

ESTUDIO DE LOS MARCADORES DE CÉLULAS MADRE NESTINA Y NOTCH EN ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS Y MURINOS

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	3
Glándula hipófisis	3
Tumores Hipofisarios. Clasificación.....	4
<i>Regulación de PRL en los lactotropos.....</i>	8
Mecanismos de tumorigénesis hipofisaria.....	10
Modelos experimentales para el estudio de los adenomas hipofisarios.....	12
<i>Estrógenos.....</i>	12
<i>Animales transgénicos.....</i>	13
<i>Ratas de edad avanzada.....</i>	14
Células madre en tumores hipofisarios.....	15
Vía de señalización de Notch	20
Notch en hipófisis	24
Nestina	25
Nestina en condiciones patológicas	25
OBJETIVOS	28
Objetivo Generales.....	28
Objetivo Específicos.....	28
MATERIALES Y METODOS	30

RESULTADOS.....	44
PRIMERA PARTE: Receptores Notch y proteína Nestina en el modelo de prolactinoma de ratas tratadas con Dietilestilbestrol.....	44
Desarrollo de Tumores Hipofisarios en Ratas Sprague-Dawley.....	44
Receptores Notch en hipófisis de ratas tratadas con DES y controles.....	48
NESTINA en hipófisis de ratas tratadas con DES y controles	58
Discusión de la PRIMERA PARTE	64
RECEPTORES NOTCH Y PROTEÍNA NESTINA EN EL MODELO DE PROLACTINOMA DE RATAS TRATADAS CON DES	64
SEGUNDA PARTE: Receptores Notch3 en Adenomas hipofisarios humanos.....	69
Notch3 en hipófisis normales y adenomas hipofisarios.....	69
Hipófisis Normales.....	69
Hipófisis Tumorales.....	71
Discusión de la SEGUNDA PARTE	76
EXPRESIÓN DE NOTCH3 EN ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS E HIPÓFISIS NORMALES	76
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES DE LA TESINA.....	79
Receptores notch y proteína nestina en la tumorigénesis hipofisaria.....	79
Abreviaturas utilizadas.	82
BIBLIOGRAFÍA.....	84

INTRODUCCIÓN

Glándula hipófisis

La Hipófisis, o glándula pituitaria, es una pequeña glándula de alrededor de 1 centímetro de diámetro y de entre 0,5 y 1 gramo de peso, situada en la silla turca del hueso esfenoides (cavidad ósea de la base del cráneo) y unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisario.

Posee dos partes bien diferenciadas: el lóbulo anterior o Adenohipófisis y el lóbulo posterior o Neurohipófisis. Existe entre ambos una pequeña zona poco vascularizada denominada Pars Intermedia, prácticamente inexistente en la especie humana y mucho más grande y funcional en algunos otros animales.

(Figura 1)

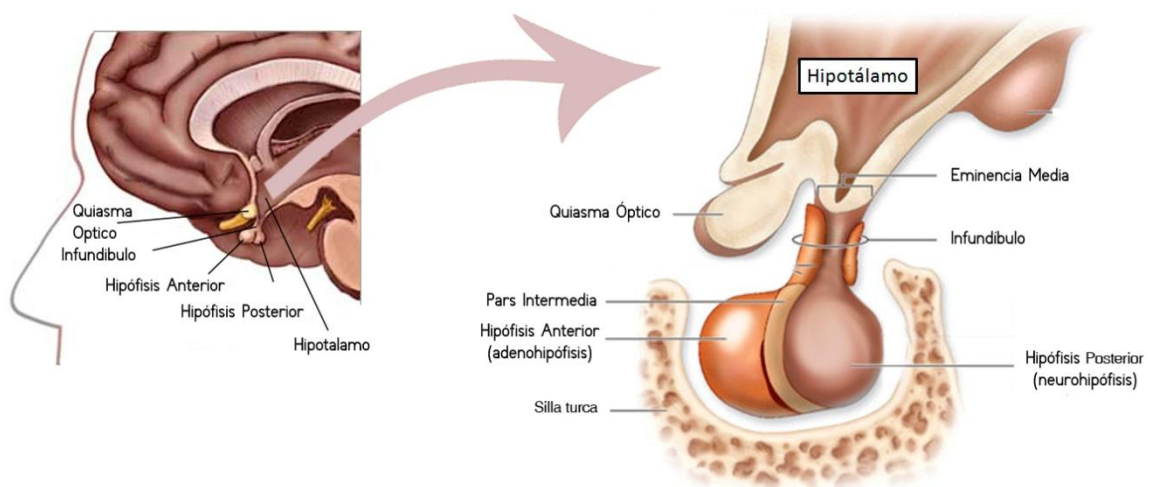


Figura 1. Representación de la ubicación de la glándula hipófisis en la base del cerebro (izquierda) y de las partes que la componen y su relación con el hipotálamo (derecha).

Desde el punto de vista embriológico, adenohipófisis y neurohipófisis tienen procedencias diferentes: la adenohipófisis deriva de la Bolsa de Rathke, una invaginación embrionaria del epitelio faríngeo, y la neurohipófisis proviene de una evaginación del tejido nervioso del hipotálamo.

La adenohipófisis secreta, a través de cinco tipos celulares diferentes, seis hormonas peptídicas que intervienen en el control de las funciones metabólicas de todo el organismo. Los somatotropos liberan hormona del crecimiento (GH), los tirotrópos liberan hormona estimulante de la tiroides (TSH), los corticotropos producen adrenocorticotrofina (ACTH), los gonadotropos secretan hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) y los lactotropos liberan prolactina (PRL). A estas células se les suman las células folículoestrelladas que no secretan hormonas pero sí liberan una gran cantidad de factores autocrinos y paracrinos.[1]

Tumores Hipofisarios. Clasificación

Los tumores hipofisarios representan aproximadamente el 10-15% de los tumores intracraneales. Son tumores de origen epitelial que se caracterizan por ser benignos, de crecimiento lento, normalmente confinados a la silla turca. Sin embargo existen algunos tumores invasivos, con un crecimiento más rápido. Se

definen como verdaderos carcinomas sólo aquellos que producen metástasis craneoespinal y/o sistémica, y éstos son raros con una incidencia de menos del 0,5% de los tumores hipofisarios sintomáticos [2]

Clínicamente los adenomas hipofisarios causan síntomas a nivel local, como dolores de cabeza, trastornos visuales ocasionados por la presión sobre el quiasma óptico, aumento de la presión intracraneal y lesión de nervios craneales.

Los tumores hipofisarios se clasifican según su tamaño en microadenomas (< 10mm) sin cambios en la silla turca (grado 0) o cambios menores en la silla (grado I), y macroadenomas (> 10mm) con agrandamiento difuso de la silla (grado II) o con destrucción focal (grado III) o extensiva (grado IV) de la silla (Figura 2)

El diagnóstico por imágenes se realiza mediante Resonancia Magnética.



Figura 2. Resonancia magnética en la que se visualiza un microadenoma (en la imagen superior) y 2 macroadenomas (en las imágenes media e inferior). En la columna derecha se resalta en color rojo la zona abarcada por el tumor.

Los pacientes con macroadenomas recurren a la consulta médica debido a efectos de compresión causados por la masa tumoral como dolores de cabeza, náuseas, vómitos y/o falla visual progresiva mientras que los microadenomas son identificados durante la investigación de síndromes clínicos endócrinos o en forma incidental durante el diagnóstico por imagen del cerebro por otras causas. Además, en un 25% de las autopsias se descubren pequeños adenomas subclínicos (nunca diagnosticados por no haber causado síntomas).

Los tumores hipofisarios se clasifican además según la hormona que producen y se describen como funcionantes si sobreproducen alguna hormona de la hipófisis anterior, o no funcionantes, si no existe alteración endócrina. Dentro de los distintos tipos de adenomas hipofisarios podemos encontrar:

Los tumores productores de GH vinculados con la acromegalia o el gigantismo, los secretores de PRL asociados con hiperprolactinemia y disfunción sexual, tumores productores de ACTH causantes de la Enfermedad de Cushing, y dentro de los tumores menos frecuentes se encuentran los productores de gonadotrofinas LH y FSH (o la subunidad alfa de la misma) y los productores de TSH relacionados con fallas en la función tiroidea.

Los tumores no funcionantes representan hasta un 10% de estos adenomas, son endocrinológicamente inactivos y dado su crecimiento evidencian un efecto de masa y su consecuente compresión de las estructuras adyacentes que puede conllevar a la hiposecreción de una o varias hormonas hipofisarias (hipopituitarismo). En algunos casos la compresión del tallo hipofisario evita la regulación de la secreción de prolactina al impedir la llegada de la dopamina hipotalámica y, de esta manera, los tumores no funcionantes cursan con hiperprolactinemia [2]

Subtipos	% de tumores hipofisarios	Expresión hormonal	Manifestaciones pre-clínicas
Prolactinomas	25–41	PRL	Galactorrea, Hipogonadismo.
Somatotropinomas	10–20	GH (GH + PRL)	Acromegalia, Gigantismo
Corticotropinoma	5–15	ACTH	Síndrome de Cushing Síndrome de Nelson
Gonadotropinomas	10–15	FSH, LH, Subunidad alfa	Irregularidades menstruales, Hipogonadismo.
Tirotropinomas	0.5–2	TSH, Subunidad alfa	Hipertiroidismo, Hipotiroidismo
Adenomas no funcionales	5–10		Hipopituitarismo

Tabla 1. Clasificación de los tumores hipofisarios según el tipo de secreción hormonal. Modificado de Seilicovich [3]

Prolactinomas

Dentro de los tumores hipofisarios secretores se destacan los adenomas secretores de prolactina o Prolactinomas dado que son los más frecuentes, representando aproximadamente el 25% de los tumores de la hipófisis y más de la mitad de los adenomas hipofisarios hallados en autopsias (incidentalomas).

Se caracterizan por ser más frecuentes en mujeres, en las que tienden a presentarse a edades tempranas acompañados de trastornos hormonales. En contraste, en los hombres se presentan más tardíamente, son de mayor tamaño, con un crecimiento más acelerado e hipopituitarismo secundario. Algunos síntomas de los prolactinomas son la anovulación, galactorrea, dismenorrea, amenorrea en mujeres, y ginecomastia, pérdida de la libido, disfunción eréctil y disminución de la testosterona en hombres.

Regulación de PRL en los lactotrofos

La dopamina ejerce un efecto tónico de inhibición en la síntesis y secreción de prolactina sobre los lactotrofos. La señalización de dopamina está mediada por la familia de receptores de dopamina que incluye los receptores de dopamina tipo 1 (R D1), los cuales estimulan la adenilato ciclasa, mientras que los receptores tipo 2 (R D2) la inhiben. Los R D2 son los encargados de regular negativamente la secreción de prolactina. De manera análoga a los R D2 los receptores de prolactina (-R PRL) sensan los niveles de prolactina y ejercen un efecto regulador a nivel de expresión del gen de PRL.[2]

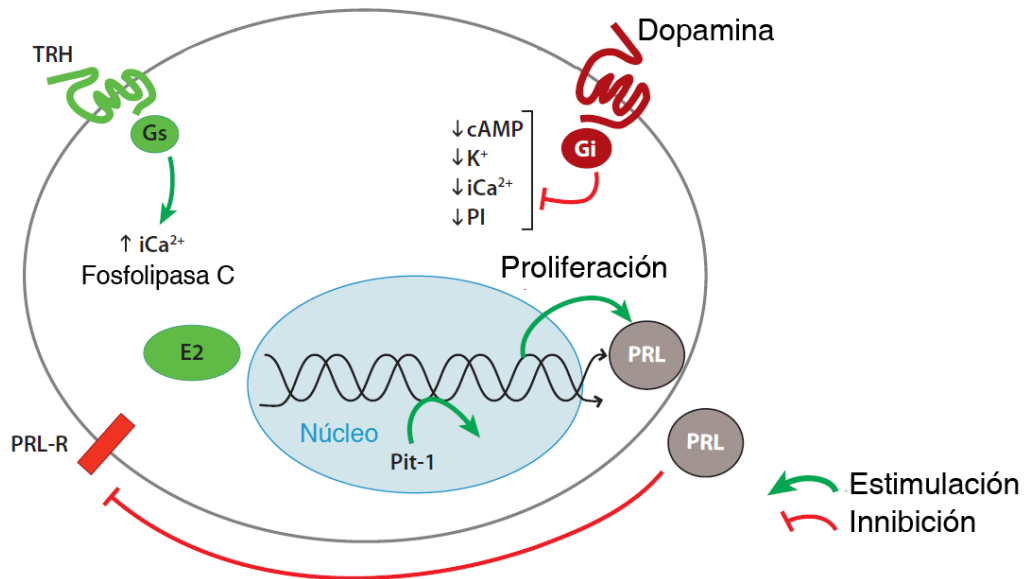


Figura 3. Regulación de PRL en los lactotopos. Los lactotopos se encuentran bajo inhibición tónica de dopamina a través de los receptores de dopamina tipo 2 (RD2) y bajo inhibición de prolactina circulante a través de los receptores de prolactina (R-PRL). Estas células se encuentran estimuladas por la hormona estimulante de tirotropos (TRH) y el estrógeno (E₂), los cuales inducen la expresión de prolactina a través del factor nuclear Pit-1. Abreviaciones: cAMP: adenosin monofosfato cíclico. PI: fosfatidilinositol. Modificado de Asa [2].

El tratamiento de los prolactinomas se realiza mediante agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y la cabergolina. Estas drogas disminuyen el tamaño del tumor y reducen a valores normales los niveles de prolactina en aproximadamente el 80% de los pacientes. La cirugía transesfenoidal para extirpar la totalidad o parte del tumor debe considerarse si la terapia médica no puede ser tolerada o si no se consiguen reducir los niveles de prolactina, restaurar el funcionamiento de la hipófisis o reducir el tamaño del tumor.

Mecanismos de tumorigénesis hipofisaria

La patogénesis de estos adenomas no se encuentra completamente dilucidada.

Las dos teorías principales que intentan explicar los mecanismos de tumorigénesis hipofisaria confrontan la estimulación hormonal contra un defecto genético intrínseco.

Dentro de los estímulos hormonales se destacan un exceso de hormonas estimuladoras, como lo son el aumento de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) que se asocia a la hiperplasia de somatotropos, la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) secretada en exceso se ha postulado como factor involucrado en la enfermedad de Cushing, mediada por el aumento de ARN mensajeros de POMC (pro-opiomelanocortina, precursor de ACTH); o el incremento de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). [4]

Otras alteraciones documentadas son las pérdidas de la regulación por parte de hormonas inhibitorias, como lo son la disminución de dopamina que provoca un aumento de la secreción de prolactina o la pérdida del control ejercido por somatostatina que deriva en un aumento de la secreción de hormona del crecimiento.[4]

Existen una variedad de factores de crecimiento que participan en el inicio y en los diferentes pasos por los que transcurre la patogénesis del tumor, como son los diversos miembros de las familias de factores de crecimiento epidérmico (TGF α , EGF) ligados a la alteración de la producción de GH, PRL y TSH; la superfamilia

TGF β y factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), caracterizados por afectar la matriz extracelular, favorecer la hiperplasia y la angiogénesis.[4]

En cuanto a los mecanismos moleculares propuestos para entender la tumorigénesis hipofisaria, las mutaciones de genes comúnmente asociados al cáncer como por ejemplo los genes Ras, p53, Rb o de la proteína quinasa C están ausentes o se encuentran de forma muy aislada en estos neoplasmas, así como tampoco se ha podido encontrar de forma generalizada la pérdida de genes supresores de tumor como el gen de Menina (MEN-1, multiple endocrine neoplasia) o el PTTG (gen transformante de tumores hipofisarios)[5, 6].

Un esquema integrado concilia las teorías hormonal y molecular. En este esquema el evento iniciador sería una alteración genética que transforma a una única célula mientras que las hormonas y factores de crecimiento participarían en la promoción de la proliferación celular. (Estos datos son revisados en Asa y Ezzat.[4]) (Figura 4).

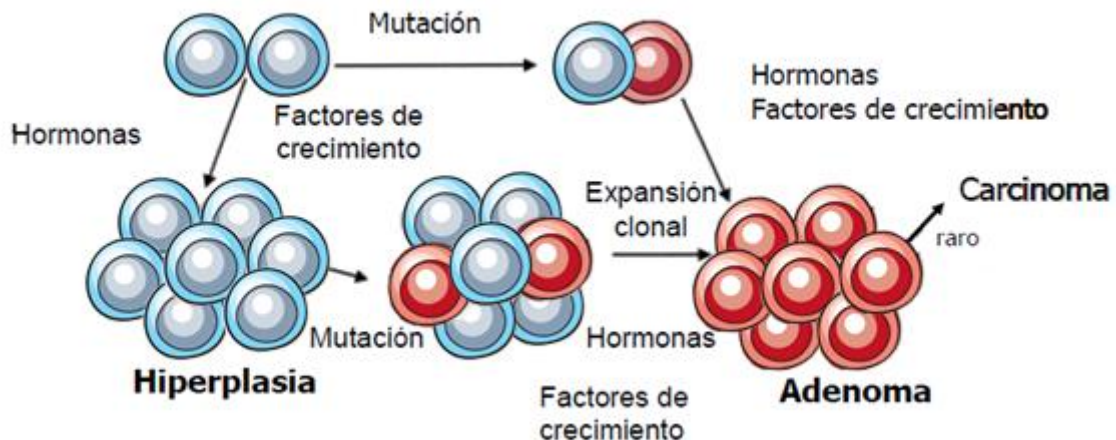


Figura 4. Modelo propuesto para la tumorigénesis hipofisaria. Modificado de Asa y Ezzat [4]

Modelos experimentales para el estudio de los adenomas hipofisarios

Se han desarrollado una serie de modelos animales para la investigación básica y aplicada de los tumores hipofisarios en general y los prolactinomas en particular [7].

Estrógenos

La secreción de prolactina es regulada por una serie de factores estimuladores e inhibidores del hipotálamo y por hormonas periféricas. La dopamina ejerce un efecto inhibitor a través de los RD2, mientras que los estrógenos son estimuladores potentes de la transcripción, síntesis y secreción de prolactina, así como también ejercen un efecto potenciador de la proliferación de lactotopos.

La estimulación crónica con alta dosis de estrógeno, representa uno de los primeros modelos de inducción de prolactinomas. Diferentes cepas de ratas y ratones han mostrado una susceptibilidad muy variable hacia la formación de adenomas. [8-10]

El 17β -estradiol (E2) y el dietilestilbestrol (DES), siendo este último un estrógeno sintético, son los más utilizados para el desarrollo de adenomas en ratas. Se demostró que la administración crónica de 10 mg de DES durante 3, 9 y 12 semanas en ratas F344 de un mes de vida genera un adenoma hipofisario de lactotopos caracterizado por aumento de la prolactina sérica, una pérdida relativa de somatotopos, ruptura de parénquima reticular con desorganización y pérdida de la red de reticulina, aparición de lagunas sanguíneas con peliosis, acompañado

de un aumento en la aparición de nuevos vasos. En los casos de exposición prolongada se produce la formación de un adenocarcinoma.[10, 11]

Animales transgénicos

Se han desarrollado modelos transgénicos que sobreexpresan factor liberador de hormona de crecimiento (GHRH)[12] , ratones deficientes en receptores de dopamina D2 (R D2^{-/-})[13] y/o en receptores de prolactina (-R PRL^{-/-})[14] y ratones hiperproductores de la hormona liberadora de corticotropina (CRH o CRF).

La ausencia de R D2 o RPRL inducen hiperprolactinemia y prolactinomas de gran tamaño en ratones hembra. Los machos RPRL^{-/-} desarrollan macroadenomas, mientras que los machos R D2^{-/-} presentan microadenomas. También se han desarrollado un modelo R D2^{-/-} hipófisis específico y un modelo que carece de ambos receptores[14].

Los ratones que sobre expresan GHRH tienen niveles elevados en sangre de GHRH y GH, desarrollan gigantismo y muestran una hiperplasia de somatotropos y en algunos casos de mamosomatotropos. [12]

Los animales transgénicos para CRF exhiben microadenomas y anormalidades endócrinas en el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, con niveles elevados de ACTH y glucocorticoides, cambios en el peso, acumulación de grasa, atrofia muscular, piel de un grosor fino y alopecia tal como lo desarrollan los pacientes del síndrome de Cushing.[15, 16]

Ratas de edad avanzada

Las ratas Sprague-Dawley de edades avanzadas (24-25 meses) y senescentes (33-35 meses) muestran prolactinomas espontáneos acompañados de un aumento en los niveles séricos de prolactina, la cual se correlaciona directamente con el peso de las hipófisis hipofisario.[17]

Células madre en tumores hipofisarios

Las células madre se definen como células que tienen la capacidad de perpetuarse a través de su propia autorrenovación y de generar células progenitoras de un tejido a través de la diferenciación. Las células progenitoras tienen un potencial más restringido, experimentando un limitado número de divisiones celulares y el mantenimiento de la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células solamente del tejido que se originaron.

Las células madre han sido identificadas en estados embrionarios como células totipotenciales capaces de generar todos los tipos celulares que constituyen el tejido desarrollado, mientras que en los tejidos adultos estas células son especializadas, las “células madre adultas o somáticas”. Estas células están envueltas en el mantenimiento y la reparación del tejido, y han sido identificadas en varios tejidos, destacándose las células madre de la medula espinal, el colon y la piel, e incluso en tejidos con baja renovación como lo el cerebro, los pulmones o el tejido mamario.

Las células madre residen en áreas específicas de los tejidos denominados “nichos”, que dan soporte y un microambiente apropiado a las células madre y progenitoras. La interacción de las células madre con sus nichos es crítica para el mantenimiento de las propiedades biológicas y en particular para mantener el

balance entre las células auto-renovantes y las diferenciadas que juegan un rol preponderante en el mantenimiento y la regulación del tejido (Figura 5).

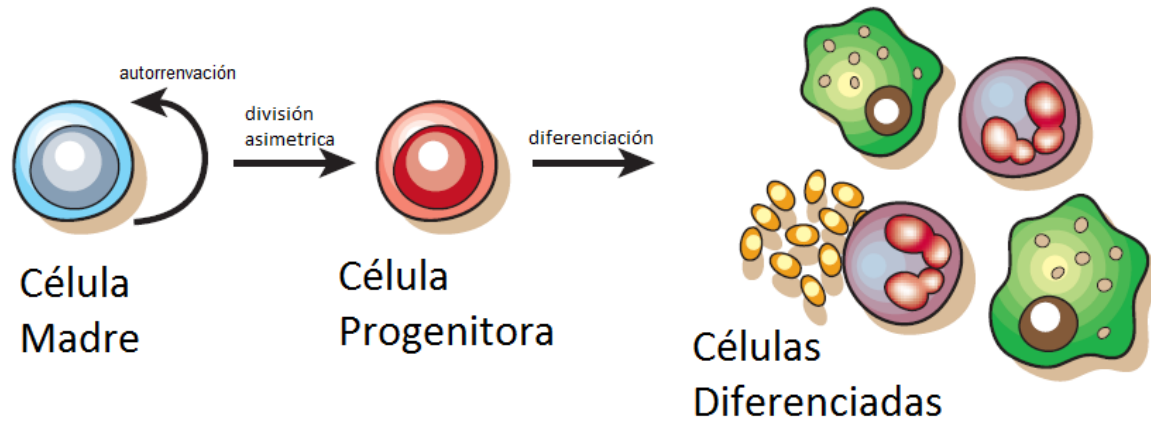


Figura 5. Proceso de autorrenovación de las células madre, la división asimétrica de las células madre que genera células madre y células progenitoras con capacidad de diferenciación limitada y las células diferenciadas específicas de cada tejido. Modificado de [18]

Células madre hipofisarias: En los últimos años diversas poblaciones celulares con propiedades de células “tipo–madre” han sido identificadas y caracterizadas en la hipófisis adulta. Varios estudios reportan la identificación de estas poblaciones, entre las que se destacan la población marginal (side population), las células formadoras de colonias, las células nestina positivas, las células Sox2⁺/Sox9⁻ y las células GPS que reciben su nombre a partir de los marcadores GFRα2 y PROP1 de Stem Cells. La tabla 2 resume las principales características de estas células.

	Población lateral (no Sca ^{alto})	Células formadoras de colonia	Células Nestina ⁺	Células Sox2 ⁺ /Sox9 ⁻	Células GPS
Expresión en la Adenohipófisis (% de las células totales)	40% de la población lateral (población lateral: 1,5% de la población total)	0,2% de las células totales y 12% son células folículo-estrelladas	2% de las células al nacer y hasta 20% en ratones de 5 meses	3-5%	0,90%
Localización	Zona marginal del cleft hipofisario	Coincidente con la distribución de células folículo-estrelladas	Distribución en toda la Adenohipófisis	Zona marginal del cleft hipofisario	Zona marginal
Fenotipo de célula madre	Sca1 (bajo), Nestina, Sox2, PROP1, E-caderina, LHX3	S100, GFAP, Sca1 (40%)	Nestina, Sox2, LHX3	Sox2 ⁺ /Sox9 ⁻ S100 ⁻ Sca1 ⁺ E-caderina ⁺	GFRa2, Sox2, Sox9, E-caderina, β catenina, OCT4, PROP1, S100 (50%)
Fenotipo diferenciado	Sox2 ⁻		Pit1 (pequeña proporción)	Sox2 ⁺ /sox9 ⁺ S100 ⁺ ; E-caderina ⁻	GFRa2 ⁻ OCT4 ⁻ PROP1 ⁻ β-III-tubulina
Expresión hormonal (post diferenciación)	Todas las hormonas hipofisarias	GH (3%)	Todas las hormonas hipofisarias	Todas las hormonas hipofisarias	Todas las hormonas hipofisarias (medios para cada hormona)

Tabla 2. Comparación de las características principales de células propuestas como madre o progenitoras. Modificado de Florio [19].

Células madre tumorales: Todos los tipos tumorales exhiben un patrón heterogéneo respecto a los tipos celulares que lo forman, y se componen por un gran número de células “no iniciadoras de tumor” (la mayor parte de las células del

tumor) y una fracción menor definida por células “iniciadoras del tumor”, denominada “Célula Madre Tumoraes”.

Similar a lo observado en tejido normal, se pueden identificar varias poblaciones celulares en los tumores: células madre de baja tasa de proliferación (células madre tumorales), células precursoras de alta tasa de división, en un estado transitorio, y las células diferenciadas que forman la estructura del tejido tumoral.

Existen actualmente dos teorías respecto al desarrollo tumoral a partir de Células Madre Tumoraes, uno sugiere que son células madre que acumulan diversas mutaciones en proto-oncogenes que dan como resultado un perfil oncogénico, y otra teoría propone que deriva de una serie de modificaciones del microambiente que rodea las células madre (nicho) y conduce a una pérdida del control extrínseco. Una u otra teoría desencadenaría el fenotipo tumoral o cancerígeno, y existe una teoría conciliadora que involucra ambos procesos. [20]

Estrategias Anti-cancerígenas

Las terapias existentes han sido desarrolladas contra las poblaciones preponderantes del tumor debido a que a menudo se identifican por su habilidad de disminuir el tamaño del tumor. Dado que la mayoría de las células tienen un potencial proliferativo limitado, esta habilidad de reducir el tumor mayormente refleja la habilidad de matar estas células.

Parecería que las células madre de los tejidos suelen ser resistentes a la quimioterapia en comparación a las células maduras del mismo tejido. Esta razón

parece estar relacionada con la alta expresión de proteínas anti-apoptóticas o a los transportadores tipo ABC como también a los genes de resistencia a múltiples drogas.

Si se pudiera dirigir la terapia a las Células Madre Tumorales específicamente se esperaría una regresión del tumor y la falta de capacidad de crecimiento o incluso de curar tumores metastásicos.[18]

Estas terapias podrán ser aplicadas en función de la correcta caracterización de las Células Madre Tumorales.

Vía de señalización de Notch

La vía de señalización de Notch participa en una variedad de procesos celulares que incluyen el mantenimiento de células madre, la especificación del destino celular, la diferenciación, la proliferación, la adhesión celular, la migración, la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la apoptosis.[21, 22]

Notch fue identificado en *Drosophila* como un gen involucrado en la neurogénesis, regulando el número de células que adquirirán un potencial neural y posteriormente determinando si la progenie adoptará un destino neural o glial dentro del tejido en diferenciación. [23]

Está reportada la expresión de Notch en diversos tipos de cáncer [21], por lo que su estudio en los tumores hipofisarios podría proveer nuevas estrategias terapéuticas en este tipo de tumores.

En 1914, John S. Dexter reportó la aparición de una muesca (*notches*) en las alas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Figura 6).

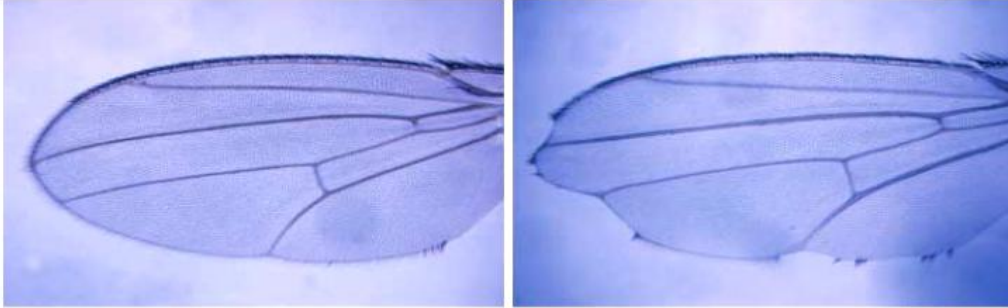


Figura 6. Ala normal *Drosophila melanogaster* (izquierda) y ala defectuosa por alteración en los genes Notch (derecha).

Los grupos de Artavanis-Tsakonas [24] y Young [25] clonaron y expresaron independientemente el gen Notch. A la fecha, se han identificado varios genes del receptor Notch en diversas especies, incluyendo en ratón y en humanos, en las que se conocen cuatro genes que codifican a sus correspondientes proteínas Notch-1 al 4.

Los genes Notch codifican receptores transmembrana de paso único de aproximadamente 300 kDa, cuya estructura está altamente conservada a lo largo del reino animal.[26]

Los productos de cada gen se expresan como un único polipéptido precursor (Figura 7) que es procesado proteolíticamente por una convertasa tipo furina en el aparato de Golgi, dando lugar a un precursor heterodimérico. El receptor procesado es anclado posteriormente en la membrana y se compone de las siguientes subunidades:

1. una subunidad extracelular (EC)

2. un dominio transmembranal (TM) y
3. la región intracitoplásmica (dominio intracelular, NICD).

La región EC contiene varias repeticiones en su secuencia de aminoácidos similares a la del factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), constituyendo las repeticiones 11 y 12 el principal sitio de unión a su ligando proveniente de otra célula.

Cuando el receptor Notch lleva a cabo la unión con su ligando (Jagged1-2 y Delta1, 3 y 4) en otra célula (Figura 7) la subunidad transmembrana es procesada proteolíticamente, liberando el fragmento intracelular (NICD) que trasloca al núcleo e interactúa con factores de transcripción co-activadores de la expresión génica a través del dominio RAM presente en el NICD.

La unión del dominio intracelular a los factores co-activadores se produce mediante el desplazamiento de factores co-represores y el reclutamiento de enzimas histona acetiltransferasa (el complejo CBP-p300), la proteína activadora de la transcripción mastermind (MAML) y la enzima ARN polimerasa (Figura 7). De esta manera el complejo ternario generado es capaz de activar la transcripción de los genes diana de Notch, entre los que se encuentran los factores represores de la transcripción HES y los factores HEY.

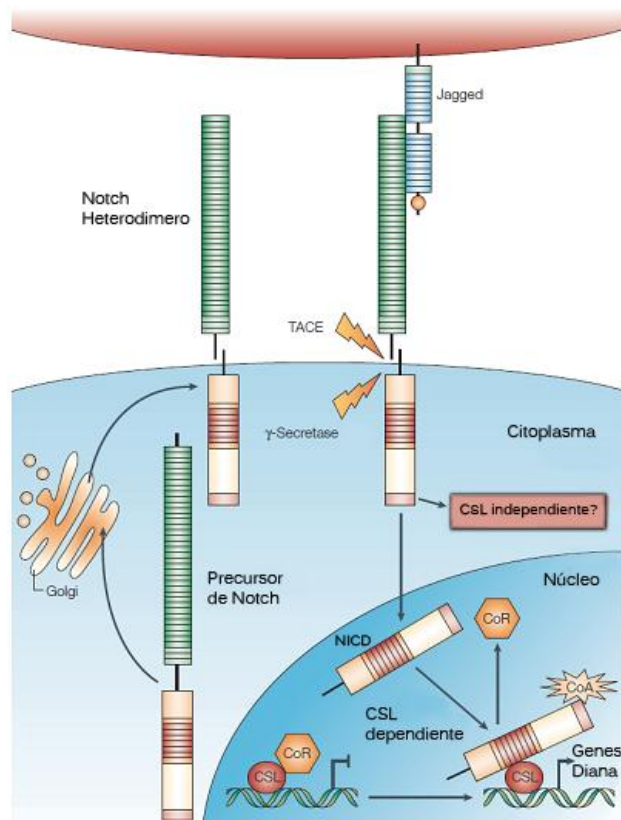


Figura 7. Esquema de la vía de señalización Notch. Modificado de [21] (CSL: factores de transcripción CoR: co-represores, CoA: co-Activadores)

Funciones de Notch

Experimentos en sapos y aves demostraron que la activación constitutiva de Notch aumenta la proporción de células indiferenciadas de la estirpe neuronal, así como también la exposición de jagged1 en células madre hematopoyéticas incrementa la proporción de células madre por sobre las que inician su diferenciación. [27]

De manera interesante, la vía de señalización Notch es capaz de determinar el destino celular entre 2 posibles destinos diferentes, ejemplos son la diferenciación

neurona-epidermis, así como también favorece el desarrollo de células T versus las células B en el timo y la especificación de vasos entre arteria o venas.[27]

Notch en hipófisis

El receptor Notch está activo durante las primeras fases del desarrollo de la hipófisis, como lo indican la expresión de Delta1, Jagged1, Notch2, Notch3, así como los genes activados aguas abajo en la cascada Hes1 y Hey1. [28]

Su expresión disminuye en la hipófisis anterior durante los primeros estadios embrionarios y esto desencadena una señal de compromiso hacia un linaje específico. [29]. En las fases posteriores del desarrollo de la hipófisis, la actividad de Notch se ve drásticamente atenuada, lo que es absolutamente necesario para la diferenciación terminal de las distintas líneas celulares.

La expresión constitutiva de la forma activa de Notch1 bajo los elementos reguladores del gen *Pit1* (*gen que se expresa en forma diferencial durante los estadios tempranos del desarrollo de la hipófisis*) en células del linaje Pit-1⁺ bloquea completamente la diferenciación terminal de los 3 tipos celulares del linaje (tirotrópos, somatotrópos y lactotrópos). Consistente con estos datos, la expresión constitutiva de Notch2 en tirotrópos y gonadotrópos conlleva a defectos en la diferenciación de éstos.[30]

Nestina

Nestina es una proteína componente de los filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto celular, que fue descrito originalmente como un marcador de células madre o progenitoras de neuronas en el sistema nervioso central en desarrollo[31].

Con la diferenciación, Nestina es sustituido por proteínas tejido específico (GFAP, queratinas, neurofilamentos), en consecuencia esta proteína es ampliamente utilizada como un marcador de células madre. Se han detectado altos niveles de expresión de Nestina en las células de linaje oligodendroglial, las células de Sertoli, las células entéricas, las células del folículo del pelo, los podocitos del glomérulo renal, las células estrelladas pancreáticas, los pericitos, el nervio óptico y los odontoblastos[32]. En los organismos adultos, las células que expresan Nestina están restringidas a lugares definidos, en el que puede funcionar como una reserva celular con capacidad de proliferar, diferenciarse y migrar después de la reactivación.

Nestina en condiciones patológicas

En condiciones patológicas, Nestina se expresa en los procesos de reparación en el sistema nervioso, los músculos, el hígado e incluso luego de infarto de miocardio. Además, el aumento de la expresión de Nestina ha sido reportado en diversas células tumorales, incluyendo los tumores del SNC, el cáncer de

páncreas, tumores del estroma gastrointestinal, el cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma maligno, el dermato-fibrosarcoma y tumores de la tiroides En varios tumores se ha documentado que Nestina se asocia con un mal pronóstico [33]

ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es un proceso esencial para que los tumores crezcan y metastatizen.

La angiogénesis es un proceso complejo que implica la proliferación de células endoteliales, la migración, y la anastomosis. Este proceso requiere la acción coordinada de factores de crecimiento y sus receptores, proteínas extracelulares, moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas y se encuentra estrechamente regulado por las condiciones del microambiente específico. Existe cada vez mayor cantidad de evidencia que indica que los estrógenos podrían ser mediadores de la angiogénesis.

Los estrógenos regulan una amplia variedad de eventos celulares mediante la activación de su receptor específico. Los receptores de estrógeno (RE) se sabe que regulan un gran número de genes que afectan a la función vascular. La presencia del RE en las células endoteliales y células musculares lisas que constituyen la pared del vaso sanguíneo y la presencia de la aromatasa, una enzima implicada en la síntesis de estrógenos en las células endoteliales, también

señalan el hecho de que los estrógenos están implicados en la angiogénesis y en la remodelación de los vasos sanguíneos.[34]

Nueva evidencia ha sido presentada en la cual se establece una conexión entre los estrógenos y Notch1 en la remodelación de la vasculatura existente, la formación de la estructura tubular y la progresión del tumor in vitro [34].

La angiogénesis en los tumores malignos (medido por la densidad microvascular o DMV) se correlaciona con factores clínico-patológicos o de supervivencia en carcinoma de pulmón, de ovario, cáncer de esófago, de mama, gástrico, colorrectal, de próstata y melanoma maligno.

Los marcadores CD34, CD31 y el factor VIII de coagulación son los más comúnmente utilizados como marcadores de células endoteliales de los vasos del tumor, y DMV se determina en base a la tinción de los vasos sanguíneos con estos marcadores.

Estos marcadores se expresan en todos los vasos sanguíneos a diferencia de Nestina que sólo lo hace en nuevos vasos sanguíneos, lo que convierte a este último en un marcador de mayor valor para el diagnóstico médico.

Existen investigaciones que muestran que Nestina se expresa en vasos en activa proliferación y con un menor diámetro en tumores cerebrales y colorectales. Lo que lleva a proponer a Nestina como futura diana molecular en la inhibición de la angiogénesis tumoral.[35]

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Investigar el papel que cumplen los receptores Notch y la proteína Nestina en el desarrollo de los tumores hipofisarios humanos y en el modelo de prolactinoma de ratas tratadas con estrógenos.
- Dada la importancia de la angiogénesis en la generación de los tumores sólidos determinar la posible vinculación entre los marcadores Notch y Nestina y la vasculatura tumoral.

Objetivos Específicos

1- RECEPTORES NOTCH 3

- Evaluar el nivel de expresión de los receptores Notch 3 en los prolactinomas de ratas tratadas con estrógenos en forma crónica por inmunohistoquímica y western blot en forma comparativa con hipófisis controles
- Determinar la expresión de Notch3 en distintos tipos de adenomas hipofisarios humanos por inmunohistoquímica

2- RECEPTORES NOTCH 1 Y PROTEÍNA NESTINA

- Determinar la expresión y localización de Notch1 y Nestina en las hipófisis de ratas tratadas con estrógenos y en hipófisis controles por inmunohistoquímica.
- Estudiar el vínculo de Notch1 y Nestina con la angiogénesis de los prolactinomas experimentales a través de la determinación del área vascular, densidad microvascular y tamaño de los vasos

MATERIALES Y METODOS

Modelo de prolactinoma en ratas: Administración crónica de estrógenos.

El modelo animal elegido para el desarrollo de tumores adenohipofisarios fue el de ratas tratadas con dietilestilbestrol (DES), el cual ha sido ampliamente desarrollado en varias cepas de rata ([36, 37]).

Este modelo experimental, en nuestro laboratorio, consiste en la aplicación de un pellet subcutáneo de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES) en hembras adultas de la cepa Sprague Dawley, que induce en alrededor de 4-6 semanas un prolactinoma.

Las ratas utilizadas en los experimentos fueron mantenidas en habitaciones con temperatura estable de 22 °C y luz por periodos de 12 horas (07:00-19:00 Hs).

Se emplearon 3 lotes de ratas para western blot y dos lotes para IHQ con una distribución de controles y tumores según se detalla en la siguiente tabla:

Técnica	Lote	Nº de ratas	
		Control	tratadas con DES
Western Blot	I	5	5
	II	3	3
	III	5	4

IHQ	I	4	3
	II	5	4

Todas las muestras procesadas para western blot fueron sembradas y analizadas mientras que en IHQ se contabilizaron sólo aquellas en las que se lograron las repeticiones necesarias para el análisis estadístico

El implante de los pellets de DES fue realizado bajo anestesia (50 mg/kg ketamina + 10 mg/kg xylazina, intraperitoneal) y consistió en la práctica de una incisión en la zona del lomo y la colocación del pellet de manera subcutánea, luego se cosió la zona del corte para cerrar el lugar del implante. Los controles fueron sometidos a operación pero no se les colocó el pellet (figura 8).

Pasadas las 4 semanas se procede a la decapitación de las ratas y la extracción de la hipófisis para su posterior análisis.



Figura 8. Realización de la incisión en el lomo para la colocación del pellet subcutáneo

Muestras humanas.

Las muestras humanas utilizadas en los análisis fueron obtenidas del servicio de neurocirugía del hospital Santa Lucía con previa firma del correspondiente consentimiento informado del paciente y siguiendo normas del código ético del hospital. Las muestras fueron clasificadas previamente de acuerdo a las hormonas producidas y los datos clínicos, radiológicos y endocrinológicos fueron utilizados para la caracterización adecuada de cada tipo de tumor hipofisario.

Los controles analizados se componen de muestras comerciales de hipófisis humanas normales (BioChain Institute, Inc.) y de muestras quirúrgicas que el servicio de patología del instituto FLENI de la ciudad de ciudad de Buenos Aires diagnosticó como hipófisis normales no tumorales.

Durante la cirugía transesfenoidal el tejido hipofisario tumoral, excedente a la porción que se envía a anatomía patológica, en lugar de ser descartado (como se procede de rutina) fue recolectado en formalina y mantenido a 4°C hasta su inclusión en parafina para nuestros estudios de inmunohistoquímica

Radioinmunoensayo (RIA) de prolactina sérica

Niveles séricos de PRL

Cuando se procedió a la decapitación para la obtención de las hipófisis se adquirió sangre troncal y a partir del suero se realizó la determinación de prolactina por duplicado por RIA.

El protocolo realizado fue el siguiente:

- La curva de concentraciones del estándar de referencia y la dilución de las muestras (10 µl de suero) fue realizada en buffer de ensayo: PBS (buffer fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0,01% azida sódica, pH final de 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA). Tanto los puntos de la curva como las muestras se analizaron por duplicado.

- El primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti-PRL de rata, NHPP-NIDDK, dilución de trabajo 1:100000) y la hormona marcada (aproximadamente 15000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados durante 24 hs.

- Al día siguiente, el segundo anticuerpo (suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo, dilución de trabajo 1:90) fue agregado al ensayo e incubado a 4°C por 24 hs. Luego de esta incubación se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación refrigerada (4°C, Beckman Instruments) a 3000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue aspirado y se midió la radioactividad asociada al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador Hewlett Packard (eficiencia: 82%).

Western Blot

Preparación de las muestras

Las hipófisis de las ratas controles y tratadas con DES fueron procesadas de la siguiente manera:

Se homogenizaron las muestras utilizando un homogenizador manual, sobre hielo en buffer TE (Tris-HCl 60 mM - EDTA 1 mM) a pH 6,8 y con una mezcla de inhibidores de proteasas: fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), TPCK, TAME, ZPCK y TLCK (Sigma, Saint Louis, MO). El volumen de buffer TE con los inhibidores usado fue de 100 μ l de buffer por cada hipófisis. El homogenato se centrifugó a 10.000g durante 10 min a 4°C. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se descartó el pellet. Una alícuota del sobrenadante se separó para la medición del contenido proteico mediante absorbancia directa a 260nm con el espectrómetro Picodrop® (Microlat SRL, Buenos Aires) y el resto se guardó a -20°C para su posterior utilización.

Veinte microlitros (μ l) del sobrenadante conteniendo 30 μ g de proteínas se mezclaron con 5 μ l de buffer de muestra 5X (Tris-HCl 60 mM, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,02%, ditioneitol 50 mM, con pH final 6,8), quedando de esta manera un volumen final de 25 μ l. Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos y luego se enfriaron rápidamente otros 5 minutos antes de sembrarlas en el gel de poliacrilamida.

Separación de proteínas

Se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS 6% y 8% (el porcentaje del gel fue determinado según el peso molecular de la proteína a detectar). Se sembraron las

muestras y los marcadores de peso molecular del rango apropiado (preteñidos y biotinilados). Se realizó la electroforesis en buffer de corrida (Tris base 0,3%, glicina 1,44%, SDS 0,1%, con un pH 8,3) durante 90 minutos (≈ 30 mA, 80V durante 30 minutos y luego 60 minutos más a 100V). Luego de la corrida las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Buenos Aires, Argentina) en buffer de transferencia (glicina 1,4%, Tris Base 0,3% y metanol 20%, pH 8,3) durante 60 minutos en baño de hielo (100 V, ≈ 30 mA).

Western Blot

Las membranas obtenidas de la corrida electroforética se incubaron sucesivamente en agitación con:

- 1) leche en polvo descremada 5% en PBS-Tween (PBS-T) para bloquear los sitios inespecíficos durante 1h.
- 2) el anticuerpo primario diluido en PBST-BSA (PBS-T con el agregado de BSA 1%) entre 2 horas y toda la noche a 4°C.
- 3) el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rabanito diluido en PBST-BSA se incubó durante 2 horas. Luego de cada incubación se lavó 3 veces por 10 min con PBS-T, para eliminar cualquier posible exceso de anticuerpo adherido inespecíficamente en la membrana.

El control negativo se realizó por medio de una incubación sin primer anticuerpo para alguna de las muestras sembradas.

La expresión de β -Actina (proteína de peso molecular ≈ 43 kDa) fue evaluada para confirmar que la cantidad de proteína cargada en las distintas calles fuera equivalente, y los resultados se normalizaron a las bandas de β -Actina (anticuerpo primario anti-actina de ratón, anticuerpo secundario anti-ratón de cabra). Se expresó la relación entre bandas en unidades arbitrarias.

Los pesos moleculares se calcularon a partir de la corrida de marcadores de peso molecular estándares preteñidos y biotinilados. Se reveló por acción de la peroxidasa conjugada a los anticuerpos secundarios mediante una reacción quimioluminiscente a partir de luminol en presencia de agua oxigenada, potenciada por ácido cumárico, y se captó la luminiscencia en placas de revelado AGFA.

Las intensidades de banda se cuantificaron por medio de un escáner y del programa ImageJ (versión 1.44p, National Institute of Health, USA).

Para repetidas incubaciones de una misma membrana con diferentes anticuerpos se realizó una incubación con buffer de stripping (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 100 mM, pH 6,7) durante 20 min a 50°C, con posterior bloqueo de sitios inespecíficos con leche descremada (5%) antes de cada nueva incubación con anticuerpo primario.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Tanto las muestras obtenidas de pacientes como las muestras obtenidas de ratas fueron introducidas en formalina para luego ser incluidas en parafina según el procedimiento que se detalla en el siguiente cuadro:

Deshidratación y Fijación	
Formalina	3 Hs
Alcohol 70°	1 Hs
Alcohol 96°	ON
Alcohol absoluto	2 X 30 min c/u
Xileno	2 X 30 min c/u
Parafina en estufa a 60°C	3 Hs

A partir de los tacos de parafina se realizaron cortes de 4-6 μm con micrótomo.

El protocolo básico que se utilizó en la inmunohistoquímica se resume en la siguiente tabla:

Desparafinización e Hidratación	
Xileno	2 X 10 min c/u
Alcohol Absoluto	10 min
Alcohol 96°	10 min
Alcohol 90°	10 min
Alcohol 70°	10 min

PBS (pH= 7.5)	3 X 10 min c/u
Recuperación Antigénica	
Citrato 10mM pH=6 (Microondas)	Precalentamiento 3 min máxima potencia
	10 min máxima potencia
	20 min enfriamiento
PBS	3 X 10 min c/u
Inhibición de peroxidadas endógenas	
Agua oxigenada 3%	30 min
PBS	3 X 10 min c/u
Bloqueo de sitios inespecíficos	
Leche descremada 5% en PBS	1 hora
PBS	3 X 10 min c/u
Anticuerpo primario	
Incubación con anticuerpo específico	ON 4°C (Cámara Húmeda)
PBS	3 X 10 min c/u
Anticuerpo Secundario	
Incubación con anticuerpo marcado con Biotina	2 Horas
PBS	3 X 10 min c/u
Revelado	
Sistema ABC* (1/50 partes de A + 1/50 partes de B)	30 min
Cromógeno: 5 µl de agua oxigenada por ml de DAB (0,25 ug/ml)	variable dependiendo el marcador (2-10 min)
Agua corriente	10 min
Contra-tinción	
Hematoxilina	Humanos 2 min
	Ratas 1 min
Lavado en agua corriente	

*Sistema Vectastain ABC (complejo avidina-biotina, Laboratorios Vector, CA, USA)
DAB: DiAmino Bencidina. ON= overnigth (toda la noche). PBS= solución buffer de fosfatos.

Anticuerpos utilizados en IHQ y Western Blot

Anticuerpos primarios	Dilución	Reconoce	Hecho en	Laboratorio
Anti- NICD3	1:200	Humanos, ratas	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Notch1	1:100	Humanos, ratas	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Nestina	1:100	Ratas	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-Actina	1:1000	Humanos, Ratas	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpos Secundarios	Dilución	Reconoce	Hecho en	Laboratorio
Anti-Conejo biotina	1:100	Conejo	Cabra	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ratón biotina	1:100	Ratón	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Conejo –HRP	1:6000	Conejo	Cabra	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ratón – HRP	1:4000	Ratón	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Biotina - HRP	1:2000	Humano, Rata		Santa Cruz Biotechnology

Evaluación de parámetros angiogénicos

Las hipófisis obtenidas en los correspondientes tratamientos fueron procesados para microscopía óptica. Se determinaron mediante IHQ los siguientes parámetros angiogénicos:

- Porcentaje de área marcada con Notch1 o Nestina
- Número de vasos marcados por μm^2 (MDV)
- Área promedio de cada vaso marcado
- Porcentaje de tejido marcado por Notch1 o Nestina

1) Área ocupada por vasos

Cuantificación: Se cuantificó el área vascular relativa utilizando cortes histológicos de IHQ para la detección de Notch1 o Nestina combinado con una técnica de análisis de imágenes.

Para la obtención de las imágenes se utilizó una cámara digital Infinity2 o Canon PowerShot G6 acoplada a un microscopio Zeiss Primostar con objetivos de distintos aumentos. Se obtuvieron imágenes de las hipófisis (5 imágenes por sección y al menos 2 secciones de tejido por animal) usando un objetivo de 40X.

Luego, utilizando el programa ImageJ se midieron áreas vasculares (previa fijación de una escala correspondiente al aumento para relacionar los pixeles con μm^2) mediante la delimitación manual al perímetro de cada vaso y luego se calculó el área comprendida por el mismo. Por último, se calculó el área total de la foto analizada. El área vascular relativa se determinó dividiendo el área vascular total (definida como la suma de las áreas de todos los vasos correspondientes a una foto) por el área total de cada foto.

2) Números de vasos por unidad de área (DMV)

La densidad microvascular (DMV) es una de las medidas más utilizadas para el estudio de angiogénesis en distintos tipos de tumores. La DMV está estrechamente relacionada con el comportamiento tumoral, su crecimiento y avance de metástasis en cáncer de pulmón, mama y de vejiga.

La evaluación de la DMV se realizó mediante la detección por IHQ de Notch1 o Nestina.

Cuantificación: Se evaluó el número de vasos por unidad de área, que se determinó dividiendo el número de vasos totales por el área total de cada foto. Finalmente, se calculó el promedio de todos los valores correspondientes a cada animal.

3) Área promedio de cada vaso

La evaluación se realizó mediante la detección por IHQ de Notch1 o Nestina, y se combinó la información obtenida en los puntos 1 y 2.

Cuantificación: Se delimitó manualmente el perímetro de cada vaso y luego se calculó el área comprendida por el mismo. Paralelamente, se cuantificó el número de vasos totales de cada imagen. Por último, el área promedio de cada vaso se determinó dividiendo el área vascular total (definida como la suma de las áreas de todos los vasos correspondientes a una foto) por el número de vasos totales de cada foto. Finalmente, se calculó el promedio de todas las áreas promedio individuales correspondientes a cada animal.

4) Porcentaje de tejido marcado por Notch1 o Nestina

Como medida de la expresión de Notch1 o Nestina se determinó el área marrón (marca de la tinción por DAB en las IHQ practicadas) presente en el tejido.

Cuantificación: utilizando el programa de análisis de imágenes ImageJ se separó mediante el filtro la marca marrón correspondientes a la zona inmunomarcada del resto de los colores presente en las imágenes analizadas. Luego mediante el comando “measure” se le pidió al programa que cuantificara el porcentaje de área marcada sobre el área total del tejido.

Evaluación por inmunohistoquímica de células marcadas.

Ratas tratadas con DES.

Cada hipófisis se evaluó en al menos dos experimentos diferentes. En cada uno de ellos se analizaron tres cortes por cada hipófisis.

A su vez, de cada uno de los cortes utilizados se tomaron y analizaron al menos 5 fotos

Evaluamos la proporción de células positivas para el marcador. La proporción se determinó dividiendo al total de células positivas marcadas sobre el total de células presentes en cada foto y se expresó como porcentaje de células marcadas sobre células totales.

Tumores humanos.

Los tumores humanos presentaron poca uniformidad en el tejido y se optó por determinar el área marrón (marca de la tinción por DAB positivo en las IHQ realizadas) presente en el segmento de tejido. Se expresaron los valores como porcentaje de área marcada sobre el área total.

Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas realizadas en los diferentes ensayos se llevaron a cabo utilizando el programa INFOSTAT (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina[38]). En la leyenda de cada figura de la sección resultados se indican los resultados de las pruebas estadísticas utilizadas.

Se utilizó el test de ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS (AMR) para el análisis de los datos de los niveles de prolactina sérica a lo largo del tratamiento entre los grupos tratados con DES y el control.

Para el análisis de los datos de Notch 3, Nestina y Notch1 se aplicó el test T de Student. Un valor $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

PRIMERA PARTE: Receptores Notch y proteína Nestina en el modelo de prolactinoma de ratas tratadas con Dietilestilbestrol

Desarrollo de Tumores Hipofisarios en Ratas Sprague-Dawley

Las hipófisis se vieron de mayor tamaño, enrojecidas y con forma irregular luego del tratamiento estrogénico crónico de las ratas durante 4 semanas. El tratamiento indujo un aumento del peso adenohipofisario acompañado de hiperprolactinemia (Figuras 9 y 10).

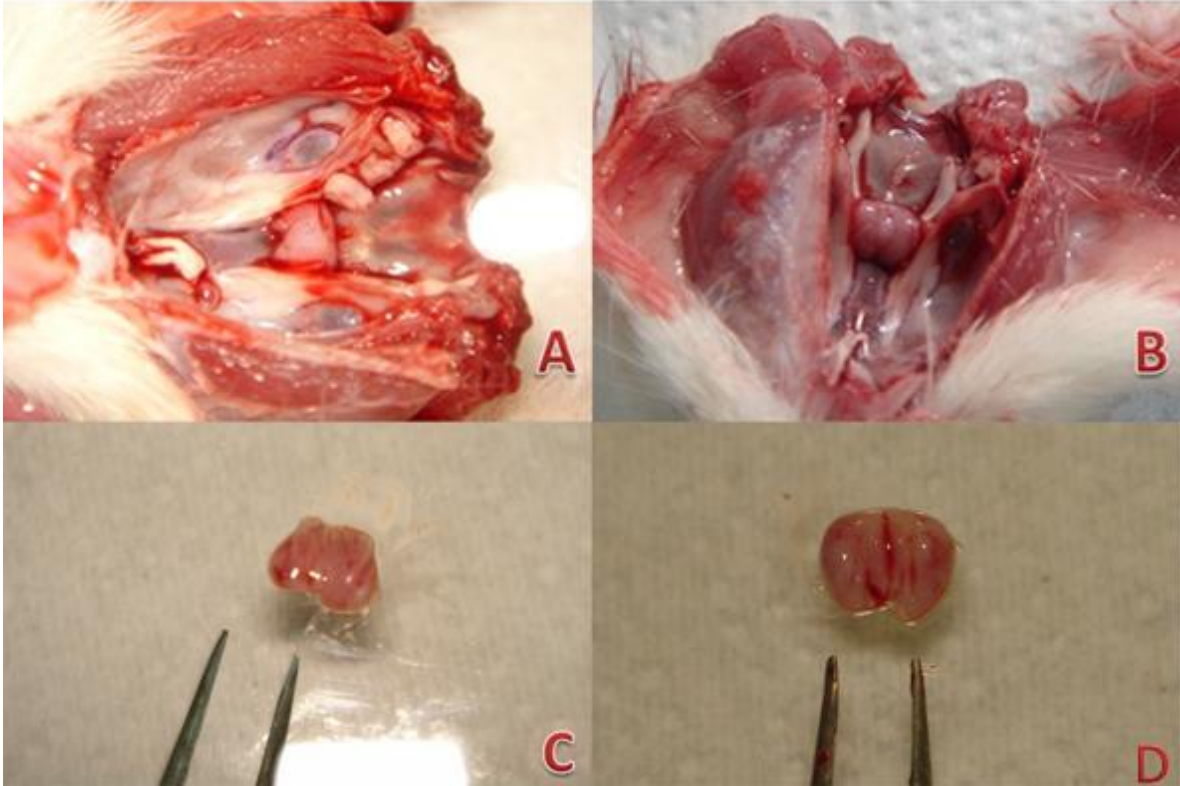


Figura 9. Las imágenes muestran fotos representativas de hipófisis normales de ratas control (A-C) e hipófisis hiperplásicas de ratas tratadas con DES (B-D).

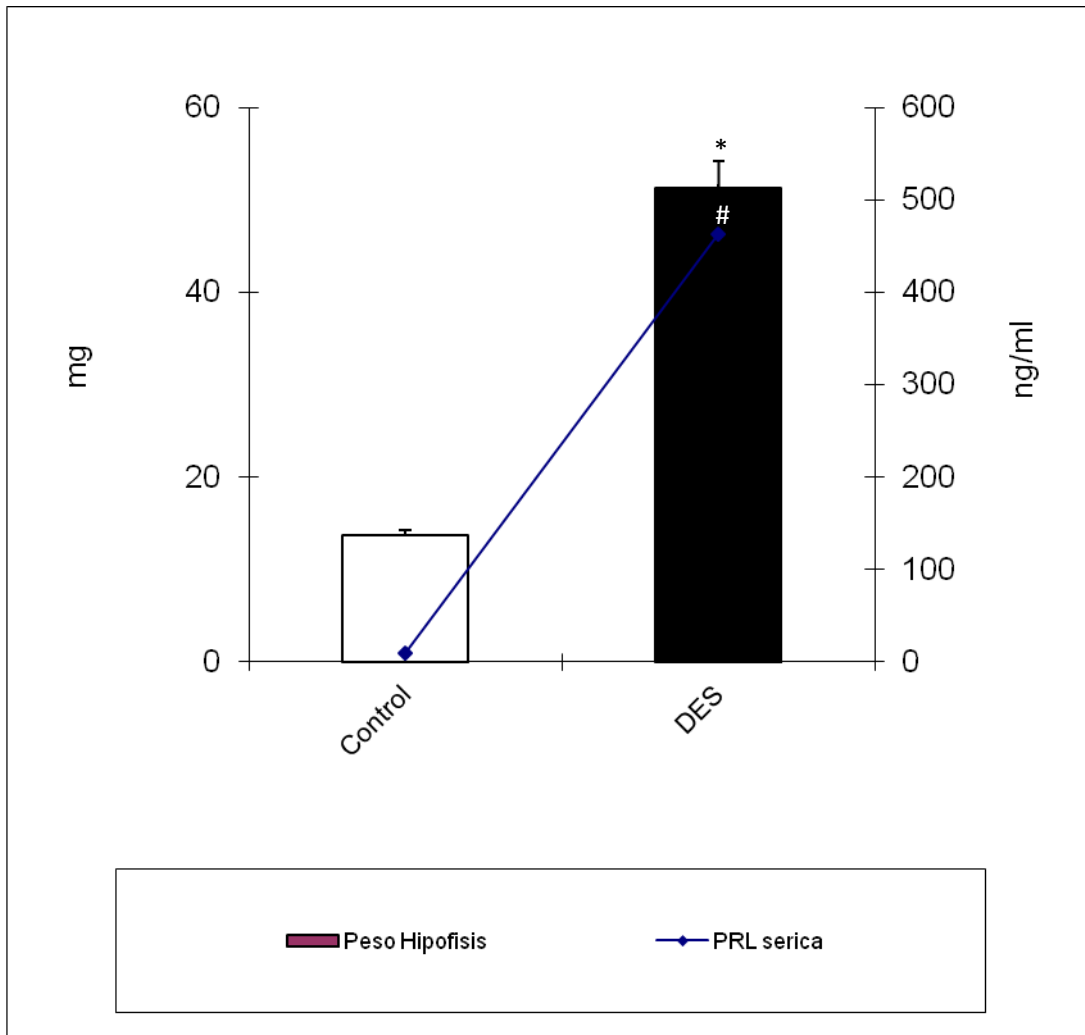


Figura 10. El gráfico muestra en barras el peso de las hipófisis de rata (13.7 ± 0.6 mg y 51.3 ± 3 mg; $n=13$ y 12 para Control y DES, respectivamente $*p<0.01$) y los puntos indican los niveles de Prolactina sérica (9.8 ± 1.4 y 463.4 ± 54.2 ng/ml; $n=13$ y 12 para Control y DES, $\#p<0.01$).

En trabajos previos con la cepa Sprague-Dawley hemos demostrado que en las adenohipófisis de las ratas tratadas con DES se produce una hiperplasia de lactotropos (aumento de la proliferación celular con aumento de la expresión de PCNA), lo que contribuye a la hiperprolactinemia y al aumento del peso

hipofisario.[39] En relación al peso, también tiene la contribución de la hipertrofia que sufren los lactotopos como consecuencia del efecto estrogénico. Para cuantificar esta hipertrofia contamos el número de células totales por campo, ya que si en una misma área del tejido analizada existe un menor número de células, éstas presentarán un mayor tamaño. Determinamos en coincidencia con datos publicados por Lombardero y colaboradores para xenotransplantes en ratas[40], que las hipófisis de las ratas tratadas con DES presentan un menor número de células por campo. (Figura 11)

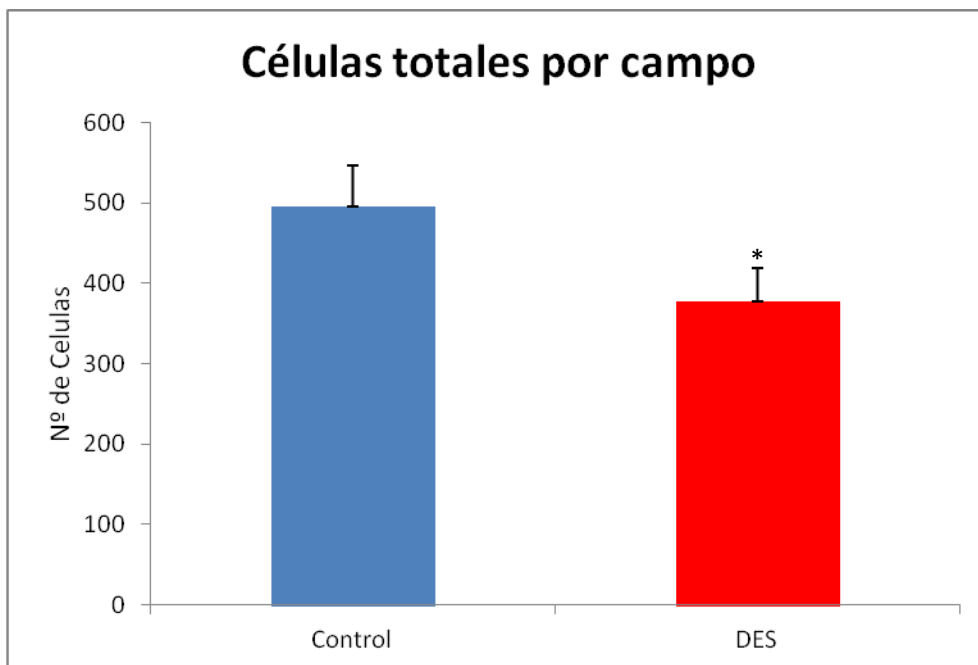


Figura 11. Número de células totales por campo en ratas control y tratadas con DES ($492 \pm 101,2$ y $370 \pm 51,65$ $n= 7$ y 7 , * $p = 0.015$ control vs. DES).

Receptores Notch en hipófisis de ratas tratadas con DES y controles

NOTCH3

Una vez obtenido el modelo experimental de prolactinoma, comenzamos la evaluación de los niveles de expresión de los receptores Notch en hipófisis. Para esto, el tejido adenohipofisario fue procesado para western blot en buffer TE (Tris-HCl 60mM- EDTA 1mM con inhibidores de proteasas). En el homogenato obtenido se cuantificaron las proteínas totales y se sembraron 30 μ gr de proteínas en geles de poliacrilamida para el análisis de la expresión de Notch3 obteniéndose una banda de un peso aproximado de 120 Kilodaltons correspondiente al dominio intracelular del receptor (NICD3). Las membranas se reincubaron con anticuerpo específico para la proteína β -actina como control interno de la carga proteica.

El análisis de la densitometría de las bandas de Notch3 mostró un aumento significativo en el contenido del receptor Notch3 en las hipófisis de las ratas tratadas con DES respecto a las hipófisis controles cuando se relativizaron los valores obtenidos para Notch3 a los de actina para cada muestra y se consideró al promedio de los controles como el 100% (Figura 12)

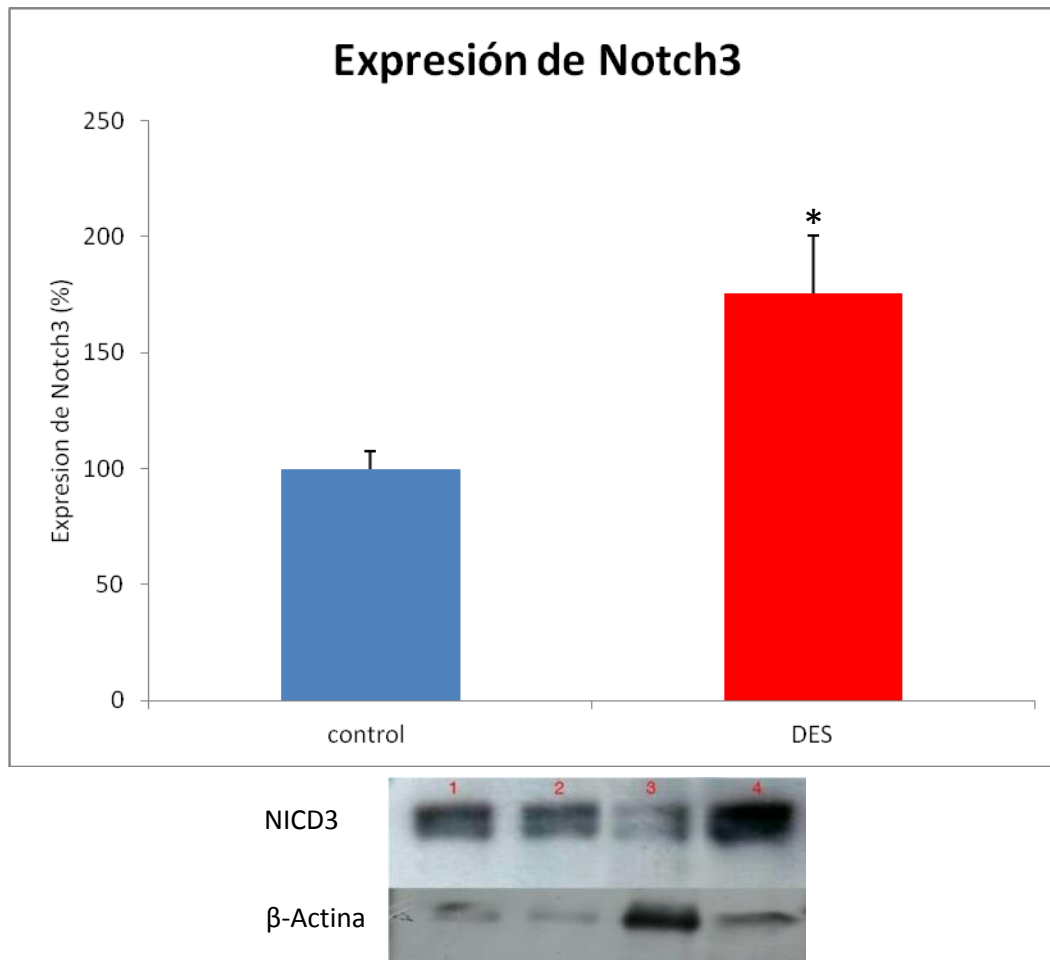


Figura 12. Niveles de expresión de Notch3 determinados por western blot y normalizados con el contenido de β -actina en hipófisis de ratas control y tratadas con DES. El promedio de intensidad de banda en el grupo control se tomó como el 100%. Control: 100 ± 7.55 %; DES: 175.7 ± 24.9 %. * $p < 0,01$ DES vs. Control, $n=13$; 12 en grupo control y DES respectivamente. Las barras indican la media y las barras de error indican el error estándar. En la parte inferior se visualizan las bandas correspondientes al dominio intracelular de Notch3 (NICD3, $PM \approx 120$ KDa) y debajo las de β -actina ($PM \approx 43$ KDa). Calle 1 y 3 controles, calles 2 y 4 ratas DES.

Expresión y localización del receptor Notch3 en cortes histológicos de hipófisis tratadas y controles

Luego analizamos por IHQ la proporción de células que expresan el receptor Notch3 y la localización del mismo.

La cuantificación de células Notch3+ (3.0 ± 0.4 % y 4.8 ± 0.1 % para ratas control y DES respectivamente) mostró que se trata de una población pequeña de células. Por otra parte las proporciones de células Notch3+ resultaron ser estadísticamente diferentes en ratas tratadas y controles, siendo mayores en las hipófisis tumorales (Figura 13).

Debido al clivaje proteolítico y a la translocación nuclear que sufre la porción intracelular de Notch, se analizó la distribución subcelular del mencionado dominio. Sorprendentemente, la marca del NICD3 fue detectada en membrana y en citoplasma pero no en núcleo (Figura 14), y esto podría deberse a que la señalización nuclear dependiente del dominio intracelular es capaz de ocurrir con cantidades muy pequeñas del NICD3 en núcleo, casi indetectables por la técnica de inmunohistoquímica.

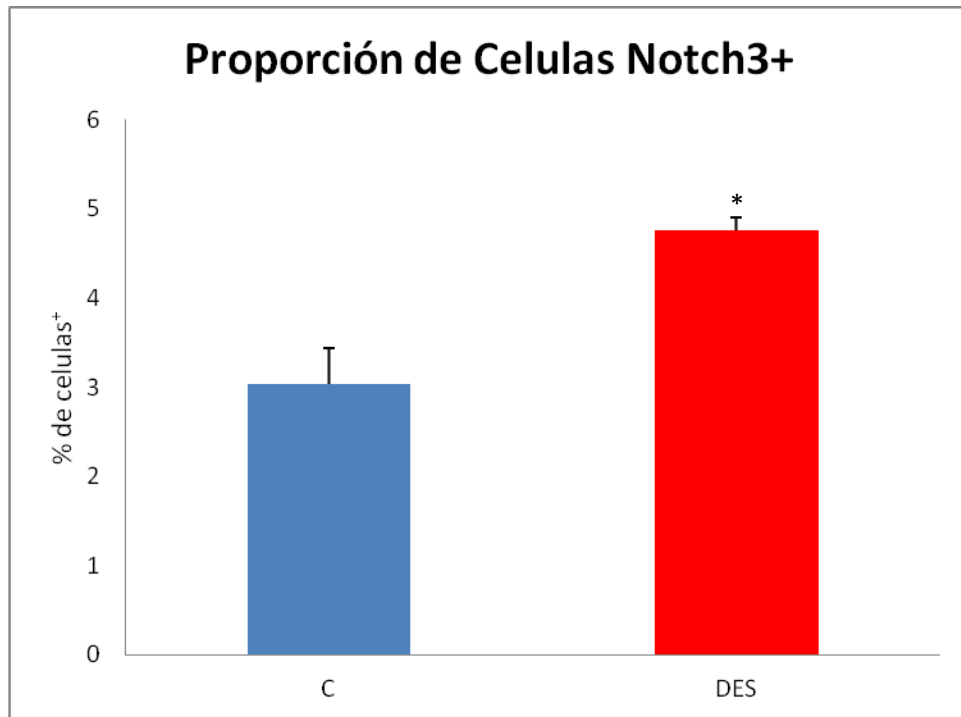


Figura 13. Porcentaje de células Inmunomarcadas con anti-Notch3. Se observó un aumento significativo de la marca en las ratas tratadas con DES respecto al grupo Control. ANOVA, LSD, * $p < 0.01$ DES vs Control, $n = 5$ y 6 en Control y DES respectivamente.

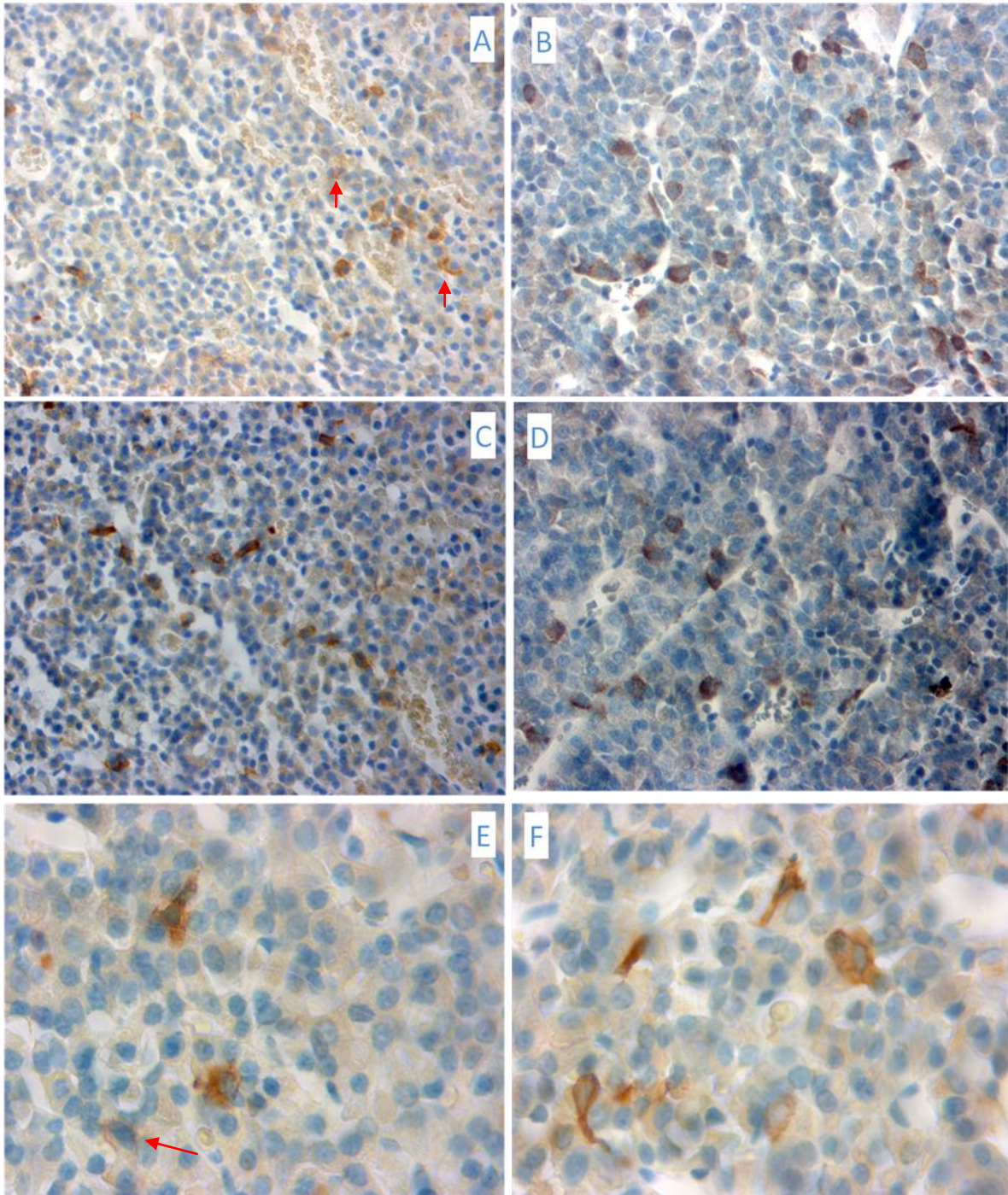


Figura 14. Fotos representativas de Inmunohistoquímica en hipófisis de ratas Control (A, C, E) y tratadas con DES (B, D, F). A y C) ratas control 40X. B y D) ratas tratadas con DES 40X. E) rata control 100X. F) rata DES 100X. Las células positivas se encuentran marcadas con

Diaminobenzidina, y los núcleos están contrateñidos con hematoxilina. La marca localizó en membrana y citoplasma. Las flechas rojas destacan células con tinción en membrana

NOTCH1

Existen 4 genes que codifican los receptores de Notch en mamíferos, Notch1, Notch2, Notch3, and Notch4, los cuales pueden expresarse de manera superpuesta o independiente.

Estudios previos de células adenohipofisarias analizadas por medio de citometría de flujo resaltaron la presencia del receptor Notch1 en una población de células indiferenciadas del tejido de ratón adulto [41]. Dados estos antecedentes y nuestro interés en el estudio de los receptores Notch en el proceso tumoral hipofisario, decidimos seleccionar a Notch1 para su análisis

Analizamos la expresión de Notch1 por inmunohistoquímica y dado que ésta mostró localización de la proteína exclusivamente en los vasos (Figura 19), se decidió estudiar parámetros vinculados a los procesos angiogénicos.

En primer lugar determinamos el número de vasos por mm^2 o densidad microvascular (DMV), donde no hallamos diferencias significativas entre hipófisis estrogenizadas y controles para vasos Notch1+ por unidad de área (Figura 15). De la misma manera al evaluar el área ocupada por estos vasos, o área vascular (expresada como % sobre el área total), no se encontraron diferencias entre hipófisis de ratas controles y tratadas (Figura 16)

En tanto que el área promedio de los vasos evidenció la presencia de vasos más chicos en las hipófisis controles ($68 \pm 16 \mu\text{m}^2$, vasos de un tamaño chico) mientras que para las ratas DES el área promedio duplicó esos valores ($139 \pm 55 \mu\text{m}^2$, vasos de un tamaño promedio grande). Figura 17.

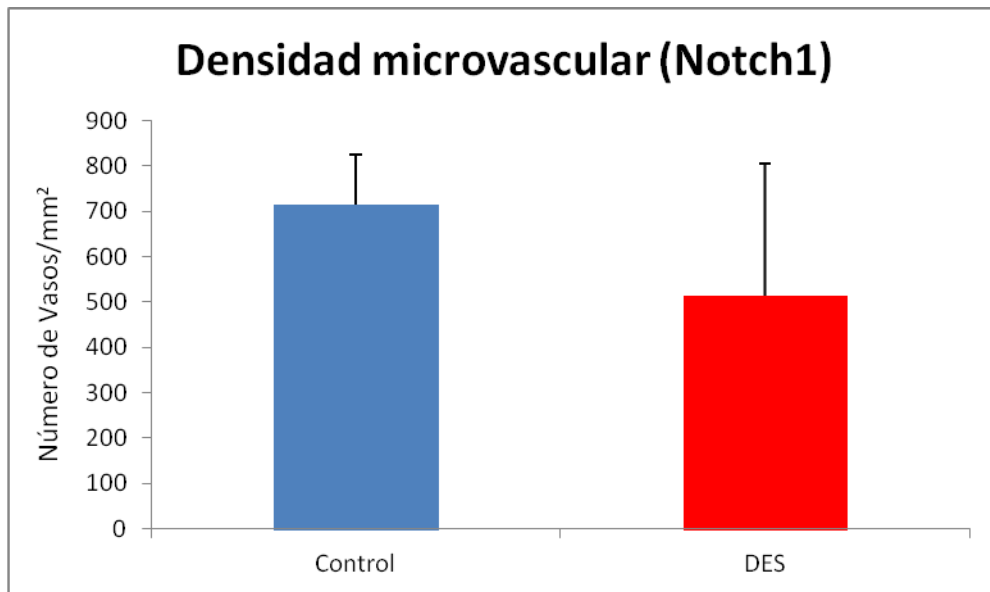


Figura 15. Número de vasos por mm^2 en ratas control y tratadas con DES determinado por inmunohistoquímica. N= 3 y 4 para control y DES respectivamente. NS

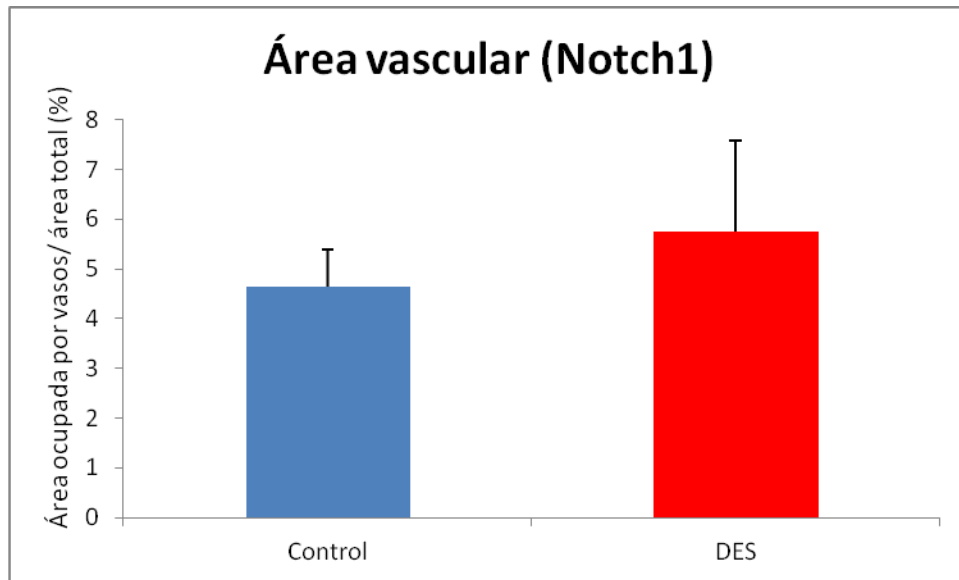


Figura 16. Área vascular (área ocupada por vasos marcados con Notch1 relativizada al área total y expresada como % de la misma) para los grupos control y DES. N=3 y 4. NS

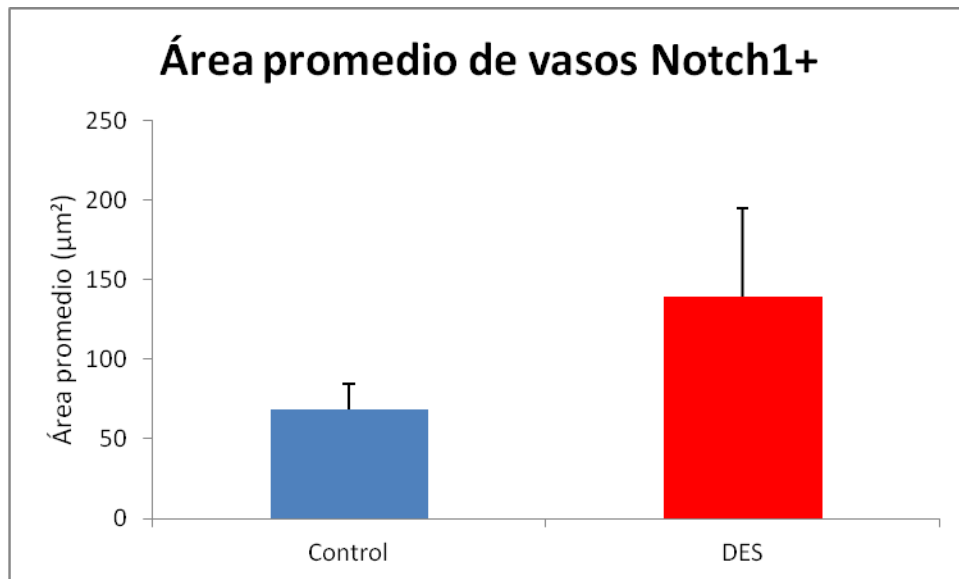


Figura 17. Área promedio de los vasos marcados para Notch1 expresada en μm^2 en hipófisis de ratas control y tratadas con estrógenos. N=3 y 4 para Control y DES respectivamente

Cuando los vasos fueron clasificados en función de su tamaño en chicos y grandes, en ambos grupos se vio un predominio de vasos chicos. No obstante, al focalizar de manera aislada en la proporción de vasos grandes, ésta resultó mayor en las ratas tratadas respecto a las controles (diferencia no significativa) (Figuras 18 y 19).

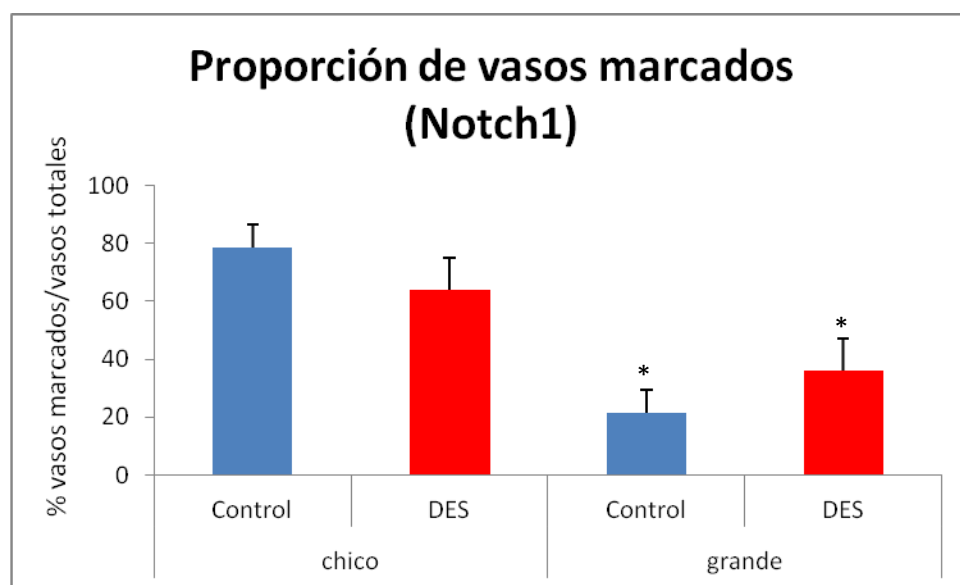


Figura 18. Proporción de vasos marcados. Los vasos cuantificados se clasificaron en chicos y grandes dentro de cada uno de los grupos. N=3,4 control y DES. * $p < 0.05$ vasos chicos respecto a vasos grandes en ambos casos.

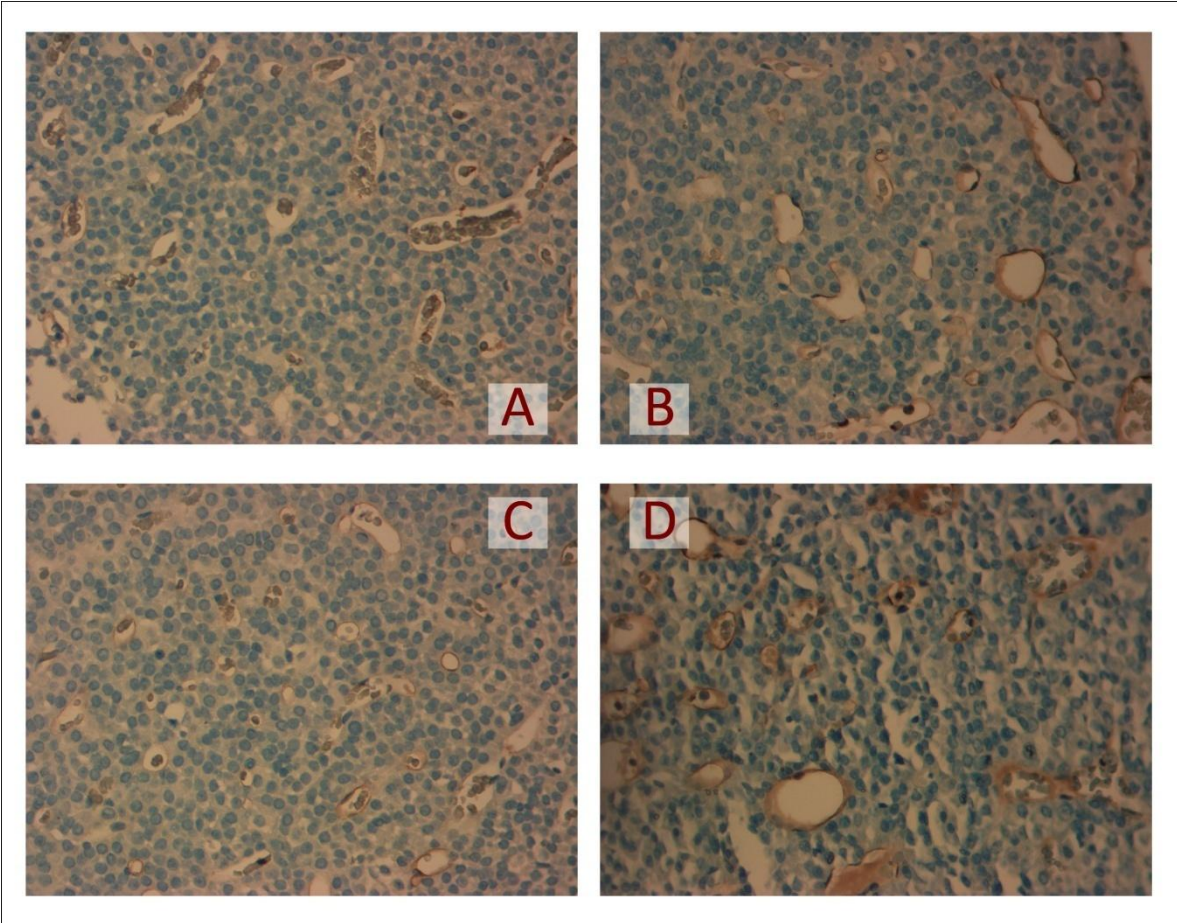


Figura 19. Imágenes representativas de la marcación de vasos con anti- Notch1 en hipófisis controles (A y C) y tratadas con DES (B y D). Los vasos Notch1+ se evidencian en color marrón por la tinción con DAB mientras que los núcleos aparecen azulados por la contratinción con hematoxilina. El aumento utilizado fue de 40X.

NESTINA en hipófisis de ratas tratadas con DES y controles

Nestina ha sido postulado como un marcador de células madre o progenitoras en diversos tejidos normales y en tejidos tumorales. A su vez las células del endotelio vascular también presentan expresión de Nestina y ésta ha sido relacionada con la angiogénesis de distintos tipos de tumores. [35]

Determinamos la expresión de nestina para dilucidar su participación en el proceso tumoral hipofisario inducido por estrógenos. La IHQ para nestina en hipófisis mostró localización de manera exclusiva en la vasculatura (Figura 20 A-D) y, al igual que con Notch1, decidimos por este motivo, evaluar los parámetros de angiogénesis: densidad microvascular, área vascular relativa, área vascular promedio y proporción de vasos chicos y grandes en los dos grupos de animales.

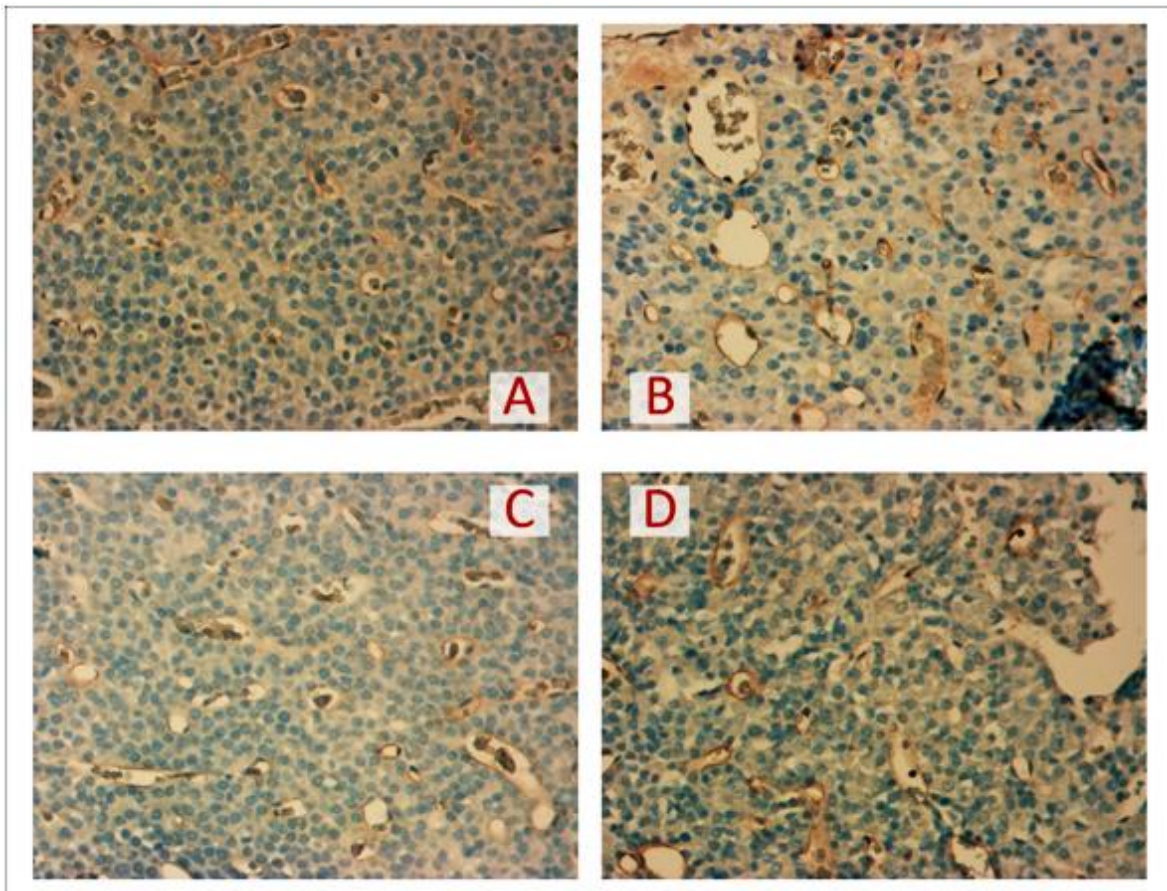


Figura 20. En las imágenes A y C se muestran 2 fotos representativas de la inmunotinción de los vasos por nestina (marrón) en ratas controles, mientras que las imágenes B y D corresponden a ratas tratadas con DES. La contratinción de núcleos se realizó con hematoxilina (azul). El aumento de las fotos utilizadas para contar fue de 40X.

La densidad microvascular, utilizando nestina como marcador de vasos, no mostró diferencias entre las hipófisis controles y las tumorales (Figura 21 A); a su vez el área vascular relativa nestina positiva mostró una tendencia a aumentar en las hipófisis tumorales respecto a los controles, aunque ésta diferencia no llegó a hacerse significativa en términos estadísticos (Figura 21 B).

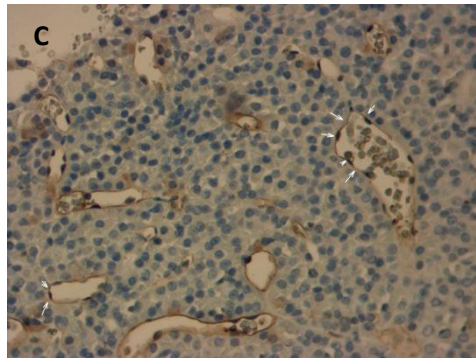
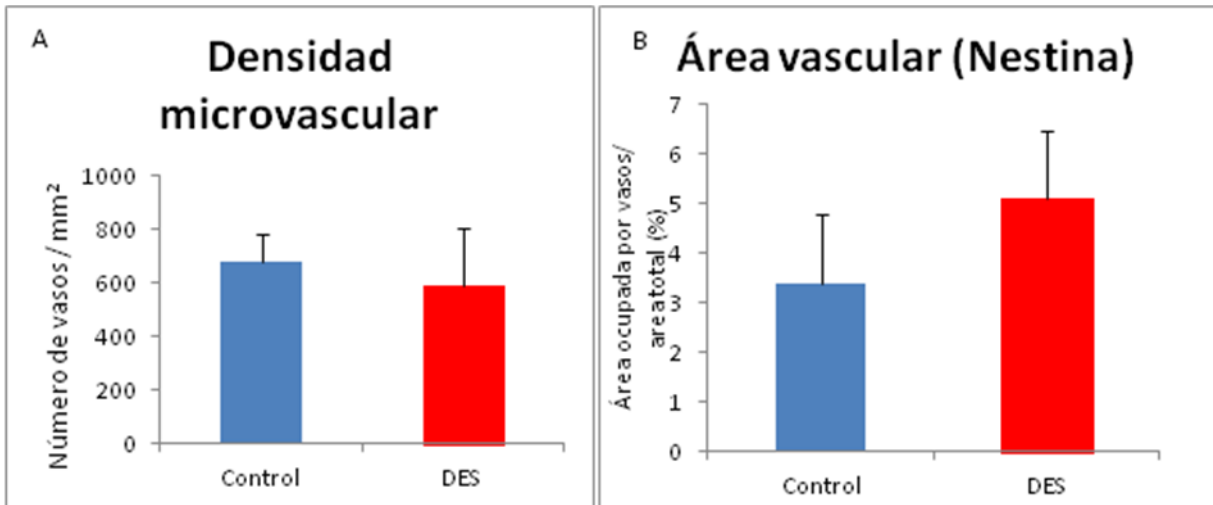


Figura 21. A) Densidad microvascular determinada como número de vasos nestina + / mm². B) Área vascular relativa determinada como área ocupada por vasos nestina + / área total expresada en %. N=2 y 3 para control y DES respectivamente. NS. C) foto representativa de los vasos inmunomarcados con nestina para una rata DES. Las flechas blancas marcan parte del vaso donde la tinción es positiva.

Cuando analizamos el área promedio (nestina+) de los vasos en las hipófisis de las ratas estrogenizadas, determinamos que éstas presentan vasos sanguíneos con áreas significativamente mayores que las controles (57,4±11.6 μm² en controles y 99,0 ±10.1 μm² en tumores) (Figura 22)

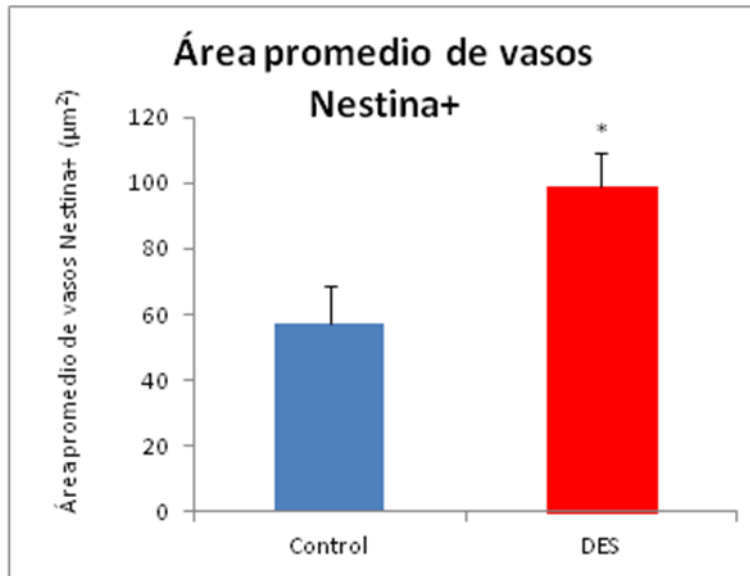


Figura 22. El área promedio de los vasos marcados con nestina (expresada en μm^2) resultó mayor en las hipófisis tumorales respecto a las controles; N=2 y 4 para control y DES respectivamente $p = 0,018$.

Finalmente, clasificamos los vasos nestina positivos según su tamaño en grandes y chicos. Y determinamos que tanto en las hipófisis de las ratas DES como en las controles predominan los vasos chicos (* $p < 0,05$ para grandes vs chicos dentro de cada grupo) pero que la proporción de vasos grandes es significativamente mayor en los prolactinomas (# $p < 0,05$ para vasos grandes en controles vs DES). (Figura 23)

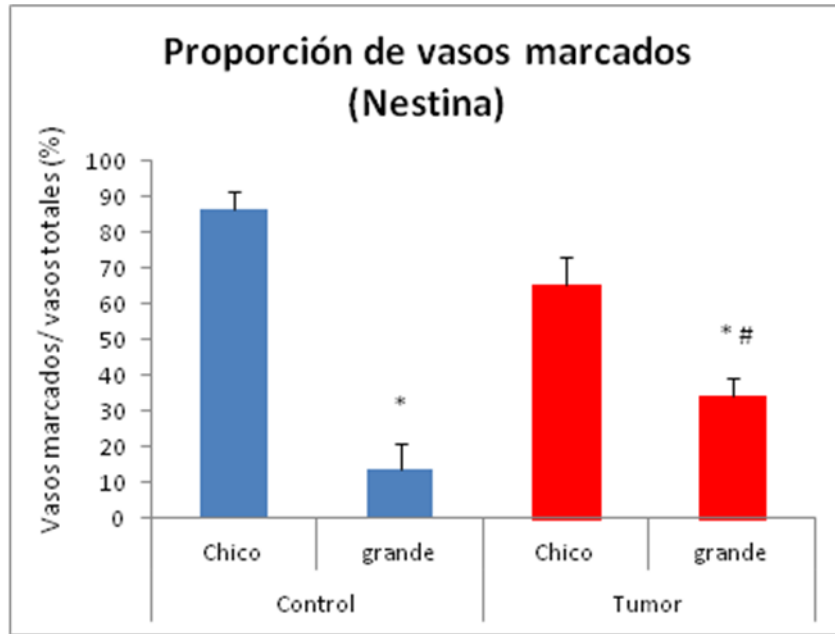


Figura 23. Proporción de vasos según tamaño expresado en % del total de vasos. Los vasos nestina positivos son predominantemente grandes en ambos grupos ^{*}p<0.05 para vasos grandes respecto a vasos chicos dentro del mismo tratamiento. [#]p<0.05 vasos grandes entre tratamientos. N = 2 y 3 para control y DES respectivamente.

Correlación de parámetros angiogénicos con Notch1 y Nestina

La evaluación cuantitativa de los marcadores Notch1 y Nestina permitió estudiar la correlación entre ambos parámetros y se pudo observar que el área Notch1 correlaciona positivamente con el área marcada con Nestina.

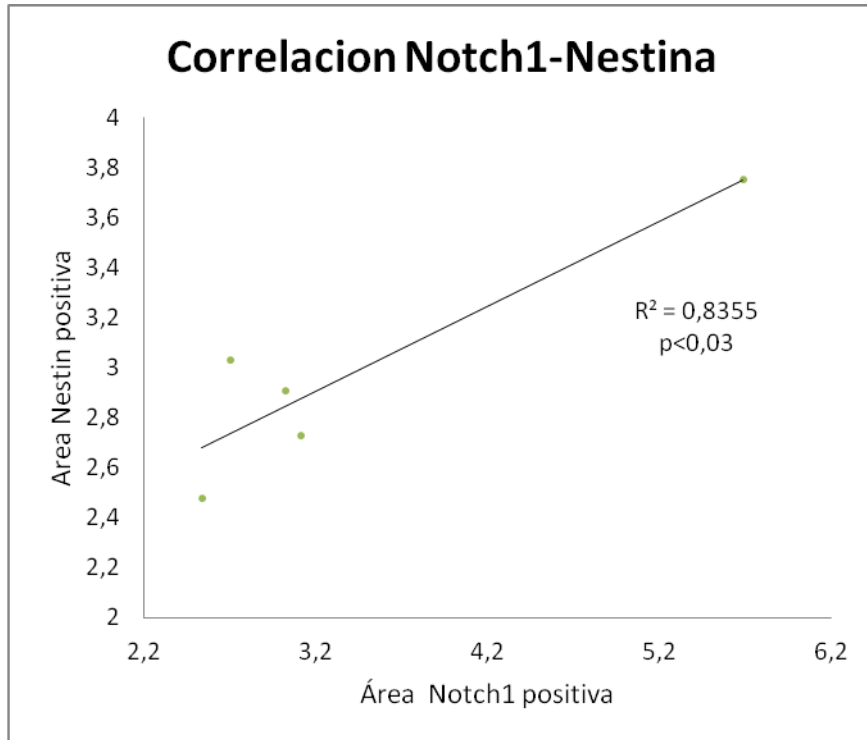


Figura 24. El gráfico muestra la correlación entre el área notch1+ y el área nestina positiva específica. ($r^2=0.966$, $p<0.01$)

Discusión de la PRIMERA PARTE

RECEPTORES NOTCH Y PROTEÍNA NESTINA EN EL MODELO DE PROLACTINOMA DE RATAS TRATADAS CON DES

La tumorigénesis hipofisaria involucra una serie compleja de factores y condiciones, tales como estímulos hormonales, reguladores del ciclo celular, factores de crecimiento y de transcripción y una intrincada red de interacciones entre los diversos efectores de las vías moleculares que median los estímulos mencionados.

A lo largo de las últimas décadas se han desarrollado un gran número de trabajos en distintos modelos animales [10, 13] para el establecimiento de los factores implicados en la patogénesis hipofisaria [5].

En el presente trabajo experimental intentamos dilucidar la participación de los receptores Notch y la proteína Nestina en la tumorigénesis hipofisaria inducida por estrógenos en ratas.

Nuestros resultados muestran que la vía de Notch está implicada en por lo menos dos mecanismos diferentes y complementarios de la tumorigénesis hipofisaria a través de dos de sus receptores, Notch3 y Notch1.

En 2006, Chen y colaboradores [42] hallaron el ARNm mensajero de Notch3 en una sub-población de células de hipófisis de ratón con características de células madre o progenitoras (población marginal). A su vez un estudio por microarray de genes implicados en la vía Notch en tres cepas de ratas tratadas con DES permitieron ver que tanto efectores como mediadores de la vía se encuentran sobreexpresados, mientras que aquellos que regulan negativamente la vía se encuentran subexpresados [43, 44].

Nosotros localizamos la proteína del receptor Notch3, en membrana y citoplasma de células del parénquima hipofisario distribuidas de manera homogénea y en forma aislada a lo largo del tejido y no concentradas en una zona en particular como publicaron Miao et al. [45]. La tinción para Notch3 no mostró marcación inespecífica lo que hizo más sencilla su cuantificación contando el número de células positivas dejando poco margen de error. El número de células positivas para los dos grupos, resultó menor al 5%. Siendo éste sin dudas un número bajo de células, no resulta lo suficientemente bajo como para pensar en la posibilidad de que todas esas células Notch3+ sean células madre. Se desprende por lo tanto de nuestros resultados la necesidad de realizar estudios de inmunohistoquímica doble para determinar si estas células colocalizan con alguna de las células comprometidas en los distintos linajes celulares de la hipófisis y si esto sufre alguna alteración en los tumores generados por tratamiento estrogénico.

El dominio intracelular del receptor una vez clivado debe translocar al núcleo para actuar como factor de transcripción y activar genes diana [26]. El anticuerpo que empleamos detecta el dominio intracelular de Notch3, por lo que su presencia en citoplasma evidenciada por inmunohistoquímica, podría indicar la activación de la vía. En concordancia con este resultado, la banda que detectamos por Western blot de aproximadamente 110 KDa corresponde al fragmento intracelular libre, como ya han publicado otros autores en diferentes tejidos [46].

Sorprendentemente, no detectamos marca nuclear del NICD3 lo que podría deberse a que la señalización nuclear dependiente del dominio intracelular podría ocurrir con cantidades muy pequeñas del NICD3 en núcleo tal y como lo sugirieron Artavanis-Tsakonas [47] y Rakic [48] o, por otro lado, podría deberse a que la proteína es rápidamente degradada en núcleo según describieron Lieber y colaboradores [49].

Por otra parte nuestros resultados muestran que el receptor Notch1 parecería estar vinculado a la angiogénesis en hipófisis ya que hallamos marca específica asociada a la vasculatura hipofisaria en ambos grupos de ratas. En relación a esto, fue reportado previamente que el receptor Notch1 censa los niveles de VEGF y coordina distintos procesos en el entorno del vaso tales como cambios en la matriz extracelular que a su vez, darían lugar a la remodelación del vaso. En las zonas donde se produce la destrucción de la matriz se forma una “punta” o “tip” del nuevo vaso en crecimiento (que expresa Dll4, ligando de Notch) mientras que

en el tallo del vaso en crecimiento estaría actuando Notch1 recibiendo las señales que permiten engrosar el vaso y dar paso a las células endoteliales de este nuevo vaso. [50].

En concordancia con nuestros resultados también, Soares y col. [34] establecieron que Notch1 y su ligando Jagged1 se encuentran involucrados en la angiogénesis mediada por 17β -Estradiol. Los autores determinaron un aumento en la expresión de Notch1 y Jagged1 a nivel de ARNm (por microarray confirmado por RT-PCR) en estudios in vitro en células MCF7 de cáncer de mama y en células endoteliales HUVEC. Describieron además la activación de la vía de señalización de Notch1 en xenotransplantes obtenidos en ratones por inoculación de las células MCF7, en los que observaron un aumento de la neovascularización en el caso de animales tratados con estradiol cuantificado como un aumento de la densidad microvascular de vasos tumorales marcados con CD34. [34]

Lombardero y colaboradores [40] establecieron en hipófisis de ratas estrogenizadas que la proteína nestina se encuentra involucrada en todas las fases del desarrollo vascular vinculándola no sólo a la neovascularización sino también a la remodelación de los vasos en crecimiento. En trabajos previos Banerjee y colaboradores en su trabajo en ratas Fischer tratadas con 17β -Estradiol [37] habían confirmado la relación entre los estrógenos, la neovascularización y la remodelación del endotelio vascular.

Nuestros resultados de Notch1 y Nestina observados a partir de la determinación de la densidad microvascular, y el tamaño de los vasos y su clasificación, reflejan también la participación de ambos marcadores en la angiogénesis de los prolactinomas experimentales inducida por el tratamiento estrogénico.

Podríamos decir, a través de nuestro estudio que el estrógeno podría estar afectando la vasculatura actuando sobre Notch1. La señal estrogénica sumada al aumento de los factores de crecimiento (VEGF, bFGF)[51, 52] permitirían a Nocth1 coordinar una serie de pasos que conducirían a una remodelación del lecho vascular y que incluye la formación de nuevos vasos (que marcan para Nestina) y el aumento del diámetro del vaso.

SEGUNDA PARTE: Receptores Notch3 en Adenomas hipofisarios humanos.

Se analizó por inmunohistoquímica la expresión de los receptores Notch3 en 16 tumores humanos obtenidos de cirugía hipofisaria transesfenoidal por el Servicio de Neurocirugía del Hospital Santa Lucia.

El análisis de inmunohistoquímica también incluyó cortes de hipófisis humana normal (BioChain Institute, Inc.) o provenientes de muestras quirúrgicas donde fue previamente corroborada la naturaleza de tejido hipofisario normal por el servicio patología del Instituto FLENI de la ciudad de Buenos Aires.

Observamos en estos tumores, inmunomarcación específica para el receptor determinando un patrón particular de tinción para cada tipo de tumor hipofisario analizado.

Notch3 en hipófisis normales y adenomas hipofisarios

Hipófisis Normales

De manera coincidente con nuestros resultados en el modelo experimental de ratas tratadas con estrógenos, la inmunotinción en las hipófisis normales mostró localización en la membrana y el citoplasma de las células hipofisarias.

La baja proporción de células marcadas se corresponde con la idea propuesta de que en el tejido hipofisario normal Notch estaría marcando una sub-población de

células que poseerían características de células madre o progenitoras, estas células servirían de reservorio ante las necesidades fisiológicas que afronta la hipófisis, como la proliferación de los lactotrofos durante el embarazo y la lactancia, o la proliferación de somatotrofos durante la pubertad, hechos que demuestran la elevada plasticidad celular de la glándula normal.

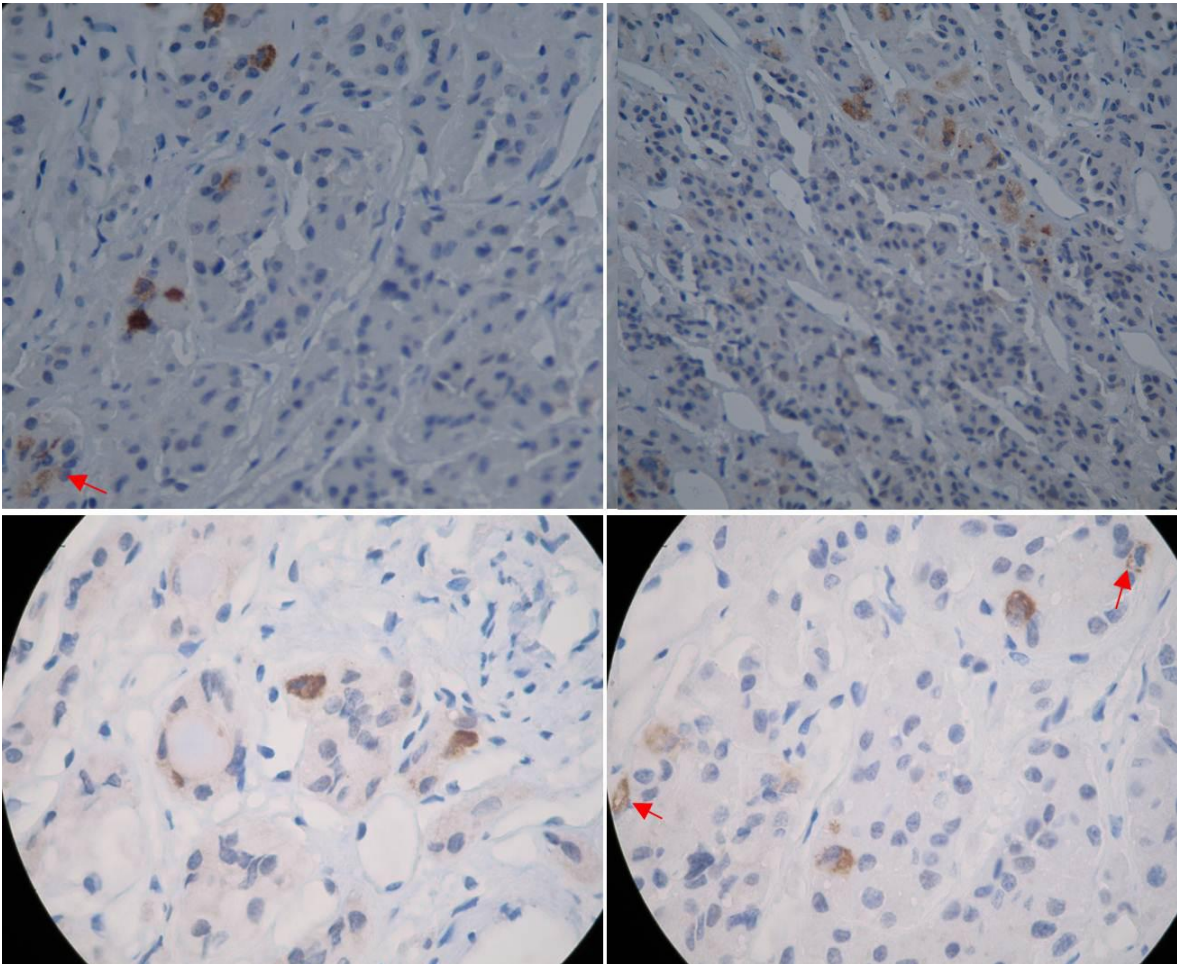


Figura 25. Fotos representativas de la IHQ para Notch3. En marrón se visualizan escasas células distribuidas en el tejido hipofisario normal. (Aumentos: 40x arriba, 100X abajo). Las flechas rojas indican células con marca en la membrana celular. Las imágenes han sido magnificadas desde sus aumentos originales para su mejor visualización.

Hipófisis Tumoraes

Adenomas No Funcionantes

La marca encontrada para Notch3 resultó relativamente escasa, y localizó en membranas y citoplasmas de la misma manera que lo observamos en las hipófisis controles.

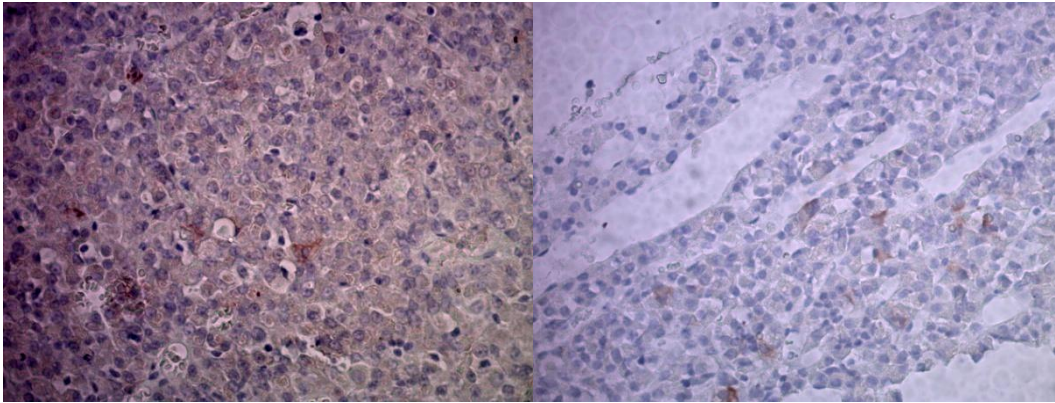


Figura 26. Imágenes representativas de la IHQ para Notch3 en tumores No Funcionantes. en marrón Se visualizan escasas células con marca citoplasmática y de membrana distribuidas en el tejido tumoral. Los núcleos se encuentran contrateñidos con hematoxilina (Aumento: 40x)

Somatotropinomas y Prolactinomas

Los tumores productores de las hormonas hipofisarias GH y PRL, ambos correspondientes a células del linaje Pit-1⁺, mostraron un patrón de tinción para Notch3 similar entre sí. Tanto en los somatotropinomas como en los prolactinomas identificamos células Notch3 positivas ubicadas en retículos de células en los que por lo general sólo algunas de las células resultaron positivas.

De manera interesante, observamos además algunas células binucleadas en gran parte de las muestras analizadas.

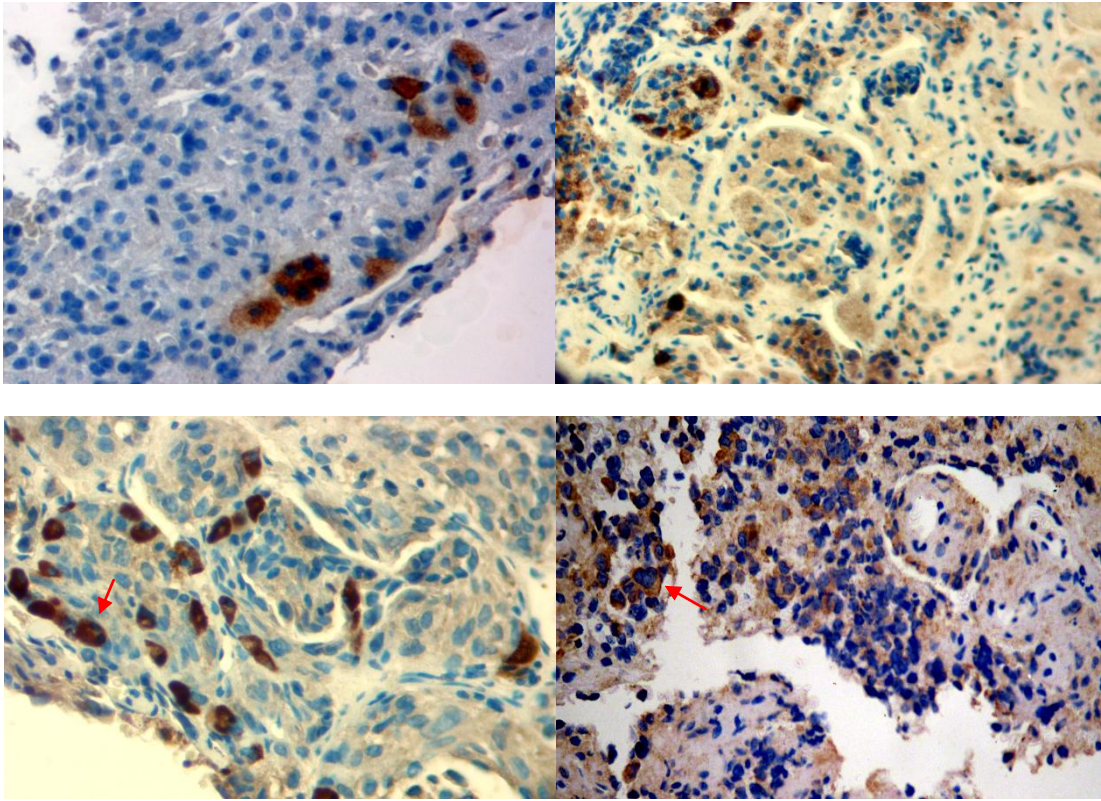


Figura 27. Imágenes representativas de la tinción para Notch3 en hipófisis de tumores secretores de GH (imágenes superiores) y PRL (imágenes inferiores). Las flechas rojas muestran cúmulos de células Notch3+ en las que la marca es intensa y no se evidencian los límites celulares

Adenomas secretores de ACTH.

Los adenomas secretores de ACTH mostraron un patrón significativamente diferente al observado en los demás tipos de tumores analizados.

En los cortes correspondientes a estos tumores pudimos observar una estructura reticular del parénquima tumoral, y hallamos de manera interesante un mayor grado de tinción específica para Notch3 (mayores niveles de expresión de Notch3 respecto a los demás tipos de adenomas) y a su vez las células ubicadas en la parte más externa del retículo mostraron marca más intensa.

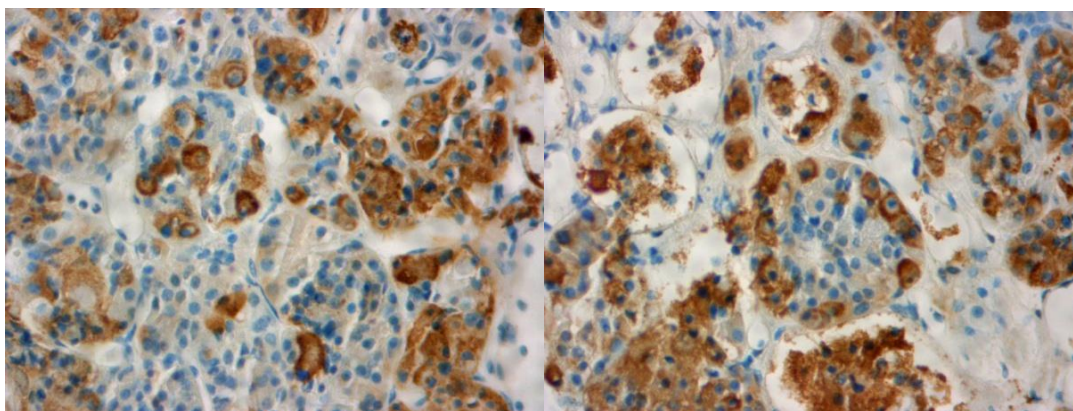


Figura 28. Imágenes representativas de la IHQ para Notch3 en tumores hipofisarios secretores de ACTH. Se visualizan en marrón las células marcadas de forma específica y la distribución particular para este tejido tumoral. En la zona exterior de los retículos se visualizan células con marca más pronunciada (Aumento: 40x).

Análisis Cuantitativo.

Cuantificamos la marca específica de Notch3 en los distintos tipos de adenomas hipofisarios y en las hipófisis normales y la expresamos como el porcentaje de área marcada específicamente para Notch3 respecto al área total. Encontramos que en el grupo de tumores secretores de ACTH la inmunomarcación ocupa una sección del tejido significativamente mayor que en cualquiera de los grupos analizados, tanto tumoral como normal.

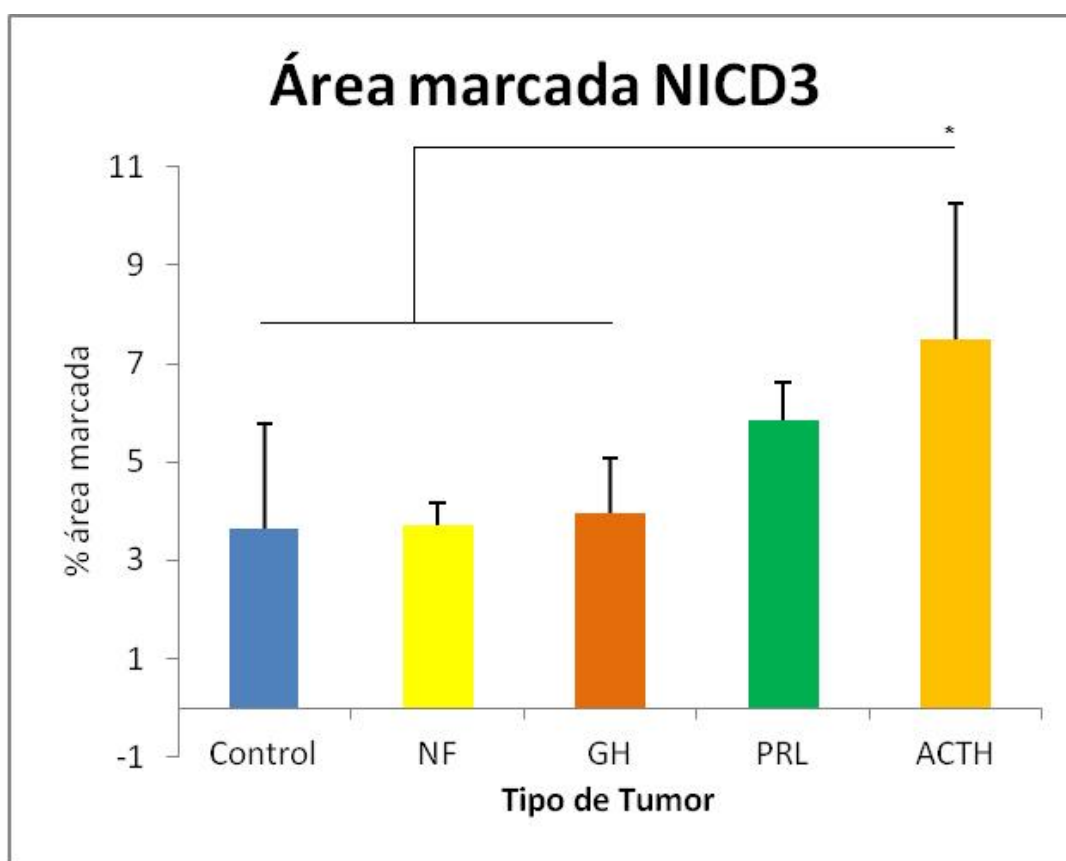


Figura 29. La figura muestra el porcentaje de area marcada para 4 tipos de tumores y los controles analizados. (n= 3, 3,4, 3 y 5 para Control, NF, GH, PRL y ACTH respectivamente. *p<0,05 ACTH vs Control, NF y GH)

Discusión de la SEGUNDA PARTE

EXPRESIÓN DE NOTCH3 EN ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS E HIPÓFISIS NORMALES

La vía Notch está involucrada en el desarrollo hipofisario [29, 30] y en la hipófisis adulta en roedores [42, 53, 54].

Un estudio realizado en pez zebra identificó por medio de ensayos de sobreexpresión e inhibición de Notch que esta vía favorecería el desarrollo de corticotropos y gonadotropos a costa de una pérdida de lactotropos y tirotropos. En cambio los somatotropos se perderían en ausencia de la señal de Notch y no se afectarían cuando Notch es sobre-expresado. Estos datos recalcan la participación de Notch en la determinación del destino celular. [55]

También se ha establecido que tanto el gen POMC como el gen de GnRH poseen elementos reguladores de expresión (cajas E) en sus secuencias regulatorias [56, 57].

Numerosas investigaciones [21, 58] han demostrado que los receptores Notch son los causantes de enfermedades de diverso origen como la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) asociada al receptor Notch1 [59], el cáncer de mama donde fue descubierta la isoforma de Notch4 [60], el síndrome de Alagille vinculado a Notch2 y Jagged1 [61] y CADASIL (Arteriopatía cerebral autosómica

dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía) causada por una acumulación de Notch3 en la membrana plasmática[62].

La sobreexpresión de Notch3 también está reportada para el cáncer de pulmón de células no pequeñas [63]

Nuestros resultados apoyarían la participación de Notch en la tumorigénesis hipofisaria humana, con una especial intervención en el mantenimiento de un subconjunto de células que podrían verse involucradas en la plasticidad de la hipófisis ante las señales emergentes del organismo y con una importancia particular en el desarrollo de los adenomas secretores de ACTH donde Notch3 podría aportar un estímulo para el crecimiento celular en este tipo de tumores.

Del análisis por microarrays llevado a cabo por Morris [64] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS1253>) se puede observar en simultaneo varios genes diferencialmente expresados en tumores hipofisarios no funcionantes (NF) y secretores de ACTH, GH y PRL respecto a hipófisis normales: el ARNm de Notch3, el ligando jagged1, la proteasa que activa a Notch (presenilina2) y la histona acetil transferasa p300 aparecen sobre-expresados, en cambio Notch2 se encuentra sub- expresado al igual que el ligando represor de la vía DLK-1.

En este sentido, nuestros resultados en nuestro grupo de adenomas hipofisarios humanos es coincidente con otros en los que Notch3 aparece diferencialmente

expresado en tumores hipofisarios humanos [43-45] especialmente en no funcionantes y prolactinomas.

Lo intrigante de estos datos se presenta al momento de examinar la expresión de los ARNm de los genes diana de la vía, Hes1, Hey1 y Hey2 los cuales se encuentran sub-expresados [64]. En este sentido Kita y col. [65] establecieron que en ausencia de los genes Hes en ratones doble KO para Hes1 y Hes5, la diferenciación se acelera en el desarrollo de la hipófisis y que estos genes son esenciales para el mantenimiento de las células progenitoras.[65]. En este sentido, en nuestro grupo de tumores nosotros no hallamos marca nuclear que pudiera vincularse con la activación del receptor Notch3, como tampoco la hallamos en los prolactinomas experimentales. Necesitamos realizar más estudios en nuestros casos, como la cuantificación de la expresión de las proteínas diana de Notch3, para confirmar la activación de la vía en la tumorigénesis hipofisaria humana.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES DE LA TESIS

Receptores notch y proteína nestina en la tumorigénesis hipofisaria

En el presente trabajo estudiamos la expresión de los receptores Notch en los tumores hipofisarios generados por estrógenos en ratas y en adenomas hipofisarios humanos provenientes de cirugía, con el objetivo de dilucidar su participación en estos tumores. Por un lado determinamos por inmunohistoquímica elevados niveles de expresión de Notch3 en hipófisis de ratas estrogenizadas, que podrían indicar activación de la vía Notch en la tumorigénesis hipofisaria a pesar de la ausencia de localización nuclear del dominio intracelular del receptor. En concordancia con este resultado y apoyando la hipótesis de la participación de Notch en la generación de los tumores hipofisarios, hallamos mayores niveles de expresión por western blot de la proteína Notch3 en hipófisis DES respecto a controles, determinando una banda de peso molecular correspondiente al dominio intracelular del receptor.

Por su parte, nuestro grupo de adenomas hipofisarios humanos también mostró expresión de Notch3, como reportaran otros autores, enfatizando la importancia de

la vía en la hipófisis y señalando a Notch3 como posible blanco terapéutico. En este sentido, para otros tipos de cáncer se ha demostrado que la expresión aberrante de Notch contribuye a la patogénesis de la enfermedad [28, 33, 62, 65]

En el modelo de prolactinoma de ratas localizamos a Notch1 y Nestina en la vasculatura, como lo han hecho otros autores para otro tipo de tumores [38, 40, 46, 51, 55]. Utilizando como marcadores de vasos sanguíneos a las dos proteínas, determinamos que si bien en los grupos tratados y controles existe un predominio de vasos pequeños, los vasos grandes se encuentran en mayor proporción en las hipófisis tumorales demostrando, como en otros modelos de prolactinomas, que la angiogénesis se asocia a vasos de mayor tamaño y que en nuestro modelo esos vasos expresan la proteína Nestina ya reportado previamente por nosotros para adenomas hipofisarios humanos [66]

En conclusión, se requieren futuros estudios para dilucidar la relevancia de los receptores Notch y la proteína Nestina en la tumorigénesis hipofisaria inducida por estrógenos, como por ejemplo estudios in vitro para análisis de activación de las vías de Notch; combinación de ligandos e inhibidores de la vía en el microambiente tumoral, etc. No obstante, los resultados de la presente tesis resultan en un aporte importante en la búsqueda de los mediadores del efecto estrogénico sobre la angiogénesis y la tumorigénesis hipofisaria.

Abreviaturas utilizadas.

Abreviatura	
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AMR	Anova de medidas repetidas
ANOVA	Análisis de la varianza
BSA	Seroalbumina bovina
Buffer TE	Buffer Tris-EDTA
cAMP	AMP cíclico
CoA	Co-activadores
CoR	Co-represores
CRH	Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa
CSL	Factores de transcripción
DAB	3-3' diaminobencidina
DES	Di etilestilbestrol
DMV	Densidad microvascular
E2	Estradiol
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
FGFs	Factores de crecimiento fibroblasticos
FSH	Hormona Folículo estimulante
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GH	Hormona del Crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofina
HES	Hairy and enhancer of split
HEY	Proteina relacionada a hairy and enhancer of split con un dominio proteico yrpw
Ig-G	Inmunoglobulina g
IHQ	Inmunohistoquímica
LH	Hormona luteinizante
MAML	Mastermind
MEN-1	Menina
NICD	Dominio intracelular de notch (notch intracellular domain)
NICD3	Dominio intracelular de notch3
NS	No significativo

ON	Overnight
PBS	Solucion buffer de fosfatos
PI	Fosfatidil-inositol
Pit-1	Gen asociado a la tumorigénesis hipofisaria
PMSF	Fenil metil sulfonilo
POMC	Pro-opiomelanocortina
PRL	Prolactina
PTTG	Gen transformante de los tumores hipofisarios
RD1	Receptor de Dopamina 1
RD2	Receptor de Dopamina 2
RE	Receptores de estrogenos
RIA	Radioinmunoensayo
R-PRL	Receptor de Prolactina
SDS	Dodecilsulfato sódico
sistema ABC	Complejo avidina-biotina
SNC	Sistema nervioso central
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TM	Transmembrana
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Hormona estimulante de Tiroide

BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton, *Hormonas hipofisarias y su control por el hipotálamo*, in *Tratado de Fisiología Médica* 2011, Elsevier España, S.L.
2. Asa, S.L. and S. Ezzat, *The pathogenesis of pituitary tumors*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 97-126.
3. Seilicovich, A., et al., *Gene therapy for pituitary tumors*. *Curr Gene Ther*, 2005. **5**(6): p. 559-72.
4. Asa, S.L. and S. Ezzat, *The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas*. *Endocr Rev*, 1998. **19**(6): p. 798-827.
5. Heaney, A.P., M. Fernando, and S. Melmed, *Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(2): p. 277-83.
6. Cristina, C., et al., *PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes*. *Mol Cancer*, 2007. **6**: p. 4.
7. Stefanescu, L., *Experimental models of pituitary tumorigenesis*, in *Diagnosis and Management of Pituitary Tumors* 2001.
8. Sarkar, D.K., *Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals*. *Front Horm Res*, 2006. **35**: p. 32-49.
9. Minematsu, T., et al., *Molecular and Histological Studies of Pituitary Tumorigenesis Using Experimental Animal Models*. *ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA*, 2005. **38**(2): p. 87-92.
10. Lloyd, R.V., *Estrogen-induced hyperplasia and neoplasia in the rat anterior pituitary gland. An immunohistochemical study*. *Am J Pathol*, 1983. **113**(2): p. 198-206.
11. Satoh, H., et al., *Invasive pituitary tumors in female F344 rats induced by estradiol dipropionate*. *Toxicol Pathol*, 1997. **25**(5): p. 462-9.
12. Stefanescu, L., et al., *Adenohypophysial changes in mice transgenic for human growth hormone-releasing factor: a histological, immunocytochemical, and electron microscopic investigation*. *Endocrinology*, 1989. **125**(5): p. 2710-8.
13. Kelly, M.A., et al., *Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice*. *Neuron*, 1997. **19**(1): p. 103-13.
14. Schuff, K.G., et al., *Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(7): p. 973-81.
15. Stenzel-Poore, M.P., et al., *Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice*. *Endocrinology*, 1992. **130**(6): p. 3378-86.

16. Helseth, A., et al., *Transgenic mice that develop pituitary tumors. A model for Cushing's disease*. Am J Pathol, 1992. **140**(5): p. 1071-80.
17. Goya, R.G., J.K. Lu, and J. Meites, *Gonadal function in aging rats and its relation to pituitary and mammary pathology*. Mech Ageing Dev, 1990. **56**(1): p. 77-88.
18. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
19. Florio, T., *Adult pituitary stem cells: from pituitary plasticity to adenoma development*. Neuroendocrinology, 2011. **94**(4): p. 265-77.
20. Bomken, S., et al., *Understanding the cancer stem cell*. Br J Cancer, 2010. **103**(4): p. 439-45.
21. Radtke, F. and K. Raj, *The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 756-67.
22. Borggreffe, T. and F. Oswald, *The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(10): p. 1631-46.
23. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
24. Wharton, K.A., et al., *Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats*. Cell, 1985. **43**(3 Pt 2): p. 567-81.
25. Kidd, S., M.R. Kelley, and M.W. Young, *Sequence of the notch locus of Drosophila melanogaster: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(9): p. 3094-108.
26. Fiuza, U.M. and A.M. Arias, *Cell and molecular biology of Notch*. J Endocrinol, 2007. **194**(3): p. 459-74.
27. Bolos, V., J. Grego-Bessa, and J.L. de la Pompa, *Notch signaling in development and cancer*. Endocr Rev, 2007. **28**(3): p. 339-63.
28. Zhu, X., A.S. Gleiberman, and M.G. Rosenfeld, *Molecular Physiology of Pituitary Development: Signaling and Transcriptional Networks*. Physiological Reviews, 2007. **87**(3): p. 933-963.
29. Raetzman, L.T., et al., *Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression*. Dev Biol, 2004. **265**(2): p. 329-40.
30. Zhu, X., et al., *Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(19): p. 2739-53.
31. Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay, *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell, 1990. **60**(4): p. 585-95.
32. Lardon, J., I. Rooman, and L. Bouwens, *Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells*. Histochem Cell Biol, 2002. **117**(6): p. 535-40.

33. Ishiwata, T., Y. Matsuda, and Z. Naito, *Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis*. World J Gastroenterol. **17**(4): p. 409-18.
34. Soares, R., et al., *Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2333-43.
35. Ishiwata, T., Y. Matsuda, and Z. Naito, *Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(4): p. 409-18.
36. Piroli, G.G., et al., *Antagonism by progesterone of diethylstilbestrol-induced pituitary tumorigenesis in Fischer 344 rats: effects on sex steroid receptors and tyrosine hydroxylase mRNA*. Neuroendocrinology, 1996. **63**(6): p. 530-9.
37. Banerjee, S.K., et al., *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, 1997. **18**(6): p. 1155-61.
38. Di Rienzo, J.A., et al., *InfoStat*.
39. Suárez, C., et al., *Angiotensin II phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in rat anterior pituitary cells*. American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism, 2003. **285**(3): p. E645-E653.
40. Lombardero, M., et al., *Effect of estrogen on the blood supply of pituitary autografts in rats*. J Anat, 2009. **214**(2): p. 235-44.
41. Chen, J., et al., *The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics*. Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3985-98.
42. Chen, J., et al., *The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3293-307.
43. Moreno, C.S., et al., *Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses*. Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10214-22.
44. Evans, C.O., et al., *Molecular pathogenesis of human prolactinomas identified by gene expression profiling, RT-qPCR, and proteomic analyses*. Pituitary, 2008. **11**(3): p. 231-45.
45. Miao, Z., et al., *Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours*. J Clin Neurosci, 2012. **19**(1): p. 107-10.
46. Capobianco, A.J., et al., *Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6265-73.
47. Artavanis-Tsakonas, S., K. Matsuno, and M.E. Fortini, *Notch signaling*. Science, 1995. **268**(5208): p. 225-32.
48. Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas, and P. Rakic, *Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling*. Science, 1999. **286**(5440): p. 741-6.
49. Lieber, T., et al., *Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei*. Genes Dev, 1993. **7**(10): p. 1949-65.

50. Hellstrom, M., L.K. Phng, and H. Gerhardt, *VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting*. *Cell Adh Migr*, 2007. **1**(3): p. 133-6.
51. Heaney, A.P., *Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis*. *Journal of Clinical Investigation*, 2002. **109**(2): p. 277-283.
52. Cristina, C., et al., *Increased pituitary vascular endothelial growth factor-a in dopaminergic D2 receptor knockout female mice*. *Endocrinology*, 2005. **146**(7): p. 2952-62.
53. Chen, J., et al., *Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection*. *Stem Cells*, 2009. **27**(5): p. 1182-95.
54. Chen, J., et al., *The Notch Signaling System Is Present in the Postnatal Pituitary: Marked Expression and Regulatory Activity in the Newly Discovered Side Population*. *Molecular Endocrinology*, 2006. **20**(12): p. 3293-3307.
55. Dutta, S., et al., *Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary*. *Developmental Biology*, 2008. **319**(2): p. 248-257.
56. Cherrington, B.D., et al., *NeuroD1 and Mash1 temporally regulate GnRH receptor gene expression in immortalized mouse gonadotrope cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **295**(1-2): p. 106-14.
57. Therrien, M. and J. Drouin, *Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(4): p. 2342-53.
58. Allenspach, E.J., et al., *Notch signaling in cancer*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(5): p. 466-76.
59. Ellisen, L.W., et al., *TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. *Cell*, 1991. **66**(4): p. 649-61.
60. Uyttendaele, H., et al., *Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene*. *Development*, 1996. **122**(7): p. 2251-2259.
61. Ciocca, M. and F. Álvarez, *Síndrome de Alagille*. *Archivos argentinos de pediatría*, 2012. **110**: p. 509-515.
62. Louvi, A., J.F. Arboleda-Velasquez, and S. Artavanis-Tsakonas, *CADASIL: a critical look at a Notch disease*. *Dev Neurosci*, 2006. **28**(1-2): p. 5-12.
63. Dang, L., et al., *Notch3 signaling initiates choroid plexus tumor formation*. *Oncogene*, 2006. **25**(3): p. 487-91.
64. Morris, D.G., et al., *Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis*. *Eur J Endocrinol*, 2005. **153**(1): p. 143-51.
65. Kita, A., et al., *Hes1 and Hes5 control the progenitor pool, intermediate lobe specification, and posterior lobe formation in the pituitary development*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(6): p. 1458-66.