueden “normalizar” la estructura aberrante de los vasos tumorales, mejorando la oxigenación tisular y la función de los vasos sanguíneos. Este efecto sería importante para mejorar el suministro de drogas quimioterapéuticas en terapias combinadas para el tratamiento del cáncer (201). En relación a esto, Campbell y col. reportaron que el tratamiento con ABT-510 en un modelo de cáncer ovárico avanzado, no sólo redujo la DMV sino que también incrementó el número de vasos maduros y disminuyó la hipoxia tumoral, sugiriendo una normalización de la vasculatura tumoral (202). Teniendo en cuenta estos antecedentes, otros factores deben estar involucrados en la reducción tumoral inducida por los análogos de TSP1.

Aparte de los efectos anti-angiogénicos de ABT-510 y ABT-898 encontrados, sin duda el resultado más interesante y novedoso del tratamiento evaluado fue la recuperación de los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo en los tumores inducidos por DES. Teniendo en cuenta que esta

citoquina es un potente inhibidor de la secreción y proliferación de los lactotropos (78;118), el aumento de su actividad local se encuentra seguramente involucrado en la regresión de los parámetros tumorales inducidos por los análogos de TSP1.

El efecto estimulador de ABT-510 y ABT-898 se observó exclusivamente sobre los niveles de la citoquina activa. No se evidenciaron alteraciones en el contenido total de TGF- $\beta$ 1, indicando la existencia de una regulación específica de estos péptidos **sobre la activación de TGF- $\beta$ 1**. Esto mismo lo verificamos con tratamientos *in vivo* a tiempos cortos, donde demostramos que ABT-510 fue capaz de incrementar marcadamente los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo tanto en hipófisis normales como en tumorales.

TSP1 ha sido descrito como un activador de TGF- $\beta$ 1 latente tanto *in vivo* como *in vitro*, en diferentes tejidos. El mecanismo de activación propuesto involucra una interacción directa entre la secuencia específica de aminoácidos (KRFK) ubicada entre las TSR tipo 1 y tipo 2 de TSP1 y el pro-péptido LAP (64) (ver Figura 35).

Resulta llamativo que los péptidos ABT-510 y ABT-898 no contienen esta secuencia capaz de activar de activar TGF- $\beta$ 1 (203). Por lo tanto el mecanismo por el cual estos péptidos inducen la activación de TGF- $\beta$ 1 en nuestro modelo es aún desconocido. El efecto podría ser directo sobre el TGF- $\beta$ 1 latente anclado en matriz, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que la unión de los análogos de TSP-1 a su receptor CD36 favorezca la interacción del mismo con otros componentes de la matriz extracelular capaces de activar TGF- $\beta$ 1. Apoyando esta teoría, ha sido descrito que la activación de CD36 por ligando permite a su dominio extracelular interactuar con otros receptores de membrana incluyendo integrinas (196;204). Pero son necesarios nuevos estudios para dilucidar el mecanismo de acción de ABT-898 y ABT-510 sobre la activación de la citoquina.

Este efecto novel de los análogos de TSP1 sobre la activación local de TGF- $\beta$ 1 debe ser tenido en cuenta, de aquí en más, en los ensayos clínicos desarrollados con estos péptidos. Si bien el incremento en la activación de TGF- $\beta$ 1 en este caso puede ser benéfico debido a sus efectos inhibitorios sobre el lactotropo, una exacerbada activación de la citoquina puede ser perjudicial en otros tejidos debido a los potentes efectos pro-inflamatorios y pro-fibróticos que se le atribuyen.

Un hallazgo interesante al evaluar el efecto de ABT-510 *in vivo* a tiempos cortos, fue que el incremento de TGF- $\beta$ 1 activo causado por el tratamiento, se vio asociado a una drástica reducción de los niveles de PRL sérica tanto en las hipófisis normales como tumorales. Nuevamente nos encontramos **con una relación inversa entre los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo y de PRL sérica**, como habíamos observado previamente en los ratones *Drd2*<sup>+/+</sup> y *Drd2*<sup>-/-</sup> (ver Figura 16, en el Capítulo 2).

Estos resultados sugieren una relación directa de TGF- $\beta$ 1 mediando la inhibición de PRL. Los mecanismos involucrados en esta inhibición son desconocidos, pero dado que el efecto se ve a tiempos muy cortos (30 minutos) podemos suponer que la regulación no sería sobre la síntesis de PRL, sino más bien sobre su secreción. Esto implica la acción de TGF- $\beta$ 1 a través de vías rápidas, independientes de SMADs, para ejercer efectos no-genómicos. Algunas de las vías de señalización no-canónicas de TGF- $\beta$ 1 involucran la rápida fosforilación de TAK1 (por *TGF- $\beta$  Activated Kinase*) seguida de la activación de MEK1/2, AKT, IKK $\alpha$ / $\beta$ , I $\kappa$ B, y NF $\kappa$ B (205;206). Por otro lado, se demostró que TGF- $\beta$ 1 activa rápidamente la vía de la MAPK p38 en la línea celular hipofisaria GH4C1 (207). Hacen falta estudios más detallados para determinar los mecanismos utilizados por TGF- $\beta$ 1 para inhibir la secreción de PRL en los lactotrofos.

Mediante los experimentos en la línea celular GH3 intentamos esclarecer el mecanismo de acción de los péptidos análogos de TSP1. Sin embargo no encontramos en estas células el mismo efecto observado *in vivo* sobre la activación de TGF- $\beta$ 1, la secreción de PRL o la proliferación celular. Esta ausencia de acción puede deberse o bien a que las células GH3 no expresen el receptor CD36 que mediaría los efectos de ABT-510 y ABT-898; o bien a que la acción de los péptidos requiere la interacción con otros tipos celulares y/o la de una determinada estructura de matriz extracelular que no se evidencia en un cultivo celular. Apoyando esta última hipótesis, sí observamos el efecto de ABT-898 sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 cuando incubamos hemi hipófisis en cultivo en el modelo *ex vivo*, en el cual se mantiene intacta la estructura tisular. De todos modos no podemos descartar que exista también un efecto directo de los péptidos sobre los lactotrofos. Si bien no lo hemos determinado aún, es posible que los lactotrofos expresen el receptor CD36, ya que su expresión se demostró en diferentes tipos celulares no endoteliales, incluyendo macrófagos,

células dendríticas, hepatocitos, adipocitos, miocitos y epitelios especializados como el de mama, riñón e intestino (ver revisión en (204)).

Resumiendo, en este capítulo de la presente tesis demostramos que un tratamiento con los análogos sintéticos de TSP1, ABT-510 y ABT-898 disminuyó el tamaño de prolactinomas inducidos por DES, reduciendo la angiogénesis tumoral, la proliferación local, los valores de PRL sérica y recuperando los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo. Postulamos que, los efectos de los péptidos sobre la angiogénesis tumoral, y sobre la activación de TGF- $\beta$ 1 participan en la inhibición de la función de los lactotrofos, con la consecuente reducción del crecimiento de los prolactinomas inducidos por DES.

**Nuestros resultados apoyan el posible uso de estas moléculas anti-angiogénicas en tratamientos para la reducción de prolactinomas, especialmente aquellos resistentes a fármacos dopaminérgicos, para los cuales, hasta la fecha no existen terapias alternativas.**

# CONCLUSIONES FINALES


## Conclusiones finales


Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes en humanos, y en general responden bien a la terapia farmacológica con agonistas dopaminérgicos del RD2. Sin embargo, para los pacientes que exhiben resistencia a estos fármacos es necesario encontrar terapias alternativas. Los prolactinomas resistentes tienden a ser de gran tamaño, con altos índices mitóticos, invasivos y altamente angiogénicos. Estas condiciones llevan a la necesidad de someter a los pacientes a una cirugía transeptoefenoidal o intracraneal, acompañada muchas veces por radioterapia para evitar las frecuentes recidivas, con los riesgos implícitos de estos procedimientos y los altos costos económicos de los mismos.


A lo largo de este trabajo nos dedicamos a caracterizar exhaustivamente al sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario, el cual, debido a su acción inhibitoria sobre la proliferación de los lactotopos y sobre la secreción de prolactina, representa un atractivo blanco para el desarrollo de terapias alternativas para los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos.


Nuestro estudio, combinando la utilización de dos modelos experimentales de prolactinomas, uno por ausencia de control dopaminérgico y otro por exceso de estimulación estrogénica, y, con el uso de herramientas farmacológicas, nos permitió profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación de TGF- $\beta$ 1 que se encuentran alterados en los prolactinomas.


Los principales resultados aportados por este trabajo se resumen a continuación:

 En primer lugar determinamos que en la hipófisis **únicamente entre un 3% y un 8% del contenido total de TGF- $\beta$ 1 almacenado en la matriz extracelular se encuentra en estado activo**. Esta observación resalta la importancia de la regulación a nivel local de la actividad de esta potente citoquina.


 Determinamos que, además de los ya descritos menores niveles de ARNm y de citoquina total, **el contenido de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario se encontró disminuido en los dos modelos de prolactinomas** estudiados. En concordancia describimos por primera vez una regulación diferencial sobre la activación de la citoquina por acción de la dopamina y el estradiol, los principales moduladores de la función de los lactotropos.


 Describimos que los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo hipofisario correlacionaron negativamente con los niveles de prolactina sérica en todos los tratamientos evaluados, de manera congruente con el efecto inhibitorio de la citoquina sobre la secreción de PRL.

 Describimos por primera vez en la literatura la expresión de las isoformas de las proteínas de unión a TGF- $\beta$  latente (LTBPs) en hipófisis normales y tumorales, así como su regulación por dopamina y estrógenos. En particular hallamos una **inhibición en la expresión de LTBP1 en los prolactinomas**, que puede estar contribuyendo a las alteraciones en la actividad de TGF- $\beta$ 1 observada en estos tumores.

 En el modelo de ratones deficientes del receptor dopaminérgico D2 encontramos **un dimorfismo sexual en el sistema TGF- $\beta$ 1 hipofisario**: los machos presentan en general mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 activo, de las LTBPs y de varios de los posibles activadores locales de TGF- $\beta$ 1. Estas características podrían explicar en parte las diferencias sexuales observadas en el desarrollo de los prolactinomas en estos ratones. Proponemos que los elevados niveles de TGF- $\beta$ 1, debido a su rol inhibitorio, podrían estar impidiendo o retrasando la hiperplasia hipofisaria en los machos respecto de las hembras de la misma edad.



 Entre los potenciales activadores de TGF- $\beta$ 1 estudiados, identificamos a trombospondina 1 y calicreína 1 como posibles candidatos a mediar la activación de TGF- $\beta$ 1 hipofisario luego de los tratamientos con estradiol y dopamina.

 Por último comprobamos que un tratamiento con los análogos de TSP1 (ABT-510 y ABT-898) lograron reducir del tamaño de la hipófisis y de los niveles de PRL sérica inducidos por estrógenos en ratas. El efecto inhibitorio de los péptidos fue mediado en parte por las propiedades anti-angiogénicas de estos péptidos; y en parte por su capacidad de restaurar los niveles de TGF- $\beta$ 1 activo en los tumores, mecanismo que no había sido reportado previamente.

**Todos estos resultados, en conjunto, aportan nuevos conocimientos sobre la función del sistema TGF- $\beta$ 1 y su regulación en la tumorigénesis hipofisaria. Consideramos que el aporte de este trabajo podrá contribuir al desarrollo de tratamientos novedales para los prolactinomas resistentes a las terapias convencionales.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Melmed S** 2011 The Pituitary. Elsevier, third edition edn
2. **Knigge KM, Scott DE** 1970 Structure and function of the median eminence. *Am journal Anat* 129:223-243
3. **Fink G** 2000 Neuroendocrine Regulation of Pituitary Function: General Principles. In: Conn PM, Freeman ME (eds). *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press, Totowa, New Jersey:107-133
4. **Riddle O, Bates RW, Dickshorn SW** 1933 The preparation, identification and assay of prolactin -a hormone of the anterior pituitary. *Am J Physiol* 105:191-216
5. **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G** 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80:1523-1631
6. **Lamberts SWJ, MacLeod RM** 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70:279-318
7. **Ben-Jonathan N, Hnasko R** 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine reviews* 22:724-763
8. **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
9. **Missale C, Russel Nash S, Robinson S, Jaber M, Caron MG** 1998 Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 78:189-225
10. **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* 99:14530-14535
11. **Enjalbert A, Musset F, Chenard C, Priam M, Kordon C, Heisler S** 1988 Dopamine inhibits prolactin secretion stimulated by the calcium channel agonist Bay-K-8644 through a pertussis toxin-sensitive G protein in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 123:406-412
12. **Swennen L, Deneff C** 1982 Physiological concentrations of dopamine decrease adenosine 3',5'-monophosphate levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs: evidence for a causal relationship to inhibition of prolactin release. *Endocrinology* 111:398-405
13. **Vallar L, Meldolesi J** 1989 Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacology Sciences* 10:74-77
14. **Arbogast LA, Voogt JL** 1991 Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* 128:997-1005

15. **Denef C** 2008 Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 20:1-70
16. **Farrell WE** 2006 Pituitary tumours: findings from whole genome analyses. *Endocr Relat Cancer* 13:707-716
17. **Kovacs K, Horvath E, Vidal S** 2001 Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 54:121-127
18. **Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, McCutcheon IE** 2004 The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 101:613-619
19. **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
20. **Arafah B, Nasrallah M** 2001 Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocr Relat Cancer* 8:287-305
21. **Bronstein MD, Guitelman M** 2004 Hiperprolactinemia y prolactinomas. In: Stalldecker G (ed). *Hipófisis Fisiopatología. Medicina, S.A., Buenos Aires*:271-292
22. **Colao A, Sarno AD, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Somma CD, Faggiano A, Biondi B, Lombardi G** 2003 Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology* 148:325-331
23. **Bevan JS, Webster J, Burke CW, Scanlon MF** 1992 Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocrine reviews* 13:220-240
24. **Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I, Scanlon MF** 1994 A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. *New England Journal of Medicine* 331:904-909
25. **Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A** 2006 Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine reviews* 27:485-534
26. **Oh M, Aghi MK** 2011 Dopamine agonist-resistant prolactinomas. *J Neurosurg* 114:1369-1379
27. **Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynek CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P, Enjalbert A** 1989 Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69:500-509
28. **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
29. **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
30. **Passos VQ, Fortes MA, Giannella-Neto D, Bronstein MD** 2009 Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists. *Neuroendocrinology* 89:163-170

31. **Mallea-Gil MS, Cristina C, Perez-Millan MI, Ballarino MC, Rodriguez Villafañe AM, Stalldecker G, Becu-Villalobos D** 2009 Invasive giant prolactinoma with loss of therapeutic response to cabergoline: expression of angiogenic markers. *Endocrine Pathology* 20:35-50
32. **Delgrange E, Sassolas G, Perrin G, Jan M, Trouillas J** 2005 Clinical and histological correlations in prolactinomas, with special reference to bromocriptine resistance. *Acta Neurochir (Wien)* 147:751-757
33. **Asa SL, Ezzat S** 1998 The Cytogenesis and Pathogenesis of Pituitary Adenomas. *Endocrine reviews* 19:798-827
34. **Paez-Pereda M, Kuchenbauer F, Arzt E, Stalla GK** 2005 Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Braz J Med Biol Res* 38:1487-1494
35. **Farnoud MR, Farhadian F, Samuel JL, Derome P, Peillon F, Li JY** 1995 Fibronectin isoforms are differentially expressed in normal and adenomatous human anterior pituitaries. *Int J Cancer* 61:27-34
36. **Farnoud MR, Veirana N, Derome P, Peillon F, Li JY** 1996 Adenomatous transformation of the human anterior pituitary is associated with alterations in integrin expression. *Int J Cancer* 67:45-53
37. **Ezzat S** 2001 The role of hormones, growth factors and their receptors in pituitary tumorigenesis. *Brain Pathol* 11:356-370
38. **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
39. **Herpin A, Lelong C, Favrel P** 2004 Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28:461-485
40. **Massague J** 1990 The transforming growth factor-beta family. *Annual Review of Cell Biology* 6:597-641
41. **Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S** 1993 Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Science* 90:770-774
42. **Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T** 1997 TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124:2659-2670
43. **Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T** 1995 Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature Genetics* 11:409-414
44. **Massague J** 1998 TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791

45. **Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P** 1999 Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124
46. **Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF** 2000 Role of transforming growth factor beta in human disease. *New England Journal of Medicine* 342:1350-1358
47. **Yoshinaga K, Obata H, Jurukovski V, Mazziere R, Chen Y, Zilberberg L, Huso D, Melamed J, Prijatelj P, Todorovic V, Dabovic B, Rifkin DB** 2008 Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. *Proceedings of the National Academy of Science* 105:18758-18763
48. **Pennison M, Pasche B** 2007 Targeting transforming growth factor-beta signaling. *Curr Opin Oncol* 19:579-585
49. **Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R** 1995 Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618-10624
50. **Annes JP, Munger JS, Rifkin DB** 2003 Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116:217-224
51. **Saharinen J, Taipale J, Keski-Oja J** 1996 Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* 15:245-253
52. **Rifkin DB** 2005 Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *Journal of Biological Chemistry* 280:7409-7412
53. **Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH** 1991 A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* 10:1091-1101
54. **Chen Y, Dabovic B, Colarossi C, Santori FR, Lilic M, Vukmanovic S, Rifkin DB** 2003 Growth retardation as well as spleen and thymus involution in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice. *J Cell Physiol* 196:319-325
55. **Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazziere R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, Sakai LY** 2003 Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *Journal of Biological Chemistry* 278:2750-2757
56. **Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB** 2004 Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *Journal of Cell Biology* 165:723-734
57. **Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H** 2002 Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes & development* 16:2264-2273
58. **Hayashi H, Sakai T** 2012 Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases. *Front Physiol* 3:12
59. **Ignatz RA, Massague J** 1986 Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345

60. **Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL** 1990 Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110:1361-1367
61. **Klotzsche-von Ameln A, Muschter A, Heimesaat MM, Breier G, Wielockx B** 2012 HIF prolyl hydroxylase-2 inhibition diminishes tumor growth through matrix metalloproteinase-induced TGFbeta activation. *Cancer Biol Ther* 13:216-223
62. **Yu Q, Stamenkovic I** 2000 Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & development* 14:163-176
63. **Murphy-Ullrich JE, Poczatek M** 2000 Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Reviews* 11:59-69
64. **Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N** 1998 Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93:1159-1170
65. **Yang Z, Mu Z, Dabovic B, Jurukovski V, Yu D, Sung J, Xiong X, Munger JS** 2007 Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J Cell Biol* 176:787-793
66. **Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D** 1999 The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96:319-328
67. **Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, Sheppard D, Broaddus VC, Nishimura SL** 2002 The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *Journal of Cell Biology* 157:493-507
68. **Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA** 1994 Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93:892-899
69. **Barcellos-Hoff MH, Dix TA** 1996 Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology* 10:1077-1083
70. **Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF** 1989 Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 158:817-823
71. **Oursler MJ** 1994 Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 9:443-452
72. **Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J** 1992 TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71:1003-1014
73. **Gorelik L, Flavell RA** 2002 Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2:46-53
74. **Derynck R, Feng XH** 1997 TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1333:F105-F150

75. **Minami S, Sarkar DK** 1997 Transforming growth factor-beta 1 inhibits prolactin secretion and lactotropic cell proliferation in the pituitary of oestrogen-treated Fischer 344 rats. *Neurochemistry International* 30:499-506
76. **Burns G, Sarkar DK** 1993 Transforming growth factor-beta1-like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat: effect of estrogen. *Endocrinology* 133:1444-1449
77. **Jin L, Tsumanuma I, Ruebel KH, Bayliss JM, Lloyd RV** 2001 Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 142:1703-1709
78. **Sarkar DK, Pastoric M, De A, Engel M, Moses H, Ghasemzadeh MB** 1998 Role of Transforming Growth Factor-b Type I and TGF-b Type II Receptores in the TGF-b1 Regulated Gene Expression in Pituitary Prolactin-Secreting Lactotropes. *Endocrinology* 139:3620-3628
79. **Hentges S, Sarkar DK** 2001 Transforming growth factor-beta regulation of estradiol-induced prolactinomas. *Frontiers in Neuroendocrinology* 22:340-363
80. **Hentges S, Pastorcic M, De A, Boyadjieva N, Sarkar DK** 2000 Opposing actions of two transforming growth factor-beta isoforms on pituitary lactotropic cell proliferation. *Endocrinology* 141:1528-1535
81. **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
82. **Suarez C, Diaz-Torga G, Gonzalez-Iglesias A, Vela J, Mladovan A, Baldi A, Becu-Villalobos D** 2003 Angiotensin II phosphorylation of extracellular signal regulated kinases in rat anterior pituitary cells. *American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism)* 285:E645-E653
83. **Diaz-Torga GS, Gonzalez Iglesias A, Achaval-Zaia R, Libertun C, Becu-Villalobos D** 1998 Angiotensin II induced calcium mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *American Journal of Physiology* 274:E534-E540
84. **Oriowo MA, Landgren BM, Stenstrom B, Diczfalusy E** 1980 A comparison of the pharmacokinetic properties of three estradiol esters. *Contraception* 21:415-424
85. **Tashjian AH, Jr., Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML** 1968 Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* 82:342-352
86. **Sanchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Goya RG, Zuccolilli GO** 2003 Impact of very old age on hypothalamic dopaminergic neurons in the female rat: a morphometric study. *J Comp Neurol* 458:319-325
87. **Sarkar DK** 2006 Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Frontiers of Hormone Research* 35:32-49
88. **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

89. **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
90. **Borrelli E, Sawchenko PE, Evans RM** 1992 Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science* 89:2764-2768
91. **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
92. **Ahtiainen P, Sharp V, Rulli SB, Rivero-Muller A, Mamaeva V, Roytta M, Huhtaniemi I** 2010 Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCGbeta-subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocr Relat Cancer* 17:611-621
93. **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
94. **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
95. **Pirolì G, Lima A, Diaz-Torga G, De Nicola AF** 1994 Biochemical parameters in the anterior pituitary during the course of tumorigenesis induced by diethylstilbestrol treatment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 51:183-189
96. **Banerjee SK, De A, Sarkar DK** 1994 Colocalization of prolactin and proliferating cell nuclear antigen in the anterior pituitary during estrogen-induced pituitary tumors. *Cancer Letters* 87:139-144
97. **Banerjee SK, Sarkar DK, Weston AP, De A, Campbell DR** 1997 Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* 18:1155-1161
98. **De Nicola AF, von Lawzewitsch I, Kaplan SE, Libertun C** 1978 Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* 61:753-763
99. **Phelps C, Hymer WC** 1983 Characterization of estrogen-induced adenohipophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology* 37:23-31
100. **Xu RK, Wu XM, Di AK, Xu JN, Pang CS, Pang SF** 2000 Pituitary prolactin-secreting tumor formation: recent developments. *Biol Signals Recept* 9:1-20
101. **MacLeod RM, Lehmeyer JE** 1973 Suppression of pituitary tumor growth and function by ergot alkaloids. *Cancer Research* 33:849-855



102. **Thorner MO, Martin WH, Rogol AD, Morris JL, Perryman RL, Conway BP, Howards SS, Wolfman MG, MacLeod RM** 1980 Rapid regression of pituitary prolactinomas during bromocriptine therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 51:438-445
103. **Recouvreux MV, Camilletti MA, Rifkin DB, Becu-Villalobos D, Diaz-Torga G** 2012 Thrombospondin-1 (TSP-1) Analogs ABT-510 and ABT-898 Inhibit Prolactinoma Growth and Recover Active Pituitary Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1). *Endocrinology* 153:3861-3871
104. **Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J** 1978 Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* 200:1173-1175
105. **Heaney AP, Fernando M, Melmed S** 2002 Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 109:277-283
106. **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
107. **Pastorcic M, De A, Boyadjieva N, Vale W, Sarkar DK** 1995 Reduction in the expression and action of transforming growth factor-b1 on lactotropes during estrogen-induced tumorigenesis. *Cancer Research* 55:4892-4898
108. **Ikeda H, Yoshimoto T, Shida N, Miyoshi I, Nakayama K, Nakayama K, Oshima M, Taketo MM** 2001 Morphologic and molecular analysis of estrogen-induced pituitary tumorigenesis in targeted disruption of transforming growth factor-beta receptor type II and/or p27 mice. *Endocrine* 16:55-65
109. **Jin L, Qian X, Kulig E, Sanno N, Scheithauer BW, Kovacs K, Young WF, Jr., Lloyd RV** 1997 Transforming growth factor-beta, transforming growth factor-beta receptor II, and p27Kip1 expression in nontumorous and neoplastic human pituitaries. *Am J Pathol* 151:509-519
110. **Dallago CM, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Meurer R, Pereira-Lima JF, Oliveira MC** 2010 Determination of cell proliferation using Mcm2 antigen and evaluation of apoptosis and TGF-beta1 expression in GH-secreting or clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Endocrine Pathology* 21:32-39
111. **Dennler S, Itoh S, Vivien D, Ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM** 1998 Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17:3091-3100
112. **Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, Higgins PJ** 2008 TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling. *J Mol Cell Cardiol* 44:527-538
113. **Brunschwig EB, Wilson K, Mack D, Dawson D, Lawrence E, Willson JK, Lu S, Nosrati A, Rerko RM, Swinler S, Beard L, Lutterbaugh JD, Willis J, Platzer P, Markowitz S** 2003 PMEPA1, a transforming growth factor-beta-induced marker of terminal colonocyte differentiation whose expression is maintained in primary and metastatic colon cancer. *Cancer Res* 63:1568-1575
114. **Levy L, Hill CS** 2005 Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-

mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol* 25:8108-8125

115. **Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, Satoh K, Wiercinska E, Yang W, Shi L, Tanaka A, Nakano N, Mommaas AM, Shibuya H, Ten Dijke P, Kato M** 2010 TMEPAI, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 37:123-134
116. **Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, Ten Dijke P** 2002 Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 21:1743-1753
117. **Sarkar AJ, Chaturvedi K, Chen CP, Sarkar DK** 2007 Changes in thrombospondin-1 levels in the endothelial cells of the anterior pituitary during estrogen-induced prolactin-secreting pituitary tumors. *Journal of Endocrinology* 192:395-403
118. **Sarkar DK, Kim KK, Minami S** 1992 Transforming growth factor-beta1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: its action on prolactin secretion and lactotropic growth. *Molecular Endocrinology* 6:1825-1833
119. **Guo Y, Jacobs SC, Kyprianou N** 1997 Down-regulation of protein and mRNA expression for transforming growth factor-beta (TGF-beta1) type I and type II receptors in human prostate cancer. *Int J Cancer* 71:573-579
120. **Todorovic V, Rifkin DB** 2012 LTBP, more than just an escort service. *J Cell Biochem* 113:410-418
121. **Dallas SL, Park-Snyder S, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF** 1994 Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 269:6815-6821
122. **Roth-Eichhorn S, Heitmann B, Flemming P, Kubicka S, Trautwein C** 2001 Evidence for the decreased expression of the latent TGF-beta binding protein and its splice form in human liver tumours. *Scand J Gastroenterol* 36:1204-1210
123. **Oklu R, Hesketh R** 2000 The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochemical Journal* 352 Pt 3:601-610
124. **Lawler J** 2002 Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 6:1-12
125. **Ying C, Gregg DW, Gorski J** 1996 Estrogen-induced changes in rRNA accumulation and RNA polymerase I activity in the rat pituitary: correlation with pituitary tumor susceptibility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 118:207-213
126. **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
127. **Feierstein C, Gelman D, Rubinstein M, Low MJ, Libertun C, Becu-Villalobos D, Diaz-Torga G** 2000 Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH, IGF-I and prolactin regulation. *Biocell* 24:56

128. **Gudelsky GA, Porter JC** 1981 Sex-related difference in the release of dopamine into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 109:1394-1398
129. **Demarest KT, Moore KE** 1981 Sexual differences in the sensitivity of tuberoinfundibular dopamine neurons to the actions of prolactin. *Neuroendocrinology* 33:230-234
130. **Ben Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW** 2008 What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine reviews* 29:1-41
131. **Hentges ST, Low MJ** 2002 Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice. *Endocrinology* 143:4536-4543
132. **Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, Seidah NG** 2001 Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *American Journal of Pathology* 158:305-316
133. **Visse R, Nagase H** 2003 Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839
134. **Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI** 1995 Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270:5331-5338
135. **Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade vW, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G** 1998 The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem* 273:871-880
136. **Hynes RO** 2002 Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687
137. **van der FA, Sonnenberg A** 2001 Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Research* 305:285-298
138. **Annes JP, Rifkin DB, Munger JS** 2002 The integrin alphaVbeta6 binds and activates latent TGFbeta3. *FEBS Letters* 511:65-68
139. **Hatala MA, Powers CA** 1988 Development of the sex difference in glandular kallikrein and prolactin levels in the anterior pituitary of the rat. *Biology of Reproduction* 38:846-852
140. **Kizuki K, Kitagawa A, Takahashi M, Moriya H, Kudo M, Noguchi T** 1990 Immunohistochemical localization of kallikrein within the prolactin-producing cells of the rat anterior pituitary gland. *Journal of Endocrinology* 127:317-323
141. **Emami N, Diamandis EP** 2010 Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGF beta 1 in semen. *Biol Chem* 391:85-95
142. **Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S** 2002 Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology* 123:352-364

143. **Xu LL, Shanmugam N, Segawa T, Sesterhenn IA, McLeod DG, Moul JW, Srivastava S** 2000 A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate. *Genomics* 66:257-263
144. **Qi W, Gao S, Wang Z** 2008 Transcriptional regulation of the TGF-beta1 promoter by androgen receptor. *Biochem J* 416:453-462
145. **Kochenour NK** 1980 Lactation suppression. *Clin Obstet Gynecol* 23:1045-1059
146. **Llewellyn-Jones D** 1968 Inhibition of lactation by oestrogens. *Br Med J* 4:387
147. **Weikkolainen K, Keski-Oja J, Koli K** 2003 Expression of latent TGF-beta binding protein LTBP-1 is hormonally regulated in normal and transformed human lung fibroblasts. *Growth Factors* 21:51-60
148. **Paez PM, Ledda MF, Goldberg V, Chervin A, Carrizo G, Molina H, Muller A, Renner U, Podhajcer O, Arzt E, Stalla GK** 2000 High levels of matrix metalloproteinases regulate proliferation and hormone secretion in pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:263-269
149. **Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Harris AL, Wass JA** 2000 Role of matrix metalloproteinase 9 in pituitary tumor behavior. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:2931-2935
150. **Liu W, Matsumoto Y, Okada M, Miyake K, Kunishio K, Kawai N, Tamiya T, Nagao S** 2005 Matrix metalloproteinase 2 and 9 expression correlated with cavernous sinus invasion of pituitary adenomas. *J Med Invest* 52:151-158
151. **Gong J, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, Lopes MB, Hussaini IM, Laws ER** 2008 Matrix metalloproteinase-9, a potential biological marker in invasive pituitary adenomas. *Pituitary* 11:37-48
152. **Cambier S, Mu DZ, O'Connell D, Boylen K, Travis W, Liu WH, Broaddus VC, Nishimura SL** 2000 A role for the integrin alphavbeta8 in the negative regulation of epithelial cell growth. *Cancer Res* 60:7084-7093
153. **Kitagawa A, Kizuki K, Moriya H, Kudo M, Noguchi T** 1990 Kallikrein- and prolactin-producing cells in the rat anterior pituitary are the same. *Journal of Biochemistry* 108:971-975
154. **Pritchett DB, Roberts JL** 1987 Dopamine regulates expression of the glandular-type kallikrein gene at the transcriptional level in the pituitary. *Proceedings of the National Academy of Science* 84:5545-5549
155. **Folkman J, Shing Y** 1992 Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 267:10931-10934
156. **Folkman J** 1995 Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1:27-31
157. **Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA** 2003 Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocrine reviews* 24:600-632
158. **Folkman J** 1972 Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175:409-416

159. **Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J** 1991 Tumor angiogenesis and metastasis-- correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal of Medicine* 324:1-8
160. **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
161. **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
162. **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
163. **Hanahan D, Weinberg RA** 2011 Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
164. **Hanahan D, Folkman J** 1996 Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364
165. **Melmed S** 2002 *The pituitary*. Blackwell, Second Edition edn
166. **Schechter J** 1972 Ultrastructural changes in the capillary bed of human pituitary tumors. *American Journal of Pathology* 67:109-126
167. **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
168. **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
169. **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
170. **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
171. **Luque GM, Perez-Millan MI, Ornstein AM, Cristina C, Becu-Villalobos D** 2011 Inhibitory effects of anti-VEGF strategies in experimental dopamine resistant prolactinomas. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 337:766-774
172. **Elias KA, Weiner RI** 1987 Inhibition of estrogen-induced anterior pituitary enlargement and arteriogenesis by bromocriptine in Fischer 344 rats. *Endocrinology* 120:617-621
173. **Elias KA, Weiner RI** 1984 Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. *Proceedings of the National Academy of Science* 81:4549-4553

174. **Folkman J** 1971 Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285:1182-1186
175. **Bergsland EK** 2004 Update on clinical trials targeting vascular endothelial growth factor in cancer. *Am J Health Syst Pharm* 61:S12-S20
176. **Ellis LM, Hicklin DJ** 2008 VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 8:579-591
177. **Bergers G, Hanahan D** 2008 Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592-603
178. **Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M, Quinones M, Morse M, Chen HX** 2007 Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol* 25:4557-4561
179. **Jain RK** 2005 Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncology (Williston Park)* 19:7-16
180. **Jain RK** 2005 Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58-62
181. **Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF** 2010 Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36:321-331
182. **Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R** 2006 Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* 1765:178-188
183. **Henkin J, Volpert OV** 2011 Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert Opin Ther Targets* 15:1369-1386
184. **Guo NH, Krutzsch HC, Inman JK, Shannon CS, Roberts DD** 1997 Antiproliferative and antitumor activities of D-reverse peptides derived from the second type-1 repeat of thrombospondin-1. *J Pept Res* 50:210-221
185. **Haviv F, Bradley MF, Kalvin DM, Schneider AJ, Davidson DJ, Majest SM, McKay LM, Haskell CJ, Bell RL, Nguyen B, Marsh KC, Surber BW, Uchic JT, Ferrero J, Wang YC, Leal J, Record RD, Hodde J, Badylak SF, Lesniewski RR, Henkin J** 2005 Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *J Med Chem* 48:2838-2846
186. **Ebbinghaus S, Hussain M, Tannir N, Gordon M, Desai AA, Knight RA, Humerickhouse RA, Qian J, Gordon GB, Figlin R** 2007 Phase 2 study of ABT-510 in patients with previously untreated advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 13:6689-6695
187. **Markovic SN, Suman VJ, Rao RA, Ingle JN, Kaur JS, Erickson LA, Pitot HC, Croghan GA, McWilliams RR, Merchan J, Kottschade LA, Nevala WK, Uhl CB, Allred J, Creagan ET** 2007 A phase II study of ABT-510 (thrombospondin-1 analog) for the treatment of metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* 30:303-309

188. **Yang Q, Tian Y, Liu S, Zeine R, Chlenski A, Salwen HR, Henkin J, Cohn SL** 2007 Thrombospondin-1 peptide ABT-510 combined with valproic acid is an effective antiangiogenesis strategy in neuroblastoma. *Cancer Res* 67:1716-1724
189. **Gordon MS, Mendelson D, Carr R, Knight RA, Humerickhouse RA, Iannone M, Stopeck AT** 2008 A phase 1 trial of 2 dose schedules of ABT-510, an antiangiogenic, thrombospondin-1-mimetic peptide, in patients with advanced cancer. *Cancer* 113:3420-3429
190. **Nabors LB, Fiveash JB, Markert JM, Kekan MS, Gillespie GY, Huang Z, Johnson MJ, Meleth S, Kuo H, Gladson CL, Fathallah-Shaykh HM** 2010 A phase 1 trial of ABT-510 concurrent with standard chemoradiation for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Arch Neurol* 67:313-319
191. **Campbell N, Greenaway J, Henkin J, Petrik J** 2011 ABT-898 Induces Tumor Regression and Prolongs Survival in a Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer. *Mol Cancer Ther* 10:1876-1885
192. **Garside SA, Henkin J, Morris KD, Norvell SM, Thomas FH, Fraser HM** 2010 A thrombospondin-mimetic peptide, ABT-898, suppresses angiogenesis and promotes follicular atresia in pre- and early-antral follicles in vivo. *Endocrinology* 151:5905-5915
193. **Maga G, Hubscher U** 2003 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116:3051-3060
194. **Anderson JC, Grammer JR, Wang W, Nabors LB, Henkin J, Stewart JE, Jr., Gladson CL** 2007 ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 6:454-462
195. **De A, Morgan TE, Speth RC, Boyadjieva N, Pastorcic M, Sarkar DK** 1995 Pituitary lactotrope expresses transforming growth factor b (TGF-b) type II receptor mRNA and protein and contains I-TGF-b1 binding sites. *Journal of Endocrinology* 149:19-27
196. **Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL** 2001 CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108:785-791
197. **Hasan J, Byers R, Jayson GC** 2002 Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *British Journal of Cancer* 86:1566-1577
198. **Lloyd RV, Scheithauer BW, Kuroki T, Vidal S, Kovacs K, Stefaneanu L** 1999 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Endocrine Pathology* 10:229-235
199. **Cristina C, Achaval-Zaia R, Baldi A, Low MJ, Rubinstein M, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D** 2000 Factores de crecimiento en la hiperplasia hipofisaria de ratones hembra deficientes en el receptor dopaminérgico tipo 2. *Medicina* 62:469
200. **Cristina C, Perez-Millan MI, Luque G, Dulce RA, Sevlever G, Berner SI, Becu-Villalobos D** 2010 VEGF and CD31 association in pituitary adenomas. *Endocrine Pathology* 21:154-160
201. **Rice C, Huang LE** 2010 From antiangiogenesis to hypoxia: current research and future directions. *Cancer Manag Res* 3:9-16

202. **Campbell NE, Greenaway J, Henkin J, Moorehead RA, Petrik J** 2010 The thrombospondin-1 mimetic ABT-510 increases the uptake and effectiveness of cisplatin and paclitaxel in a mouse model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 12:275-283
203. **Young GD, Murphy-Ullrich JE** 2004 The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *Journal of Biological Chemistry* 279:47633-47642
204. **Silverstein RL, Febbraio M** 2009 CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2:re3
205. **Gingery A, Bradley EW, Pederson L, Ruan M, Horwood NJ, Oursler MJ** 2008 TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res* 314:2725-2738
206. **Kim SI, Kwak JH, Na HJ, Kim JK, Ding Y, Choi ME** 2009 Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF-beta receptor kinase activity in mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry* 284:22285-22296
207. **de Guise C, Lacerte A, Rafiei S, Reynaud R, Roy M, Brue T, Lebrun JJ** 2006 Activin inhibits the human Pit-1 gene promoter through the p38 kinase pathway in a Smad-independent manner. *Endocrinology* 147:4351-4362