

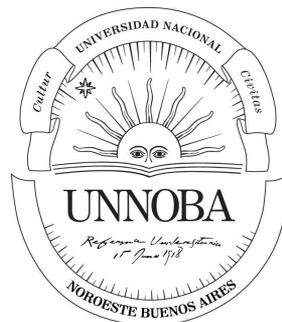
**PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA NOTCH EN
MODELOS EXPERIMENTALES DE TUMORES HIPOFISARIOS MURINOS**

Trabajo Final del alumno

GAZZA, ELÍAS

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de
LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera: Licenciatura en Genética



Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA NOTCH EN
MODELOS EXPERIMENTALES DE TUMORES HIPOFISARIOS MURINOS**

Trabajo Final del alumno

GAZZA, ELÍAS

DRA. CRISTINA, CAROLINA

Directora

GAZZA, ELÍAS

Alumno

Pasquinelli, Virginia

García, Jorge

Lacau, Isabel María

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Pergamino, 7 de Marzo de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios y mi familia. Por la vida, por permitirme estudiar esta carrera, por creer en mí, por financiar mis gastos. Por su aguante y apoyo. Por brindarme espacio, tiempo y confirmarme su amor a diario. También para quien supo entenderme, hacerme reír y brindarme su apoyo incondicional.

En lo que respecta al presente trabajo, primeramente, a mi directora Carolina quien me permitió formar parte de su laboratorio. Por su instrucción, capacitación, confianza y mucha dedicación.

A mis compañeros de laboratorio, por todo. Por ser grandes personas, grandes compañeros y grandes profesionales. Por las risas, las anécdotas, las bromas, el soporte teórico y el apoyo emocional. En el laboratorio y en los congresos, pero también en la terraza y el bioterio. En las buenas, pero en las malas mucho más. En el resultado y en la frustración. A Sofi, Giani y Leti, lo mejor.

A todo el CIBA. Desde las chicas LA, VP, hasta técnicas y bioteristas, con quienes compartimos muchos momentos gratos, seminarios, equipos, facturas y picadas.

A la UNNOBA por el soporte institucional y estructural para que, como estudiantes, podamos instruirnos, recibirnos y trabajar de manera competitiva.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
Vía de señalización Notch	6
Notch en enfermedades humanas	11
Notch en tumores	13
Hipófisis	14
Adenomas hipofisarios	15
Notch en adenomas hipofisarios	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
Hipótesis	20
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Adenomas hipofisarios humanos	23
Modelos experimentales	23
Técnicas	24
Cultivo celular	24
Cultivo de hipófisis <i>ex vivo</i>	25
Western Blot	25
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	27
Inmunohistoquímica (IHQ)	28
RESULTADOS	30
Expresión del receptor Notch 3 en adenomas hipofisarios humanos	31

Expresión de receptores Notch en corticotropos tumorales e hipófisis murinas normales	32
Expresión del ligando Jagged 1 y gen diana Hes-5 en corticotropos tumorales e hipófisis murinas normales	33
Acciones del sistema Notch en hipófisis murina normal	35
Producción de Prolactina en glándula normal frente al tratamiento con DAPT	38
Respuesta proliferativa en hipófisis murina frente al tratamiento con DAPT	39
Evaluación de la expresión de componentes de la vía Notch en un modelo de prolactinoma in vivo	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIÓN	53
BIBLIOGRAFÍA	55

INTRODUCCIÓN

VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH

La primera referencia a Notch se realizó en 1917 cuando Thomas Hunt Morgan descubre un fenotipo mutante en *Drosophila melanogaster*. Este fenotipo "Notch", que consiste en moscas con escotaduras en el borde de sus alas, se debe a un factor ligado al sexo, dominante con respecto a las escotaduras pero recesivo en su efecto letal (Morgan 1917).

Más tarde, otros trabajos reportaron efectos adicionales del factor, como anormalidades embrionarias, relacionando a Notch con el desarrollo y dando cuenta de su naturaleza pleiotrópica. También se describió que Notch funcionaba durante la señalización célula-célula (Lehmann *et al.* 1981). Gracias a la realización de screenings en busca de fenotipos similares, se descubrieron otros componentes que participan en la vía. Entre ellos *Delta*, *mastermind (MAML)*, *Enhancer of Split (E(spl))*, *Suppressor of Hairless (Su(H) o CSL)* y *Serrate* (Lehmann *et al.* 1981, 1983, Fortini 1994, Fleming *et al.* 1990).

Un avance muy importante se realizó en la década de 1980, con el clonado e identificación del **gen** Notch (Artavanis-Tsakonas *et al.* 1983). Desde entonces, se ha estudiado intensamente la vía de señalización Notch ya que influye en un gran número de funciones celulares y se encuentra conservada desde moscas a gusanos, ratones y humanos.

El gen codifica para un largo **receptor transmembrana** de paso único. Organismos como *D. melanogaster* sólo poseen un receptor Notch, mientras que los mamíferos tienen cuatro receptores parálogos que comparten algunas funciones pero difieren en otras (Kopan e Ilagan 2009). El receptor de mamíferos se sintetiza como un único polipéptido y se cliva durante el proceso de maduración en su vía secretoria. Este clivaje en el sitio S1 es realizado por una proteasa tipo furina que separa el

dominio extracelular (**NECD**) del resto del receptor (NTMIC), compuesto por un dominio transmembrana (TMD) y uno intracelular (**NICD**). De esta manera, se forma un heterodímero que se mantiene unido por interacciones no covalentes en la región de heterodimerización (interacción a nivel extracelular) (Figura 1).

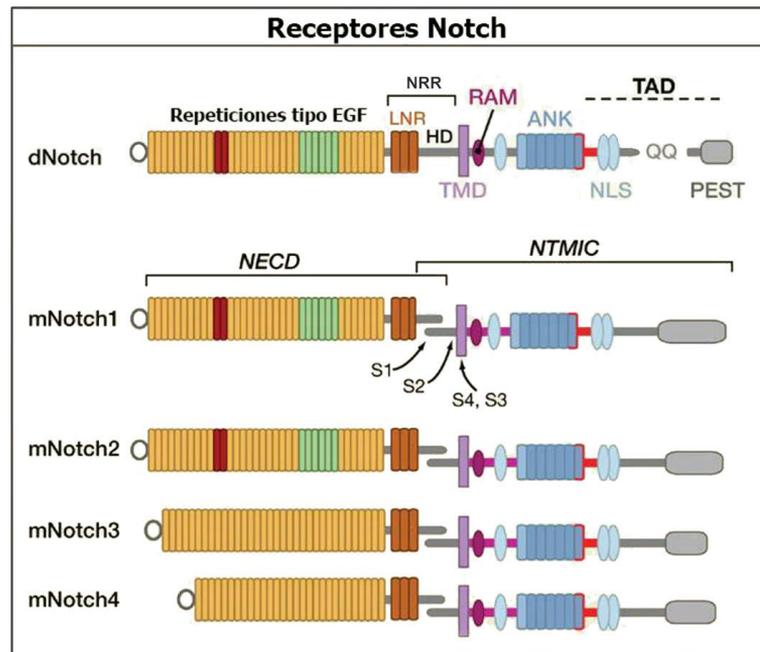


Figura 1. Estructura del receptor Notch de *Drosophila melanogaster* (dNotch) y de los 4 receptores en mamíferos (mNotch). Las repeticiones tipo EGF en rojo interactúan con ligandos en células vecinas y las verdes con ligandos de la misma célula (Según Kopan e Ilagan 2009).

NRR=región regulatoria negativa, LNR=repeticiones tipo LIN, HD=dominio de heterodimerización, TMD=dominio transmembrana, RAM=módulo de asociación a RBPJ, ANK=repeticiones tipo anquirina, NLS=señales de localización nuclear, TAD=dominio de transactivación, PEST=región regulatoria negativa, NECD=dominio extracelular de Notch, NTMIC= dominio transmembrana e intracelular de Notch, monómero no activo. S1-S2-S3,S4= sitios de clivaje.

El **NECD** posee repeticiones de tipo EGF (epidermal growth factor-like), una zona regulatoria negativa y un dominio de heterodimerización. Las repeticiones tipo EGF median la interacción con el ligando, que puede ser de una célula vecina o incluso de la misma célula.

El **NICD** posee un módulo de asociación al regulador transcripcional RBPJ, repeticiones tipo anquirina, señalizaciones de localización nuclear, un dominio de transactivación evolutivamente divergente y una región regulatoria negativa conservada. Dicha región regulatoria modula la estabilidad de este dominio.

El receptor heterodimérico se ancla en membrana por su único dominio **transmembrana**.

La mayoría de los **ligandos** de la vía también son proteínas transmembrana. Los ligandos clásicos **canónicos** para *D.melanogaster* son Delta y Serrate; para mamíferos los ligandos son Jagged (Jagged 1 y Jagged 2) y tipo Delta (DII1, DII3 y DII4). Los ligandos pueden agruparse dependiendo de la presencia de ciertos motivos en su estructura, aunque también existen proteínas que no poseen algunos de dichos motivos y han sido reportados por actuar como ligandos **no-canónicos** de la vía (Kopan e Ilagan 2009) (Figura 2).

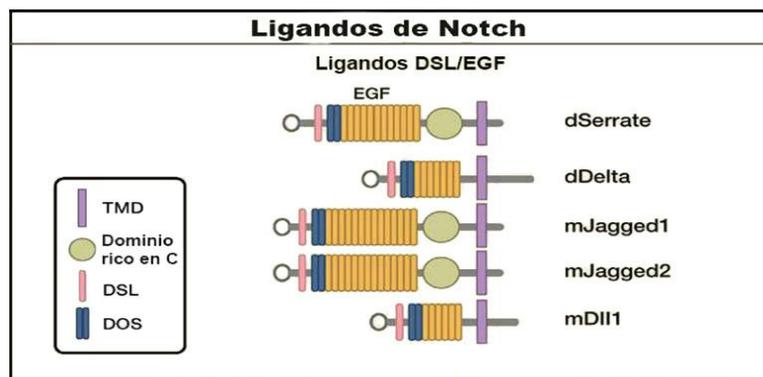


Figura 2. Ligandos canónicos de Notch para *D. melanogaster* (d) y mamíferos (m). DSL:motivo Delta-Serrate-LAG, DOS=motivo Delta-OSM, EGF=repeticiones tipo EGF, TMD=dominio transmembrana (Según Kopan e Ilagan 2009).

Un modelo mecanístico de transactivación propone que la unión con el ligando tracciona del dominio extracelular haciendo que se despliegue la región regulatoria negativa y exponiendo el sitio S2 para el clivaje por una proteasa de la familia ADAM.

Esto lleva a la remoción del dominio extracelular, el cual es trans-endocitado por la célula que expresa el ligando. La parte remanente unida a membrana es ahora sustrato del complejo γ -secretasa (compuesto por presenilina, nicastrina, PEN2 y APH1) que produce un regulado clivaje proteolítico intramembrana en el sitio S3/S4 que libera al NICD (Andersson *et al.* 2011) (Figura 3).

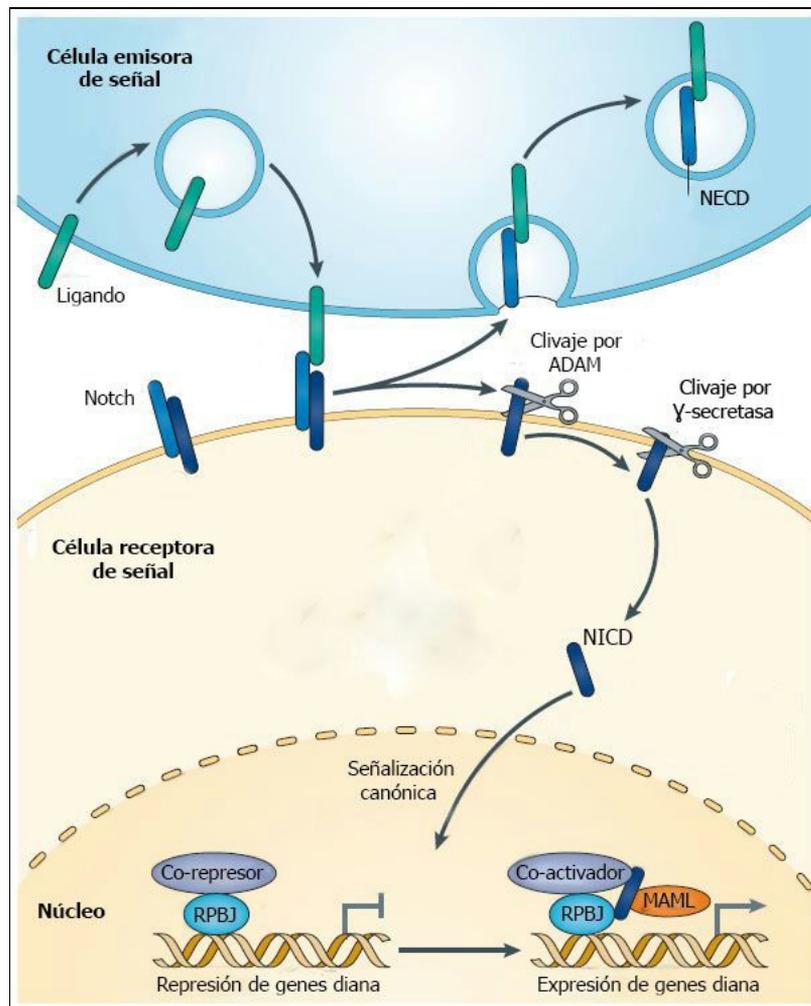


Figura 3. Esquema de la vía de señalización Notch (Según Ables *et al.* 2011)

Una vez clivado, el NICD es **translocado** al núcleo donde interacciona con proteínas de la familia CSL (CBF1 o RBPJ en mamíferos, proteína Su(H) en

D.melanogaster o *LAG-1* en *C.elegans*) desplazando complejos represores y reclutando factores adicionales, como remodeladores cromatínicos y de la maquinaria de transcripción, para activar la expresión de genes diana. La unión a CSL recluta a la proteína adaptadora MAML, formándose un complejo ternario que posibilita la unión del NICD al gen diana. Se han determinado cristalográficamente partes de dicho complejo ternario y se observa un alto grado de conservación estructural entre distintas especies, como gusanos y humanos, si bien otros factores adicionales todavía deben ser identificados (Borggreffe y Liefke 2012).

Los factores que determinan qué genes pueden ser activados por Notch tienen que ver, por tanto, con el estado de la cromatina y con la posibilidad del ensamblaje de CSL y del complejo activador. Estudios a nivel genómico revelan la asociación de un gran número de factores de transcripción a los genes modulados por Notch, pudiendo estos actuar de manera independiente o regulando la unión de CSL (Borggreffe y Liefke 2012). Entre los **genes diana** más conocidos se encuentran Hes-1, Hes-5, Hes-6, Hes-7, Hey-1 y Hey-2 (*Hes*: Hairy Enhancer of Split; *Hey*: Hes-related with YRPW motif) (Fischer y Gessler 2007). Si bien algunos genes son regulados por Notch en varios tipos celulares, no ha sido posible identificar un único gen que se exprese en todos ellos.

Una vez que el NICD cumple su función de activación génica, debe ser rápidamente degradado ya que su acumulación sostenida puede tener efectos deletéreos (Kopan e Ilagan 2009). En muchos casos, la activación de Notch es pulsátil y transitoria, lo que permite regular de manera óptima la intensidad de la señal. Para su degradación, el dominio PEST del NICD es fosforilado y se convierte en blanco de ubiquitinaciones que llevan a su degradación proteosomal y al restablecimiento del estado celular previo.

Una de las características notables de la vía Notch es que carece de amplificación de señal, como sí poseen las vías de señalización clásicas, y que se consume cada molécula de receptor que es activado. La vía Notch es compleja, dependiente del contexto celular y altamente regulada. Los procesos controlados por ella son determinantes tanto a nivel celular como del organismo entero. Estos procesos incluyen la proliferación, diferenciación, apoptosis, especificación de destino y segregación de linajes celulares y el mantenimiento de células madre (Leong 2006). Esta diversidad de funciones es lograda por las combinaciones que establecen los patrones de expresión ligando-receptor y a la intensidad de la señal, modulada en todos sus niveles: desde la producción de sus componentes, modificaciones postraduccionales (como glicosilación, fosforilación, acetilación, hidroxilación), ensamblaje a otras proteínas, hasta su degradación regulada. Si bien en estos años se ha logrado un gran avance en el entendimiento de la vía, todavía quedan por contestar muchas preguntas de tipo mecanístico para comprender de forma cabal cuáles son todas las actividades moduladas por Notch, de qué manera y en qué grado.

NOTCH EN ENFERMEDADES HUMANAS

Si bien la vía cumple con un papel trascendental durante el desarrollo y en condiciones fisiológicas durante la vida adulta, también se encuentra implicada en cuadros patológicos. La primer asociación de Notch con enfermedades **humanas** provino de estudios genéticos en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de tipo T (T-ALL). Se describe en la literatura a la activación de Notch 1 como causante de la patología, ya sea por la producción de un receptor truncado y constitutivamente activo (Ellisen *et al.* 1991) o por mutaciones en la región PEST del receptor que impiden su degradación (Weng 2004).

Otros estudios relacionan a Notch con enfermedades pleiotrópicas. El Síndrome de Alagille (MIM 118450) es causado por haploinsuficiencia de Jagged 1 (Oda *et al.* 1997, Li *et al.* 1997), en el que también se encuentran involucradas mutaciones en Notch 2 (Mcdaniell *et al.* 2006). El síndrome consiste en un desorden autosómico dominante, de penetrancia incompleta y expresividad variable, que produce anomalías en los conductos biliares (reducción del número, conductos mal formados) y en el esqueleto (huesos de la columna vertebral con forma inusual semejante a una mariposa), estenosis pulmonar, defecto septal ventricular, vasos sanguíneos del sistema nervioso central y/o riñones afectados junto con rasgos faciales distintivos. Malformaciones esqueléticas como la Disostosis Espondilocostal (MIM 277300) se relacionan con defectos en componentes de la vía como Dll3 y Hes-7 (Louvi y Artavanis-Tsakonas 2012). Notch también se encuentra involucrado en enfermedades cardiovasculares con defectos letales o anomalías vasculares (High y Epstein 2008).

Se asocia a Notch por primera vez a enfermedades **hereditarias** al encontrarse mutaciones que incrementan el número de residuos de cisteína en el dominio extracelular de Notch 3, el cual se acumula en pacientes con la enfermedad CADASIL (MIM 125310). En la literatura se reportan más de 150 mutaciones en, al menos, 500 pedigrées. Todas estas mutaciones recaen sobre los exones 2-24 de Notch 3, con un fuerte agrupamiento en los exones 3 y 4 donde se encuentran las repeticiones tipo EGF del NECD. La clínica de este síndrome es variable e incluye eventos isquémicos subcorticales, deterioro cognitivo, demencia, migraña y trastornos en el estado de ánimo. La inmunotinción de muestras de piel con anticuerpo monoclonal contra Notch 3 puede revelar su acumulación y ha demostrado ser una técnica muy sensible (Chabriat *et al.* 2009).

NOTCH EN TUMORES

En ciertos casos la vía de Notch actúa de manera oncogénica aunque, dependiendo del contexto, también puede actuar como supresora de tumor. Algunos autores postulan que la vía de Notch no es oncogénica *per se* pero que existe una clara asociación entre la activación de Notch y otras actividades celulares, como la de proliferación, que actuarían en sinergia para predisponer a las células a adquirir mutaciones que sí son oncogénicas (Louvi y Artavanis-Tsakonas 2012).

Aún así, un gran volumen de publicaciones sugiere que la vía de Notch juega un papel importante en tumores sólidos como cáncer colorrectal, cervical, de mama, próstata, hígado, páncreas, piel, melanoma y carcinoma de células escamosas (Mittal *et al.* 2009, Hulleman *et al.* 2008, Hoek 2004, Pinnix *et al.* 2009, Stylianou 2006, Purow 2005, Meng *et al.* 2009, Giovannini *et al.* 2009, Duan *et al.* 2006, Plentz *et al.* 2009, Hallahan 2004). En muchos de estos, la señalización de Notch parece ser crucial y altamente dependiente del contexto espacio-temporal (Ranganathan *et al.* 2011). Si bien en T-ALL el mecanismo de activación es principalmente por mutaciones, en tumores sólidos hay varios mecanismos, como la sobre-expresión y pérdida de reguladores negativos.

En gliomas Notch está asociado al mantenimiento y proliferación de células madre tumorales (CSC), lo que contribuye a la radioresistencia de los mismos dado que las células madre no son sensibles a esta radioterapia y repueblan el tumor (Ables *et al.* 2011). Los ligandos Dll4 y Jagged 1 han sido encontrados modulando la angiogénesis al activar la vía en endotelio tumoral (Dufraine *et al.* 2008). Notch ha sido propuesto también como la posible conexión entre las señales de hipoxia y el proceso de transición epitelio-mesenquimal (asociado a metástasis) en líneas tumorales de origen cervical, de colon, ovario y gliomas (Sahlgren *et al.* 2008).

HIPÓFISIS

La hipófisis es una **glándula endócrina** de secreción interna que regula la homeostasis corporal a través de varios procesos fisiológicos. Se encuentra localizada en la base del cerebro, en una depresión del hueso esfenoides y se conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisario (Figura 4). Está constituida por dos partes fisiológica y anatómicamente diferentes: la neurohipófisis y la adenohipófisis (Figura 5).

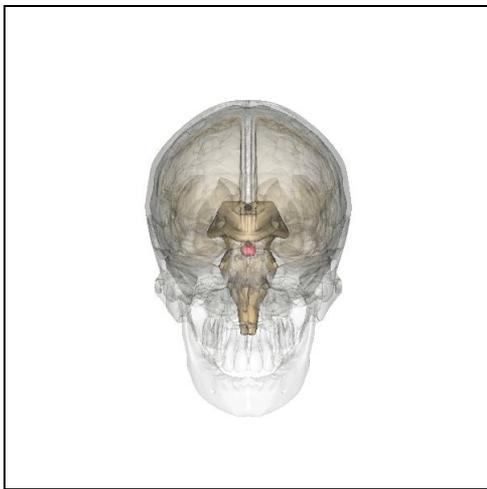


Figura 4. Localización glandular en rojo (Life Science Databases, lifesciencedb.jp/bp3d)

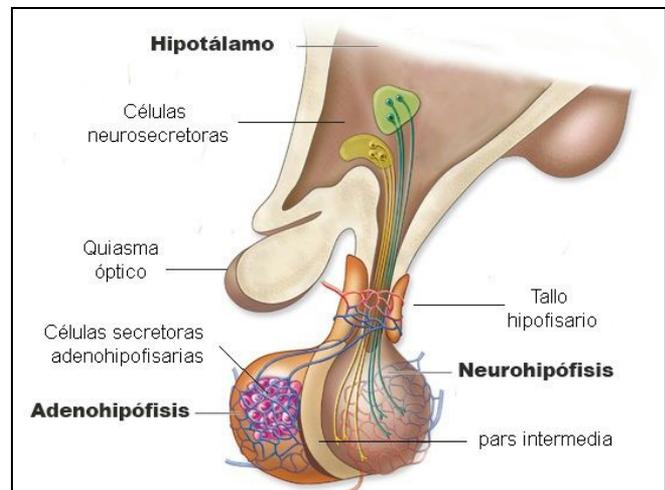


Figura 5. Anatomía hipofisaria (Copyright ©McGraw-Hill companies, Inc.)

La **neurohipófisis** (o hipófisis posterior) tiene un origen embriológico nervioso. Su función es el almacenamiento y secreción de hormona antidiurética (ADH) y oxitocina, producidas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo.

La **adenohipófisis** (o hipófisis anterior) proviene de una invaginación embrionaria faríngea llamada "bolsa de Rathke". Está compuesta por distintas poblaciones celulares con funciones específicas. Entre ellas, hay 5 tipos que se encargan de la síntesis y secreción hormonal: corticotropos (secretan la hormona adrenocorticotrofina, o ACTH), somatotropos (secretan hormona de crecimiento, o

GH), lactotrofos (secretan prolactina, o PRL), tirotrofos (secretan hormona estimulante de tiroides, o TSH) y gonadotrofos (secretan hormona luteinizante y folículo-estimulante, o LH y FSH, respectivamente). Las células folículo-estrelladas no secretan hormonas pero son fuente de muchos agentes que controlan el comportamiento de las otras poblaciones celulares y de la glándula en sí (Figura 6).

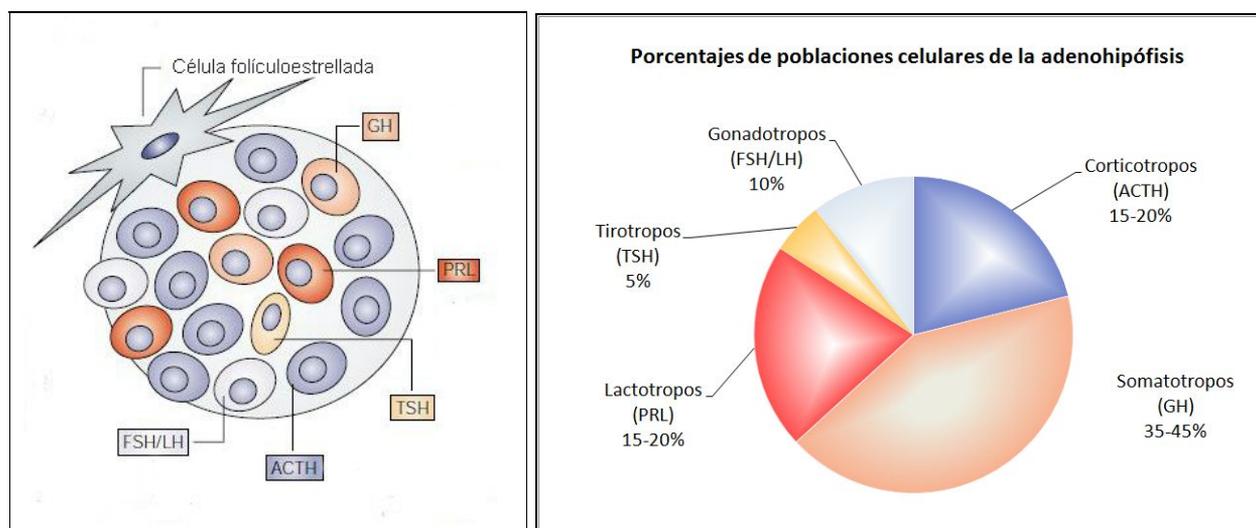


Figura 6. Composición celular de la adenohipófisis y hormonas producidas (esquema adaptado de Asa y Ezzat 2002; gráfico realizado con datos de Perez-Castro *et al.* 2012)

Entre dichos lóbulos, existe una zona marginal denominada *pars intermedia*. En humanos, es marginal y vestigio de la bolsa de Rathke (estructura embrionaria). En vertebrados inferiores, se encarga de la producción y secreción de péptidos como endorfinas y hormona estimulante de melanocitos (MSH) (Perez-Castro *et al.* 2012).

ADENOMAS HIPOFISARIOS

Fisiológicamente, la hipófisis responde a un complejo **conjunto de señales** centrales y periféricas que regulan el crecimiento de la glándula y la secreción de hormonas tróficas. La respuesta a estas señales, que pueden provenir de fuentes

externas o de la propia hipófisis, determina si el cambio en la masa glandular es patológico o sólo plasticidad fisiológica. La desregulación en la proliferación celular de la adenohipófisis produce desórdenes en la secreción hormonal, ocasionando problemas endócrinos por su baja o excesiva producción.

Los **adenomas** hipofisarios son un conjunto de tumores diversos que derivan de la glándula hipofisaria. La hipoplasia y deficiencia hormonal se relacionan con mutaciones en genes del desarrollo, mientras que la secreción excesiva se asocia con adenomas monoclonales de un tipo celular específico (Melmed 2003).

Histológicamente los adenomas hipofisarios se presentan como benignos en el sentido de que raramente se encuentran casos de malignidad o metástasis. Se los clasifican por su tamaño, dividiéndolos en *macro* ($\geq 1\text{cm}$) y *microadenomas* ($< 1\text{cm}$) (Ezzat *et al.* 2004). Los macroadenomas se comportan como una masa celular en expansión que causa compresión en tejidos cerebrales circundantes provocando sintomatología de tipo neurológica como cefaleas, epilepsia, convulsiones y pueden volverse invasivos o agresivos.

Otra clasificación de los adenomas distingue entre "*no funcionantes*" (cuando carecen de un síntoma clínico aparente) y "*funcionantes*" (cuando sobreproducen alguna hormona hipofisaria). Diferenciándolos de acuerdo al tipo celular afectado y por ende, al perfil de secreción hormonal, los prolactinomas son adenomas hipofisarios secretores de PRL, los somatotropinomas de GH, los corticotropinomas de ACTH, los tirotropinomas de TSH y los gonadotropinomas de LH y FSH.

La tasa de prevalencia de los adenomas hipofisarios en la población, según un estudio sistemático, es del 16,7% (14,4% en autopsias y 22,5% en estudios radiográficos) (Ezzat *et al.* 2004).

NOTCH EN ADENOMAS HIPOFISARIOS

En estudios previos se ha demostrado que vías reconocidas como la de Notch, Wnt y Hedgehog están activas durante las etapas tempranas del desarrollo glandular de la hipófisis. Específicamente se observa a Notch 2 y Hes-1 en células progenitoras desdiferenciadas de la bolsa de Rathke, con disminución de Notch 2 hacia zonas más diferenciadas. La señalización por Notch estaría implicada en controlar la transición de *proliferación a diferenciación* de los 5 tipos celulares endócrinos controlando el tiempo y contexto en el que lo hacen (Yavropoulou *et al.* 2015). Aumentos en la expresión del receptor Notch 2 durante el desarrollo hipofisario son suficientes para retardar la diferenciación de gonadotropos generando hipogonadismo hipogonadotrófico (MIM 146110), probablemente a través de Hey-1 (Raetzman *et al.* 2006). En hipófisis adulta, su expresión colocaliza con zonas que contienen células progenitoras (Yavropoulou *et al.* 2015).

De manera interesante, en tejido hipofisario tumoral ha sido reportado que la expresión de Notch 3 se encuentra aumentada en adenomas hipofisarios no funcionantes con respecto a tejido de glándulas adultas normales (Miao *et al.* 2012). En otro estudio también se ha descrito aumentos en la expresión de Notch 3 y Jagged 1 en adenomas no funcionantes con respecto a hipófisis adulta normal y una disminución de su expresión en somatotropinomas (Zhang 2013).

Aún así, queda por dilucidar el perfil de expresión y el rol que cumplen los diferentes receptores Notch en hipófisis adulta. También se requiere de mayor investigación para conocer su función en los distintos tipos de tumores hipofisarios. Poder interpretar los resultados a la luz del contexto celular, el estado de activación y participación precisos de la vía de receptores Notch es todo un desafío en la patogénesis hipofisaria, donde esta vía de señalización podría convertirse en blanco

terapéutico en los casos de resistencia o intolerancia a los fármacos convencionales (Purow 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La vía de los receptores de membrana Notch participa en el desarrollo de los adenomas hipofisarios y en la función de la hipófisis adulta normal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el patrón de expresión de los receptores Notch, la activación de la vía de señalización y su efecto sobre distintas funciones celulares de manera comparativa en hipófisis tumorales y glándulas normales para dilucidar su participación en la tumorigénesis hipofisaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión de Notch 3 en muestras de pacientes con distintos tipos de adenomas hipofisarios y compararlas con la expresión en muestras de hipófisis normales.
- Determinar los niveles de expresión del ARN mensajero de los receptores Notch 1-4 en la línea celular de corticotropos tumorales murinos AtT20 en forma comparativa con hipófisis normales de ratón.
- Determinar los niveles de expresión a nivel proteico de los distintos receptores Notch en el modelo de corticotropinoma murino y en hipófisis murinas normales.

- Determinar los niveles de expresión a nivel del ARN mensajero de ligandos de la vía y evaluar la activación de la misma mediante la transcripción de genes diana, tanto en el modelo tumoral como en hipófisis murinas normales.
- Modular la vía en estudio en explantes hipofisarios (hipófisis tratadas *ex vivo*) y evaluar:
 - Efectos en la transcripción de componentes de la vía, como receptores, ligandos y genes diana, frente a la modulación *ex vivo* con inhibidores de la activación de la vía señalización Notch.
 - Efecto del tratamiento con moduladores de la vía de señalización Notch sobre funciones celulares hipofisarias como proliferación y producción hormonal.
- Determinar la expresión de componentes de la vía Notch a nivel de la proteína en un modelo experimental de prolactinoma murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS

Se utilizaron muestras de adenomas hipofisarios humanos obtenidas de pacientes del Hospital Santa Lucía de la ciudad de Buenos Aires y de la Clínica La Pequeña Familia de la ciudad de Junín que fueron derivados a cirugía. En ambos nosocomios, el paciente fue informado por el cirujano interviniente de los estudios que se realizarían firmando el respectivo consentimiento.

Tejido hipofisario tumoral excedente a la porción que se envía a anatomía patológica durante una cirugía transesfenoidal, en lugar de ser descartado como se procede de rutina, fue conservado en formalina para su inclusión en parafina y posterior realización de cortes histológicos para analizarse por inmunohistoquímica.

MODELOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron los siguientes modelos:

- Ratones Balb/C de entre 2 y 3 meses de edad criados en el bioterio de nuestro laboratorio, mantenidos bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, administración de alimento (Cooperación, ACA) y agua *ad libitum*, limpieza y cambio de cama 1-2 veces por semana.
- Línea celular de corticotropos murinos At-T20: Línea tumoral hipofisaria de ratón con crecimiento en adherencia y secretora de la hormona adrenocorticotrofina o ACTH.
- Ratones lacDrd2KO: Estos ratones transgénicos fueron producidos en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI CONICET, Argentina), acorde a las regulaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (National Institute of Health). Carecen de expresión del receptor dopaminérgico D2 en

lactotropos hipofisarios por lo que desarrollan prolactinomas espontáneamente. Para su generación se utilizó una construcción transgénica constituida por 2.9 kb de la región promotora de PRL dirigiendo la expresión de la recombinasa *cre* con una señal de localización nuclear. El transgen *Prl-cre*, de 4.2 kb, fue microinyectado en el pronúcleo de óvulos fertilizados de B6D2F2 originando ratones transgénicos *Prl-cre*. La línea seleccionada, $Tg(Prl-cre)^{1Mrub}$, fue cruzada por 5 generaciones con el tipo parental C57BL/6J. Ratones $Tg(Prl-cre)^{1Mrub}$ fueron cruzados consecutivamente con ratones $Drd2^{loxP/loxP}$ para generar ratones $Drd2^{loxP/loxP}.Tg(Prl-cre)$, denominados *lacDrd2KO* (Noain *et al.* 2013). Cortes histológicos de hipófisis de hembras *lacDrd2KO* y controles fueron gentilmente cedidos por la Dra. Becú-Villalobos para ser utilizados en las inmunohistoquímicas de los componentes de la vía Notch. Estos experimentos fueron iniciados y luego guiados por la Dra. Luque (IBYME-CONICET)

TÉCNICAS

CULTIVO CELULAR

La línea celular AtT20 fue cultivada en botellas con medio completo, que consiste en medio DMEM-F12 (EMEVE, Laboratorios Microvet), glutamina 1%, penicilina /estreptomicina 1% (Life Technologies) y Suero Fetal Bovino (SFB) 10% (Natocor). Las células se mantuvieron en estufa de cultivo con 5% de CO₂ a 37°C. Previo a la siembra en placa, se realizaron lavados con PBS 1X estéril a 37°C. Para levantar las células adheridas a la superficie de las botellas se utilizó tripsina 0,05% (Life Technologies), incubando por 1 minuto a temperatura de cultivo 37°C. Luego de

detener la acción de la tripsina con exceso de SFB, se procedió a la recolección y centrifugación de las células por 10 minutos a 1800 RPM. El pellet resultante se resuspendió en medio completo y las células se contaron con cámara de Neubauer para su posterior utilización.

CULTIVO DE HIPÓFISIS EX VIVO

Se sacrificaron ratones macho de la cepa Balb/C y se extirparon las hipófisis. Estas fueron recibidas en medio de cultivo completo a 4°C (DMEM-F12, SFB 10%, glutamina 1% y penicilina/estreptomicina 1%). Se procedió a separar las glándulas en hemi-hipófisis (para optimizar su perfusión) y a estabilizarlas en medio de cultivo completo durante 2 horas a 37°C.

Luego de la estabilización, se evaluó el efecto del inhibidor de la γ -secretasa DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine- butyl ester) (Sigma-Aldrich). Para ello, se añadió DAPT 10uM disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), o el volumen equivalente de DMSO, al medio de cultivo por 4 horas. Luego de dos lavados con medio completo, las glándulas fueron incubadas por 2 horas adicionales en medio con DAPT 10uM o con volumen equivalente de DMSO. Los tratamientos fueron realizados en placa de cultivo P96 a 37°C y se denominaron: DMSO (control), DAPT (10uM) y DAPT/DMSO (combinación de los tratamientos anteriores: 4 horas con tratamiento DAPT y 2 horas con tratamiento DMSO). Se presenta un esquema del experimento en la [Figura 7](#).

WESTERN BLOT (WB)

Las proteínas fueron extraídas utilizando un buffer de lisis (HEPES 50mM, NaCl 140uM, Glicerol 10%, EDTA 1mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 100mM, PMSF 1mM, inhibidores

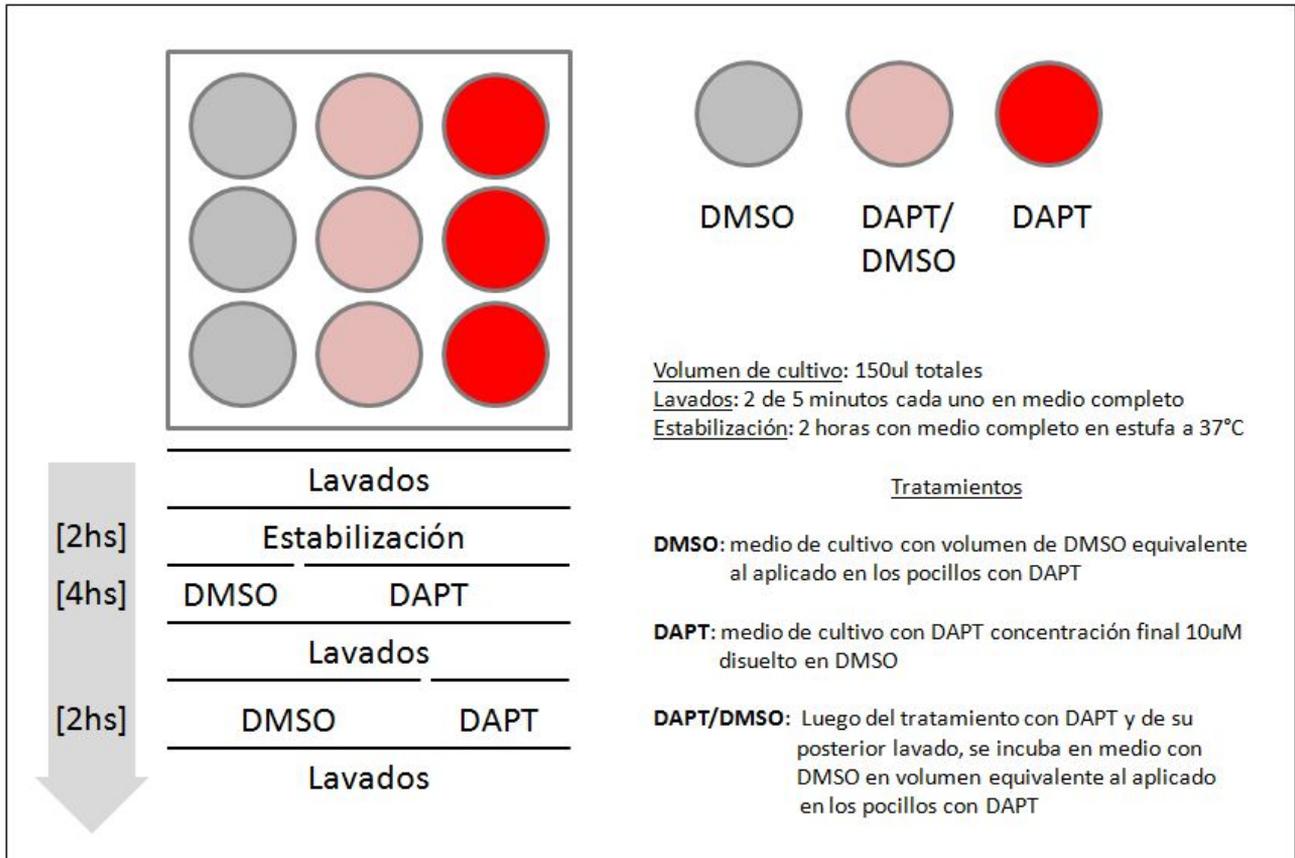


Figura 7. Esquema del diseño experimental para el cultivo *ex vivo* de hipófisis normales de ratones macho.

de proteasas 1X y Tritón 1%) a través del método descrito por Khattak y colaboradores (Khattak *et al.* 2010) con modificaciones realizadas en el laboratorio.

Se determinó la concentración proteica por Picodrop (Microlat) y las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de acuerdo a experiencia en el laboratorio (Cristina *et al.* 2007). Se sembraron 50 ug de proteínas por calle y se corrieron en buffer de corrida (Tris-Base, Glicina, SDS y agua bi-destilada) a 90 v para el gel de apilamiento y a 110 v para el gel de resolución (voltaje constante). Luego, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond, GE) en buffer de transferencia (Tris-Base, Glicina, metanol y agua bi-destilada) por 1 hora 20 minutos

a 400 mA constantes. El bloqueo de la membrana se realizó con leche descremada al 3% en PBS-T (PBS 1X, Tween 0.05%) y los lavados se realizaron con PBS-T.

Se utilizaron diferentes anticuerpos primarios (anti-Notch 1 y anti-Notch 2, Millipore; anti-Notch 3 y anti-mouse PRL, NeobioLab; anti-PCNA, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology). Para la relativización de cada calle, las membranas fueron re-bloteadas con anticuerpo anti-Actina (Santa Cruz Biotechnology).

El revelado se realizó adicionando Luminol y H₂O₂ (sustratos de la HRP), capturando las imágenes con un equipo detector de imágenes de electroquimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000, GE). Las bandas obtenidas se cuantificaron con el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Las muestras se conservaron en reactivo TRIzol (Life Technologies) a -80°C hasta su procesamiento. Al momento de extraer el ARN total, se incubaron por 5 minutos a 30°C, se agregó cloroformo y se incubó por 5 minutos más. Se centrifugó a 4°C por 15 minutos a 12000 g, obteniéndose un sobrenadante al que se le añadió isopropanol y se incubó nuevamente por 10 minutos a 30°C. Se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 12000 g y se eliminó el sobrenadante, quedando el ARN en el pellet. A este pellet se lo lavó con etanol 70% y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos para eliminarlo. Se dejó secar el etanol remanente al aire antes de resuspender al ARN total en 5 ul de H₂O libre de ARNasas. Después de cuantificar la cantidad de ARN por Picodrop (Microlat), se conservó en freezer a -80°C.

El ARN fue convertido a ADN copia por retrotranscripción (RT) empleando la enzima retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen, Life Technologies) siguiendo las

indicaciones del fabricante. El programa de retrotranscripción consistió en un ciclo de 10 minutos a 25°C y uno de 50 minutos a 37°C en termociclador de punto final Veriti (Applied Biosystems).

Se realizaron PCR en tiempo real (qPCR) con primers (Integrated DNA Technologies) para los distintos componentes de la vía Notch en termocicladores StepOne (Applied Biosystems) y LineGene 9600 (Bioer). El gen de referencia utilizado para todos estos análisis fue G3PDH. El programa de ciclado utilizado y primers para cada gen se encuentran especificados en la Figura 8.

Programa		Primers	
40x	95° ___ 10m	Notch1	Fo 5'-CAA GAG GCT TGA GAT GCT CC-3'
	95° ___ 20"		Re 5'-GAT TGG AGT CCT GGC ATC GT-3'
	Tm° ___ 1m	Notch2	Fo 5'-AGT ACA TTT GA CCT GCC CA-3'
	72° ___ 40"		Re 5'-ACT GTT GGC CAT AGC ACA CT-3'
	95° ___ 20"	Notch3	Fo 5'-CAT CAG GAT TCA GTG GGT CCA T-3'
	60° ___ 20"		Re 5'-ATC CAC GTT TCG CTC ACA CA-3'
95° ___ 20"		Hes 1	Fo 5'-GTC AAC ACG ACA CCG GAC A-3'
			Re 5'-GGA ATG CCG GGA GCT ATC T-3'
		Jagged 1	Fo 5'-AGA CAA CTG GTA TCG GTG CG-3'
			Re 5'-CCT GAA ACT TCA TGG CAC TTG G-3'
		G3PDH	Fo 5'-GGG GCT GCC CAG AAC ATC AT-3'
			Re 5'-GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3'

Figura 8. Programa de ciclado para qPCR y secuencias de los primers utilizados.

INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La técnica se realizó de acuerdo a la experiencia del laboratorio (Cristina *et al.* 2005). Los tejidos fueron fijados en formalina e incluidos en parafina. Se cortaron secciones de 4 um en micrótopo y se montaron en portaobjetos de vidrio con carga

positiva. Las secciones fueron desparafinizadas en xileno, rehidratadas en alcoholes de concentraciones decrecientes, lavadas con PBS, tratadas con citrato (10mM a pH=6) en microondas a potencia máxima durante 10 minutos para la recuperación de antígenos y las peroxidasas endógenas fueron inhibidas con H₂O₂ 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se pre-incubaron con leche descremada al 5% durante 1 hora para bloquear sitios de unión inespecífica. Luego se incubaron con anticuerpos primarios para detección de Notch 1 (Millipore), Notch 3 (Santa Cruz Biotechnology) y Hes-1 (Millipore) durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Seguido a esto, se lavaron con PBS, incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora 30 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo (Santa Cruz Biotechnology) y luego con un complejo de avidina y biotina (ABC) preformado por 20 minutos (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories). Al finalizar los lavados correspondientes, se agregó una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,05% (Sigma-Aldrich) conteniendo 0,01% de H₂O₂ para su revelado. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y montaron con DPX (Biochemika, Fluka). Los preparados se analizaron con microscopio de campo claro PrimoStar (Zeiss) equipado con una cámara digital AxioCam ERc 5s (Zeiss).

RESULTADOS

RESULTADOS

Expresión del receptor Notch 3 en adenomas hipofisarios humanos

La expresión del receptor Notch 3 ha sido reportada en la literatura en adenomas hipofisarios no funcionantes, somatotropinomas, prolactinomas e hipófisis normales (Zhang 2013). Análisis de microarray en tejido de tumores no funcionantes y glándulas normales demostraron su sobreexpresión en los tumores (Moreno 2005). Resultados de nuestro laboratorio en parte de la cohorte de adenomas hipofisarios obtenidos de cirugía demuestran, de manera interesante, una elevada expresión de Notch 3 en muestras de pacientes con Enfermedad de Cushing (corticotropinoma) y una expresión reducida en prolactinomas al ser comparados con glándulas normales (Figura 9).

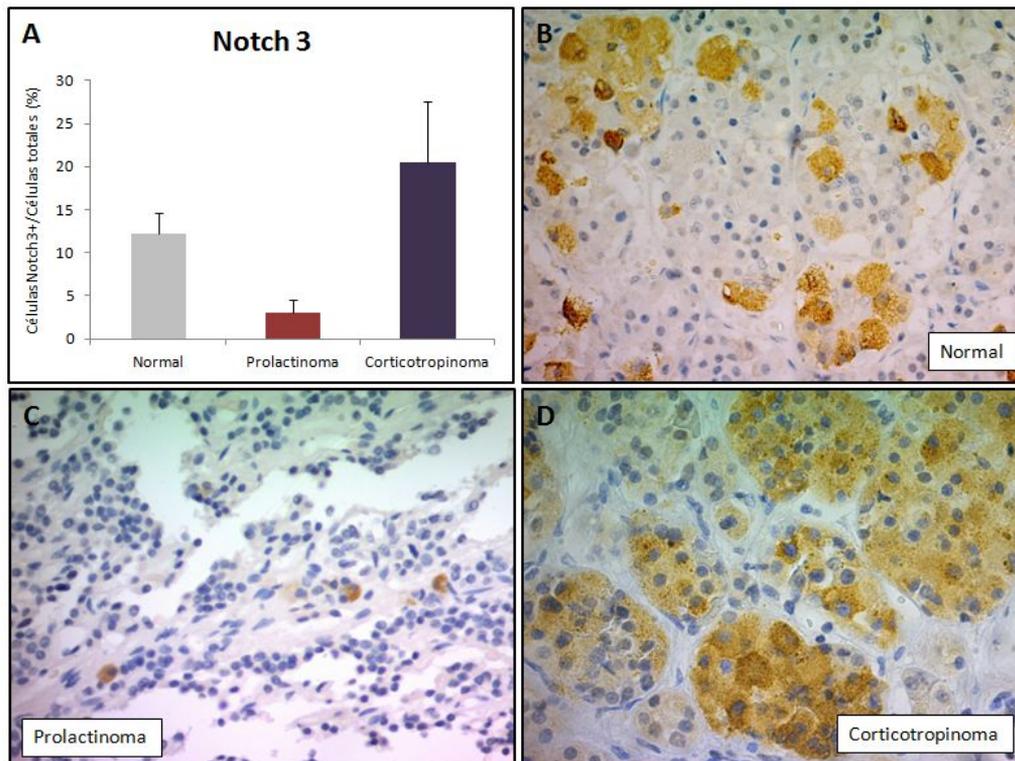


Figura 9. Expresión de Notch 3 a nivel de la proteína por IHQ, expresado como porcentaje de células positivas sobre células totales en tejido hipofisario normal, prolactinomas y corticotropinomas (N=4,3,3, respectivamente). Se muestran imágenes representativas para cada tipo de tumor con una magnificación 100X.

No existen publicaciones en relación a la participación de la vía Notch en corticotropinomas, lo que podría resultar de importancia terapéutica debido a la expresión incrementada que hayamos del receptor. Por otra parte, sólo el receptor Notch 3 ha sido evaluado en la tumorigénesis hipofisaria hasta el momento.

Dichos antecedentes bibliográficos y nuestros resultados en muestras de pacientes motivaron el estudio del sistema Notch de manera más integral, evaluando otros receptores, ligandos y genes diana en forma comparativa en modelos tumorales hipofisarios murinos e hipófisis normales.

Expresión de receptores Notch en corticotropos tumorales e hipófisis murinas normales

Dados los antecedentes descritos en adenomas hipofisarios humanos y, en particular, en las muestras de los pacientes con Enfermedad de Cushing, decidimos evaluar la expresión diferencial de los receptores Notch y de otros componentes del sistema de señalización en hipófisis normal y modelos de corticotropinomas en ratón.

Para ello, cuantificamos el ARN mensajero para cada uno de los receptores de manera comparativa entre el modelo tumoral de corticotropos murinos AtT20 y glándulas normales de ratones machos y hembras. Notch 1, 2 y 4 no mostraron diferencias en el modelo tumoral respecto a las hipófisis normales. En cambio, Notch 3 mostró una menor expresión en AtT20 respecto a las glándulas controles, la cual resultó estadísticamente significativa. La expresión de los receptores entre glándulas de hembra y de machos no mostró diferencias significativas en ninguno de los casos (Figura 10).

Por otra parte, se evaluó por WB la expresión de tres de los receptores de mamíferos, determinando una banda de 110 KDa correspondiente al monómero no

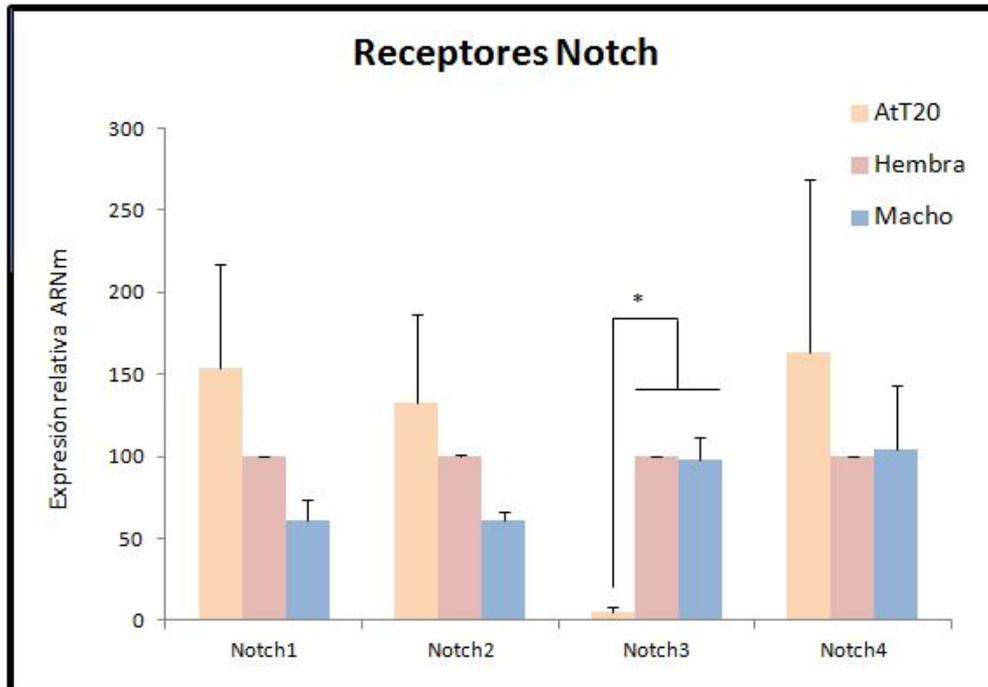


Figura 10. Expresión comparativa del ARNm para cada uno de los receptores graficado como porcentaje de los valores para Hembras, que se tomaron como el 100% (N=3,3,3 para AtT20, Hembra y Macho, respectivamente) (Notch 3 $p < 0.0001$).

activo del receptor (NTMIC) y otra de 80 KDa correspondiente al dominio activo del receptor (NICD). Los resultados para la banda de 110 KDa muestran una reducción significativa en la expresión de Notch 1 y Notch 3 en el modelo tumoral respecto a las hipófisis hembras. No se encontraron diferencias significativas en el caso de Notch 2. Por el contrario, para la banda de 80KDa, se observa un incremento estadísticamente significativo en los niveles de Notch 2 y Notch 3 en el modelo tumoral frente a las hipófisis normales. Para el caso de Notch 1, no se hallaron diferencias entre el modelo y las hipófisis controles (Figura 11).

Expresión del ligando Jagged 1 y gen diana Hes-5 en corticotropos tumorales e hipófisis murinas normales

Arcaroli y colaboradores describieron que el aumento de copias en el gen Notch

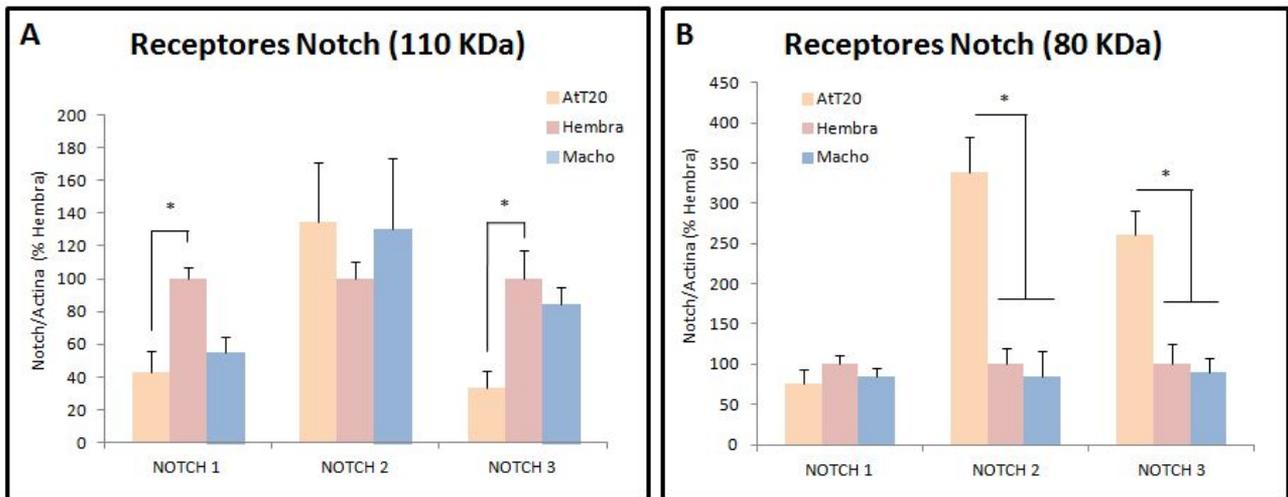


Figura 11. Expresión proteica de los receptores Notch, tanto para el monómero no activo del receptor (NTMIC) de 110KDa como para el receptor activo (NICD) de 80KDa, relativizados a Actina. Los resultados se grafican relativizados al de la hembra, que se toma como el 100%. Se analiza cada receptor por separado (A: N=3,3,3 para AtT20, Hembra y Macho, respectivamente; Notch 1 p=0.0373; Notch 2 NS, Notch 3 p=0.061) (B: N=3,3,3 para AtT20, Hembra y Macho, respectivamente; Notch 1 NS; Notch 2 p=0.0086; Notch 3 p=0.0113).

1, junto con elevados niveles de Jagged 1, se asocian con una peor sobrevida en pacientes con cáncer colorrectal (Arcaroli *et al.* 2015). En este mismo tipo de tumores, otro trabajo propone a Jagged 1 como la posible conexión entre las vías WNT y NOTCH (Rodilla *et al.* 2009). Este hecho es de especial interés para nuestro laboratorio ya que el estudio de la vía WNT en adenomas hipofisarios es otra de nuestras líneas de trabajo. En adenomas hipofisarios, está descrita la sobre-expresión de Jagged 1 en los tumores no funcionantes respecto a las glándulas normales (Zhang 2013). Dados tales antecedentes, en el laboratorio se decidió determinar la expresión de este ligando en las células de corticotropinoma, AtT20, y en hipófisis normales de ratón.

La expresión del ligando Jagged 1 resultó significativamente mayor en el modelo tumoral respecto a las hipófisis normales indicando una posible activación del sistema. Buscando genes diana de dicha activación, determinamos Hes-5 a nivel del

ARNm. A diferencia de Jagged 1, Hes-5 se encontró con una expresión significativamente reducida en la línea tumoral respecto a las hipófisis de machos (Figura 12).

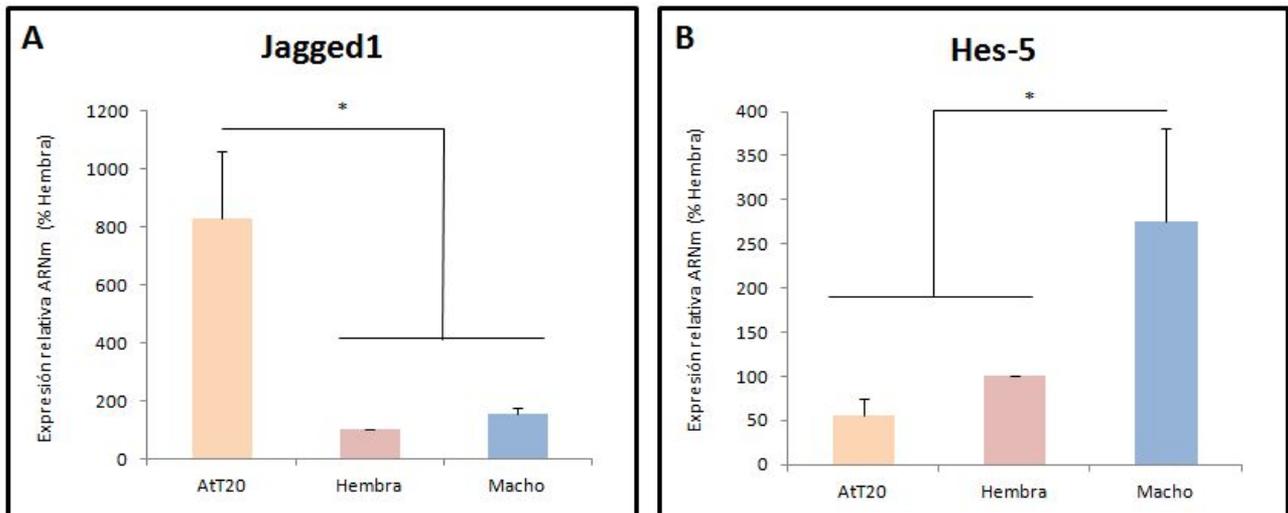


Figura 12. Expresión del ARNm del ligando Jagged 1 y del gen target Hes-5. Los resultados se grafican como porcentaje de los valores para Hembras, que se toma como el 100%. (A: N=3,3,2 para AtT20, Hembra y Macho, respectivamente; p=0.0230) (B: N=3,3,2 para AtT20, Hembra y Macho, respectivamente; p=0.0175).

Acciones del sistema Notch en hipófisis murina normal

Dado que el sistema Notch cumple con importantes funciones en tejidos normales, como son la proliferación, apoptosis y angiogénesis, además de participar durante la embriogénesis y desarrollo hipofisario, nos propusimos como objetivo estudiar el efecto del sistema Notch en hipófisis normal. Para ello, utilizamos el inhibidor de la activación de Notch, DAPT (inhibidor de γ -secretasa que cliva el receptor liberando al NICD), en hipófisis completas de ratones macho cultivadas *ex vivo*. Como se mencionó en la introducción al tema, ligandos y receptores interactúan entre células vecinas, por lo que este experimento con hipófisis completas permite estudiar las acciones de la vía en el contexto de la glándula. En esta condición próxima a la fisiológica, se mantienen las interacciones célula-célula, con los vasos

sanguíneos y la matriz extracelular. Determinamos los niveles de transcripción del mensajero de los receptores Notch y observamos que el tratamiento con DAPT 10uM no afecta los niveles de ARNm de Notch 1,2 y 3; si bien en el Notch 3 se marcó una tendencia al aumento de su expresión. (Figura 13).

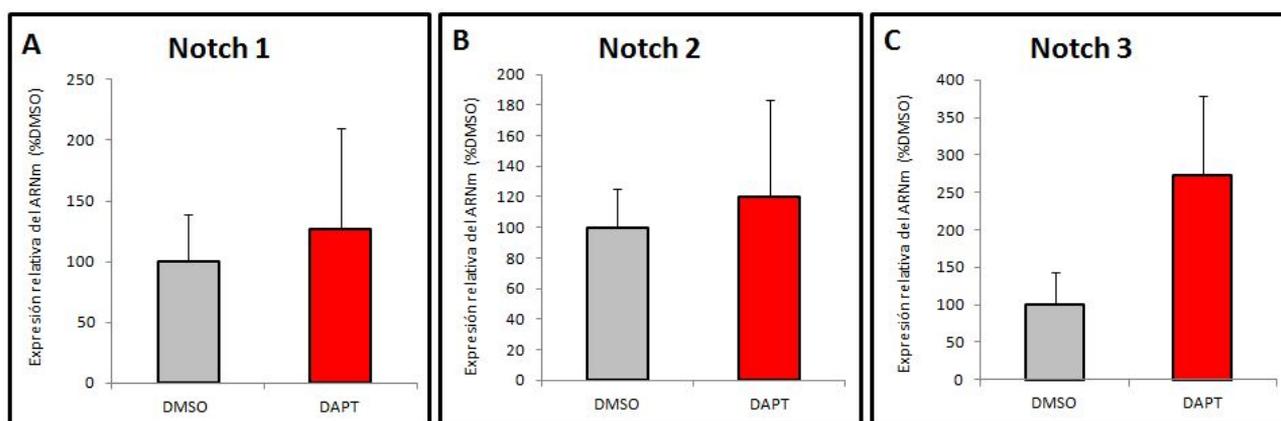


Figura 13. Expresión del ARNm de los receptores Notch 1, 2 y 3. Los resultados se grafican como porcentaje de los valores para DMSO, que se toma como el 100%. (A: N=2,2; B: N=2,3; C: N=3,3; para DMSO y DAPT, respectivamente).

Para la evaluación a nivel proteico, el cultivo de las hipófisis *ex vivo* incluyó un tratamiento adicional donde el medio de cultivo con DAPT se dejó actuar y luego fue reemplazado por medio de cultivo con DMSO, lavando el DAPT, con la intención de visualizar una reversión del efecto provocado por el inhibidor de la γ -secretasa. En esta instancia, tanto al monómero no activo como el activo de los receptores Notch 2 y Notch 3 mostraron una tendencia en sentido opuesto: disminuye Notch 2 y aumenta Notch 3 con el tratamiento, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 14).

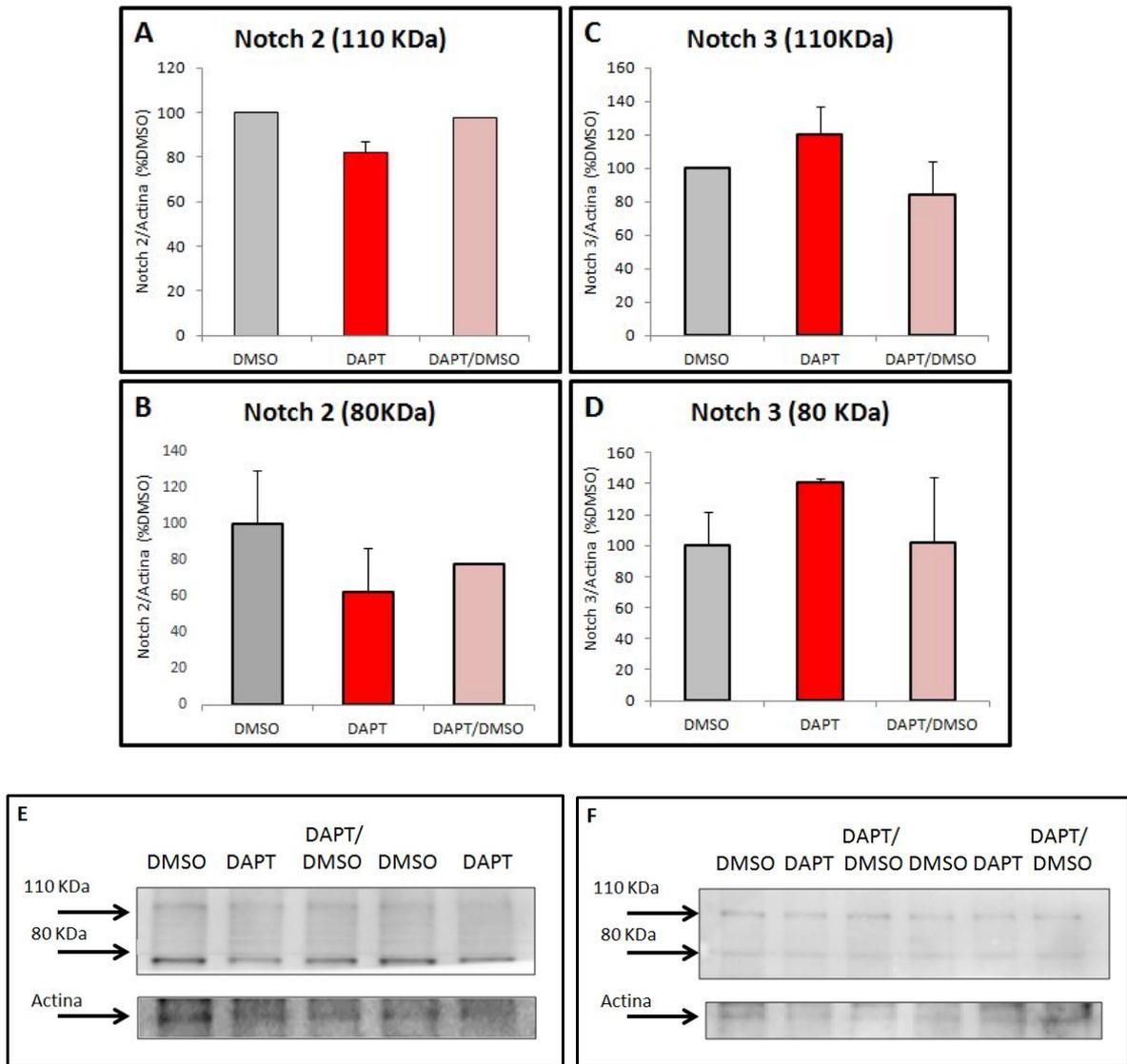


Figura 14. Expresión del monómero no activo del receptor (110KDa) y del dominio activo (80kDa) de Notch 2 y 3 a nivel de la proteína relativizado a Actina y graficado como porcentaje del valor para DMSO que se toma como el 100% (A,B: N=2,2,1 para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO, respectivamente) (C,D: N=2,2,2 para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO, respectivamente)

E: Bandas representativas de Notch 2 y Actina en WB para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO

F: Bandas representativas de Notch 3 y Actina en WB para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO

Si bien la droga tienen efecto específico sobre la activación de los receptores, podría existir un efecto compensatorio a nivel de la expresión del ligando en la célula debido al tratamiento. Es por ello que decidimos determinar la expresión del ligando Jagged 1 bajo el tratamiento con el DAPT, así como también de un gen diana de la vía.

En el caso de Jagged 1, no detectamos cambios bajo el efecto de la droga. Por el contrario, observamos una disminución en los niveles de ARNm para el gen diana Hes-1 en el tratamiento con DAPT frente al DMSO, aunque no fue significativa ([Figura 15](#)).

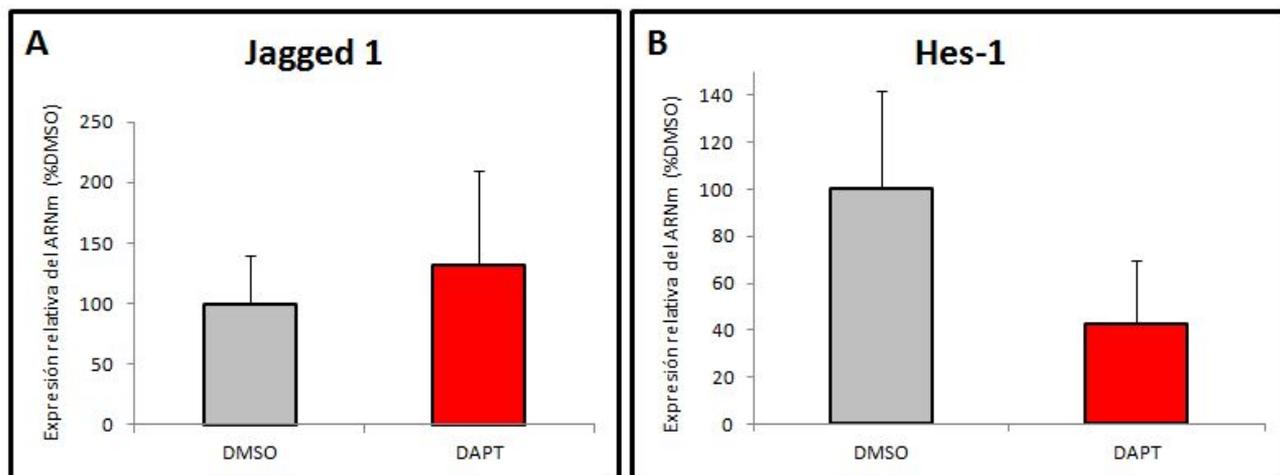


Figura 15. Expresión del ARNm para el ligando Jagged 1 y para el gen target Hes 1, graficado como porcentaje de los valores para DMSO que se toma como el 100% (A: N=3,2; B: N=3,3 para DMSO y DAPT, respectivamente).

Producción de Prolactina en glándula normal frente al tratamiento con DAPT

Para evaluar las posibles acciones del sistema Notch sobre la función hipofisaria, determinamos los niveles de expresión de prolactina en las hipófisis sometidas al tratamiento con DAPT, DAPT/DMSO y controles (DMSO). La PRL es la hormona secretada por los lactotropos, población celular con un importante aporte en la composición hipofisaria.

Si bien el análisis no arrojó diferencias estadísticas significativas, determinamos una tendencia al incremento de la PRL en las hipófisis que fueron tratadas con DAPT y una restitución a niveles similares al control cuando el DAPT fue sustituido por DMSO ([Figura 16](#)).

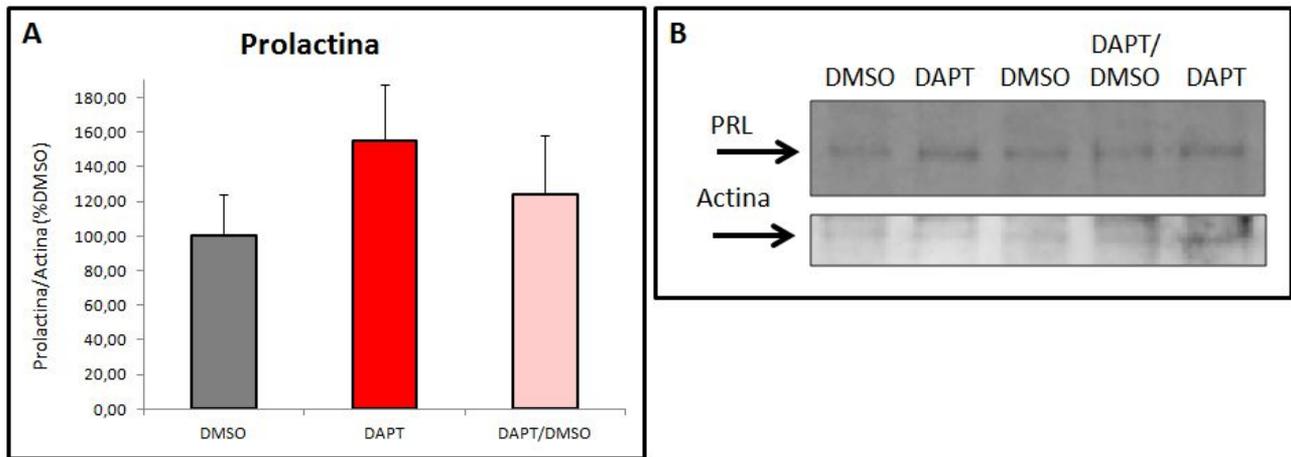


Figura 16. Expresión de prolactina (PRL) a nivel de la proteína relativizada a Actina y graficada como porcentaje del control (DMSO) que se toma como el 100%. (N=4,4,3 para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO, respectivamente).
 B: Bandas representativas de PRL y Actina en WB para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO

Respuesta proliferativa en hipófisis murina frente al tratamiento con DAPT

Dada la asociación descrita entre la activación de Notch con estados proliferativos y de crecimiento celular, decidimos utilizar el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para evaluar el efecto del DAPT y de esta manera conocer el efecto de Notch a nivel hipofisario en glándulas adultas normales.

La cuantificación de las bandas obtenidas en el WB no mostró diferencias significativas en la expresión de dicho antígeno ([Figura 17](#)). No obstante, no descartamos la posible acción del Notch en hipófisis sobre la proliferación celular. Se requieren determinaciones adicionales con otros marcadores de proliferación para dilucidar el rol de Notch en este complejo y regulado proceso celular.

Evaluación de la expresión de componentes de la vía Notch en un modelo de prolactinoma in vivo

Como modelo de prolactinoma, utilizamos ratones *knock-out* (KO) para el

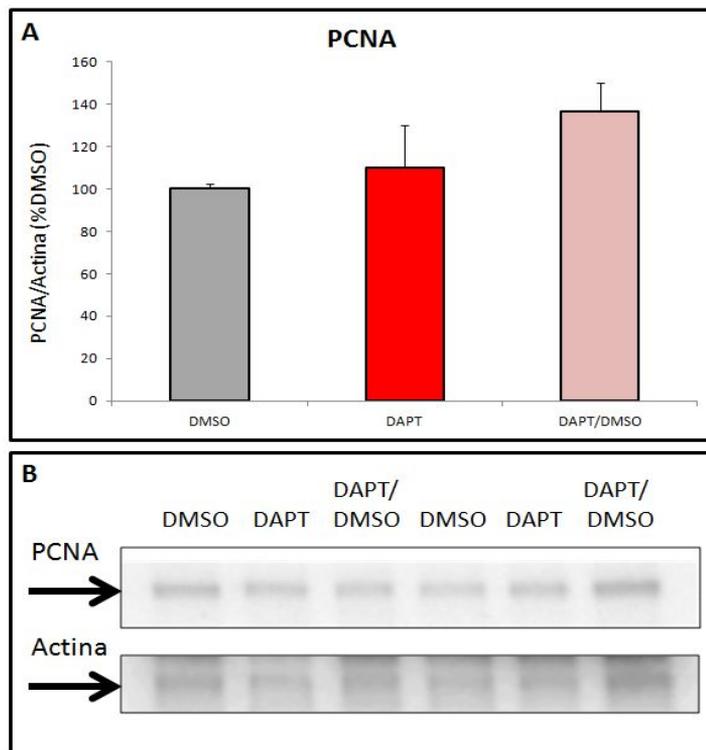


Figura 17. A: Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) a nivel de la proteína, relativizada a Actina y expresado como porcentaje del control (DMSO) determinado por WB en homogenatos de hipófisis completas previamente tratadas ex vivo con DMSO, DAPT O DAPT/DMSO (N=4,4,3 para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO, respectivamente)
 B: Bandas representativas de PCNA y Actina en WB para DMSO, DAPT y DAPT/DMSO.

receptor de Dopamina D2 *dirigido* a lactotropos (lacDrd2KO), los cuales generan espontáneamente este tipo de tumores. El laboratorio ha caracterizado este modelo en cuanto a generación de prolactinomas, secreción hormonal y angiogénesis, como así también otro modelo de ratones KO *totales* (Drd2KO). Sin embargo, hasta el momento no habíamos estudiado la participación de la señalización Notch en ninguno de estos casos. Decidimos, entonces, determinar por IHQ la expresión proteica del receptor Notch 1, Notch 3 y del gen target Hes-1 en el modelo tumoral (lacDrd2KO o KO) en forma comparativa con hipófisis de ratones control (Drd2^{loxP/loxP} o Ctrl).

En esta comparación, observamos disminuciones en la expresión de los tres componentes del sistema Notch en las hipófisis con prolactinomas (Figura 18).

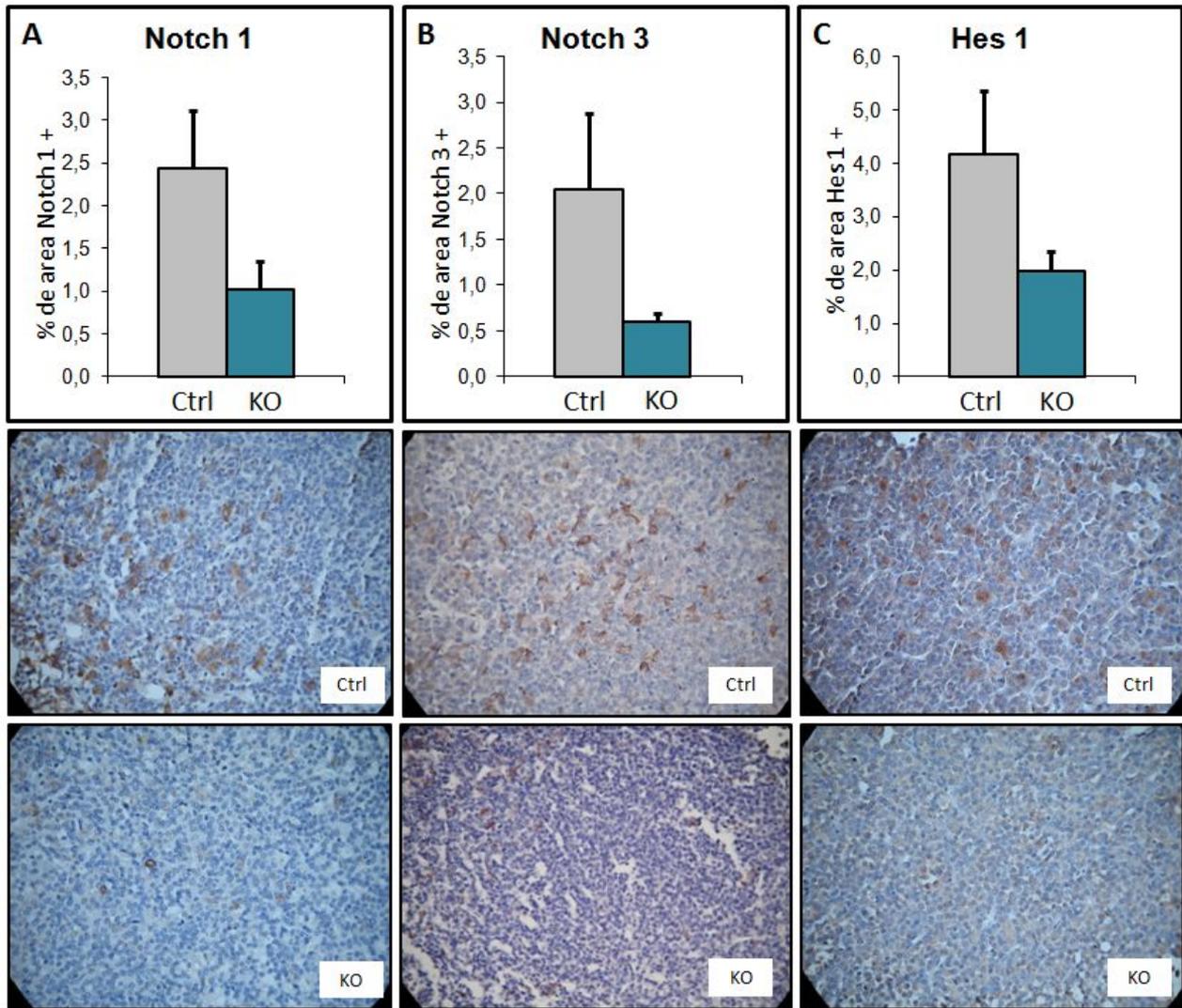


Figura 18. Determinación por IHQ el porcentaje de área positiva respecto al área total para receptores Notch 1, Notch 3 y el gen diana Hes 1 en ratones controles *Drd2^{loxP/loxP}* (Ctrl) y *lacDrd2KO* (KO) (A: N=4,4 para Control y KO, respectivamente $p=0.15$) (B: N=5,5 para Control y KO, respectivamente $p=0.16$) (C: 5,5 para Control y KO, respectivamente $p=0.137$) Debajo de cada caso, se muestran imágenes representativas de la IHQ revelada con DAB y contrateñidas con hematoxilina, con una magnificación de 40X.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los adenomas hipofisarios poseen una prevalencia del 16,7% en la población (Ezzat *et al.* 2004). Sus efectos pueden deberse a la secreción desregulada de hormonas tróficas o, en el caso de los macroadenomas, a la expansión de una masa celular que ejerce presión sobre tejidos cerebrales circundantes provocando sintomatología neurológica y ceguera.

Los pacientes con Enfermedad de Cushing tienen niveles séricos excesivos de cortisol debido a un adenoma hipofisario secretor de ACTH, o tumor monoclonal de corticotropos (Guyton y Hall 2006). La primera opción para el tratamiento de esta enfermedad es la cirugía transesfenoidal. Sin embargo, a las dificultades propias de una cirugía de este tipo, se le suma una tasa de remisión variable (50-90%) y un alto riesgo de recurrencia (Pas *et al.* 2012). Es por ello que se buscan terapias alternativas a través del estudio de posibles blancos terapéuticos presentes en el tumor para su aplicación en la clínica (Pas *et al.* 2012).

En el caso de los pacientes con adenomas secretores de prolactina, los síntomas se relacionan con la hiperprolactinemia, lo que favorece una detección temprana e inequívoca del tumor. La dopamina, es el principal factor para inhibir la síntesis y secreción de prolactina, así como también la proliferación de células lactotropas. Esto se logra por la unión de la dopamina al receptor D2 expresado en los lactotropos. La cabergolina, un agonista dopaminérgico, constituye la primer línea de terapia en los casos de prolactinomas donde hay expresión del receptor D2. Existe, sin embargo, un número considerable de estos pacientes que no responden a la terapia convencional por no expresar dichos receptores en el tumor. Estos prolactinomas

resistentes a los agonistas dopaminérgicos presentan una alta probabilidad de recidiva y un crecimiento agresivo.

Como se ha descrito en la introducción, muchas publicaciones relacionan a Notch con enfermedades humanas, entre ellas los tumores sólidos. Esta asociación de la activación de Notch con estados proliferativos y de progresión tumoral podría darse también en los tumores hipofisarios. Es por eso que nuestro laboratorio trabaja desde hace unos años con una línea enfocada en dicha vía de señalización en tumores hipofisarios, empleando muestras de pacientes obtenidas de cirugía y modelos tumorales murinos. Nuestros estudios pretenden conocer el grado de participación de la vía Notch en la tumorigénesis hipofisaria.

Para ello, determinamos la expresión proteica de Notch 3 en una cohorte de adenomas hipofisarios secretores de PRL, de ACTH y en muestras de tejido normal. Comparando con tejido no tumoral, encontramos sobre-expresado dicho receptor en corticotropinomas y disminuído en prolactinomas.

Este hecho guarda relación con un estudio por microarray realizado en 2005 por Moreno, donde se comparó hipófisis normal con adenomas no funcionantes (NF). Dicho análisis de expresión diferencial arrojó como resultado cambios en genes que componen la vía de NOTCH y WNT, en particular Notch 3, el cual se encontró sobre-expresado en los tumores (Moreno 2005). Zhang también comparó los niveles de expresión de Notch 3 en tumores NF y glándula normal a nivel del ARN mensajero y proteína, encontrándolo sobre-expresado en los tumores. Sugiere que dicha sobre-expresión del receptor puede proveer el estímulo necesario para el crecimiento celular en este tipo de tumores, aunque el mecanismo mediante el cual lo hace permanece desconocido. Aún así, propone que un inhibidor de la activación de la vía, como el DAPT, podría ser beneficioso para pacientes con tumores NF (Zhang 2013).

El patrón de expresión encontrado en nuestros experimentos de IHQ podría sugerir que Notch 3 posee un rol en corticotropinomas similar al de NF descrito por Moreno y Zhang, pero diferente en los prolactinomas.

Se resalta el aspecto original de nuestro trabajo al no existir referencias en la literatura en lo que respecta a la relación entre Notch y los corticotropinomas, hecho que podría resultar de gran importancia terapéutica en pacientes con enfermedad de Cushing. Es de destacar que sólo algunos componentes de la vía han sido evaluados en la tumorigénesis hipofisaria hasta la fecha, por lo que consideramos importante ampliar el foco del análisis abarcando otros receptores y componentes de la vía, como ligandos y genes diana, para conocer el rol del sistema Notch completo a nivel hipofisario, tanto en estado fisiológico como patológico.

Dados nuestros resultados en cortes histológicos de pacientes y los datos reportados en la literatura, decidimos utilizar un modelo murino de corticotropinoma y estudiar en él la expresión de los receptores Notch en forma comparativa con hipófisis murinas controles. Así como los tumores hipofisarios humanos provienen de expansiones monoclonales, la línea murina AtT20 deriva de la expansión clonal de células tumorales que fueron obtenidas por el pasaje en cultivo de tumores murinos productores de ACTH (Ooi *et al.* 2004).

En dicha comparación observamos a nivel proteico que los dominios activos (NICD) de Notch 2 y Notch 3 tienen un patrón similar, encontrándose ambos significativamente incrementados en la línea tumoral respecto a las hipófisis normales. Este hecho concuerda con nuestras observaciones en muestras de pacientes, donde Notch 3 podría ser el receptor que participa en la progresión de los corticotropinomas. En el caso de Notch 1, el NICD no aparece incrementado en las células tumorales AtT20 cuando éstas se comparan con hipófisis controles. Esto sugiere que distintos

receptores Notch estarían teniendo funciones diferentes tanto en glándulas adultas como en los tumores y que, además, la función de Notch 2 y 3 podría ser diferente a la de Notch 1 dentro de la línea tumoral.

En la revisión de la literatura, Notch 3 es el único de los receptores que se describe sobre-expresado en tumores cuando se analiza la expresión por microarray. Pensar que Notch 3 podría estar ejerciendo una función diferente a la del resto de los receptores en el contexto de los adenomas hipofisarios tendría entonces fundamento. Más aún, varias publicaciones postulan a dos receptores Notch con roles distintos e incluso opuestos. Graziani y colaboradores describen en mesotelioma maligno a Notch 1 con un rol pro-oncogénico y a Notch 2 como supresor de tumor (Graziani *et al.* 2008). En cáncer colorrectal, Chu y colaboradores postulan elevados niveles de Notch 1 y bajos niveles de Notch 2 como indicadores independientes de mal pronóstico (Chu *et al.* 2011).

Por otra parte y de acuerdo a nuestros resultados, Notch 3 es el receptor que mostró menores niveles de transcripción en la línea tumoral murina cuando lo determinamos por RT-qPCR pero, de acuerdo a lo observado por WB, existen grandes niveles del receptor activo. Esto puede deberse a las características de la vía en particular, donde incluso pequeñas cantidades de receptor pueden ejercer funciones importantes. En este sentido es importante destacar que la vía de Notch no posee segundos mensajeros ni amplificación de señal como tienen las vías clásicas de señalización celular. Durante la señalización Notch, se consume cada molécula de receptor que se utiliza y diferencias en la duración de la señal pueden llegar a tener efectos muy marcados (Kopan e Ilagan 2009).

Podría pensarse incluso, que los distintos NICD tienen afinidad por diferentes conjuntos de proteínas celulares o factores de transcripción. Sin embargo, ha sido

demostrado que la fuerza (número de moléculas de NICD que translocan al núcleo) y la duración de la señal (vida media del complejo NICD-RBPJ-MAML-ADN, cooperatividad y estabilidad) son los factores que determinan las diferencias entre las acciones de los distintos receptores. Dicha conclusión se desprende de un estudio reciente en el que se intercambiaron los NICD de un receptor con el NECD de otro. En el mencionado trabajo, se observó que procesos dependientes de un receptor en particular eran conseguidos en la misma medida cuando el NICD era intercambiado por el de un receptor distinto. Esto fue evaluado en el contexto del desarrollo de células T, diferenciación de la piel y carcinogénesis, oído interno, pulmones y retina (Liu *et al.* 2015).

Cuando analizamos al ligando Jagged 1 en las hipófisis normales y en el modelo tumoral, determinamos un aumento significativo de su expresión en los corticotropos murinos con respecto a las hipófisis controles. Esto coincide con lo observado en adenomas humanos por otros autores, quienes describen expresión elevada a nivel del mensajero para Jagged 1 en adenomas no funcionantes y prolactinomas (Zhang 2013). La expresión conjunta de ligando y receptores en hipófisis, son indicativos de activación y/o acción de la vía.

El estudio del sistema Notch en corticotropinomas resulta muy interesante al momento de dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales este tipo de adenomas se genera, progresa o hace recidivas. Nuestro trabajo en corticotropinomas humanos (manuscrito en preparación) y los resultados en las células AtT20 (único modelo de corticotropinoma murino descrito) de la presente tesis representan las primeras evidencias de la participación de los receptores de membrana Notch en la generación de este tipo de adenoma hipofisario, uno de los más complejos en lo que respecta a su manejo quirúrgico y tratamiento farmacológico.

En el caso del gen diana Hes-5, a diferencia del ligando Jagged 1, se encontró con niveles disminuidos en el modelo tumoral. Esto podría deberse, dada la alta expresión del ligando y el estado activo de los receptores Notch 2 y Notch 3 en la línea tumoral, a que la vía de Notch esté ejerciendo su acción por medio de la transcripción de otros genes diana específicos de la vía, como podría ser Hes-1 (Monahan *et al.* 2009).

Sabiendo que la vía de Notch se encuentra activa durante la embriogénesis y en condiciones fisiológicas durante la vida adulta (Tando *et al.* 2012), decidimos estudiar el efecto del inhibidor de la activación de la vía Notch, el DAPT, en hipófisis murinas adultas. En una adaptación de los experimentos descritos por el grupo del Dr. Raetzman (Nantie *et al.* 2014), utilizamos explantes de hipófisis murinas las cuales fueron extraídas, lavadas con PBS y transferidas a una placa de cultivo. En dicha placa se utilizó medio de cultivo con DMSO para los controles o con DAPT para el tratamiento, tal como se describe en materiales y métodos. La dosis de DAPT utilizada (10uM) se determinó previamente *in vitro* en una línea celular de prolactinoma (Zubeldía Brenner *et al.* 2015) y fue coincidente con la dosis utilizada por Nantie y colaboradores (Nantie *et al.* 2014). En este experimento con hipófisis murinas cultivadas *ex vivo* determinamos que Notch 3 mostró tendencia a incrementar sus niveles de expresión con el tratamiento con DAPT, tanto a nivel del ARNm como de la proteína. Esto podría deberse a una respuesta compensatoria de la glándula frente a la inhibición de la activación de la vía por los otros receptores, incrementando selectivamente la transcripción de Notch 3. Sin embargo, no hemos hallado literatura que describa dicha posible selectividad o mayor afinidad del DAPT por alguno de los receptores descritos en mamíferos y estudiados en el presente trabajo en particular.

Dados nuestros resultados, el próximo paso para dilucidar la acción del sistema en hipófisis será modular la vía *in vitro* en el modelo de las células tumorales AtT20. Para ello emplearemos el DAPT con el que venimos trabajando y también hemos adquirido el ligando soluble Jagged 1 para estimular la vía.

Como hemos detallado antes, el DAPT inhibe la enzima que produce el clivaje proteolítico que libera al dominio intracelular de Notch. El tratamiento con dicho inhibidor no ha demostrado alterar los niveles de expresión a nivel del mensajero de ligando Jagged 1. Asimismo, dada la baja expresión de este ligando en las hipófisis normales frente al modelo de corticotropinoma murino, podría hipotetizarse que en hipófisis murina adulta la vía no incluya a Jagged 1, sino a otro ligando. Este bien podría ser otro ligando canónico o uno no-canónico, como el DLK1 descrito por Puertas-Avendaño y colaboradores (Puertas-Avendaño *et al.* 2011). El tratamiento con DAPT ha reducido la expresión del gen diana Hes-1, aunque no de manera significativa pero dando cuenta del efecto de dicho inhibidor y posicionando Hes-1 como uno de los genes que puede estar siendo activado en hipófisis normales adultas de ratón a través de la acción de los receptores Notch.

En nuestro trabajo evaluamos la actividad secretoria de la hipófisis en presencia del DAPT. En cuanto a hormonas y su relación con Notch, Wang y colaboradores han reportado que el tratamiento con inhibidores de la vía de Notch alteran la secreción hormonal de progesterona en células del cuerpo lúteo murino (Wang *et al.* 2015). En este sentido, hemos determinado el contenido de PRL en hipófisis adultas controles y tratadas con DAPT. Si bien los resultados no son estadísticamente significativos, con el tratamiento se visualiza una tendencia a aumentar el contenido de PRL. Esto puede indicar que los receptores Notch podrían participar regulando de manera negativa la producción de PRL, formando parte de un complejo y más amplio conjunto de señales

que modulan la producción hormonal en los lactotrofos, donde la dopamina es el inhibidor por excelencia y más potente de dicha síntesis y secreción.

El gen diana de la vía Hes-1 codifica para un factor de transcripción que actúa como represor de inhibidores del ciclo celular. Esto significa que la activación de Hes-1 por la vía de Notch promueve un estado celular proliferativo. Monahan y colaboradores publicaron un trabajo donde ratones mutantes para Hes-1 muestran, durante el desarrollo glandular hipofisario, una merma en la proliferación de las células situadas en la bolsa de Rathke, sitio anatómico de origen embriológico de la adenohipófisis (Monahan *et al.* 2009). Este hecho motivó nuestro estudio del efecto de la modulación de Notch, en este caso, sobre la proliferación de las células en hipófisis adultas. Para ello, se utilizó el antígeno marcador de proliferación celular (PCNA) evaluándose a nivel proteico por WB. El tratamiento con DAPT no produjo cambios significativos en la expresión de dicho antígeno. No obstante, no descartamos una acción de Notch en la proliferación celular hipofisaria y evaluaremos el proceso a través de inmunomarcación para Ki-67 para este experimento.

Dentro de los adenomas hipofisarios, los prolactinomas han sido ampliamente estudiados por nuestro laboratorio y el de la Dra. Becú-Villalobos, con quien mantenemos colaboraciones permanentes (Cristina *et al.* 2005, 2006, 2007; Luque *et al.* 2011). En la presente tesis se utilizó un modelo *in vivo* de prolactinoma en ratón que genera espontáneamente tumores hipofisarios secretores de PRL por carecer del receptor de dopamina D2 de manera específica en los lactotrofos (Noain *et al.* 2013). Estos ratones representan un buen modelo de prolactinoma resistente a agonistas dopaminérgicos en los cuales, al no funcionar la terapia farmacológica, debe recurrirse a la cirugía. El hallazgo de nuevos blancos terapéuticos es indispensable para evitar la instancia de la operación o para reducir al tumor previo a su extirpación. En muestras

de pacientes con prolactinomas, Zhang describe que Notch 3 se encuentra disminuído, aunque no significativamente, con respecto hipófisis control (Zhang 2013). Nuestros resultados en los prolactinomas de ratones lacDrd2KO también muestran esta misma tendencia. Cabe destacar que en nuestras comparaciones por IHQ de ratones con prolactinomas y normales, no solo hemos encontrado disminuciones de los niveles de Notch 3 para los prolactinomas, sino también en los de Notch 1 y del gen diana Hes-1. Otro factor que soporta las observaciones en prolactinomas murinos, son nuestros propios resultados en muestras de pacientes con prolactinomas, donde Notch 3 también se encuentra disminuído. Resultados producto del trabajo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Becú-Villalobos del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) sobre un modelo de rata con prolactinomas generados mediante la administración subcutánea de un pellet de estrógenos sintético, también muestran una disminución estadísticamente significativa de Notch 1 y Notch 3 en los tumores respecto a los controles.

Todos estos hechos indican la participación de la vía de receptores Notch y sugieren que, en el caso de los prolactinomas, Notch 3 podría tener un papel supresor de tumor. Este mismo rol ha sido descrito para Notch 3 por Cui y colaboradores. En su trabajo, han observado que elevados niveles de Notch 3 pueden inducir la senescencia celular y, además, que sus niveles se encuentran disminuidos en determinadas líneas celulares tumorales humanas así como en muestras de pacientes con melanoma y cáncer de mama (Cui *et al.* 2013). En el caso de los corticotropinomas, en cambio, al haberlo encontrado sobreexpresado en los adenomas de pacientes y activo en el modelo celular tumoral, es posible que Notch esté llevando adelante un proceso celular diferente que en prolactinomas. Para evaluarlo son fundamentales los estudios *in vitro* con moduladores de la vía, determinar qué efecto tienen ellos en la

proliferación y secreción de ACTH además de, en un futuro, poder avanzar con estudios *in vivo* mediante el empleo de xenotransplantes generados por inyección subcutánea de células AtT20 en ratones atímicos (*nude*).

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

Concluimos que los resultados de la presente tesis de Licenciatura contribuyen al conocimiento de la función del sistema Notch en hipófisis normal e indican su participación en la tumorigénesis hipofisaria.

Se desprende de nuestros resultados que el receptor Notch 3 podría cumplir con un rol diferencial según el contexto celular, contribuyendo a la progresión tumoral en corticotropinomas pero teniendo un papel supresor de tumor en prolactinomas.

Considerando la importancia clínica que pueden tener estas investigaciones, vemos necesaria la continuación de nuestros experimentos *in vitro* evaluando el posible efecto de moduladores de Notch sobre funciones celulares implicadas en estas patologías. Así como también de los estudios con implantación de líneas celulares tumorales en ratones atímicos, lo que contribuirá al entendimiento global de la participación del sistema Notch en un contexto *in vivo*.

Si bien la vía de Notch es compleja, nuestros estudios en modelos tumorales murinos, junto con los análisis de muestras de pacientes, constituyen un aporte importante en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para los adenomas hipofisarios.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ables, J.L., Breunig, J.J., Eisch, A.J. y Rakic, P. (2011). Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nature Reviews Neuroscience Nat Rev Neurosci*12, 269–283.
- Andersson, E.R., Sandberg, R. y Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*138, 3593–3612.
- Arcaroli, J.J., Tai, W., McWilliams, R., Bagby, S., Blatchford, P.J., Varella-Garcia, M., Purkey, A., Quackenbush, K.S., Song, E.-K., Pitts, T.M., et al. (2015). A NOTCH1 gene copy number gain is a prognostic indicator of worse survival and a predictive biomarker to a Notch1 targeting antibody in colorectal cancer. *International Journal Of Cancer Int. J. Cancer*138, 195–205.
- Artavanis-Tsakonas, S., Muskavitch, M.A. y Yedvobnick, B. (1983). Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings Of the National Academy of Sciences*80, 1977–1981.
- Asa, S.L. y Ezzat, S. (2002). The pathogenesis of pituitary tumours. *Nature Reviews Cancer Nat Rev Cancer*2, 836–849.
- Borggrefe, T. y Liefke, R. (2012). Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle*11, 264–276.
- Chabriat, H., Joutel, A., Dichgans, M., Tournier-Lasserre, E. y Boussier, M.G. (2009). Cadasil. *The Lancet Neurology*8, 643–653.
- Chu, D., Zhang, Z., Zhou, Y., Wang, W., Li, Y., Zhang, H., Dong, G., Zhao, Q. y Ji, G. (2011). Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Annals Of Oncology*22, 2440–2447.
- Cui, H., Kong, Y., Xu, M. y Zhang, H. (2013). Notch3 Functions as a Tumor Suppressor by Controlling Cellular Senescence. *Cancer Research*73, 3451–3459.
- Cristina, C., Díaz-Torga, G., Baldi, A., Góngora, A., Rubinstein, M., Low, M.J. y Becú-Villalobos, D. (2005). Increased Pituitary Vascular Endothelial Growth Factor-A in Dopaminergic D2 Receptor Knockout Female Mice. *Endocrinology*146, 2952–2962.
- Cristina, C., García-Tornadú, I., Díaz-Torga, G., Rubinstein, M., Low, M.J. y Becú-Villalobos, D. (2006). Dopaminergic D2 Receptor Knockout Mouse: An Animal Model of Prolactinoma. *Frontiers Of Hormone Research Pituitary Today: Molecular, Physiological and Clinical Aspects*50–63.
- Cristina, C., Diaz-Torga, G., Gongora, A., Guida, M.C., Perez-Millan, M.I., Baldi, A. y Becu-Villalobos, D. (2007). Fibroblast growth factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice. *AJP: Endocrinology And Metabolism*293
- Duan, L., Yao, J., Wu, X. y Fan, M. (2006). Growth suppression induced by Notch1 activation

- involves Wnt- β -catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells. *Biology Of the Cell*98, 479–490.
- Dufraine, J., Funahashi, Y. y Kitajewski, J. (2008). Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene*27, 5132–5137.
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A., Reynolds, T.C., Smith, S.D. y Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*66, 649–661.
- Ezzat, S., Asa, S.L., Couldwell, W.T., Barr, C.E., Dodge, W.E., Vance, M.L. y Mccutcheon, I.E. (2004). The prevalence of pituitary adenomas. *Cancer*101, 613–619.
- Fischer, A. y Gessler, M. (2007). Delta Notch and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research*35, 4583–4596.
- Fleming, R.J., Scottgale, T.N., Diederich, R.J. y Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*4, 2188–2201.
- Fortini, M. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*79, 273–282.
- Giovannini, C., Gramantieri, L., Chieco, P., Minguzzi, M., Lago, F., Pianetti, S., Ramazzotti, E., Marcu, K.B. y Bolondi, L. (2009). Selective ablation of Notch3 in HCC enhances doxorubicin's death promoting effect by a p53 dependent mechanism. *Journal Of Hepatology*50, 969–979.
- Graziani, I., Elias, S., Marco, M.A.D., Chen, Y., Pass, H.I., May, R.M.D., Strack, P.R., Miele, L. y Bocchetta, M. (2008). Opposite Effects of Notch-1 and Notch-2 on Mesothelioma Cell Survival under Hypoxia Are Exerted through the Akt Pathway. *Cancer Research*68, 9678–9685.
- Guyton, A.C. y Hall, J.E. (2006). *Tratado de fisiología médica* (Madrid: Elsevier España).
- Hallahan, A.R. (2004). The SmoA1 Mouse Model Reveals That Notch Signaling Is Critical for the Growth and Survival of Sonic Hedgehog-Induced Medulloblastomas. *Cancer Research*64, 7794–7800.
- High, F.A. y Epstein, J.A. (2008). The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet Nature Reviews Genetics*9, 49–61.
- Hoek, K. (2004). Expression Profiling Reveals Novel Pathways in the Transformation of Melanocytes to Melanomas. *Cancer Research*64, 5270–5282.
- Hulleman, E., Quarto, M., Vernell, R., Masserdotti, G., Colli, E., Kros, J.M., Levi, D., Gaetani, P., Tunic, P., Finocchiaro, G., et al. (2008). A role for the transcription factor HEY1 in glioblastoma. *Journal Of Cellular and Molecular Medicine*13, 136–146.

- Kelly, M.A., Rubinstein, M., Asa, S.L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J.R., Allen, R.G., Hnasko, R., Ben-Jonathan, N., Grandy, D.K., et al. (1997). Pituitary Lactotroph Hyperplasia and Chronic Hyperprolactinemia in Dopamine D2 Receptor-Deficient Mice. *Neuron*19, 103–113.
- Khattak, M.N.K., Buchfelder, M., Kleindienst, A., Schöfl, C. y Kremenevskaja, N. (2010). CRH and SRIF Have Opposite Effects on the Wnt/ β -Catenin Signalling Pathway Through PKA/GSK-3 β in Corticotroph Pituitary Cells. *Cancer Investigation*28, 797–805.
- Kopan, R. y Ilagan, M.X.G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*137, 216–233.
- Lehmann, R., Dietrich, U., Jimenez, F. y Campos-Ortega, J.A. (1981). Mutations of early neurogenesis in *Drosophila*. *Wilhelm Roux' Archiv Wilhelm Roux's Archives Of Developmental Biology*190, 226–229.
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U. y Campos-Ortega, J.A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archiv Wilhelm Roux's Archives Of Developmental Biology*192, 62–74.
- Leong, K.G. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*107, 2223–2233.
- Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W.L., Cochran, J., et al. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nature Genetics Nat Genet*16, 243–251.
- Liu, Z., Brunskill, E., Varnum-Finney, B., Zhang, C., Zhang, A., Jay, P.Y., Bernstein, I., Morimoto, M. y Kopan, R. (2015). The intracellular domains of Notch1 and Notch2 are functionally equivalent during development and carcinogenesis. *Development*142, 2452–2463.
- Louvi, A. y Artavanis-Tsakonas, S. (2012). Notch and disease: A growing field. *Seminars In Cell & Developmental Biology*23, 473–480.
- Luque, G.M., Perez-Millan, M.I., Ornstein, A.M., Cristina, C. y Becu-Villalobos, D. (2011). Inhibitory Effects of Antivascular Endothelial Growth Factor Strategies in Experimental Dopamine-Resistant Prolactinomas. *Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*337, 766–774.
- Mcdaniell, R., Warthen, D.M., Sanchez-Lara, P.A., Pai, A., Krantz, I.D., Piccoli, D.A. y Spinner, N.B. (2006). NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogeneous Disorder of the Notch Signaling Pathway. *The American Journal Of Human Genetics*79, 169–173.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *Journal Of Clinical Investigation J. Clin. Invest.*112, 1603–1618.
- Meng, R.D., Shelton, C.C., Li, Y.-M., Qin, L.-X., Notterman, D., Paty, P.B. y Schwartz, G.K. (2009). -Secretase Inhibitors Abrogate Oxaliplatin-Induced Activation of the Notch-1

- Signaling Pathway in Colon Cancer Cells Resulting in Enhanced Chemosensitivity. *Cancer Research*69, 573–582.
- Miao, Z., Miao, Y., Lin, Y. y Lu, X. (2012). Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *Journal Of Clinical Neuroscience*19, 107–110.
- Mittal, S., Subramanyam, D., Dey, D., Kumar, R.V. y Rangarajan, A. (2009). Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. *Molecular Cancer Mol Cancer*8, 128.
- Monahan, P., Rybak, S. y Raetzman, L.T. (2009). The Notch Target Gene Hes1 Regulates Cell Cycle Inhibitor Expression in the Developing Pituitary. *Endocrinology*150, 4386–4394.
- Moreno, C.S. (2005). Novel Molecular Signaling and Classification of Human Clinically Nonfunctional Pituitary Adenomas Identified by Gene Expression Profiling and Proteomic Analyses. *Cancer Research*65, 10214–10222.
- Morgan, T.H. (1917). The Theory of the Gene. *The American Naturalist*51, 513–544.
- Nantie, L.B., Himes, A.D., Getz, D.R. y Raetzman, L.T. (2014). Notch Signaling in Postnatal Pituitary Expansion: Proliferation, Progenitors, and Cell Specification. *Molecular Endocrinology*28, 731–744.
- Noain, D., Perez-Millan, M.I., Bello, E.P., Luque, G.M., Cordero, R.C., Gelman, D.M., Peper, M., Tornadu, I.G., Low, M.J., Becu-Villalobos, D., et al. (2013). Central Dopamine D2 Receptors Regulate Growth-Hormone-Dependent Body Growth and Pheromone Signaling to Conspecific Males. *Journal Of Neuroscience*33, 5834–5842.
- Oda, T., Elkahoun, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S., et al. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nature Genetics Nat Genet*16, 235–242.
- Ooi, G.T., Tawadros, N. y Escalona, R.M. (2004). Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molecular And Cellular Endocrinology*228, 1–21.
- Pas, R.V.D., Herder, W.W.D., Hofland, L.J. y Felders, R.A. (2012). New developments in the medical treatment of Cushing's syndrome. *Endocrine Related Cancer*19.
- Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M.R., Stalla, G.K. y Arzt, E. (2012). Cellular and Molecular Specificity of Pituitary Gland Physiology. *Physiological Reviews*92, 1–38.
- Pinnix, C.C., Lee, J.T., Liu, Z.-J., Mcdaid, R., Balint, K., Beverly, L.J., Brafford, P.A., Xiao, M., Himes, B., Zabierowski, S.E., et al. (2009). Active Notch1 Confers a Transformed Phenotype to Primary Human Melanocytes. *Cancer Research*69, 5312–5320.
- Plentz, R., Park, J.S., Rhim, A.D., Abravanel, D., Hezel, A.F., Sharma, S.V., Gurumurthy, S., Deshpande, V., Kenific, C., Settleman, J., et al. (2009). Inhibition of γ -Secretase Activity Inhibits Tumor Progression in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*136.
- Puertas-Avenidaño, R.A., González-Gómez, M.J., Ruvira, M.D., Ruiz-Hidalgo, M.J.,

- Morales-Delgado, N., Laborda, J., Díaz, C. y Bello, A.R. (2011). Role of the Non-Canonical Notch Ligand Delta-Like Protein 1 in Hormone-Producing Cells of the Adult Male Mouse Pituitary. *Journal Of Neuroendocrinology*23, 849–859.
- Purow, B.W. (2005). Expression of Notch-1 and Its Ligands, Delta-Like-1 and Jagged-1, Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation. *Cancer Research*65, 2353–2363.
- Purow, B.W. (2012). Notch Inhibition as a Promising New Approach to Cancer Therapy. *Advances In Experimental Medicine and Biology Notch Signaling in Embryology and Cancer*305–319.
- Raetzman, L.T., Wheeler, B.S., Ross, S.A., Thomas, P.Q. y Camper, S.A. (2006). Persistent Expression of Notch2 Delays Gonadotrope Differentiation. *Molecular Endocrinology*20, 2898–2908.
- Ranganathan, P., Weaver, K.L. y Capobianco, A.J. (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews Cancer Nat Rev Cancer*11, 338–351.
- Rodilla, V., Villanueva, A., Obrador-Hevia, A., Robert-Moreno, A., Fernandez-Majada, V., Grilli, A., Lopez-Bigas, N., Bellora, N., Alba, M.M., Torres, F., et al. (2009). Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proceedings Of the National Academy of Sciences*106, 6315–6320.
- Sahlgren, C., Gustafsson, M.V., Jin, S., Poellinger, L. y Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings Of the National Academy of Sciences*105, 6392–6397.
- Stylianou, S. (2006). Aberrant Activation of Notch Signaling in Human Breast Cancer. *Cancer Research*66, 1517–1525.
- Tando, Y., Fujiwara, K., Yashiro, T. y Kikuchi, M. (2012). Localization of Notch signaling molecules and their effect on cellular proliferation in adult rat pituitary. *Cell Tissue Res Cell And Tissue Research*351, 511–519.
- Wang, J., Liu, S., Peng, L., Dong, Q., Bao, R., Lv, Q., Tang, M., Hu, C., Li, G., Liang, S., et al. (2015). Notch Signaling Pathway Regulates Progesterone Secretion in Murine Luteal Cells. *Reproductive Sciences*22, 1243–1251.
- Weng, A.P. (2004). Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science*306, 269–271.
- Yavropoulou, M.P., Maladaki, A. y Yovos, J.G. (2015). The role of Notch and Hedgehog signaling pathways in pituitary development and pathogenesis of pituitary adenomas. *Hormones*, 14 (1): 518
- Zhang, Y. (2013). Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. *Oncology Letters Oncol Lett*.
- Zubeldía Brenner, L., Cristina, C. y Becu-Villalobos, D. (2015) Notch pathway inhibition with

DAPT diminishes tumor growth and hormone secretion in GH3 xenografted NUDE/NUDE mice". International Workshop in Neuroendocrinology (IWNE 2015), Mendoza, Argentina.