

**BÚSQUEDA DE microARNs TUMORALES COMO BIOMARCADORES DE AGRESIVIDAD EN
TUMORES HIPOFISARIOS**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



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

Licenciada en Genética

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Junín, 7 de Noviembre de 2022

BÚSQUEDA DE microARNs TUMORALES COMO BIOMARCADORES DE AGRESIVIDAD EN
TUMORES HIPOFISARIOS

Trabajo Final de Grado
de la alumna

ERIKA WERNER

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. Agustina Pascual

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

Dra. Ina Sevic

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

Dra. Eleonora Sorianello

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

-

(Nombre y Apellido)
Co-Director/a

Dra. Carolina Cristina

(Nombre y Apellido)
Directora

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

Junín, 7 de Noviembre de 2022

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
GLÁNDULA HIPOFISARIA	5
ADENOHIPÓFISIS.....	5
TUMORES HIPOFISARIOS.....	8
CLASIFICACIÓN	9
PATOGENESIS.....	12
TRATAMIENTOS GENERALES	13
TUMORES HIPOFISARIOS AGRESIVOS.....	14
DETERMINACIÓN DE INVASIVIDAD – GRADOS DE KNOSP.....	17
VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT Y SU ROL EN CÁNCER	21
VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN TUMORES DE HIPÓFISIS.....	25
miARNs.....	26
miARNs Y SU ROL EN CÁNCER	29
miARNs Y SU ROL EN TUMORES HIPOFISARIOS. POSIBLES BIOMARCADORES	30
miARNs: ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS	32
miARNs Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN TUMORES HIPOFISARIOS	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL.....	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS.....	35
SELECCIÓN DE miARNs.....	36
MÉTODO DE DETERMINACIÓN PARA DETECCIÓN DE miARNs y DISEÑO DE PRIMERS.....	37
EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc.....	40
PCR EN TIEMPO REAL.....	42
INMUNOHISTOQUÍMICA	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS.....	45
SELECCIÓN DE miARNs.....	45
EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS.....	46

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y EL TAMAÑO TUMORAL.....	50
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y LA INVASIVIDAD TUMORAL	54
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI-67	58
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y LA RECURRENCIA TUMORAL.....	61
EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS.....	62
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y EL TAMAÑO TUMORAL	64
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y LA INVASIVIDAD TUMORAL	67
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI-67.....	71
RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y LA RECURRENCIA TUMORAL	72
RELACIÓN ENTRE LOS miARNs hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR15b-5p Y LOS ARNm DE LOS GENES <i>CTNNB1</i> , <i>CTNNBIP1</i> Y <i>CCND1</i> DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA EVALUADOS EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS	73
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS	80
DISCUSIÓN	85
CONCLUSIÓN	95
AGRADECIMIENTOS	96
BIBLIOGRAFÍA	97

INTRODUCCIÓN

GLÁNDULA HIPOFISARIA

La hipófisis es una glándula endócrina encargada de la regulación de la homeostasis corporal durante diversos procesos fisiológicos mediante la secreción de hormonas específicas a la circulación sistémica, las cuales ejercen su acción regulatoria sobre otras glándulas (glándulas adrenales, gónadas y tiroides) [1]. Es un órgano intermedio para el intercambio de señales entre el hipotálamo y los órganos periféricos. Se localiza en una pequeña cavidad ósea denominada silla turca; una depresión del hueso esfenoideos en la base del cerebro. Está conectada al hipotálamo por la eminencia media a través del tallo infundibular. La hipófisis se divide en dos lóbulos anatómica y funcionalmente diferentes: la neurohipófisis (o lóbulo posterior) y la adenohipófisis (o lóbulo anterior) (Figura 1); siendo este último el de interés en este trabajo final de grado [2].

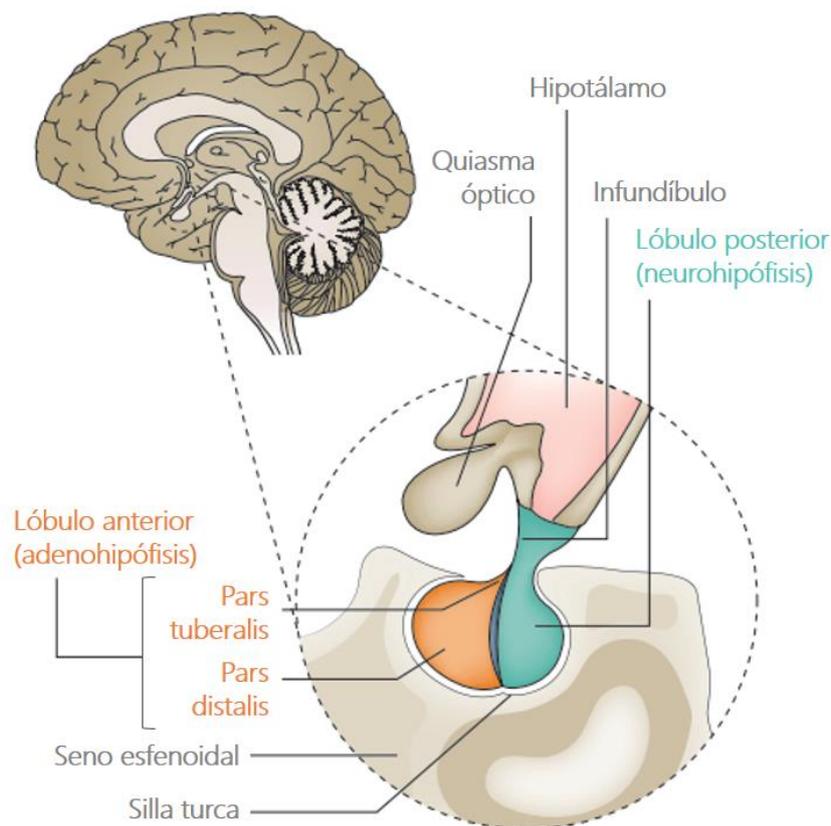


Figura 1 | Localización y anatomía de la glándula hipofisaria. Adaptada de [3].

ADENOHIPOFISIS

La adenohipófisis se divide en tres regiones anatómicas: 1) la pars tuberalis (también conocida como pars infundibularis), una extensión de unas pocas capas de células que rodean la región externa del

tallo hipofisario inferior; 2) la pars intermedia (también conocida como lóbulo intermedio), que está localizada en el área marginal entre la hipófisis anterior y la hipófisis posterior y es rudimentaria en los seres humanos adultos; 3) y la pars distalis, que es la porción más grande de la adenohipófisis (también conocida como lóbulo anterior) y comprende aproximadamente el 80% de la glándula [2].

La hipófisis anterior está constituida por 5 tipos de células endócrinas que secretan diferentes hormonas (Tabla 1):

- Células lactotropas (o lactotropos): secretoras de prolactina (PRL). Representan aproximadamente el 15% de la población celular de la adenohipófisis distribuyéndose en grupos dispersos; aunque un número significativo se encuentra en la porción media-posterior de la glándula.

La secreción de PRL está principalmente regulada por el hipotálamo, siendo la dopamina (DA) su principal inhibidor en animales y humanos; y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) su factor estimulador predominante (los estrógenos y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) también estimulan la secreción de PRL).

- Células gonadotropas (o gonadotropos): secretoras de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo-estimulante (FSH). Constituyen aproximadamente el 10% de la adenohipófisis, y se distribuyen a lo largo de la pars distalis e incluyen la mayor parte de la pars tuberalis. Se encuentran en contacto estrecho con los lactotropos, lo que facilita interacciones parácrinas.

La secreción de LH y FSH está principalmente regulada por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), y además mediante retroalimentación de factores gonadales (estradiol, testosterona, progesterona e inhibina).

- Células tirotropas (o tirotropos): secretoras de hormona estimulante de tiroides (TSH). Representan aproximadamente el 5% de la población celular hipofisaria total, y son comúnmente encontradas en la región anterior-media de la glándula.

La secreción de TSH está positivamente regulada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), y negativamente regulada por retroalimentación de TSH.

- Células somatotropas (o somatotropos): secretoras de la hormona de crecimiento (GH). Constituyen aproximadamente entre el 40-50% de la población celular adenohipofisaria, y se ubican mayormente en las regiones laterales.

La secreción de GH es estimulada por la hormona liberadora de GH (GHRH), e inhibida por la somatostatina (SST) y por retroalimentación negativa del blanco principal de GH, el factor de

crecimiento similar a insulina I (IGF-I). Otros factores reguladores controlan la síntesis y secreción de GH como la grelina, hormona tiroidea, glucocorticoides e insulina.

- Células corticotropas (o corticotropos): secretoras de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Representan aproximadamente entre el 15-20% de las células de la hipófisis anterior, y se encuentran principalmente alrededor de la región mucoide central de la glándula. Estas células producen proopiomelanocortina (POMC) y sus derivados proteolíticos ACTH, MSH, lipotropina (LPH) y endorfinas. La hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la vasopresina son los principales estimuladores de la secreción de ACTH, mientras que los glucocorticoides presentan una acción inhibitoria [2].

Cada uno de estos tipos celulares se origina a partir de una célula progenitora común, la cual se diferencia en respuesta a distintos estímulos [1].

La secreción de hormonas por la adenohipófisis es un proceso estrictamente regulado, influenciado por estímulos fisiológicos y por retroalimentación de los órganos efectores corriente abajo. Las hormonas liberadas por el hipotálamo viajan por el sistema venoso portal a la glándula hipofisaria, donde producen la secreción de hormonas por la adenohipófisis, las cuales ejercen su acción en órganos diana mediante efectos biológicos directos o induciendo la liberación hormonal en estos órganos [1].

Además, hay varios tipos de células no endócrinas, como las células folículoestrelladas (FS), células endoteliales y pericitos. Las células FS representan el 10-15% del total de células hipofisarias. Aunque son células no productoras de hormonas, son la fuente de muchos agentes que controlan el comportamiento de las células circundantes y de la propia glándula. Tienen un papel importante en la integración de las señales en los *loops* autócrinos/parácrinos de la hipófisis anterior [2].

Tabla 1 | Funciones fisiológicas de los distintos ejes endócrinos regulados por la adenohipófisis. Adaptada de [1].

TABLA 1 FUNCIÓN DE LAS HORMONAS DE LA HIPÓFISIS ANTERIOR			
Hormona	Blanco	Efectos en el blanco	Efectos corriente abajo
ACTH	Glándula adrenal	Inducción de la secreción de cortisol	Regulación del metabolismo; resistencia a estrés fisiológico, mantenimiento del tono vascular
GH	Hígado, esqueleto, tejidos blandos	Secreción de IGF-1 (hígado); crecimiento y regulación del metabolismo de nutrientes	IGF-1 es el principal mediador del crecimiento
FSH y LH	Testículos, ovarios	Secreción de testosterona o estrógenos/progesterona	Mantenimiento de: fertilidad, masa corporal magra y densidad ósea
PRL	Mama	Lactancia	—
TSH	Glándula tiroidea	Inducción de la secreción de la hormona tiroidea T4	Regulación del metabolismo

La patología de la glándula hipofisaria es causada principalmente por tumores hipofisarios benignos que pueden resultar en hipersecreción hormonal, deterioro de la función hipofisaria normal o efecto de masa o compresión sobre las estructuras circundantes [1].

TUMORES HIPOFISARIOS

Los tumores hipofisarios se definen tradicionalmente como benignos, sin embargo, exhiben un amplio espectro de comportamientos clínicos que van desde lesiones indolentes estables hasta tumores agresivos, invasivos, complejos de extirpar por cirugía y/o resistentes a la terapia que causan una morbilidad significativa a pesar de no ser metastásicos. Dado que las células productoras de hormonas hipofisarias son miembros de la familia de células neuroendócrinas, actualmente se ha propuesto describir a estas lesiones tumorales como: "tumores hipofisarios neuroendócrinos" o PitNETs [4].

Los tumores hipofisarios representan aproximadamente el 15% de los tumores intracraneales. La prevalencia de los mismos en la población en general ha aumentado a 115 casos por 100.000 habitantes durante las últimas décadas, probablemente como resultado de una mayor conciencia y mejores pruebas hormonales y de diagnóstico por imagen [5].

Estudios que incluyeron tomografías computadas (CT) o imágenes por resonancia magnética (MRI) revelaron que aproximadamente el 20% de las glándulas hipofisarias "normales" albergan una lesión incidental que mide 3 mm de diámetro o más. Estas lesiones se denominan incidentalomas

hipofisarios. Del mismo modo, los estudios de autopsias han indicado que la verdadera prevalencia de los tumores hipofisarios puede ser incluso mayor debido a hallazgos incidentales, ya que la mayoría de estos tumores son pequeños y no secretores de hormonas, por lo que están presentes durante toda la vida sin ser detectados [4].

La prevalencia de los tumores hipofisarios aumenta con la edad, observándose una edad pico de diagnóstico entre los 30 y 60 años. Todos los estudios poblacionales muestran que en las mujeres se presentan a una edad más temprana con una mayor proporción de microadenomas (tumores pequeños) [4].

Los carcinomas hipofisarios son extremadamente raros. Representan menos del 1% de los tumores hipofisarios y por definición son aquellos que muestran metástasis por diseminación craneoespinal o sistémica [6].

CLASIFICACIÓN

Los tumores hipofisarios se clasifican según su tamaño. Los microadenomas tienen menos de 10 mm de diámetro y los macroadenomas son los que superan el límite de los 10 mm. Estos últimos, independientemente del origen celular, pueden afectar estructuras vasculares y neurales paraselares críticas, provocando defectos del campo visual y dolores de cabeza [5].

Los tumores hipofisarios además se clasifican en secretores de hormonas (funcionantes; 46% - 64%) o no secretores de hormonas (no funcionantes; 36% - 54%). A su vez, los tumores funcionantes se clasifican según la hormona que secretan en: prolactinomas (secretores de PRL; 32% - 51%), somatotropinomas (secretores de GH; 9% - 11%), corticotropinomas (secretores de ACTH; 3% - 6%); y tirotropinomas (secretores de TSH) y gonadotropinomas (secretores de FSH y LH) los cuales son muy raros (<1% de los tumores hipofisarios). Si bien los adenomas hipofisarios son típicamente benignos, subyacen a una morbilidad significativa a través del efecto de masa directo sobre las estructuras neurovasculares circundantes y/o la hipersecreción hormonal [7].

En 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS), destacó el papel de los factores de transcripción en la diferenciación del tumor según el linaje celular, en la regulación de la producción hormonal y en la patogénesis de tumores hipofisarios. Por lo tanto, recomendó clasificar a los PitNETs según el linaje celular, en lugar de basarse en la secreción hormonal, y posteriormente categorizar las variantes histológicas según el contenido hormonal y las características histológicas e inmunohistoquímicas específicas [6].

Esto fue sostenido y respaldado en la 5ª edición de la Clasificación de Tumores Endócrinos y Neuroendócrinos por la OMS del año 2022. Entre los principales factores de transcripción se encuentran: PIT-1, que conduce a la diferenciación de somatotropos, lactotropos, mamosomatotropos y tirotropos; T-PIT, que impulsa el linaje de corticotropos; y SF-1, que regula la diferenciación de las células gonadotropas. En la edición anterior de la OMS de 2017, los tumores mamosomatotropos no se clasificaban como un tipo diferenciado, pero en la nueva edición del 2022 asumen una posición de relevancia, al igual que los tumores de células madre acidófilas. La categoría de tumor plurihormonal positivo para PIT1 que se introdujo en 2017 se reemplazó en 2022 por dos PitNETs clínicamente distintos: el tumor inmaduro de linaje PIT1 (anteriormente conocido como tumor silente subtipo 3), y el tumor plurihormonal maduro de linaje PIT1 [8] (Tabla 2).

Tabla 2 | Nueva clasificación de tumores generados en la adenohipófisis, OMS 2022. Adaptada de [8].

Clasificación de los tumores hipofisarios neuroendócrinos (PitNETs) por la OMS (2022)				
Tipo de PitNET	Subtipo	Factores de transcripción	Hormonas	LMWK
<u>PitNETs del linaje PIT1</u>				
Tumor de somatotropos	Tumor de somatotropos densamente granulado	PIT1	GH, subunidad α	Perinuclear
	Tumor de somatotropos escasamente granulado	PIT1	GH	Cuerpos fibrosos (>70%)
Tumor de lactotropos	Tumor de lactotropos escasamente granulado	PIT1, ER α	PRL (en forma de punto paranuclear)	Débil o negativa
	Tumor de lactotropos densamente granulado	PIT1, ER α	PRL (citoplasmática difusa)	Débil o negativa
Tumor de mamosomatotropos		PIT1, ER α	GH (predominante), PRL, subunidad α	Perinuclear
Tumor de tirotropos		PIT1, GATA3	Subunidad α , β TSH	Débil o negativa
Tumor plurihormonal maduro de linaje PIT1		PIT1, ER α , GATA 3	Células tumorales monomórficas con expresión predominante de GH y variable de PRL, β TSH y subunidad α	Perinuclear
Tumor inmaduro de linaje PIT1		PIT1 (ER α , GATA 3)	Células tumorales monomórficas con ausencia de tinción o tinción focal/variable para una o más de GH, PRL, β TSH y/o subunidad α	Focal/Variable

Tumor de células acidófilas		PIT1, ER α	Células tumorales monomórficas con PRL (predominante) y GH (focal/variable)	Cuerpos fibrosos dispersos
Tumor mixto de somatotropos y lactotropos*		PIT1, ER α **	Componente somatotropo del tumor: GH \pm subunidad α dependiendo del subtipo; componente lactotropo del tumor: PRL (difusa o paranuclear dependiendo del subtipo)	Características del subtipo tumoral
<u>PitNETs del linaje TPIT</u>				
Tumor de corticotropos	Tumor de corticotropos densamente granulado	TPIT	ACTH y otros derivados de POMC	Fuerte, siempre difusa
	Tumor de corticotropos escasamente granulado			Variable (con frecuencia difusa)
	Tumor de células de Crooke			Citoplasmática perinuclear en forma de anillo
<u>PitNETs del linaje SF-1</u>				
Tumor de gonadotropos		SF1, ER α , GATA3	Subunidad α , β FHS, β LH, o ninguna	Variable o negativa
<u>PitNETs sin linaje celular diferenciado</u>				
Tumor plurihormonal		Múltiples combinaciones	Múltiples combinaciones en una población celular monomórfica	Variable
Tumor de células nulas		Ninguno	Ninguna	Ninguna
LMWK = citoqueratina de bajo peso molecular; *estos tumores están compuestos por dos poblaciones celulares tumorales morfológica e inmunohistoquímicamente diferentes; **positiva en el componente lactotropo del tumor				

Idealmente, todos los PitNETs deberían someterse a inmunohistoquímica al menos para los tres principales factores de transcripción PIT1, TPIT y SF1; mejor aún, se debería incluir también a ER α y GATA3. La marcación hormonal debería incluir ACTH, GH, PRL, β TSH, β FSH y β LH así como la subunidad α de las hormonas glicoproteicas (α SU) [8].

El enfoque ideal es realizar el panel completo para las proteínas mencionadas; sin embargo, a veces esto no es factible. En esos casos, se propone realizar un enfoque escalonado, comenzando con la marcación de los factores de transcripción hipofisarios, siguiendo con las hormonas que aplican en cada caso según los el/los factor/factores de transcripción identificado/s. Este enfoque es económicamente más rentable y se puede usar cuando se cuenta con muestras pequeñas que pueden no tener suficiente tejido para el estudio del panel completo; no obstante se pueden pasar por alto tumores inusuales que requieren de una evaluación más detallada [8].

En esta 5ª edición 2022, también se recomienda reemplazar el término anterior de “carcinoma hipofisario” utilizado hasta 2017 por “PitNET metastásico” para evitar confusiones con el carcinoma neuroendócrino (NEC), ya que éste corresponde a una neoplasia neuroendócrina epitelial pobremente diferenciada, y debido a que los PitNETs pueden metastatizar y las lesiones metastásicas por lo general no presentan una diferenciación pobre, no existe razón para utilizar el término “carcinoma”. En cambio, ahora se pueden clasificar los PitNETs como lesiones primarias y metastásicas [8].

PATOGÉNESIS

Los tumores hipofisarios son monoclonales, ya que surgen de la expansión de una célula precursora que posee una ventaja proliferativa única [9]. Se han implicado varios factores etiológicos en la patogénesis de estos tumores, y debido a la gran variabilidad de comportamientos que presentan, es probable que interactúen varios de ellos para iniciar la transformación y promover la proliferación de células tumorales [10].

Los factores que se sabe que contribuyen al inicio y proliferación de neoplasias hipofisarias incluyen condiciones hormonales y mecanismos de retroalimentación, factores de crecimiento, activación de oncogenes, reguladores del ciclo celular y genes supresores de tumores. Sin embargo, se ha demostrado que las mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes presentes comúnmente en otros tumores no están involucradas en el desarrollo de los adenomas hipofisarios [11].

La glándula hipofisaria se encuentra regulada por mecanismos de retroalimentación complejos generados por las hormonas hipotalámicas y los órganos diana, que están estrictamente controlados para mantener la homeostasis endócrina. Por lo tanto, patologías externas que conduzcan a una sobreestimulación hormonal o a una alteración de los mecanismos de retroalimentación negativos, pueden ser la base de la patogenia de los tumores hipofisarios [10].

Varias líneas de evidencia apuntan también a la participación de células progenitoras hipofisarias, con características de células madre, que pueden dar lugar a adenomas hipofisarios [9], [12].

Se han encontrado diversos factores reguladores del ciclo celular alterados en distintos tipos de tumores hipofisarios, como por ejemplo: Rb (inhibe el ciclo celular e impide la replicación del ADN dañado), p21-p27 (inhibidores universales de quinasas dependientes de ciclina, CDKI; por lo que inhiben la fosforilación e inactivación de pRb) y *PTTG1* (codifica una securina importante en el intercambio de cromátidas hermanas durante la metafase en mamíferos) [9], [11]. También se han detectado irregularidades en las vías de señalización celular; aproximadamente el 40% de los somatotropinomas presentan mutaciones en *GNAS*, que codifica para la subunidad alfa de la proteína G, esto da lugar a niveles elevados de AMPc e hipersecreción de GH [4], [9]. Por otra parte, varios factores de crecimiento y/o sus receptores, incluidos miembros de las familias de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), NGF (factores de crecimiento nervioso), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), TGF β (factor de crecimiento transformante beta) o las vías de señalización Akt y WNT han sido implicados en la tumorigénesis

hipofisaria. Proteínas reguladoras de la transcripción también han sido relacionadas a la patogénesis de los tumores hipofisarios, por ejemplo, la sobreexpresión de la proteína HMGA2 en ratones transgénicos, resulta en la formación de prolactinomas y somatotropinomas, mediada por un aumento en la actividad del factor de transcripción E2F. Se ha detectado sobreexpresión de *HMGA2* en algunos prolactinomas humanos y tumores no funcionantes. *HMGA1* también se encuentra sobreexpresado en adenomas hipofisarios [9], [11].

Si bien la mayoría de los tumores hipofisarios son esporádicos, cerca del 5% del total de los tumores hipofisarios surgen como componentes de síndromes tumorales familiares [9], [11]. Por ejemplo, la neoplasia endocrina múltiple tipo I es un síndrome autosómico dominante causado por mutaciones inactivadoras de *MEN1*. El síndrome conduce al desarrollo de neoplasias en las glándulas paratiroidea, pancreática e hipofisaria. Los tumores hipofisarios pueden incluir prolactinomas, acromegalia, síndrome de Cushing o, muy raramente, adenomas secretores de TSH [9], [10].

TRATAMIENTOS GENERALES

El diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz son fundamentales para reducir la morbilidad y minimizar la mortalidad. Las estrategias de tratamiento se adaptan al subtipo específico de tumor y pueden incluir la resección quirúrgica, terapia farmacológica y/o radioterapia [7].

- Cirugía transesfenoidal → Representa la ruta menos traumática de acceso quirúrgico a la glándula hipofisaria, con menor morbilidad y mortalidad, llevándose a cabo en el 97% de las cirugías para la resección de adenomas hipofisarios [13], [14]. Generalmente está indicada para macroadenomas y aquellos tumores que presentan extensión extraselar o que comprimen estructuras adyacentes, así como para el crecimiento tumoral persistente, especialmente si la visión está comprometida o amenazada [5]. El enfoque transcraneal actualmente se utiliza en un pequeño porcentaje de cirugías, indicándose únicamente para la resección de tumores hipofisarios con amplia extensión supraselar y paraselar [14].

La resección quirúrgica tiene como objetivo normalizar la hipersecreción hormonal cuando está presente, eliminar la masa tumoral y el riesgo de recurrencia, y al mismo tiempo preservar la función hipofisaria normal y las estructuras neurales circundantes [15].

En el post-operatorio, se puede desarrollar hipopituitarismo (insuficiencia hipofisaria), al igual que diabetes insípida y pérdidas de líquido cefalorraquídeo. Aproximadamente el 10% de los pacientes tienen una recurrencia durante un período de 10 años después de la cirugía [5].

- Tratamiento farmacológico → En el caso de los tumores hipofisarios funcionantes, los tratamientos farmacológicos que inhiben la secreción de hormonas hipofisarias o la respuesta de los órganos diana pueden ser un paradigma de tratamiento temporal o indefinido eficaz. Este tratamiento médico no es invasivo y no conlleva los riesgos anatómicos y potencialmente permanentes de la cirugía o la radiación. Sin embargo, a excepción de los prolactinomas, es poco probable que la terapia farmacológica erradique el tumor y dé como resultado una cura permanente; cuando es eficaz generalmente proporciona control bioquímico. Los riesgos de esta terapia son específicos del medicamento que se utiliza, el cual varía en cada uno de los tipos de tumores hipofisarios [7].
- Radioterapia → Se utiliza generalmente en pacientes que no logran una reducción adecuada del tamaño tumoral y/o de la hipersecreción hormonal en respuesta a la cirugía, terapia farmacológica o ambas [15], [16]. También se la puede emplear como tratamiento adyuvante para los tumores hipofisarios en casos de resección incompleta (por ejemplo, si el tumor está invadiendo el seno cavernoso), en casos de tumores invasivos/agresivos, o incluso para evitar la recurrencia a largo plazo después de la cirugía [14], [15].

Actualmente, puede ser administrada por medio de técnicas convencionales de haz externo (EBT), o mediante radiocirugía estereotáxica (SRS). La opción radioterapéutica más adecuada debe establecerse según la historia clínica de cada paciente [15]–[17].

El crecimiento tumoral suele detenerse durante un período de varios años mientras que la hipersecreción hormonal, en los tumores funcionantes, puede persistir durante los primeros años. Entre otros efectos secundarios, la mayoría de los pacientes desarrollan hipopituitarismo dentro de los 10 años posteriores a la radioterapia y requieren un reemplazo hormonal [5], [7].

TUMORES HIPOFISARIOS AGRESIVOS

La mayoría de los tumores hipofisarios son benignos, de crecimiento lento y con buena respuesta al tratamiento convencional (cirugía, terapia farmacológica o radioterapia). Sin embargo, una proporción de estos tumores puede tener un comportamiento agresivo difícil de predecir [18].

El comportamiento agresivo puede manifestarse incluso más de 10 años después del diagnóstico primario de un tumor hipofisario y, hasta el momento, no existe ningún marcador capaz de predecirlo con precisión. Este hecho es de particular importancia porque permitiría una evaluación más temprana y un mejor manejo de estos tumores [19].

Actualmente, la OMS recomienda la evaluación del potencial proliferativo del tumor mediante el recuento mitótico y el índice Ki-67 (aunque los PitNETs ya no se clasifican según los índices de proliferación), y otros parámetros clínicos como la invasión tumoral (mediante resonancia magnética o durante la cirugía), en casos individuales para considerar a los tumores como clínicamente agresivos. Además, resalta tanto en su 4ª edición de 2017 como en su 5ª y última de 2022 que la correcta clasificación del tipo y subtipo tumoral presenta la mayor significancia clínica respecto al posible comportamiento agresivo que pueda llegar a tener o no el tumor [6], [8], [20]. Sin embargo, no termina de esclarecerse cuál es la definición de tumores hipofisarios agresivos.

En la literatura se han encontrado definiciones diversas en relación a la agresividad; recientemente la Sociedad Europea de Endocrinología emitió una guía para el manejo de estos tumores, definiendo a los tumores agresivos como radiológicamente invasivos y con una tasa de crecimiento tumoral inusualmente rápida o un crecimiento tumoral clínicamente relevante a pesar de las terapias convencionales [19], [21]. Teniendo en cuenta esta definición, para diagnosticar a estos tumores sería importante poder predecir aquellos que tendrán un comportamiento invasivo, crecerán más rápido que los tumores hipofisarios habituales y/o que presentarán un crecimiento refractario a las terapias convencionales [18]. A continuación se mencionan los criterios utilizados en la actualidad para la definición y el diagnóstico clínico de los tumores hipofisarios agresivos (**Tabla 3**):

- Tumor invasivo → Algunos tumores hipofisarios pueden invadir estructuras circundantes como el seno esfenoidal o el seno cavernoso. Los tumores hipofisarios agresivos suelen ser invasivos, aunque la invasividad por sí sola, no es sinónimo de agresividad, ya que algunos tumores que invaden estructuras circundantes no presentan un comportamiento agresivo y son indolentes y/o responden a tratamientos convencionales [22]. Sin embargo, la invasividad tumoral es un dato clínico importante, debido a que es la principal limitación para la resección quirúrgica completa de los tumores además de asociarse con mayores tasas de recidivas tras la cirugía [18].

En la literatura, se ha intentado determinar a la “invasividad” mediante criterios patológicos, quirúrgicos o radiológicos. El criterio patológico se basa en la detección microscópica de invasión de la duramadre durante el análisis histopatológico. Sin embargo, presenta una baja precisión para definir un tumor hipofisario agresivo, ya que la invasión dural ocurre en la mayoría de los macroadenomas e incluso en una gran proporción de microadenomas; y la misma no muestra correlación con el comportamiento del tumor luego de la cirugía. La invasión del seno cavernoso o la erosión del piso selar y la invasión del seno esfenoidal puede ser reportada durante la cirugía (criterio quirúrgico); sin embargo, el criterio más utilizado es el radiológico; el cual suele

determinarse a partir de las MRI de la región selar, y la clasificación más utilizada es la propuesta por Knosp *et al.* (que considera invasivos a aquellos tumores con un grado de Knosp 3 o 4) [18]; lo cual será abordado más adelante en esta introducción.

Los tumores agresivos frecuentemente son tumores grandes, y muchos de ellos son tumores gigantes (diámetro mayor ≥ 4 cm). La invasión de las estructuras circundantes suele ser más frecuente en los tumores gigantes, sin embargo, el tamaño del tumor en el momento del diagnóstico no se asocia linealmente con un comportamiento más agresivo ya que algunos tumores gigantes presentan una excelente respuesta al tratamiento. Además, el tamaño tumoral no es el principal factor pronóstico de cirugía, siendo la invasión del seno cavernoso el principal determinante del éxito quirúrgico en la mayoría de los casos [18].

- Crecimiento tumoral inusualmente rápido → La evidencia de un crecimiento tumoral rápido, especialmente si es refractario a las terapias convencionales, es el sello distintivo de un tumor hipofisario agresivo [23]. Sin embargo, no existen suficientes datos en la literatura que permitan definir claramente qué se considera como crecimiento tumoral inusualmente rápido o clínicamente relevante. Diversos autores coinciden en que un aumento $>20\%$ en el diámetro más largo del tumor debería ser suficiente para considerarlo como tumor de crecimiento rápido, ya que porcentajes menores se encuentran dentro de los márgenes de error de medición. Este incremento en el diámetro más largo del tumor debe ser de al menos de 2 mm en un lapso de 6 meses [18].
- Crecimiento tumoral clínicamente relevante → Con respecto al crecimiento clínicamente relevante, Mirela Diana Ilie *et al.* proponen que, debido a la ubicación de los tumores hipofisarios, deberían ser consideradas las situaciones que incluyen tumores que comienzan a acercarse o a comprimir el quiasma óptico, el agravamiento de los defectos del campo visual y la compresión de los nervios craneales [19]; a pesar de haberse llevado a cabo una terapia convencional óptima [18].

Además de la presencia de tumor residual, la edad más joven en el momento del diagnóstico, la presencia de extensión supraselar o paraselar y la marca positiva para marcadores de proliferación se asociaron con una mayor tasa de crecimiento tumoral después de la cirugía [18]. En este sentido, hay que diferenciar el “recrecimiento” debido a la resección incompleta del tumor, de la “recidiva o recurrencia”, que se observa en pacientes presuntamente curados en los que varios años después se observa una nueva masa tumoral generalmente con un comportamiento más agresivo. En la actualidad, la Sociedad Europea de Endocrinología recomienda como mínimo, realizar

inmunoquímica para hormonas hipofisarias y determinar el índice Ki-67, y en los casos con índice Ki-67 mayor o igual al 3%, debe llevarse a cabo el recuento mitótico y la inmunodetección de p53 [19].

Tabla 3 | Definición de los criterios utilizados en el diagnóstico clínico de un tumor hipofisario agresivo.
Adaptada de [18].

CRITERIO	DEFINICIÓN
Tumor invasivo +	Grados de Knosp 3 o 4 Invasión del seno esfenoidal (documentado durante la cirugía o en análisis patológicos)
Crecimiento tumoral inusualmente rápido	Crecimiento >20% y al menos 2 mm dentro de los 6 meses
Crecimiento tumoral clínicamente relevante a pesar de una óptima terapia convencional	Crecimiento >20% a pesar de cirugía, tratamiento médico y/o radioterapia adecuadas

DETERMINACIÓN DE INVASIVIDAD – GRADOS DE KNOSP

Según los datos publicados, del 25 al 55% de los tumores hipofisarios invaden las estructuras circundantes, como el seno esfenoidal y/o el seno cavernoso. El conocimiento de la anatomía normal de las regiones selar y paraselar permite la comprensión de los compartimentos anatómicos que pueden ser invadidos por los tumores hipofisarios [24] (Figura 2).

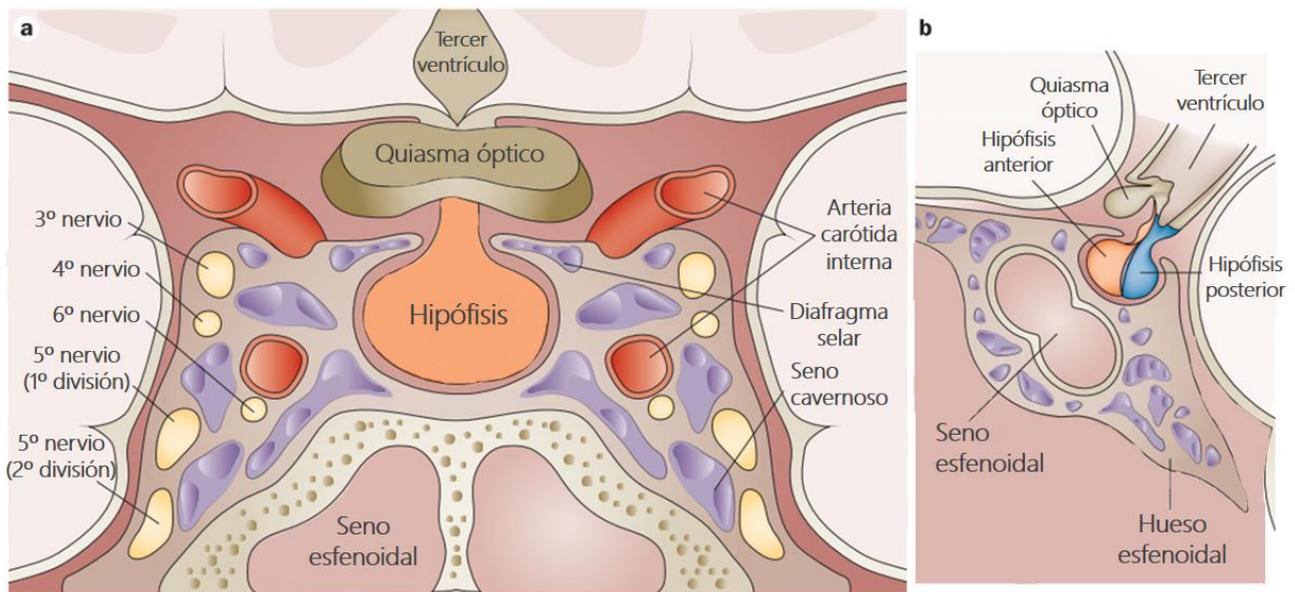


Figura 2 | Anatomía normal de las regiones selar y paraselar que rodean a la glándula hipofisaria. A) Vista coronal, B) Vista lateral. Adaptada de [24].

La metodología más utilizada para determinar la invasividad es la clasificación radiológica, que en general tiene una buena correlación con la invasión documentada durante la cirugía. El sistema de

clasificación más utilizado a partir de las MRI de la región selar es el propuesto por Knosp *et al.*, que permite predecir la invasión del seno cavernoso en gran parte de los tumores [18], [25] y es el que hemos utilizado en este trabajo para determinar la invasividad tumoral debido a su fácil aplicación. Knosp *et al.* basó su sistema de clasificación únicamente en la extensión paraselar del tumor observada a partir de MRI coronales utilizando gadolinio como agente de contraste. Y clasificó a los tumores en 5 grados, de 0 a 4, donde los grados 0, 1 y 2 se consideran no invasivos y los grados 3 y 4 se consideran invasivos [25].

Clasificación de Knosp:

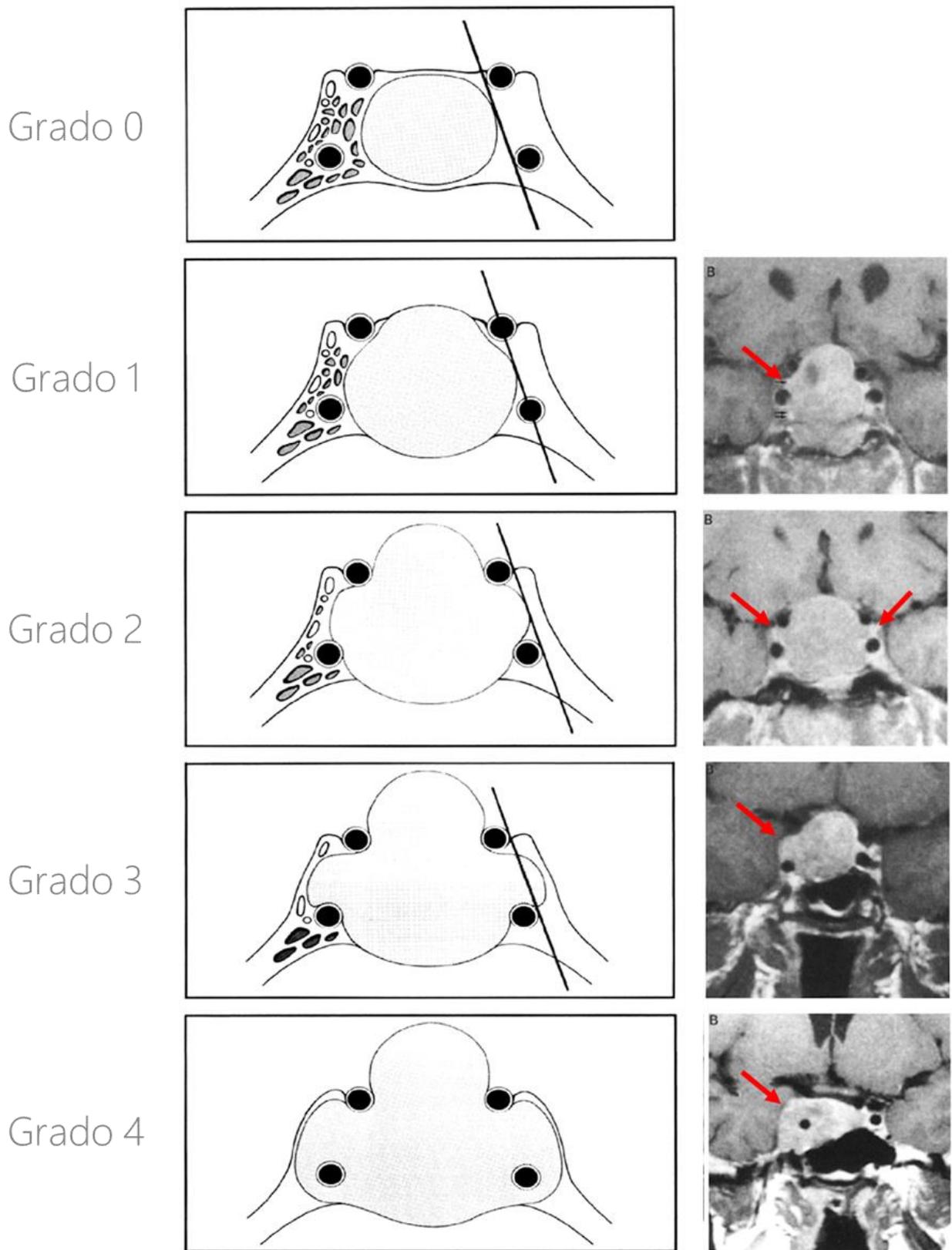


Figura 3 | Representación esquemática y mediante MRI de la clasificación basada en los grados de Knosp. Las flechas rojas indican los puntos de invasión que corresponden al grado de Knosp indicado. Adaptada de [25].

- Grado 0: condición normal del espacio del seno cavernoso, con realce de todos los compartimentos venosos. El adenoma no invade el espacio del seno cavernoso. Por tanto, no sobrepasa la tangente de las caras mediales de la ACI (arteria carótida interna) supra e intracavernosa (lado derecho de la representación esquemática que se muestra en la Figura 3). En el lado izquierdo de la representación esquemática (Figura 3), se pueden distinguir diferentes compartimentos que son superior, inferior, lateral y medial a la ACI intracavernosa [25].
- Grado 1: extensión del tumor que pasa la tangente medial, pero no va más allá de la línea trazada entre los centros transversales de las ACI intracavernosa y supracavernosa, la llamada “línea intercarotídea”. En la mayoría de los casos, el compartimento medial del plexo venoso cavernoso no es visible [25].
- Grado 2: el tumor se extiende más allá de la línea intercarotídea, pero no más allá de la tangente a las caras laterales de las ACI intracavernosa y supracavernosa. En caso de crecimiento tumoral superior a la ACI intracavernosa, el compartimento superior del plexo venoso cavernoso estará menos realzado o puede faltar. Si el tumor crece por debajo de la ACI, el realce del compartimento inferior del plexo venoso cavernoso está alterado o falta [25].
- Grado 3: el tumor se extiende lateralmente a la tangente lateral de las ACI intracavernosa y supracavernosa. Dependiendo de la dirección del crecimiento del tumor, no se realzarán los compartimentos medial, superior y/o inferior del plexo venoso cavernoso. También puede faltar el compartimento lateral. En la mayoría de los casos, se puede observar un abultamiento en la pared lateral del seno cavernoso adyacente al tumor [25].
- Grado 4: Se caracteriza por el recubrimiento total de la arteria carótida intracavernosa. No se realiza ninguno de los compartimentos del plexo venoso cavernoso. En casos raros, pueden realizarse las partes inferolaterales más alejadas del compartimento inferior. Por lo general, las paredes superior y lateral del espacio del seno cavernoso se estiran y tienen un contorno convexo [25].

Además del criterio de Knosp, existe el sistema de clasificación de Hardy, que constituyó el primer intento de clasificar a los tumores hipofisarios invasivos [26]–[29]. De acuerdo con esta clasificación, los tumores de la silla turca pueden ser no invasivos, entre los que se incluye a los de grado 0 (intacto con contorno normal), grado I (intacto con piso abultado) y grado II (fosa agrandada e intacta); o invasivos, que son los de grado III (y se caracterizan por una erosión ósea local de la silla turca) y grado IV (los cuales se caracterizan por una extensa erosión ósea de la silla turca, que incluye la base del

cráneo y las estructuras paraselares). Esta clasificación también establece que los tumores supraselares pueden ser simétricos (grado A, solo cisterna supraselar; grado B, receso del tercer ventrículo; o grado C, tercer ventrículo anterior completo) o asimétricos (grado D, extradural intracraneal; o grado E, extradural extracraneal [seno cavernoso]). No obstante, como se mencionó anteriormente, el enfoque de Knosp *et al.* es el que más se utiliza, ya que los grados de Knosp crecientes de los tumores hipofisarios correlacionan con la invasión del seno cavernoso; y esto es un hecho en aquellos tumores clasificados como de grado 3 o 4 [24].

VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT Y SU ROL EN CÁNCER

La biología de las células tumorales toma ventaja de la identificación de las diversas vías de señalización celular que se encuentran dereguladas en el contexto tumoral en distintos tipos de cáncer. Las vías de señalización celular son un importante medio de comunicación entre el exterior celular y los mediadores intracelulares, como así también entre las interacciones intracelulares responsables de diversos procesos celulares. Las mutaciones oncogénicas o la expresión anormal de componentes de estas señales alteran las redes regulatorias que rigen las funciones celulares, lo que permite la proliferación desregulada de las células tumorales, su resistencia a la apoptosis y la invasión de tejidos adyacentes. El conocimiento de la desregulación de las vías de señalización celular permite la comprensión de la fisiopatología tumoral y también contribuye a mejorar las terapias dirigidas [30].

Los Wnts (Wingless) son una familia de glicoproteínas secretadas que están evolutivamente conservadas. Estas son importantes para el desarrollo normal de vertebrados e invertebrados. La señalización de Wnt se encuentra en un equilibrio cuidadosamente orquestado entre varios ligandos Wnt y sus receptores (receptores Frizzled), co-receptores (LRP5/6, Ror1/2), y una serie de factores inhibitorios incluyendo las familias de receptores secretados relacionados con Frizzled (*SFRP*) y Dickkopf (*DKK*) [31]. Además, *ICAT* (inhibidor de β -Catenina y Tcf) o *CTNNBIP1* (proteína de interacción con beta catenina 1) es otro de los inhibidores de la señalización Wnt, cuya proteína actúa impidiendo directamente la unión de β -Catenina a los Tcf [32]. La proteína codificada por *ICAT* se une a β -Catenina en dos partes dentro de su dominio central formado por las denominadas “repeticiones armadillo”: un dominio de un haz de 3 hélices con extremo amino terminal se une a las repeticiones 10-12 y es el dominio crítico para la unión del inhibidor a β -Catenina; y un dominio de cola extendida con extremo carboxilo terminal se une a las repeticiones 5-9 y es el responsable de la exclusión de los TCF de su unión a β -Catenina [32].

Existen 19 genes Wnt conocidos en mamíferos, normalmente asociados con la llamada vía canónica (Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3a, etc) y los relacionados con las vías no canónicas (Wnt5A, Wnt5b, Wnt11, etc) [33], aunque estos pueden activar tanto la vía canónica como las no canónicas, dependiendo del contexto, del tejido en cuestión y del receptor al que se unan [34]. Han sido identificados un gran número de genes diana de las vías, muchos de los cuales se cree que son específicos de tejido, e incluyen genes implicados en la proliferación como c-Myc, Ciclina D1 (*CCND1*), p21, y *PITX2* [31], [35].

Tres vías importantes de señalización a través de Wnt han sido descritas: la vía Wnt/ β -Catenina o vía canónica de interés en el presente trabajo, la vía Wnt/quinasa Jun N-terminal (JNK) y la vía Wnt-calcio [36].

Dentro de éstas, la vía Wnt/ β -Catenina es la más estudiada. Ha sido caracterizada como marcador de células madre, ya que les confiere características de automantenimiento y totipotencialidad. β -Catenina es el producto proteico del gen *CTNNB1* y actúa como principal efector de la vía canónica de Wnt, pertenece a la familia “armadillo” y consta de 728 aminoácidos (92 kDa). Posee un dominio central de 525 aminoácidos, que consta de 12 repeticiones de 42 aminoácidos cada una, las llamadas “repeticiones armadillo”; usadas tanto para la unión directa a la E-cadherina, como para la unión con el complejo “lymphocyte enhancer factor” (Lef)/“T-cell factor” (TCF) en el núcleo o con los inhibidores Axina/APC (adenomatosis polyposis coli) en el citoplasma. Estas proteínas participan en la regulación de la actividad de β -Catenina promoviendo su fosforilación y posterior degradación; mientras que cuando la misma no es fosforilada, forma complejos con los factores Lef/TCF para activar la transcripción génica. Lindante a éstos, se encuentra el extremo amino terminal (N-terminal) de 149 aminoácidos, que contiene los sitios de unión para α -Catenina, así como los sitios donde ocurre la fosforilación por parte de la glucógeno sintasa quinasa-3 o GSK3; lo que promueve la degradación de la β -Catenina libre en el citoplasma impidiendo su translocación al núcleo [37] (Figura 4).

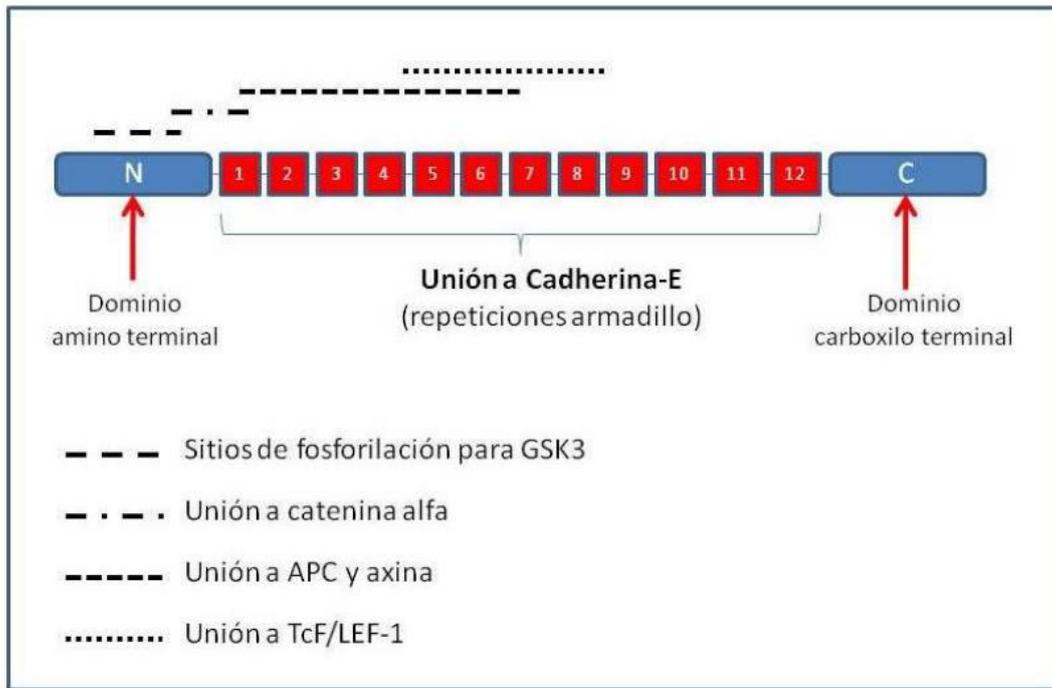


Figura 4 | Características estructurales y funcionales de β-Catenina. Tomada de [37].

Para realizar su función de transcripción génica, β-Catenina debe translocarse al núcleo, lo cual depende de los niveles de la proteína no asociada a E-cadherina, que se encuentra libre en el citosol [37]. Posteriormente se ha reportado que los “pooles” de β-Catenina de membrana y citoplasmática pueden relacionarse tras la activación de la vía de Wnt y la disrupción de las uniones adherentes, por lo que una disminución de la proteína en membrana se traduciría en una mayor translocación de β-Catenina al núcleo y consecuente activación de la vía Wnt [38].

La proteína β-Catenina citoplasmática se encuentra formando un complejo con GSK3 y APC. Bajo estas condiciones, GSK3 fosforila 3 residuos del extremo amino terminal de β-Catenina (serina 33, 37 y treonina 41), previa fosforilación de serina 45 por CK1α y/o CK1ε [36], lo que da por resultado su ubiquitinación y su rápida degradación por el proteosoma. El control de los niveles citosólicos de β-Catenina está estrictamente regulado. Principalmente, la vía Wnt induce su estabilización en el citoplasma inhibiendo la actividad del complejo GSK3/APC, evitando así su degradación. De esta manera, cuando Wnt interacciona con el receptor Frizzled y el correceptor LRP5/6, se produce la activación del intermediario Dishevelled (Dsh), lo que resulta en el desensamble del complejo de degradación y β-Catenina permanece desfosforilada. Cuando la vía Wnt está inactiva, β-Catenina es capturada y fosforilada a través del complejo de destrucción GSK3/APC [37].

Por otro lado, β -Catenina es un componente central del complejo de adhesión y unión celular cadherina/catenina esencial para que se lleve a cabo la unión con los filamentos de actina a través de α -catenina [39] (Figura 5).

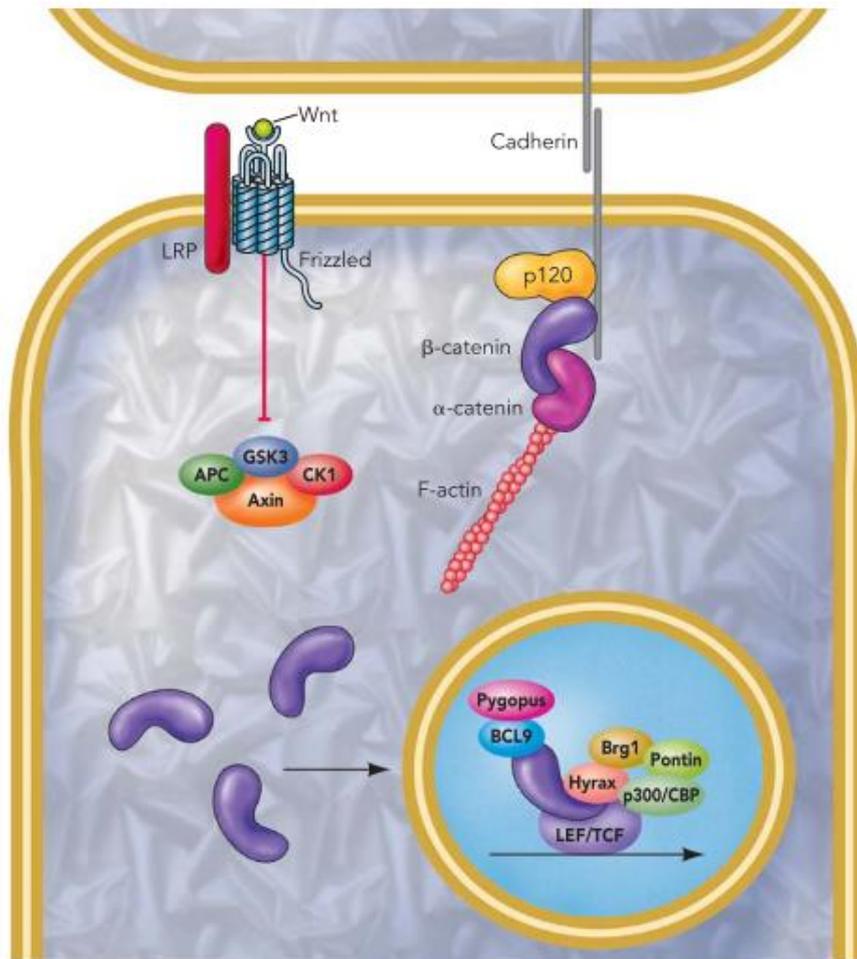


Figura 5 | Vía de señalización canónica de Wnt y rol de β -Catenina en la unión celular. Tomada de [40].

La decisión de cuál de estas dos funciones realizará β -Catenina es de gran importancia para un desarrollo normal. Uno de los factores que podría estar determinando su destino es la competencia que existe entre moléculas citoplasmáticas y nucleares por β -Catenina [37].

Debido a esta doble función, β -Catenina ha sido propuesta como un factor integrador de la adhesión celular y la transcripción génica [37].

La vía Wnt/ β -Catenina ha sido implicada en la patogénesis de una serie de tumores humanos. Evidencias de esto han sido reportadas en distintos tipos de cáncer, siendo el cáncer de colon aquel sobre el cual más estudios fueron llevados a cabo [41]. En los craneofaringiomas adamantinomatosis,

tumores raros de la región selar, las mutaciones de β -Catenina tienen implicancias en la tumorigenesis [42].

Para el caso de los tumores de hipófisis, la evidencia científica no es concluyente a la fecha. Se ha reportado la acumulación nuclear de la proteína asociada a tumores hipofisarios de alto índice de proliferación celular [43], [44]. El rol de la vía de Wnt en la tumorigénesis hipofisaria se detallará a continuación.

VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN TUMORES DE HIPÓFISIS

Es sabido que mutaciones que estabilizan a β -Catenina (p.ej. KO Exón 3, sitio de unión de la proteína y diana de fosforilación por GSK3) pueden ser responsables de distintos tipos de cáncer. Esta β -Catenina mutante tiene un rol sobre la etiología de los craneofaringeomas humanos [42] y también en ratones mutantes en células progenitoras de la hipófisis [45]. Estos tumores murinos se asemejan a los humanos. Mutaciones en *CTNNB1* pueden afectar sobre todo a un pequeño número de células con características fenotípicas de células madre/progenitoras hipofisarias [45]. En tumores hipofisarios humanos comparados con hipófisis normales y en modelos experimentales a diferencia de su contraparte normal, fueron descritos niveles de proteína y ARNm elevados de β -Catenina y de otros componentes de la vía de Wnt tales como TCF4, Ciclina D1 y c-Myc [41], [46]. También se observó una reducción en la expresión del ARNm de los ligandos Wnt5a, Wnt3 y Wnt10b y de los inhibidores de la vía canónica tales como WIF1, sFRP2 y sFRP4 en los distintos subtipos de tumores hipofisarios [41], [47]. Estudios de proteómica y transcriptómica en tumores no funcionantes demuestran una fuerte vinculación de las vías de señalización Wnt/ β -Catenina y mTOR con la patología, y una elevada expresión de β -Catenina en los tumores comparados con el tejido normal [48]. A pesar de ello, cuando se estudia la localización subcelular de β -Catenina en el tejido de los tumores de hipófisis la evidencia es poco clara, encontrando en los cortes histológicos acumulación subcelular (principalmente en membrana y núcleo) muchas veces opuestas [43], [44], [49]. Demarchi *et al.* reportaron una disminución de β -Catenina en la membrana de prolactinomas humanos al comparar con su contraparte normal [50]. Adicionalmente, se han publicado trabajos en donde no han detectado expresión de β -Catenina ni en los tipos de tumores hipofisarios analizados ni en tejido normal, y tampoco en la expresión génica de componentes de la vía canónica de Wnt [51].

En conjunto, estos trabajos previos demuestran que si bien varios autores se han abocado al estudio del rol de la vía de Wnt/ β -Catenina en la tumorigénesis hipofisaria, la evidencia disponible aún es

poco concluyente, mostrando resultados controversiales entre los distintos tipos tumorales y entre los distintos modelos estudiados.

miARNs

Los microARNs (miARNs) son una clase de ARN no codificante de 19 a 25 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, al unirse a las 3', 5' -UTR o dentro de la secuencia codificante de los ARNm diana provocando su degradación o inhibiendo su traducción [56], [57]. Son considerados reguladores negativos que controlan procesos clave como la proliferación celular, el metabolismo, la apoptosis y la diferenciación. Aunque se sabe que ejercen su acción regulatoria de forma intracelular, varios estudios demostraron que los miARNs pueden ser medidos en diferentes fluidos corporales como sangre y orina, entre otros [56].

Los genes que codifican miARNs pueden ubicarse en el genoma individualmente o en grupos, en intrones de secuencias codificantes, como parte de secuencias no codificantes más amplias o en regiones intergénicas [56], [58]. En humanos, se sabe que al menos 247 miARNs se encuentran agrupados en 64 *clusters* a una distancia inter-miARN de menos de 5000 pares de bases (pb), y debido a que la mayoría de estos *clusters* están muy conservados evolutivamente, se cree que esta tendencia al agrupamiento de miARNs podría estar mediando el papel biológico de los mismos [58].

El *cluster* miR-23a~27a~24-2 es uno de ellos. Las duplicaciones génicas han dado lugar a parálogos del *cluster* miR-23 en mamíferos: el *cluster* miR-23a~27a~24-2 (localizado en el cromosoma 19p13.12) [52], que es intergénico, y su *cluster* parálogo miR-23b~27b~24-1 (localizado en el cromosoma 9q22.32), el cual es intrónico. El *cluster* miR-23a~27a~24-2 codifica un pri-miARN compuesto por miR-23a, miR-27a y miR-24, del cual luego deriva cada miARN maduro individual (lo mismo ocurre con su *cluster* parálogo). Sin embargo, aunque deriven del mismo transcripto, se sabe que dependiendo de las condiciones biológicas, sus patrones de expresión varían. Por otro lado, dado que las secuencias maduras de estos parálogos son similares, se podría especular que tengan *targets* superpuestos, lo cual ocurre para miR-23a y miR-23b, y miR-27a y miR-27b; y también ha sido reportado que ambas isoformas están sobreexpresadas o subexpresadas simultáneamente. Si bien pueden presentar los mismos genes diana, su regulación puede ser independiente entre sí ya que los *clusters* parálogos están en diferentes cromosomas y se producen a partir de diferentes transcriptos. Por lo tanto, las diferencias funcionales entre ellos se deberían a la regulación diferencial de su expresión y procesamiento más que a sus potenciales *targets*. [53].

La familia miR-26 en humanos corresponde a un grupo de miARNs ampliamente conservados que incluye a miR-26a, miR-26b, miR-1297 y miR-4465, los cuales comparten una secuencia semilla idéntica entre los vertebrados: "UCAAGUA". La forma madura de los mismos se generan a partir de secuencias intrónicas de distintos genes, con diferentes localizaciones cromosómicas [54].

El grupo miR-15/107 en humanos está formado por 10 miARNs altamente conservados: miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p, miR-103a-3p, miR-107, miR-195-5p, miR-424-5p, miR-497-5p, miR-503-5p y miR-646. Estos miARNs comparten la secuencia "AGCAGC" en la región semilla, que comienza en el primer o segundo nucleótido desde el extremo 5' del miARN maduro. Recientemente se ha reportado que el miR-6838-5p también comparte esta secuencia semilla, por lo que fue incluido como nuevo miembro del grupo. Los miembros de la familia miR-15/107 se expresan solo en cordados, siendo varios de ellos específicos de mamíferos (miR-195,-497, -503, -424 y -646) y miR-646 de humanos y chimpancés. Todos los miembros de este grupo se encuentran localizados dentro de secuencias génicas codificantes y no codificantes. A diferencia de la mayoría de los miARNs, que reconocen secuencias complementarias en la región 3'-UTR, algunos miembros del grupo miR-15/107 se caracterizan particularmente por la capacidad de dirigirse a la secuencia codificante (CDS) de sus ARNm diana [55].

Se cree que aproximadamente del 30% al 50% de todos los genes que codifican proteínas podrían estar regulados por miARNs. Un solo miARN puede regular la expresión de varias proteínas como así también la expresión de una única proteína puede estar regulada por varios miARNs. Además, múltiples miARNs pueden modular la expresión del mismo gen e interactuar entre sí formando redes de co-targeting. Debido a que las células pueden exportarlos o incorporarlos activamente, los miARNs pueden cruzar las barreras celulares y ejercer su función en otras células. Aproximadamente el 98% de los ARN no codificantes circulantes son miARNs [56]. Se considera que su rol es llevar la expresión génica al nivel óptimo [57].

La biogénesis de los miARNs comienza en el núcleo, donde son transcritos por la ARN polimerasa II, generándose un precursor primario largo denominado pri-miARN. Luego, éste es clivado por un complejo que contiene a Drosha (una ARNasa III) en un pre-miARN de 60-70 nucleótidos de longitud con una estructura secundaria en horquilla. El pre-miARN es transportado al citoplasma por la Exportina 5 y allí es procesado por otra ARNasa III, Dicer, en un dúplex de miARN de aproximadamente 21 nucleótidos. Una hebra de este dúplex, el miARN maduro, es incorporada en el complejo de silenciamiento inducido por miARN (RISC) y de esta forma reprime la traducción de proteínas al inhibir

su síntesis, escindir el ARNm mediante la proteína AGO2 o provocar su degradación por deadenilación. La otra hebra, denominada hebra “pasajera” normalmente es degradada, aunque reportes recientes sugieren que también puede ser incorporada a RISC para su exportación. Además de regular negativamente la expresión de proteínas a nivel intracelular (la función más ampliamente conocida de los miARNs), también pueden ser exportados de la misma. Los miARNs pueden ser incorporados en endosomas multivesiculares del que luego derivan exosomas, en microvesículas y en cuerpos apoptóticos; o pueden formar complejos con proteínas de unión a ARN (AGO) o con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los cuerpos apoptóticos son más grandes que las vesículas y también contienen miARNs además de otros orgánulos celulares [57] (Figura 6).

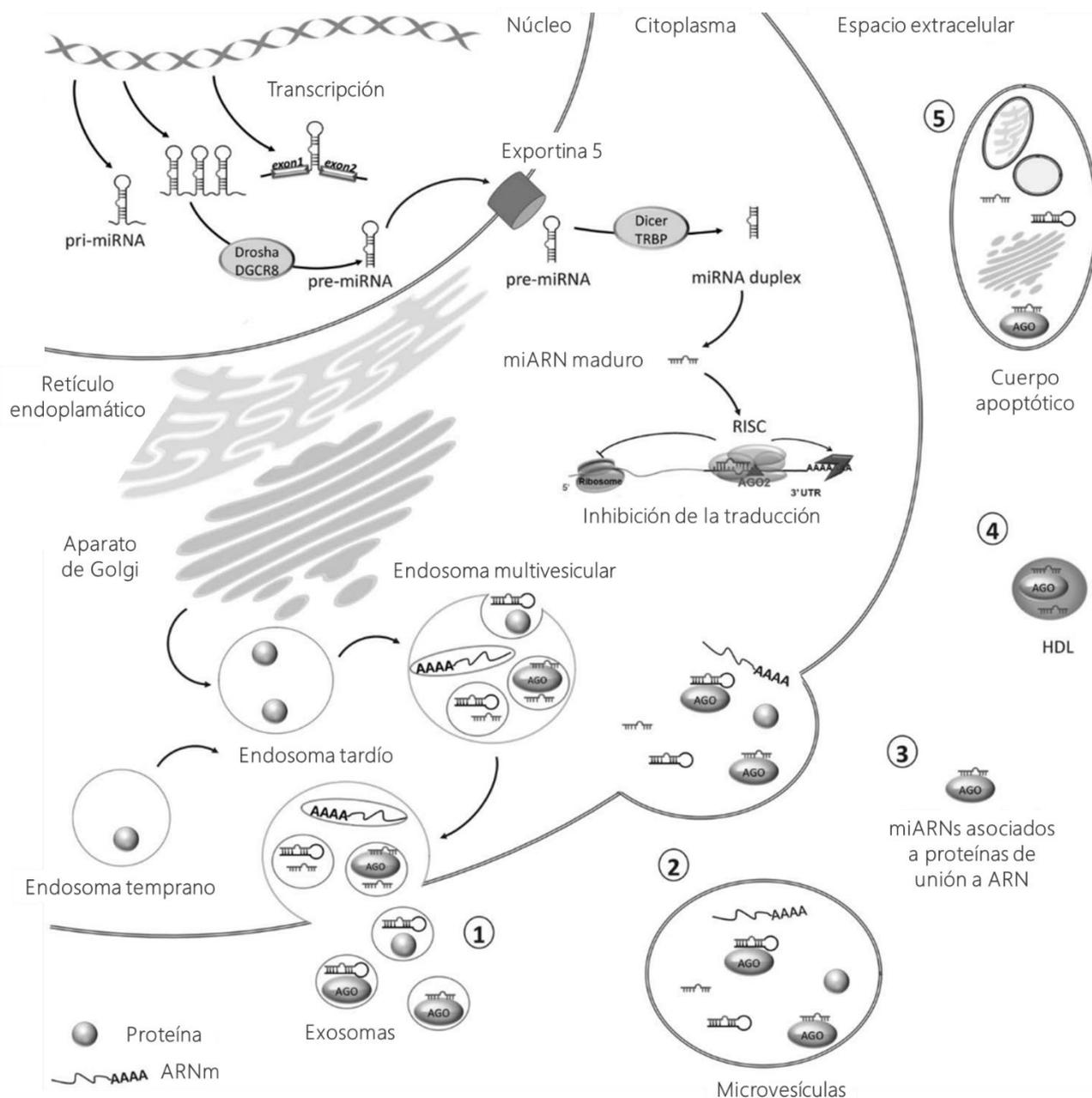


Figura 7 | Biogénesis de los miARNs y sus posibles destinos intra o extracelulares. Adaptada de [57].

miARNs Y SU ROL EN CÁNCER

La desregulación de los miARNs en células tumorales constituye un sello distintivo del tumor, y los miARNs pueden actuar como supresores tumorales u oncogenes dependiendo del contexto celular y las diversas funciones de sus genes target [58]. Los miARNs oncogénicos, a los que se les suele llamar “oncomiRs”, pueden promover la progresión del tumor al inhibir la expresión de genes supresores tumorales involucrados en diferentes procesos biológicos. Estos oncomiRs promueven la proliferación, inhiben la apoptosis, inducen la angiogénesis tumoral y aumentan los efectos oncogénicos de factores de transcripción como *MYC* [59], [60]. Por ejemplo, se ha reportado que los oncomiRs miR-221 y miR-222 mejoran la supervivencia celular, facilitando la resistencia a TRAIL al regular negativamente la expresión de las proteínas p27kip1, PTEN y TIMP3 [61]. Además, estos miARNs también regulan las vías intrínsecas de la apoptosis en células epiteliales humanas. miR-125b puede regular la señalización de BAK1 y así promover la proliferación descontrolada de células tumorales de próstata y mama [62], [63]. Se ha reportado que miR-24 altera la expresión de p16INK4a en células de carcinoma cervical [64]. El oncomiR miR-504 es capaz de inhibir el arresto del ciclo celular mediado por p53 en carcinoma colorrectal, en las células U2OS de osteosarcoma y en las células de carcinoma de pulmón H460 [65]–[67]. Por lo general, los oncomiRs se encuentran sobreexpresados en el contexto tumoral [60].

Por otro lado, los miARNs “supresores tumorales” regulan negativamente la expresión de oncogenes al unirse a las 3'-UTR de sus ARNm. Por lo tanto, son capaces de inhibir la generación y progresión tumoral. A diferencia de los oncomiRs, el nivel de expresión de los miARNs supresores tumorales se encuentra reducido en el tumor [60] (Figura 7).

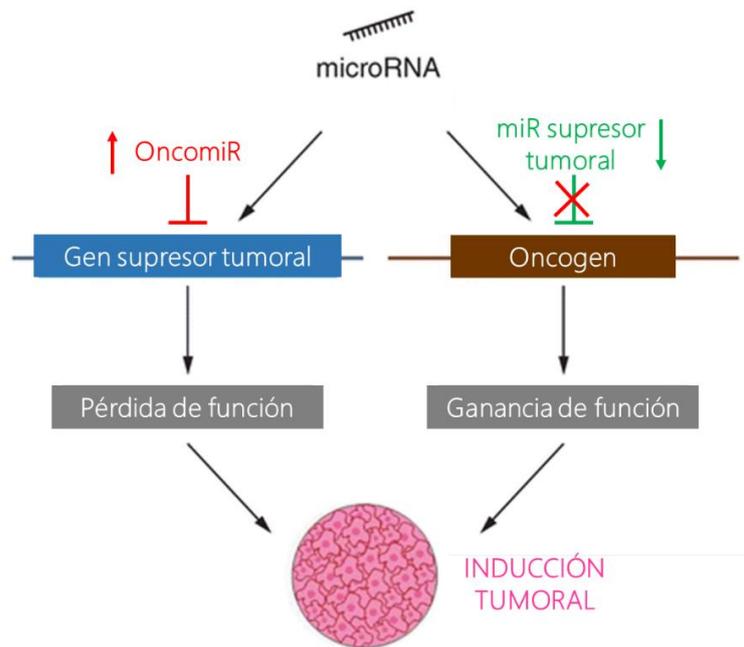


Figura 7 | Esquema representativo del rol de los oncomiRs y los miRs supresores tumorales tras la alteración de su expresión normal en un contexto tumoral. Adaptada de [68].

miARNs Y SU ROL EN TUMORES HIPOFISARIOS. POSIBLES BIOMARCADORES

En la última década, la expresión desregulada de miARNs ha sido asociada con distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentran los tumores hipofisarios. Esta desregulación contribuye a la tumorigénesis ya que desencadena proliferación celular descontrolada, inhibición de la muerte celular, evasión de la supresión tumoral, invasión y angiogénesis [58]. Distintos estudios comparativos sobre perfiles de expresión de miARNs que utilizan muestras de tumores de hipófisis indican claramente una expresión diferencial de varios miARNs en el tumor al comparar con controles, lo cual enfatiza el papel de los miARNs en la patogénesis de los tumores hipofisarios [60]. Algunos miARNs están involucrados directamente en el desarrollo del tumor a través de la modulación de la diferenciación celular y la apoptosis, regulando genes supresores tumorales y/o oncogenes. Por ejemplo, miR-410-3p fue tradicionalmente descrito como oncomiR en gonadotropinomas y corticotropinomas, sin embargo en somatotropinomas este miARN actúa como supresor tumoral [69]. También, se ha reportado la asociación de ciertos miARNs con la invasividad y la recurrencia tumoral hipofisaria [70]–[72]. En este sentido, por ejemplo, Su *et al.* determinaron por RT-qPCR que la subexpresión del miR-193a-3p en el tejido de pacientes con tumores hipofisarios invasivos se asocia con un mayor riesgo de presentar remanentes del tumor y recurrencia luego de la cirugía [73]. También, Nikolova *et al.* describieron la subexpresión de miR-20a, miR-19a, miR-16, miR-17 y miR-

106a en tejido de pacientes con tumores no funcionantes invasivos recurrentes en comparación a aquellos no recurrentes [70].

En los últimos años, cada vez más trabajos se han abocado a la identificación de patrones de expresión diferenciales de miARNs en fluidos biológicos humanos para utilizarlos como nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en pacientes con tumores hipofisarios. Debido a que los síntomas pueden aparecer muchos años después del desarrollo de un tumor de hipófisis, contar con biomarcadores específicos y no invasivos sería de mucha utilidad en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la respuesta del paciente al tratamiento. Esto resultaría de particular relevancia para aquellos casos en los que se presentan tumores con un comportamiento agresivo, ya que por lo general son refractarios a las terapias y presentan recurrencias; siendo una entidad difícil de manejar en la clínica [74].

En 2008, se publicaron cuatro estudios que reportaron la existencia de miARNs circulantes (c-miARNs) en sangre. Más tarde, distintos investigadores lograron identificar miARNs en otros fluidos corporales como saliva, fluido cerebroespinal, fluido folicular ovárico, leche materna, orina, lágrimas, lavajes bronquiales y semen. De hecho, contrariamente a lo que ocurre con los ARN celulares, los miARNs circulantes son muy estables en fluidos corporales humanos debido a su asociación con proteínas específicas (*AGO2*, *NPM1*, *HDL*) o a su empaquetamiento en vesículas como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. También se ha demostrado su resistencia en condiciones desfavorables como pH ácido o alcalino, altas temperaturas o múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento [74].

Aunque en la actualidad los c-miARNs no son utilizados en la práctica clínica, los avances en el área demuestran que su efectividad en el diagnóstico y pronóstico de tumores podrían ser cruciales y reemplazar las dificultades existentes en las prácticas de diagnóstico actuales. Ventajas del uso de miARNs para el diagnóstico molecular:

1. La detección es no invasiva.
2. Los miARNs son estables y abundantes en muestras biológicas humanas.
3. Los c-miARNs son muy sensibles a la patología, ya que su expresión se encuentra modificada.
4. Los c-miARNs pueden ser detectados en las etapas tempranas de la enfermedad, mientras que los marcadores proteicos son detectables en la circulación sanguínea sólo cuando ya ocurrió un daño significativo en el tejido tumoral.
5. Los miARNs participan de casi todas las funciones celulares.

6. Los miARNs tienen un papel en la comunicación entre las células tumorales, ya sea dentro de vesículas extracelulares o en asociación con AGO2 [60].

La biopsia líquida constituye una muestra en tiempo real de biomarcadores a partir de biofluidos, como son los c-miARNs, y podría considerarse como un enfoque prometedor para la detección no invasiva, la caracterización molecular y el seguimiento de la progresión de tumores hipofisarios agresivos y otros tumores del sistema nervioso central para los que una biopsia no es posible. La identificación temprana de tumores de hipófisis con comportamiento agresivo es un desafío y reviste gran importancia clínica, ya que estos tumores se asocian con una mayor morbilidad e incluso mortalidad [60].

miARNs: ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Respecto a la utilización de miARNs como agentes terapéuticos en cáncer, incluidos los tumores hipofisarios, podrían llevarse a cabo dos estrategias principales:

1. Restauración de los niveles de miARNs supresores tumorales.
2. Inhibición de la sobreexpresión de oncomiRs.

El restablecimiento de los niveles de miARNs supresores puede lograrse utilizando mimics del miARN específico, que son moléculas sintéticas de ARN doble cadena con la misma secuencia que el miARN que se pretende restaurar, capaces de unirse al ARNm diana, inducir a RISC y de esta forma llevar a cabo su función antitumoral. Por otro lado, la terapia “anti-miARN” tiene como objetivo reducir la sobreexpresión de oncomiRs. Esta inhibición se puede llevar a cabo utilizando antagomiRs (oligonucleótidos capaces de suprimir la expresión de oncomiRs y que están conjugados a colesterol para facilitar la entrada a la célula), oligonucleótidos antisentido (AMOs), miARNs enmascarados (oligonucleótidos modificados por una metilación en la posición 2'-O, complementarios a los sitios de unión del miARN a su ARNm diana), bloqueo del ácido nucleico (oligonucleótidos con un fragmento de LNA ribosa modificado para mejorar la especificidad y la estabilidad), inhibidores de miARNs de bajo peso molecular (SMIRs) y esponjas de miARN [60].

miARNs Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN TUMORES HIPOFISARIOS

Los miARNs se encuentran involucrados en casi todos los tipos de cáncer, incluidos los tumores hipofisarios. Dada su tendencia a regular numerosos procesos celulares, no es sorprendente que la expresión desregulada de miARNs se asocie con la desregulación de las vías de señalización

oncogénicas, como la vía Wnt/ β -Catenina en distintos tipos de cáncer [75]. En general, los cánceres impulsados por la vía Wnt presentan hiperactivación de reguladores positivos (oncogenes) o inhibición de reguladores negativos (genes supresores tumorales). Múltiples miARNs han sido descritos como los responsables de esta desregulación, ya que modulan a los distintos componentes de la vía canónica de Wnt en distintos tipos de cáncer [76].

En tumores hipofisarios los miARNs también regulan distintos componentes de la vía Wnt. Por ejemplo, fue descrito que miR-137 podría tener un papel crítico en la regulación de la señalización Wnt, al afectar el estado de metilación del promotor del inhibidor *WIF1* [74]. Por otro lado, este mismo miARN fue reportado con un rol supresor de la invasividad tumoral con valor pronóstico en prolactinomas, al regular *MITF* y la vía Wnt/ β -Catenina [77]. El miARN miR-543 promueve la invasión celular e impide la apoptosis en tumores hipofisarios al activar la vía Wnt mediante la regulación negativa de *Smad7* [78].

Sin embargo, la relación entre los miARNs y la modulación de los componentes de la vía canónica de Wnt que éstos ejercen no se encuentra estudiada de forma exhaustiva como sí sucede en otros tumores cerebrales como los gliomas [79]. Serían de gran ayuda nuevos estudios en este área sobre la comprensión de regulación de la vía Wnt por moléculas como los miARNs, lo cual podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas combinadas.

HIPÓTESIS

En los tumores hipofisarios humanos existe un perfil de expresión de microARNs (miARNs) tisulares vinculado a la agresividad y recurrencia, que permite diferenciarlos de aquellos de comportamiento no agresivo, y que presenta asociación con la señalización celular Wnt/ β -Catenina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de microARNs tisulares como biomarcadores de agresividad y recurrencia en tumores hipofisarios humanos, que permitan un diagnóstico y pronóstico más eficaz para estos tumores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el perfil de expresión de microARNs tisulares en muestras de tumores hipofisarios de diferente grado de agresividad provenientes de cirugía.
2. Evaluar la existencia de asociación entre los niveles de expresión de los microARNs y componentes de la señalización Wnt/ β -Catenina.
3. Determinar si existe correlación entre los niveles de los microARNs con parámetros como índice de proliferación, invasividad, grado de Knosp, recurrencia, tamaño tumoral, entre otros.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente Trabajo Final de Grado (TFG) se encuentra enmarcado en el contexto del proyecto “Primer Estudio Multicéntrico de Argentina sobre marcadores de agresividad en tumores hipofisarios”, que se lleva a cabo en el Laboratorio de Neuroendocrinología/Fisiopatología de la Hipófisis del Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA-UNNOBA, Junín, provincia de Buenos Aires) y es coordinado desde el CIBA y la Clínica Santa Isabel (Ciudad Autónoma de Buenos Aires).

MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS

Las muestras de tumores hipofisarios fueron obtenidas de pacientes derivados a neurocirugía en distintos centros de Argentina especializados en patología hipofisaria: Sanatorio Dupuytrén, Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, Clínica Santa Isabel, Hospital Británico, Hospital de Clínicas José de San Martín, Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI) y Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; Sanatorio 9 de Julio S.A., Hospital Ángel C. Padilla y Sanatorio Modelo S.A. de San Miguel de Tucumán, Provincia de Tucumán; y Clínica La Pequeña Familia (LPF) de la ciudad de Junín, provincia de Buenos Aires.

Los 37 tumores utilizados fueron previamente clasificados de acuerdo al criterio clínico según su secreción hormonal en tumores funcionantes: somatotropinomas (secretor de GH), corticotropinomas (secretor de ACTH), y prolactinomas (secretor de PRL), o en tumores no funcionantes (NF) cuando no se detectó secreción hormonal. De los 37 pacientes, 22 eran de sexo femenino, 15 masculino y tenían, al momento de la cirugía, entre 19 y 75 años de edad (media: 45,81).

Posteriormente a la cirugía transesfenoidal, el exceso del tejido tumoral de los estudios anatómopatológicos de rutina se conservó en RNA Later (Ambion, INC) a -80°C hasta su procesamiento para las determinaciones de microARN (miARN) y ARN mensajero (ARNm), o se reservó en formol al 4% a 4°C para luego ser incluido en parafina para estudios de inmunohistoquímica (IHQ). Las características de tamaño, recurrencia, invasividad como también el grado de Knosp fueron provistos y calculados por los servicios de neurocirugía intervinientes a partir de imágenes de resonancia magnética (MRI) y de la historia clínica. El dato del índice de proliferación celular de los tumores evaluados a través de la expresión de Ki-67 (%) fue provisto por los respectivos departamentos de anatomía patológica de los nosocomios intervinientes. Las características de la cohorte de tumores utilizados en el presente trabajo se resumen en la **Tabla 6** que se muestra en la sección de resultados.

En todos los casos, cada paciente que se sometió a cirugía con diagnóstico de tumor hipofisario y del cual obtuvimos la muestra firmó el debido consentimiento informado, en donde se detallaron las actividades a realizar en el proyecto con las muestras proporcionadas. Además, el protocolo de investigación fue evaluado previamente por el Comité de Ética en la Investigación y en Uso de Animales de Experimentación de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (COENOBA) y autorizado por la máxima autoridad de cada institución interviniente. La privacidad del paciente fue siempre preservada. Para el caso de los tejidos hipofisarios normales utilizados en inmunohistoquímica (IHQ) en el presente trabajo, todos fueron de origen comercial (Biochain).

SELECCIÓN DE miARNs

Los miARNs a evaluar en las muestras de tumores hipofisarios fueron elegidos a través de la herramienta bioinformática miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>). Esta herramienta permite realizar predicciones sobre los posibles genes diana para miARNs de puntual interés y viceversa, en *Homo sapiens* y en *Mus musculus*. Esta plataforma integra siete algoritmos muy conocidos de predicción de targets: DIANA, miRanda, miRBridge, PicTar, PITA, rna22, y TargetScan. Además, contiene datos validados de TarBase y miRecords sobre la interacción entre los miARNs y sus genes diana. Asimismo, miRSystem identifica las posibles vías de señalización reguladas por los miARNs de interés en base a la función biológica de sus genes *target*; para lo cual incluye KEGG, BioCarta, Pathway Interaction Database y Reactome, que son bases de datos de vías de señalización [80].

A partir de datos de la literatura se seleccionaron 26 genes candidatos asociados al crecimiento y la invasividad, reportados en dos o más estudios transcriptómicos de tumores hipofisarios agresivos (Tabla 1, [81]). Éstos fueron introducidos en miRSystem como “*Target genes to miRNAs*” obteniéndose una lista de posibles miARNs reguladores de dichos genes. Para reducir la lista inicial de miARNs a un número posible de manejar en el presente trabajo, se aplicaron una serie de filtros en base a criterios generales y de interés establecidos por nuestro laboratorio:

- Criterio 1 → Al menos 1 interacción miARN-gen target esté predicha por 4 o más algoritmos en miRSystem.

Este primer criterio lo establecimos en base a la siguiente explicación que Lu *et al.* dieron en su trabajo [80]: en miRSystem, el “*hit*” representa el número de algoritmos que predicen interacción entre el mismo par miARN-gen. Ellos demuestran que casi el 75% de las asociaciones miARN-gen son predichas por un solo algoritmo, lo cual indica que se deben combinar múltiples algoritmos

para identificar predicciones miARN-gen *target* confiables. Esto, sumado a la necesidad de obtener un número manejable de registros, hizo que los autores establecieran un *hit* de 3 como parámetro por *default* en miRSystem. Con esta configuración, son analizadas aproximadamente el 9% del total de predicciones que se obtienen [80]. Nosotros, en nuestro Criterio 1, elevamos el número de *hits* a 4 para aumentar la exigencia en la confiabilidad de las predicciones.

- Criterio 2 → 3 o más interacciones miARN-genes target (un miARN común con distintos genes target) estén predichas por 4 o más algoritmos en miRSystem.

Al establecer este segundo criterio, mantuvimos la exigencia en la confiabilidad de las predicciones, pero incrementamos de 1 a como mínimo 3, el número de genes target que presentan una interacción predicha con un mismo miARN.

- Criterio 3 → 3 o más interacciones con genes seleccionados de las vías Wnt/ β -Catenina o Notch, y al menos 1 interacción con un gen de cada vía, estén predichas en miRSystem.

Para el tercer criterio, establecimos que los miARNs que cumplan los Criterios 1 y 2, además presenten las interacciones descritas en el Criterio 3 con los siguientes genes seleccionados de las vías de señalización en las que trabaja nuestro laboratorio:

- Wnt/ β -Catenina: *CCND1*, *WIF1*, *APC*, *CTNNBIP1*, *TCF3*, *WNT3A* y *WNT5A*.
- Notch: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *JAG1*, *HES1*, *HEY2* y *DLL1*.

Para esto, se introdujeron los miARNs que cumplieron con los Criterios 1 y 2 en la solapa “*miRNAs to Target Genes*” de miRSystem. Se buscó en la lista de resultados los genes de las vías de interés mencionados anteriormente, y en base a esto se analizó qué miRNAs cumplían con el tercer criterio.

Una vez aplicados todos los filtros, a partir del número final de miRNAs obtenidos, seleccionamos un grupo reducido para evaluar durante el presente trabajo de tesis.

MÉTODO DE DETERMINACIÓN PARA DETECCIÓN DE miARNs y DISEÑO DE PRIMERS

En la literatura, se han propuesto muchos métodos de detección de miARNs: Northern blot, que requiere altas concentraciones de ARN y es un método que presenta bajo rendimiento; hibridación *in situ*, cuyo rendimiento también es bajo; secuenciación de bibliotecas de ARN pequeño y microarray, en este caso la gran elaboración es una desventaja; y bead arrays, que requieren PCR e hibridación [82]. En 2005, Chen *et al.* [83] propusieron por primera vez un nuevo método de cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real para la detección confiable de miARNs maduros y de alta sensibilidad: la Stem-Loop RT-qPCR (cabe aclarar que debido a su longitud de 19-25 nucleótidos resulta imposible

utilizar a los miARNs como molde y amplificarlos por RT-qPCR convencional, dado que ésta utiliza primers que tienen la misma longitud que el propio miARN y por ende requiere de un molde con una longitud mínima de 40 nucleótidos). Debido a su alta precisión y sensibilidad, la técnica de Stem-Loop RT-qPCR se convirtió en un método popular de detección de miARNs en el campo de la investigación biomédica [82].

El método de Stem-Loop RT-qPCR permite la amplificación de miARNs específicos utilizando un Stem-Loop primer (de mayor longitud que los primers convencionales) altamente estable durante la retrotranscripción (en lugar de oligos dT o random primers), cuyas 6 últimas bases en 3' son complementarias a las 6 últimas bases en 3' del miARN; y de esta forma alarga el ADNc de su longitud inicial de ~22 a >60 nucleótidos. Luego, la amplificación por PCR en tiempo real utiliza un primer forward específico para el miARN (que es su propia secuencia pero convertida a ADN, cambiando U por T), menos los últimos 6 nucleótidos en 3', que incluye además 5 nucleótidos adicionales en 5' para ajustar una T_m apropiada; y un primer reverse universal que es complementario a una secuencia dentro del RT Stem-Loop primer [84] (Figura 8):

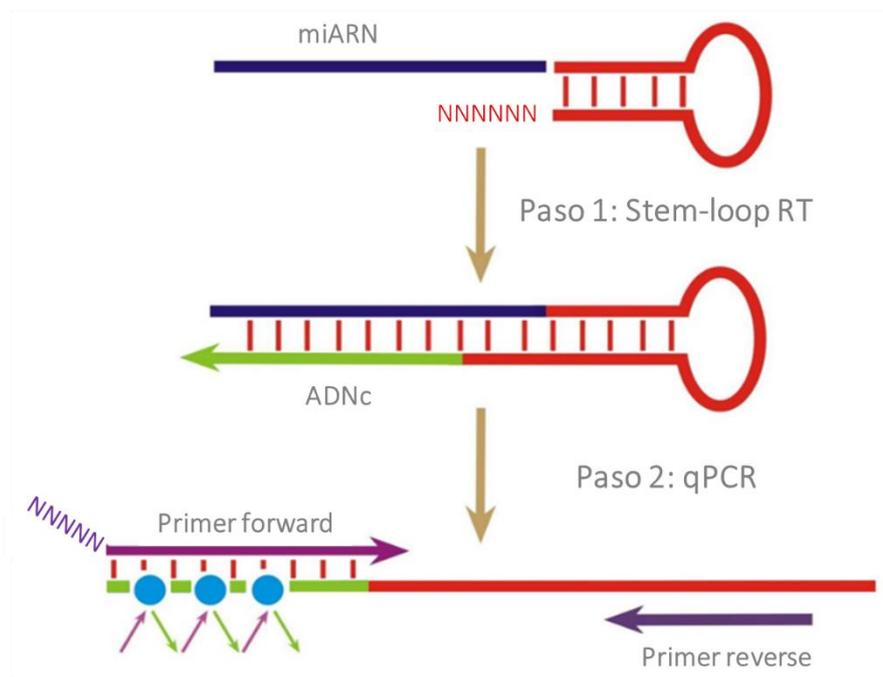


Figura 8 | Esquemización del método de Stem-Loop RT-qPCR. Adaptada de [82].

Este método expande la tecnología de PCR en tiempo real utilizada para la detección de expresión génica desde macromoléculas como ARNm, a micromoléculas como miARNs, tiARNs (ARNs inducidos por estrés derivados de ARNs de transferencia) y ARNpn (ARNs pequeños nucleolares) [83].

A continuación se muestra a modo de ejemplo el diseño de los primers para uno de los miARNs evaluados en el presente trabajo. Se aplicó la misma metodología a todos ellos [84].

1. Secuencia del miARN de interés → hsa-miR-15b-5p (<https://www.mirbase.org/>):

5'- UAGCAGCAUCAUGGUUUACA -3'

2. Stem-Loop RT primer → Esta secuencia combina 44 nucleótidos del Stem-Loop propuesto por Chen *et al.* [83]: 5'- GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC -3' (en rojo); con el reverso complementario de los últimos 6 nucleótidos en 3' del miRNA (en violeta):

5'- GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTGTAAA -3'

Para evitar amplificaciones inespecíficas, la secuencia del Stem-Loop que se utiliza no presenta similitud con ninguna secuencia del genoma humano. En este caso corresponde a un fragmento de ADN de *Ophiorrhiza prostrata* (verificado con la herramienta BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que son arbustos herbáceos o de sotobosque que se distribuyen por Asia tropical y subtropical, Australia, Nueva Guinea y las islas del Pacífico; y que pertenecen a la familia de las dicotiledóneas *Rubiaceae* [85], [86]. Dicha secuencia propuesta por Chen *et al.*, y la cual utilizamos en el presente trabajo, también fue utilizada previamente por otros investigadores [87]–[89].

3. Primer forward qPCR → Corresponde a la secuencia completa del miARN menos los últimos 6 nucleótidos en 3', pero pasada a ADN (reemplazando U por T) y con 5 nucleótidos adicionales en 5' para ajustar una Tm adecuada (en negrita):

5'- GCGAGTAGCAGCACATCATGG -3'

4. Primer reverse qPCR → Al utilizar la misma secuencia del Stem-Loop de 44 nucleótidos para todos los RT primers (Stem Loop primer universal), se puede utilizar un primer reverse universal derivado de alguna secuencia dentro del Stem-Loop; en nuestro caso:

5'- TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT -3'

La secuencia de nuestro primer reverse es prácticamente igual a la reportada por Chen *et al.* [83]: 5'- GTGCAGGGTCCGAGGT -3' (arriba, resaltada en rojo y negrita).

Al finalizar el diseño, utilizando la herramienta Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), se corroboró que los parámetros de Tm, %GC, Self complementarity y Self 3'-complementarity de los primers forward y reverse fueran adecuados, y que no amplificaran secuencias de ADN genómico o ARN que no fueran de interés. El análisis de los

parámetros también se complementó con la herramienta OligoAnalyzer de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>).

Los RT y qPCR primers del resto de los miARNs fueron diseñados siguiendo la misma metodología.

EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

La extracción de ARN total a partir de muestras de tumores hipofisarios humanos obtenidas en RNA Later (Ambion, INC) se realizó utilizando TRI Reagent (Molecular Research Center, INC) según describimos en [90]. La única modificación del protocolo fue que la incubación en isopropanol se llevó a cabo overnight (ON), para promover la precipitación de los miARNs. La concentración del ARN total se determinó por medida de la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro de luz UV (Picodrop, Microlat) y su pureza se evaluó según la relación de absorbancia 260/280 nm (se consideró aceptable un valor de ~ 2.0). El ARN se mantuvo congelado a -80°C hasta el momento de ser analizado.

La retrotranscripción de ARNm para la obtención del ADN copia (ADNc) se llevó a cabo utilizando 2 μg de ARN en un volumen final de 20 μl en presencia de Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, DTT 10 mM (M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer; Promega, WI, USA), desoxi-NTPs 1 mM, cebadores oligo dT15 1 pM (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), 200 U de retrotranscriptasa M-MLV (Promega, WI, USA) y H_2O estéril comercial para llevar a volumen final. Se utilizó el termociclador GenePro (Bioer Technology Co. Ltd.) con el siguiente programa de ciclado: 10' a 25°C (hibridación oligos dT-ARNm), 50' a 37°C (catálisis de la retrotranscripción por la M-MLV), finalizando a 4°C . Los controles negativos de la reacción fueron realizados omitiendo la enzima o la muestra.

La retrotranscripción de miARNs para la obtención de ADNc se llevó a cabo utilizando 2 μg de ARN en un volumen final de 20 μl en presencia de las Mix 1 y 2:

- Mix 1 \rightarrow desoxi-NTPs 1 mM (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina) y Stem-Loop RT primers 0,05 μM , no más de 3 por reacción incluyendo el control interno *SNORD44* (Integrated DNA Technologies, Inc.) (Tabla 4). En la actualidad, no existen genes de referencia o "housekeepings" aceptados universalmente para la normalización de los niveles de expresión de miARNs, y aquellos que se utilizan son específicos del tejido, la especie y la patología. Por lo tanto, no existe un consenso para la normalización respecto a la expresión de un gen de referencia estándar entre distintas enfermedades, lo que provoca que los resultados de los estudios de expresión de miARNs no sean comparables entre sí. La estrategia ideal consiste en normalizar la expresión de miARNs a

genes de referencia con la misma naturaleza bioquímica pertenecientes a la misma clase de ARN, en este caso, a un miARN. Sin embargo, los miARNs propuestos como genes de referencia en otras patologías, poseen una expresión diferencial en tumores hipofisarios, por lo que no pueden ser utilizados. Idealmente, se consideran como buenos genes de referencia a aquellos cuya expresión en todas las muestras analizadas presenta bajos desvíos estándar y valores similares para la media y mediana de su expresión, además de ser poco sensibles a las condiciones de almacenamiento y procesamiento de la muestra y poseer una alta eficacia de extracción. Por lo tanto, cuando no es posible utilizar un miARN como referencia, se puede normalizar a un ARN como propiedades similares, como es el caso de los ARN pequeños nucleolares (ARNpn), que poseen longitud, estabilidad y abundancia de expresión similares a los miARNs [91]. En este trabajo normalizamos los niveles de expresión de los miARNs evaluados al ARNpn *SNORD44* (si bien durante la puesta a punto de la técnica se probaron también el ARNr 5S y U6, pero no se logró la correcta amplificación de los mismos, por lo cual fueron descartados).

- Mix 2 → Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM (M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer; Promega, WI, USA) y 200 U de retrotranscriptasa M-MLV (Promega, WI, USA).

En primer lugar, se realizó una pre-incubación de la Mix 1, el ARN y el H₂O estéril comercial durante 2 minutos en un termobloque (AccuBlock, Labnet International, Inc.) a 65°C. Luego, se la sometió a un shock térmico en hielo durante 2 minutos. Por último, se agregó la Mix 2, la mezcla final se agitó mediante vórtex y se la colocó en el termociclador GenePro (Bioer Technology Co. Ltd.) con el siguiente programa de ciclado: 30' a 16°C (hibridación miARN-Stem-Loop primer), 60' a 37°C (catálisis de la retrotranscripción por la M-MLV), 5' a 85°C (desnaturalización de la enzima), finalizando a 4°C. Los controles negativos de la reacción fueron realizados omitiendo la enzima o la muestra.

Tabla 4 | Secuencias de los Stem-Loop RT primers utilizados durante la retrotranscripción de cada miARN y del control interno *SNORD44*. Se resaltan en verde y negrita las últimas 6 bases específicas.

miARN	Stem-Loop RT primer (5' -> 3')
hsa-miR-23a-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC GGAAT
hsa-miR-23b-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC GTGGTA
hsa-miR-26a-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC AGCCTA
hsa-miR-15b-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC TGTA
<i>SNORD44</i>	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC AGTCAG

PCR EN TIEMPO REAL

La técnica de PCR en tiempo real se llevó a cabo según el protocolo descrito por nosotros en [92]–[94]. Los *primers forward* y *reverse* para los ARNm evaluados se diseñaron utilizando la herramienta “Primer Blast” de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) y fueron adquiridos en Integrated DNA Technologies, Inc. Las secuencias de cada uno y las temperaturas de hibridación se muestran en la **Tabla 5**. Las mezclas de reacción fueron preparadas en un volumen final de 15 μ l utilizando 7,5 μ l de SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix de Bio-Rad Laboratories, Inc., USA (contenido: antibody-mediated hot-start Sso7d fusion polymerase, dNTPs, MgCl₂ y SYBR Green I), 150 ng de ADNc y cebadores en una concentración de 0,5 μ M en el caso de los ARNm y en una concentración de 0,2 μ M para los miARNs. Luego de un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min, el ADNc fue amplificado durante 40 ciclos (20 segundos a 95°C, 60 segundos para los ARNm y 40 segundos para los miARNs a 56.2 - 63°C dependiendo del par de cebadores utilizados, y finalmente 40 segundos a 72°C). La amplificación de los productos de ADN fue monitoreada y registrada con el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), y los datos fueron analizados a través del método del delta CT (diferencia de umbral de fluorescencia alcanzado entre el gen de interés y el gen de referencia). En nuestro caso se utilizó como referencia o control interno el gen de la Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para los ARNm, y SNORD44 para los miARNs (ARN pequeño nucleolar, C/D box 44). La pureza del producto de la reacción fue siempre corroborada a través de la curva de Melting obtenida en el programa. Se realizaron duplicados para cada muestra y blanco.

Tabla 5 | Secuencias y temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos cebadores utilizados en el presente trabajo.

Gen/miARN	Referencia NCBI/miRBase	Secuencia primers (5'->3')	T° annealing
<i>CTNNB1</i>	NM_001904.4; NM_001098209.2; NM_001098210.2; NM_001330729.2	Fw: ATGGCTTGGAAATGAGACTGCT Rv: GGTCCATACCCAAGGCATCC	58.5°C
<i>CTNNBIP1</i>	NM_020248.3; NM_001012329.2	Fw: GGAAGATGGGATCAAACCTGAC Rv: GAAAACGCCATCACCACGTC	56.2°C
<i>CCND1</i>	NM_053056.3	Fw: TATTGCGCTGCTACCGTTGA Rv: CCAATAGCAGAAACAATGTGAAA	63°C

<i>GAPDH</i>	NM_001357943.2; NM_001256799.3; NM_001289745.3; NM_001289746.2; NM_002046.7	Fw: TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA Rv: TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT	62°C
<i>SNORD44</i>	NR_002750.2	Fw: GCAAATGCTGACTGAACATGAAGG Rv: TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	58.8°C
hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	Fw: GCTCGATCACATTGCCAGGG Rv: TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	59.6°C
hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	Fw: GACCGATCACATTGCCAGGG Rv: TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	59.5°C
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	Fw: GGCCGGTTCAAGTAATCCAGG Rv: TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	59.3°C
hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417	Fw: GCGAGTAGCAGCACATCATGG Rv: TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	58.4°C

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica se realizó en cortes histológicos de 4 µm obtenidos con micrótopo de muestras de tumores hipofisarios humanos embebidos en parafina (ART. 181601, Cicarelli Laboratorios, Santa Fe, Argentina) y colocados sobre portaobjetos de vidrio con carga positiva (Patho-Lab, China), como hemos descrito previamente en [90], [95], [96]. Los cortes fueron desparafinizados en xileno, rehidratados en alcoholes de concentraciones decrecientes, lavados y tratados con citrato de sodio 10mM pH=6 en microondas a potencia máxima durante 10-20 minutos para la recuperación de antígenos. Las peroxidasa endógenas fueron inhibidas con H₂O₂ 3% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se pre-incubaron con leche 5% en PBS 1X durante 1 hora para bloquear sitios de unión inespecífica. Luego se delimitaron los tejidos con lápiz hidrofóbico (Mini PAP Pen, Ref. 008877, Life Technologies) y se incubaron con el anticuerpo primario anti-β-Catenina total (rabbit polyclonal IgG, #06-734, EMD Millipore Corp., MA, USA) en una dilución entre 1:150-1:500 en PBS 1X-BSA 1% durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron con PBS en ausencia de anticuerpo primario.

Seguido a esto, los cortes se lavaron e incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado anti-rabbit IgG (H+L) (#14708S, Cell Signaling Technology, MA, USA) o con el anticuerpo secundario biotinilado anti-rabbit IgG (H+L) (BA-1000, Vector Laboratories,

Inc.) en una dilución 1:200 en PBS 1X; y luego con un complejo de avidina y biotina (ABC) preformado por 30 minutos (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Inc., CA, USA). Como cromógeno se utilizó Diaminobenzidina (DAB) (DAB Substrate Kit, Peroxidase, with Nickel, SK-4100, Vector Laboratories, Inc.). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas con alcoholes de graduación creciente, sumergidas en xileno y montadas con DPX (Sigma Aldrich). Los análisis se realizaron utilizando un microscopio de luz transmitida Carl Zeiss Primo Star con cámara AxioCam ERc 5s, con una magnificación total de 400X. El procesamiento de las imágenes adquiridas se realizó con el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para determinar porcentajes de células β -Catenina positivas, se contabilizaron las células positivas para la proteína en membrana y se las relativizó al total de núcleos de la imagen. Un mínimo de 3 imágenes de 3 experimentos distintos fue contabilizado para cada caso.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias. Las comparaciones de los niveles de microARNs y ARNm entre los distintos grupos de pacientes, clasificados a partir de los datos de sus historias clínicas, se efectuaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas: el análisis de la variancia de Kruskal Wallis y la prueba U de Mann-Whitney. Las correlaciones entre los niveles de diferentes microARNs y ARNm, y los parámetros clínicos y de laboratorio, se realizaron utilizando el test de correlación de Spearman. $p < 0.05$ se consideró significativo. Cuando las diferencias no alcanzaron la significancia ($p > 0.05$) se las determinó como "NS". El número de unidades experimentales o repeticiones de cada experimento (N) se encuentra detallado en cada figura. Se utilizó el programa GraphPAD Prism 8 para realizar los análisis mencionados (<https://www.graphpad.com/>).

RESULTADOS

SELECCIÓN DE miARNs

Como se desarrolló en la sección de Materiales y Métodos, llevamos a cabo la selección de los miARNs a evaluar en base a criterios que establecimos en el laboratorio y aplicamos de manera secuencial utilizando la herramienta miRSystem [80]. Luego de introducir los 26 genes relacionados a la invasividad y el crecimiento de tumores hipofisarios agresivos en al menos dos estudios transcriptómicos tomados de [81] como "*Target genes to miRNAs*" en el miRSystem, obtuvimos un total de 670 posibles miARNs reguladores. Luego de aplicar un primer filtro en base al primer criterio: Criterio 1 → "Al menos 1 interacción miRNA-gen target está predicha por 4 o más algoritmos en miRSystem", este número se redujo a 141 miARNs (**Figura 9, A**). De éstos, solo 38 cumplieron con el segundo criterio: Criterio 2 → "3 o más interacciones miRNA-genes target están predichas por 4 o más algoritmos en miRSystem" y pasaron el segundo filtro (**Figura 9, B**). Por último, se aplicó un tercer filtro siguiendo el tercer criterio: Criterio 3 → "3 o más interacciones con genes seleccionados de las vías Wnt/ β -Catenina o Notch, y al menos 1 interacción con un gen de cada vía, están predichas por miRSystem". De esta manera obtuvimos un número final de 10 miARNs que cumplieron con los tres criterios (**Figura 9, C**). De estos 10 miARNs seleccionamos 5 para su evaluación en este trabajo: hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p y hsa-miR-424-5p.

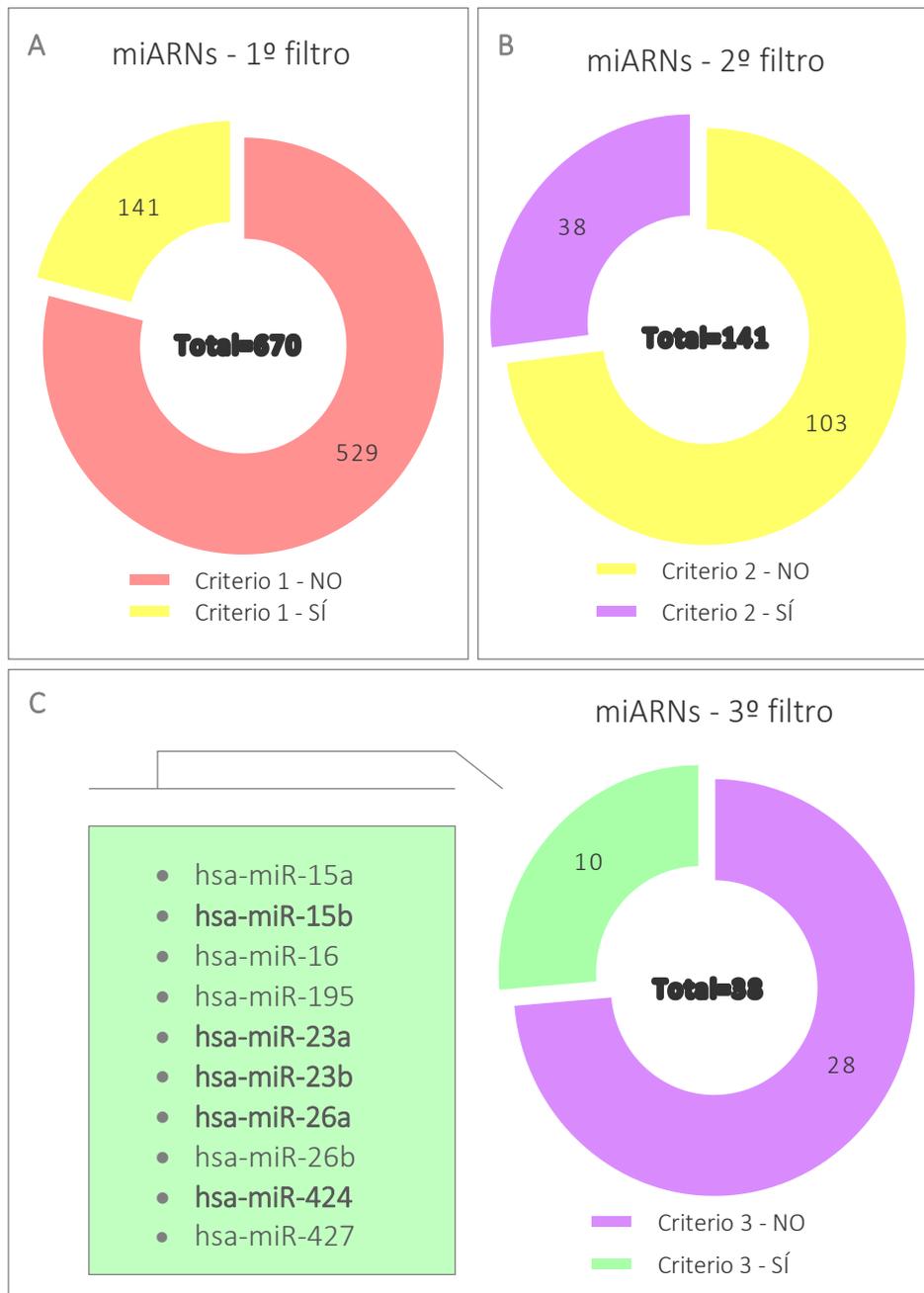


Figura 9 | Representación gráfica de los 3 filtros realizados siguiendo los criterios que establecimos en el laboratorio para la selección de los miARNs a evaluar en este trabajo: A) 1º filtro – Criterio 1, B) 2º filtro – Criterio 2 y C) 3º filtro – Criterio 3; en negrita se resaltan los miARNs seleccionados. En cada gráfico de torta se indica el total y el número de miARNs que cumplen o no el criterio.

EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS

Durante la puesta a punto de la Stem-Loop RT-qPCR en nuestro laboratorio, el hsa-miR-424-5p no pudo ser amplificado, por lo cual no fue medido en la cohorte de pacientes estudiada en el presente trabajo.

Se detectó expresión de los otros cuatro miARNs en la totalidad de los tumores hipofisarios humanos analizados (Tabla 6), en general con niveles de expresión variables dentro del mismo histotipo tumoral (Figura 10 A-D). En particular, se observó una expresión más homogénea del hsa-miR-26a-5p en el grupo de tumores no funcionantes (Figura 10 C). Al comparar las medianas, no encontramos diferencias significativas entre los distintos histotipos tumorales para ninguno de los miARNs evaluados (no se muestra). Tampoco hallamos diferencias al comparar el grupo de los tumores hipofisarios funcionantes (F) respecto a los no funcionantes (NF) para ninguno de los miARNs (Figura 11 A-D). Sin embargo, dada la expresión del hsa-miR-15b-5p particularmente baja para los prolactinomas (Figura 10 D), se comparó su expresión en este grupo respecto al resto de los tumores (NF, GH y ACTH), y también se analizó su expresión respecto a los NF y a los secretores (GH y ACTH). Encontramos para este miARN una expresión significativamente más baja del grupo de prolactinomas con respecto al resto de tumores evaluados (Figura 12 A), como así también al comparar NF vs PRL (Figura 12 B), y respecto al resto de tumores funcionantes (Figura 12 C). No obstante, se deberían sumar prolactinomas a la cohorte para confirmar estas diferencias. Esto no se encontró para ningún otro miARN evaluado (no se muestra).

Tabla 6 | Características de la cohorte de tumores hipofisarios utilizados para las determinaciones por RT-qPCR. En la tabla se muestra la edad y el sexo de los pacientes portadores de los tumores así como el subtipo de tumor según sus características secretoras, si es micro o macroadenoma según el tamaño, si se considera o no invasivo, el grado de Knosp evaluado por el neurocirujano interviniente a partir de las MRI y si se observó recurrencia; además, en los casos en los que fue posible la adquisición del dato, se indica el índice de proliferación a partir de la marcación con Ki-67 (%).

Paciente	Edad	Sexo	% Ki-67	Invasivo	Grado Knosp	Micro/macro	Tamaño (mm)	Recurrente
NF1	66	M	2%	Sí	3	Macro	24	No
NF2	75	F	-	No	1	Macro	30	No
NF3	58	M	<1%	Sí	4	Macro	54	No
NF4	55	F	1,20%	No	2	Macro	25	No
NF5	68	F	<1%	Sí	4	Macro	42	No
NF6	52	F	<1%	Sí	3	Macro	15	No
NF7	27	M	<1%	Sí	1	Macro	40	No
NF8	27	F	-	Sí	3	Macro	60	No
NF9	38	M	-	No	2	Macro	25	No
NF10	67	F	1%	Sí	3	Macro	22	No
NF11	63	F	-	Sí	4	Macro	55	No
NF12	55	F	<1%	No	1	Macro	32	No
NF13	49	F	<1%	Sí	4	Macro	42	No
NF14	44	F	2,40%	No	1	Macro	19	No
NF15	69	M	<1%	No	1	Macro	18	No
NF16	42	M	-	Sí	4	Macro	38	No

NF17	46	M	-	Sí	4	Macro	32	No
NF18	40	F	1,20%	No	1	Macro	34	No
NF19	45	M	3%	Sí	4	Macro	72	Sí
GH1	43	F	1,60%	No	1	Macro	27	No
GH2	22	F	-	Sí	3	Macro	17	No
GH3	46	M	-	No	2	Macro	17	No
GH4	23	M	7,50%	Sí	4	Macro	26	No
GH5	21	F	-	Sí	4	Macro	21	No
GH6	43	F	-	No	2	Macro	17	No
GH7	61	F	-	No	1	Micro	10	No
GH8	62	M	-	No	0	Micro	9	No
ACTH1	65	F	2%	Sí	4	Macro	67	Sí
ACTH2	19	F	<1%	No	0	Micro	3	No
ACTH3	33	F	2%	No	0	Macro	15	No
ACTH4	61	M	3%	Sí	3a	Macro	12	No
ACTH5	28	F	2-3%	No	0	Micro	8	No
ACTH6	35	F	2-3%	No	0	Micro	5	No
PRL1	39	F	1%	No	1	Micro	9	No
PRL2	38	M	<1%	Sí	1	Macro	48	No
PRL3	39	M	<1%	Sí	1	Macro	48	Sí
PRL4	31	M	2%	No	2	Macro	22	No

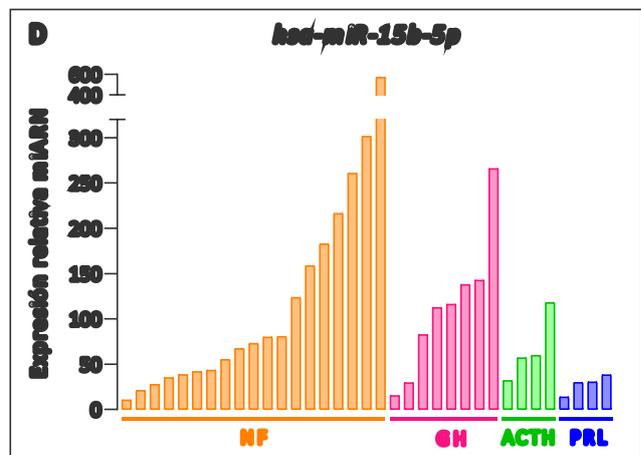
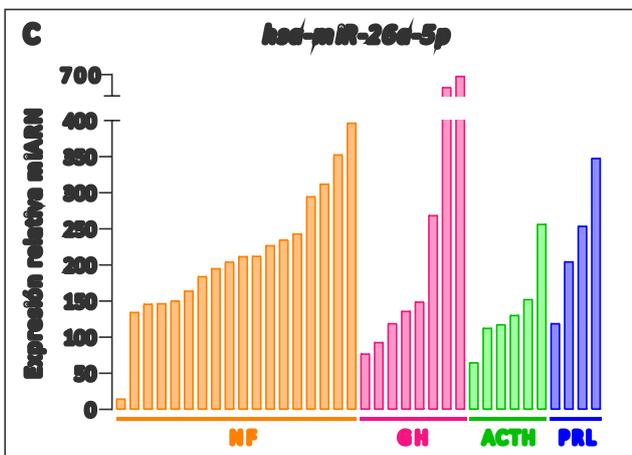
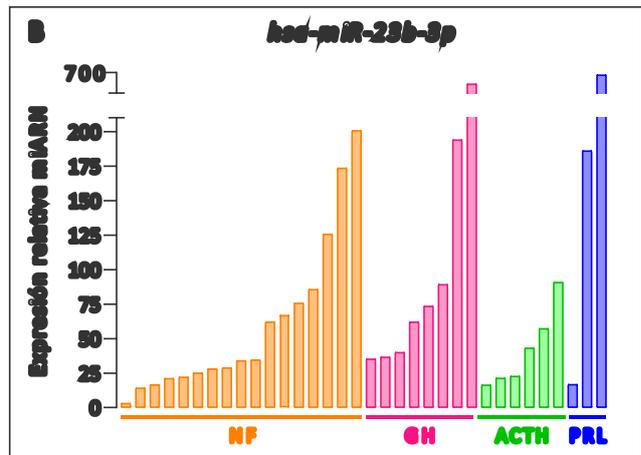
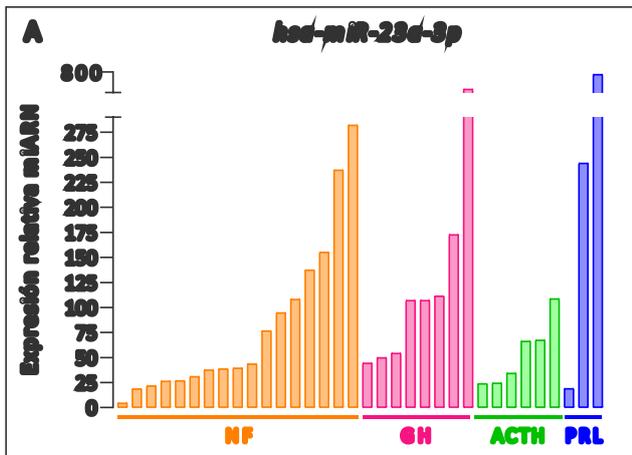


Figura 10 | Expresión de los miARN determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos. A) hsa-miR-23a-3p (n=34), B) hsa-miR-23b-3p (n=34), C) hsa-miR-26a-5p (n=36) y D) hsa-miR-15b-5p (n=35). Los niveles de expresión de cada miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. NF = no funcionante, GH = somatotropinoma, ACTH = corticotropinoma, PRL = prolactinoma.

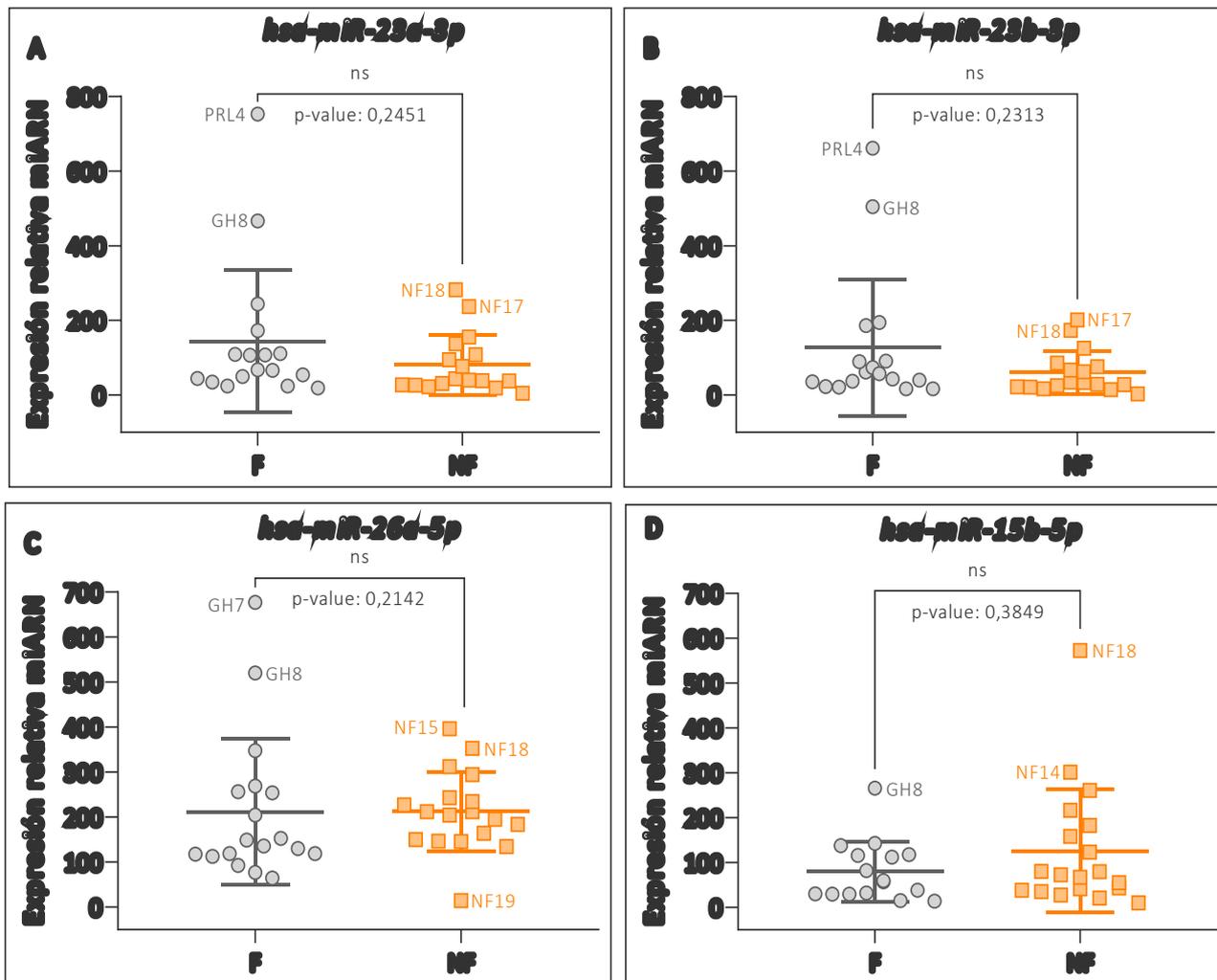


Figura 11 | Expresión de los miARN determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en funcionantes y no funcionantes. A) hsa-miR-23a-3p F (n=17) vs NF (n=17), B) hsa-miR-23b-3p F (n=17) vs NF (n=17), C) hsa-miR-26a-5p F (n=18) vs NF (n=18) y D) hsa-miR-15b-5p F (n= 16) vs NF (n= 19). Los niveles de expresión de los miARNs en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B), C) y D) p=ns (no significativo). NF = no funcionante, F = funcionante.

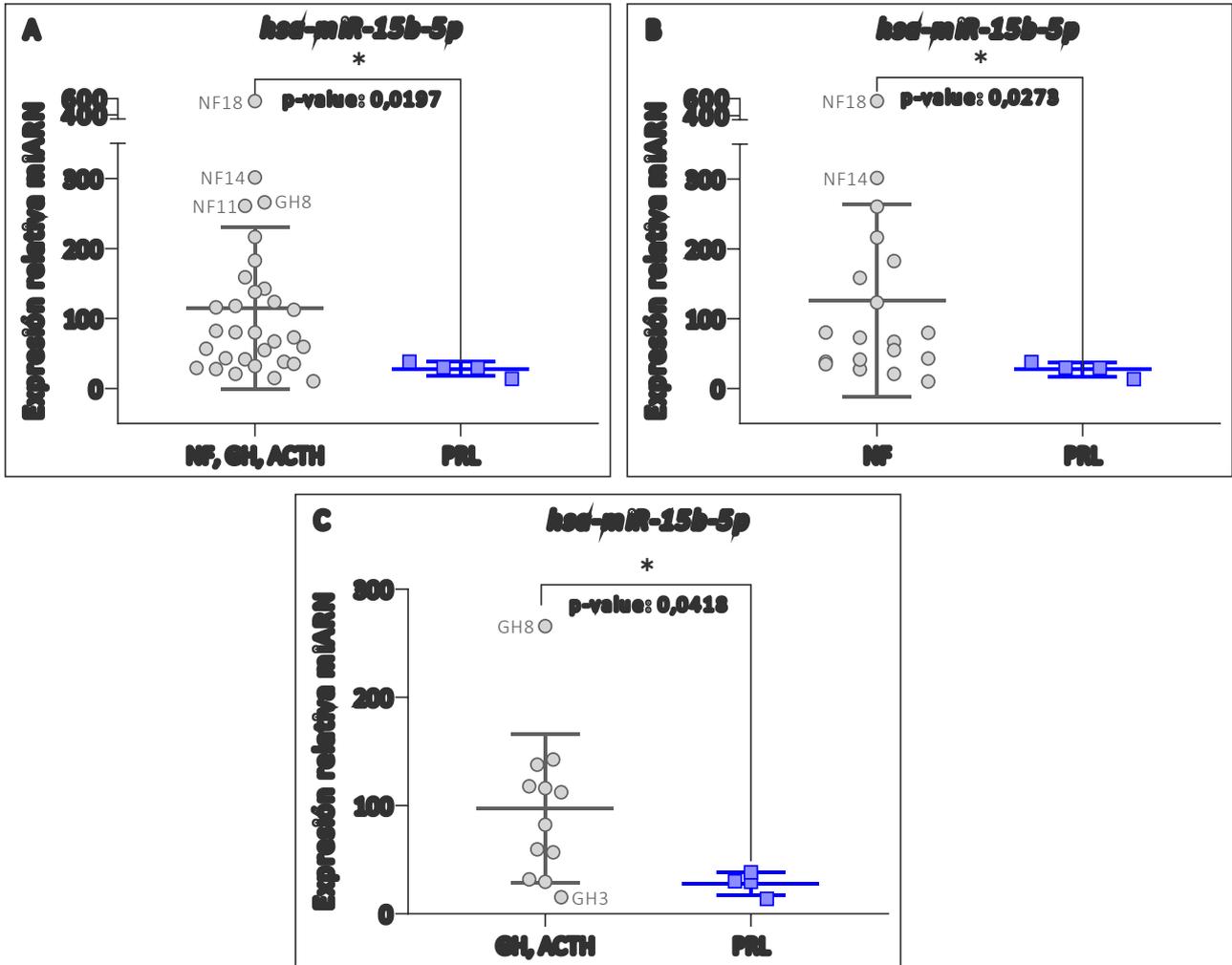


Figura 12 | Expresión de hsa-miR-15b-5p determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en: A) NF, GH y ACTH (n=31) vs PRL (n=4), B) NF (n=19) vs PRL (n=4) y C) GH y ACTH (n=12) vs PRL (n=4). Los niveles de expresión del miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A) *p= 0,0197; B) *p= 0,0273; C) *p= 0,0418. NF = no funcionante, GH = somatotropinoma, ACTH = corticotropinoma, PRL = prolactinoma.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y EL TAMAÑO TUMORAL

También analizamos la expresión de los miARNs y su posible relación con el tamaño tumoral, para lo cual agrupamos los tumores en microadenomas (<10 mm) y macroadenomas (>10 mm). Como muestra la Figura 13 A-D, no encontramos diferencias significativas entre estos grupos para la expresión de ningún miARN.

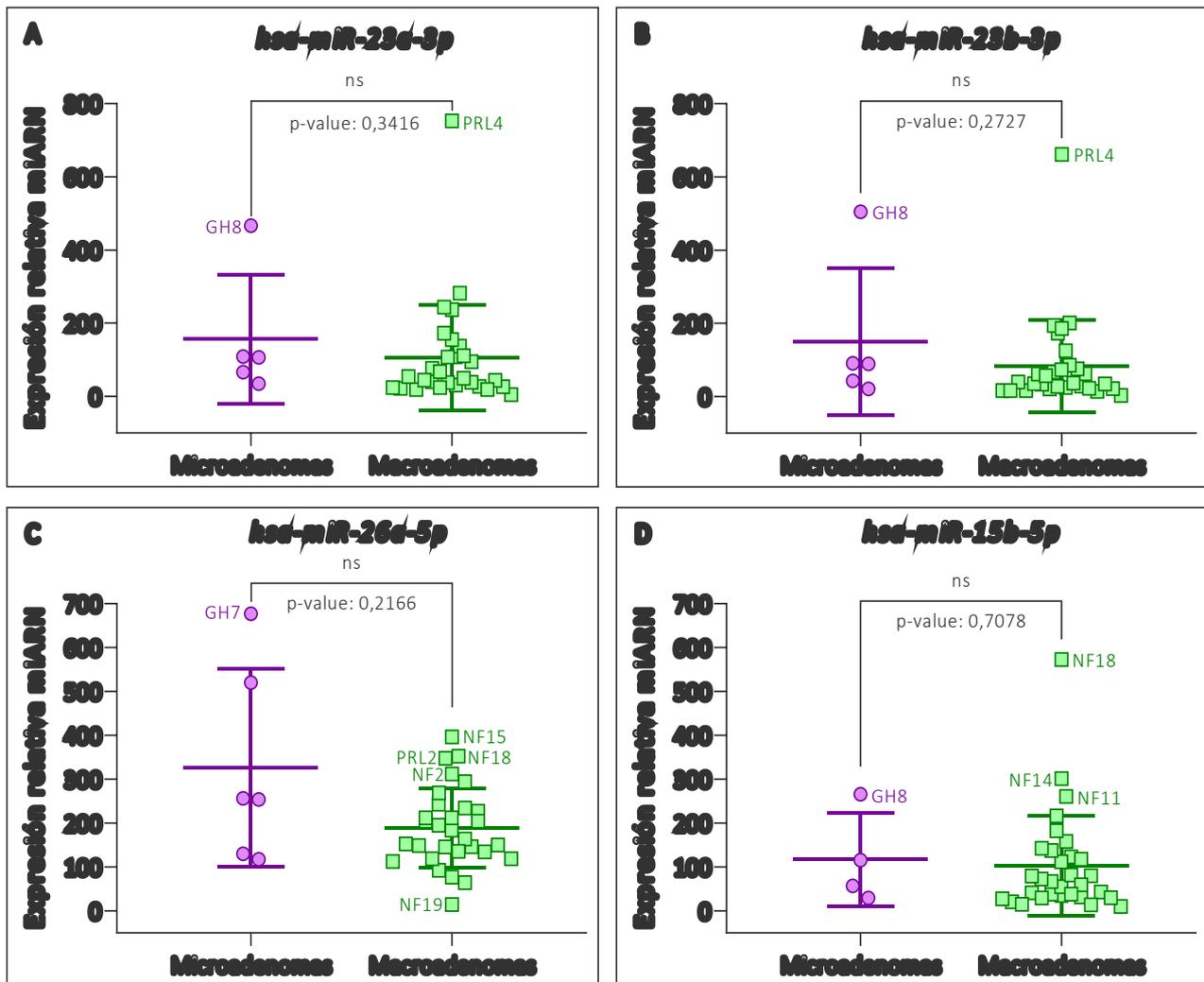


Figura 13 | Expresión de los miARNs determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en microadenomas y macroadenomas: A) hsa-miR-23a-3p micro (n=5) vs macro (n=29), B) hsa-miR-23b-3p micro (n=5) vs macro (n=29), C) hsa-miR-26a-5p micro (n=6) vs macro (n=30) y D) hsa-miR-15b-5p micro (n=4) vs macro (n=31). Los niveles de expresión del miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B), C) y D) p=ns (no significativo).

Por otro lado, al visualizar los datos en un mapa de calor ordenando los tumores de menor a mayor tamaño, observamos para hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p y hsa-miR-26a-5p un predominio de baja expresión (indicado en verde claro) entre los tumores de mayor tamaño, y de mayor expresión entre aquellos de menor tamaño (Figura 14). No obstante, se debe considerar que este tipo de apreciaciones son cualitativas. Por último, en el mismo mapa de calor se evidencia que la expresión del hsa-miR-15b-5p es heterogénea para los distintos tamaños tumorales, por lo cual parece ser independiente de este dato clínico.

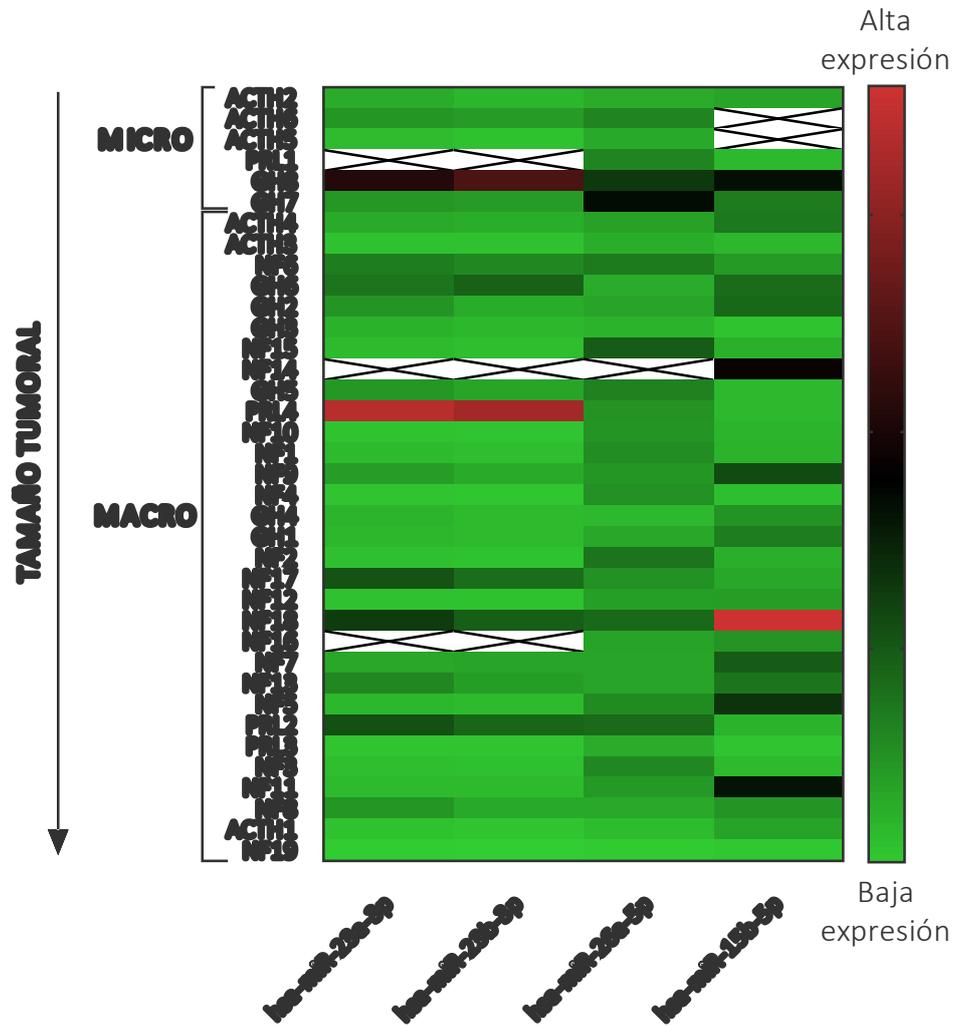


Figura 14 | Mapa de calor en el que se muestra la relación entre la expresión de los miARNs y el tamaño de los tumores. En base a los datos del tamaño en mm de las historias clínicas, los tumores se ordenaron de menor a mayor, y se muestra para cada uno de ellos el perfil de expresión de los miARNs evaluados. El color verde claro indica bajos niveles y el color rojo claro indica elevados niveles.

En concordancia con lo observado en los gráficos de la Figura 13 y en el mapa de calor de la Figura 14, el análisis de correlación indica que ninguno de los miARN correlaciona con el tamaño tumoral, si bien los miARNs hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p y hsa-miR-26a-5p, a diferencia del hsa-miR-15b-5p, muestran un probable comportamiento opuesto entre el tamaño tumoral y la expresión de los miARNs (Figura 15 A-D), aunque los valores r son bajos y los valores p no son significativos.

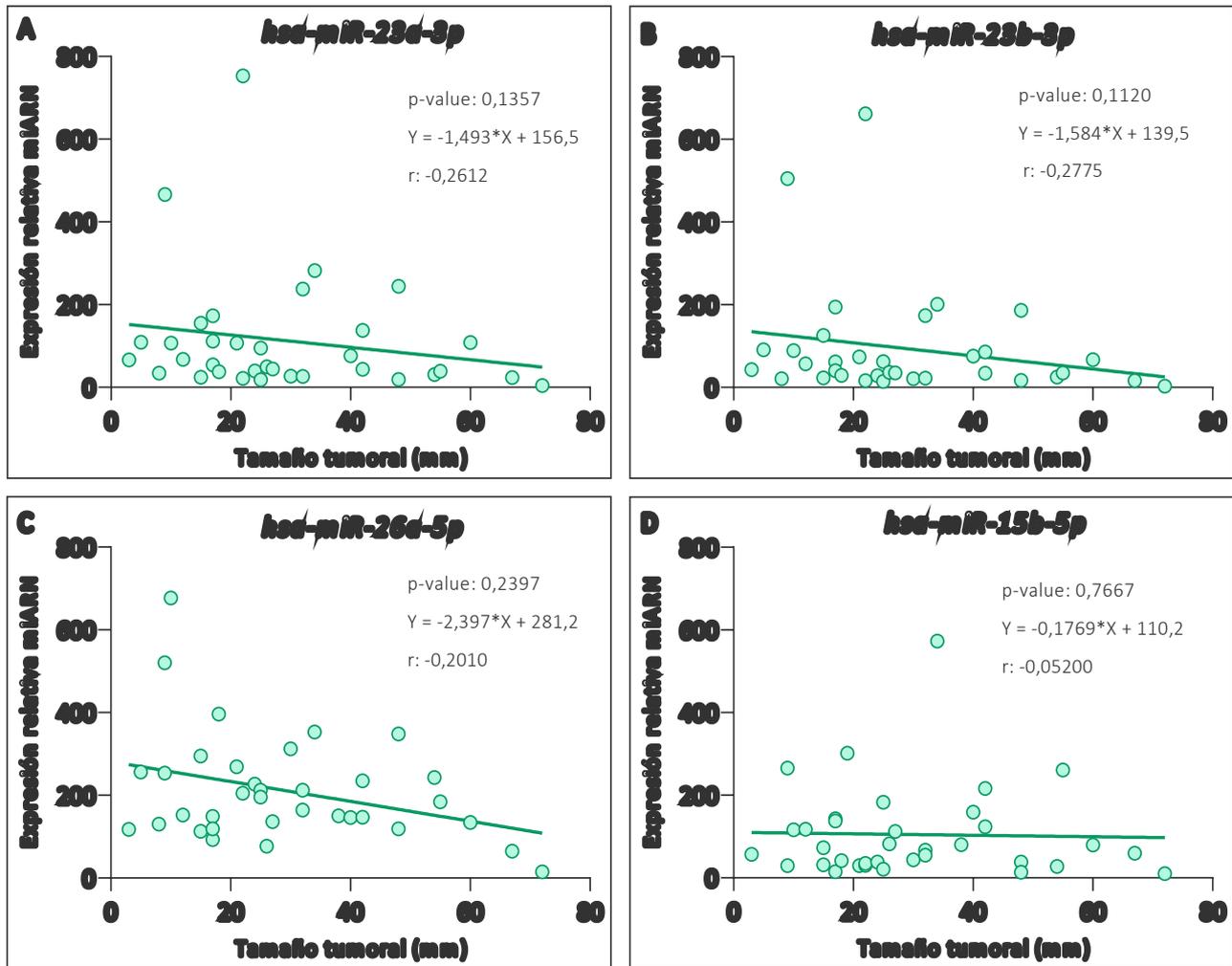


Figura 15 | Correlaciones entre los niveles de expresión de los miARN con el tamaño tumoral (en mm) en muestras de tumores hipofisarios humanos. A) hsa-miR-23a-3p (n= 34), B) hsa-miR-23b-3p (n= 34), C) hsa-miR-26a-5p (n=36) y D) hsa-miR-15b-5p (n=35). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramétrico: A), B), C) y D) no hay correlación, p=ns (no significativo).

Además, al realizar la misma evaluación pero dentro de los grupos de tumores funcionantes (F) y no funcionantes (NF) por separado, no encontramos correlaciones significativas en ninguno para hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p y hsa-miR-15b-5p y el tamaño tumoral (no se muestra). Sin embargo, encontramos una correlación negativa y con significancia estadística entre la expresión relativa de hsa-miR-26a-5p y el tamaño tumoral dentro del grupo de tumores no funcionantes, los cuales son todos macroadenomas (Figura 16 A), y no así en el grupo de funcionantes (no se muestra). Al analizar dentro de cada subtipo funcionante, encontramos correlaciones negativas y significativas entre la expresión del hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-23b-3p con tamaño tumoral únicamente en el grupo de somatotropinomas (Figura 16 B, C).

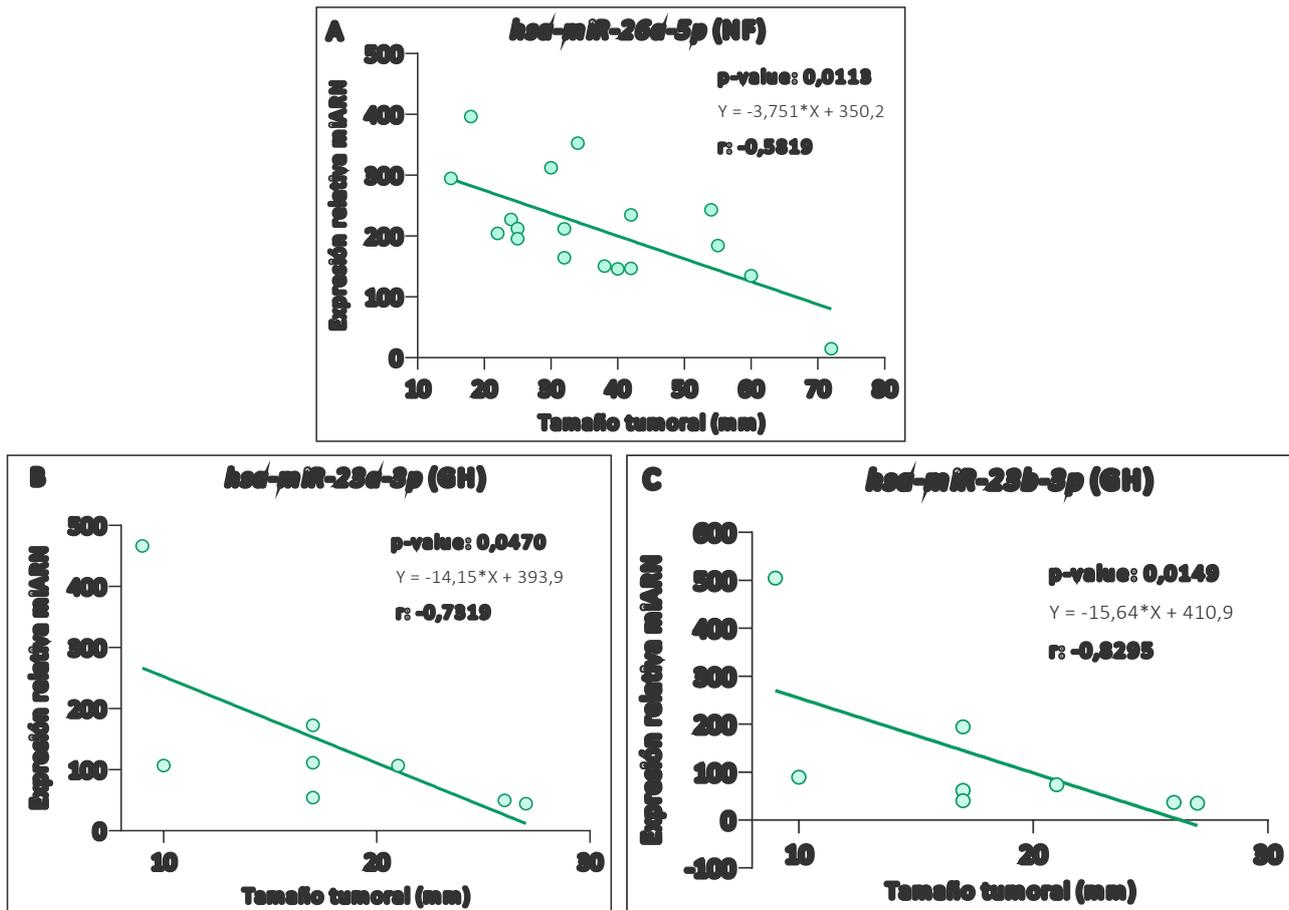


Figura 16 | Correlaciones entre los niveles de expresión de miARNs con el tamaño tumoral (en mm) en muestras de tumores hipofisarios humanos. A) hsa-miR-26a-5p (NF, n=18), B) hsa-miR-23a-3p (GH, n=8) y C) hsa-miR-23b-3p (GH, n=8). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramétrico: correlaciones negativas y significativas en A) $r = -0,5819$, $*p = 0,0113$ B) $r = -0,7319$, $*p = 0,0470$ y C) $r = -0,8295$, $*p = 0,0149$. NF = no funcionantes, GH = somatotropomas.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y LA INVASIVIDAD TUMORAL

Por otro lado, analizamos la expresión de los miARNs respecto a la invasividad de los tumores. Como se puede observar en la Figura 17, no hallamos diferencias significativas entre invasivos y no invasivos para la expresión de los miARNs estudiados (Figura 17 A-D). Sin embargo, parece existir una tendencia a una baja expresión de hsa-miR-26a-5p dentro del grupo de tumores no funcionantes (NF) invasivos respecto a los no invasivos (Figura 17 E), lo cual también se observa para este miARN al analizar la totalidad de los tumores (Figura 17 C).

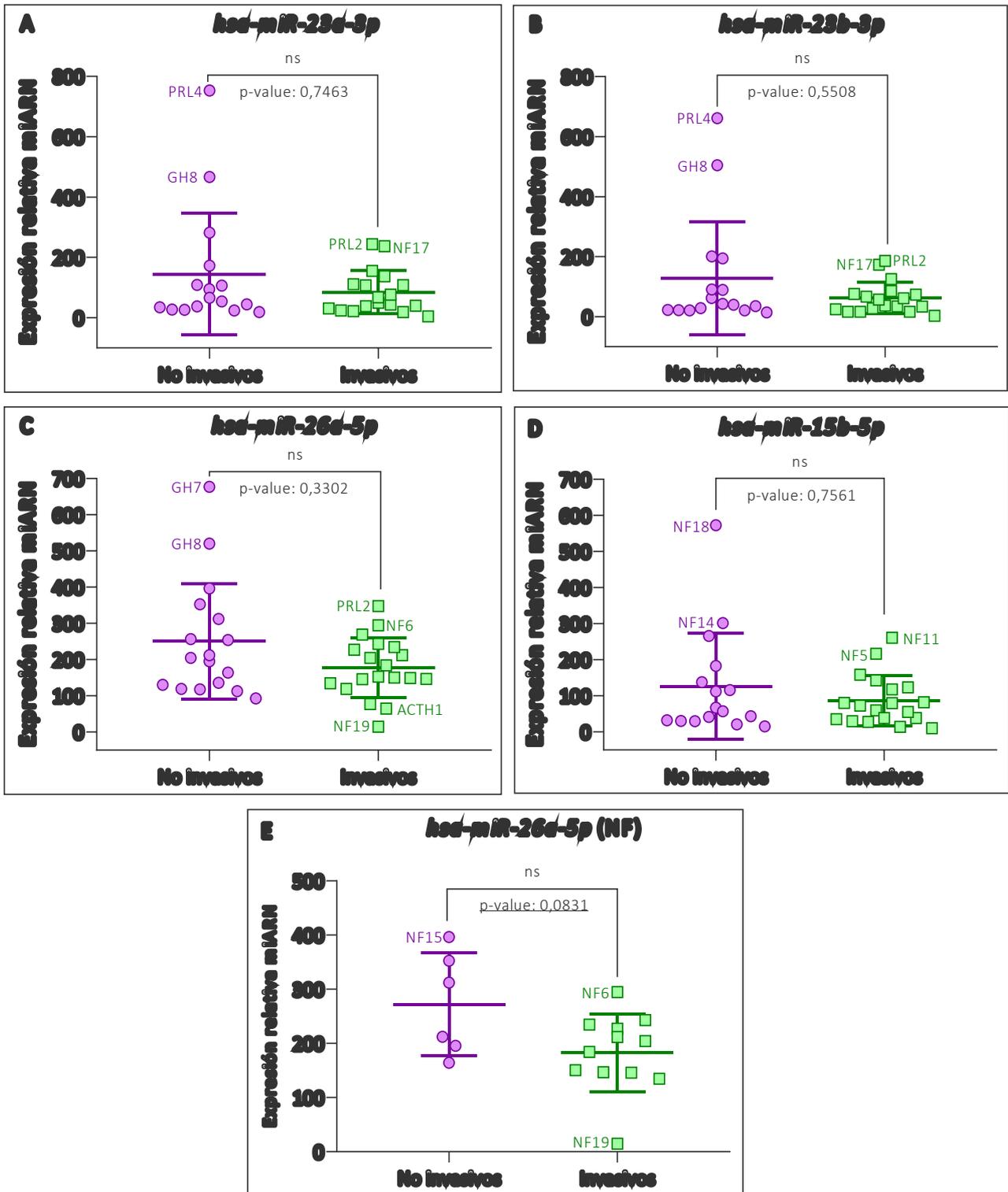


Figura 17 | Expresión de los miARNs determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en invasivos (I) y no invasivos (NI): A) *hsa-miR-23a-3p* I (n=17) vs NI (n=17), B) *hsa-miR-23b-3p* I (n=17) vs NI (n=17), C) *hsa-miR-26a-5p* I (n=18) vs NI (n=18), D) *hsa-miR-15b-5p* I (n=18) vs NI (n=17) y E) *hsa-miR-26a-5p* I (n=12) vs NI (n=6) en tumores no funcionantes (NF). Los niveles de expresión del miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibratoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B), C), D) y E) $p=ns$.

Además, nos preguntamos si había diferencias en la expresión de los miARNs según el grado de Knosp de los tumores, para lo cual los dividimos en 5 grupos: Knosp 0, 1, 2, 3 y 4. En este caso, tampoco encontramos diferencias significativas entre ninguno de los grupos para ninguno de los miARNs (Figura 18 A-D). La expresión de hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-23b-3p presentó una distribución heterogénea entre los distintos grados de Knosp (Figura 18 A-B), mientras que para el hsa-miR-15b-5p se observa lo contrario, siendo su expresión más homogénea entre los diferentes grupos (Figura 18 D). Para el hsa-miR-26a-5p, se pudo visualizar una mayor expresión para los grados 0 y 1, y una menor expresión para los grados 2, 3 y 4; ns (no significativo) (Figura 18 C).

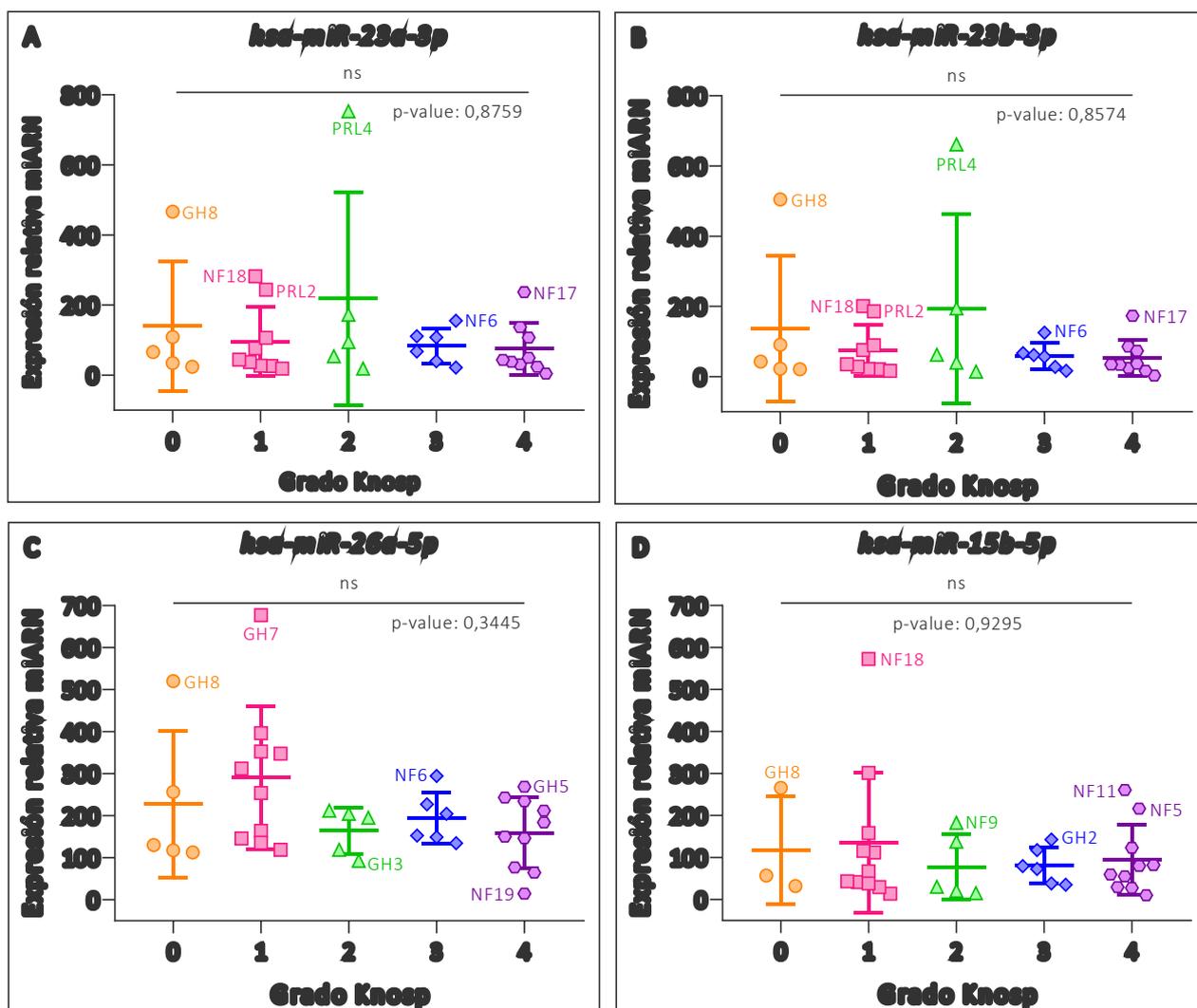


Figura 18 | Expresión de los miARNs determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados según el grado de Knosp (0, 1, 2, 3 y 4): A) hsa-miR-23a-3p y B) hsa-miR-23b-3p 0 (n= 5), 1 (n=9), 2 (n=5), 3 (n=6) y 4 (n=9); C) hsa-miR-26a-5p 0 (n=5), 1 (n=10), 2 (n=5), 3 (n=6) y 4 (n=10); y D) hsa-miR-15b-5p 0 (n=3), 1 (n=11), 2 (n=5), 3 (n=6) y 4 (n=10). Los niveles de expresión del miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al

promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B), C) y D) p=ns.

También analizamos la existencia de correlación entre los niveles de expresión de los miARNs y el grado de Knosp de los tumores. Como muestra la Figura 19, esa correlación no existe para hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p y hsa-miR-15b-5p (Figura 19 A-B, D). Para el hsa-miR-26a-5p tampoco se encontró correlación significativa, sin embargo presentó los mejores parámetros, con el coeficiente r más alto (r: -0,1795) y el valor p más bajo (p= 0,2945) (Figura 19 C). En concordancia con esto, al ordenar los datos de expresión de los miARNs de menor a mayor según el grado de Knosp de los tumores en un mapa de calor, se puede observar una menor expresión de hsa-miR-26a-5p cuanto mayor es el grado de Knosp (indicado en verde claro); mientras que para el resto de los miARNs la expresión es heterogénea y, como vimos con las correlaciones, independiente del grado de Knosp de los tumores. Se destaca la marcada heterogeneidad observada en el mapa de calor para la expresión del hsa-miR-15b-5p respecto a los grados de Knosp crecientes (Figura 20).

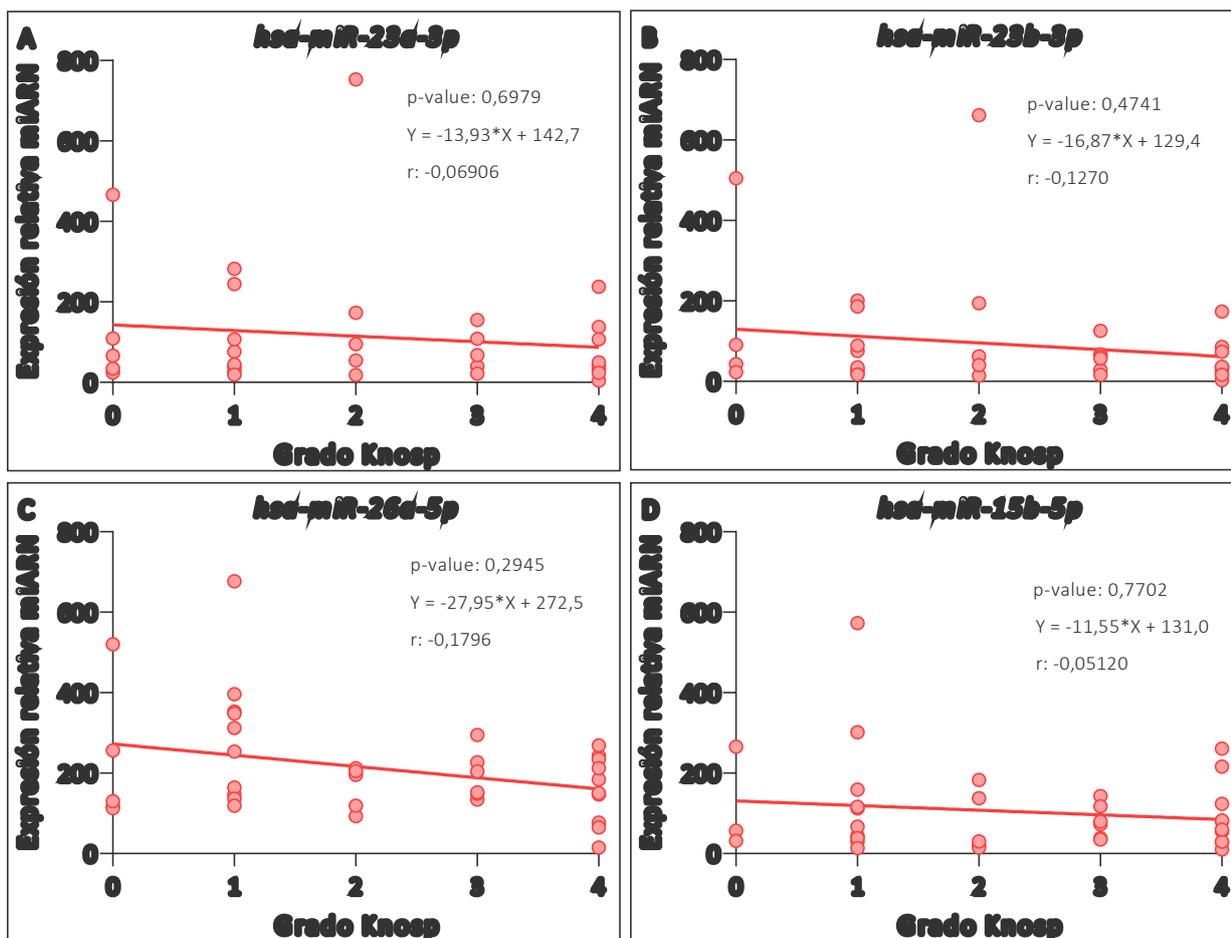


Figura 19 | Correlaciones entre los niveles de expresión de los miARN con los grados de Knosp (0, 1, 2, 3 y 4) en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) hsa-miR-23a-3p (n= 34), B) hsa-miR-23b-3p (n= 34), C) hsa-miR-

26a-5p (n=36) y D) hsa-miR-15b-5p (n=35). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramétrico: A), B), C) y D) no hay correlación, p=ns.

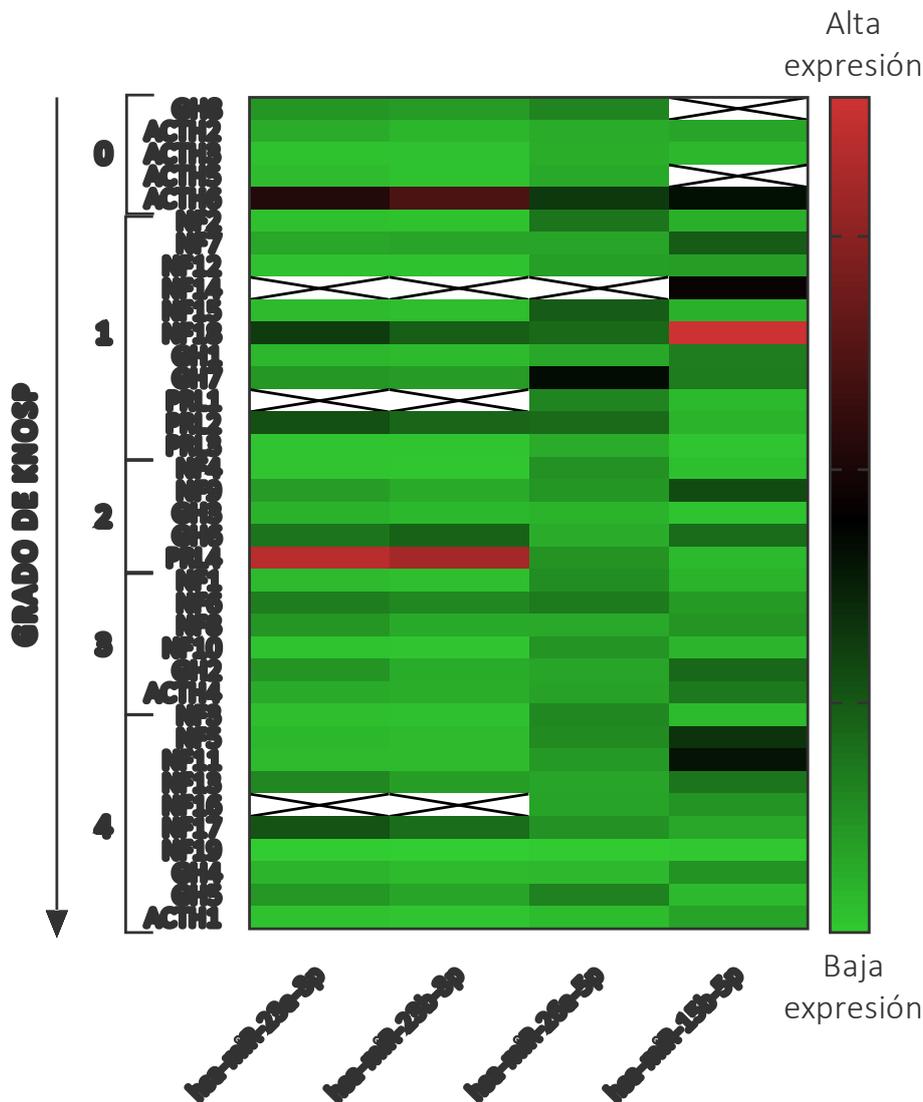


Figura 20 | Mapa de calor en el que se muestra la relación entre la expresión de los miARNs y el grado de Knosp de los tumores. En base a los datos del grado de Knosp de las historias clínicas, los tumores se ordenaron de menor a mayor, y se muestra para cada uno de ellos el perfil de expresión de los miARNs evaluados. El color verde claro indica bajos niveles y el color rojo claro indica elevados niveles.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI-67

Además, decidimos analizar qué sucedía en relación al índice de proliferación Ki-67. Para esto, dividimos a los tumores en dos grupos, según si su %Ki-67 era menor al 3% o si era igual o mayor al 3%. Como resultado de este análisis, no encontramos diferencias significativas en la expresión de hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p y hsa-miR-15b-5p entre los grupos (Figura 21 A-B, D). A diferencia del

resto, para el hsa-miR-26a-5p encontramos una menor expresión en aquellos tumores con Ki $\geq 3\%$ en comparación al grupo con Ki $< 3\%$, con una significancia estadística de 0,0502 (Figura 21 C). Sin embargo, sería interesante aumentar el número de tumores con Ki $\geq 3\%$ dado que en nuestra cohorte el número de tumores con este porcentaje de Ki es muy bajo (n=3). Este resultado sería de relevancia para su potencial uso en la clínica en el diagnóstico y pronóstico de los tumores hipofisarios humanos agresivos en particular.

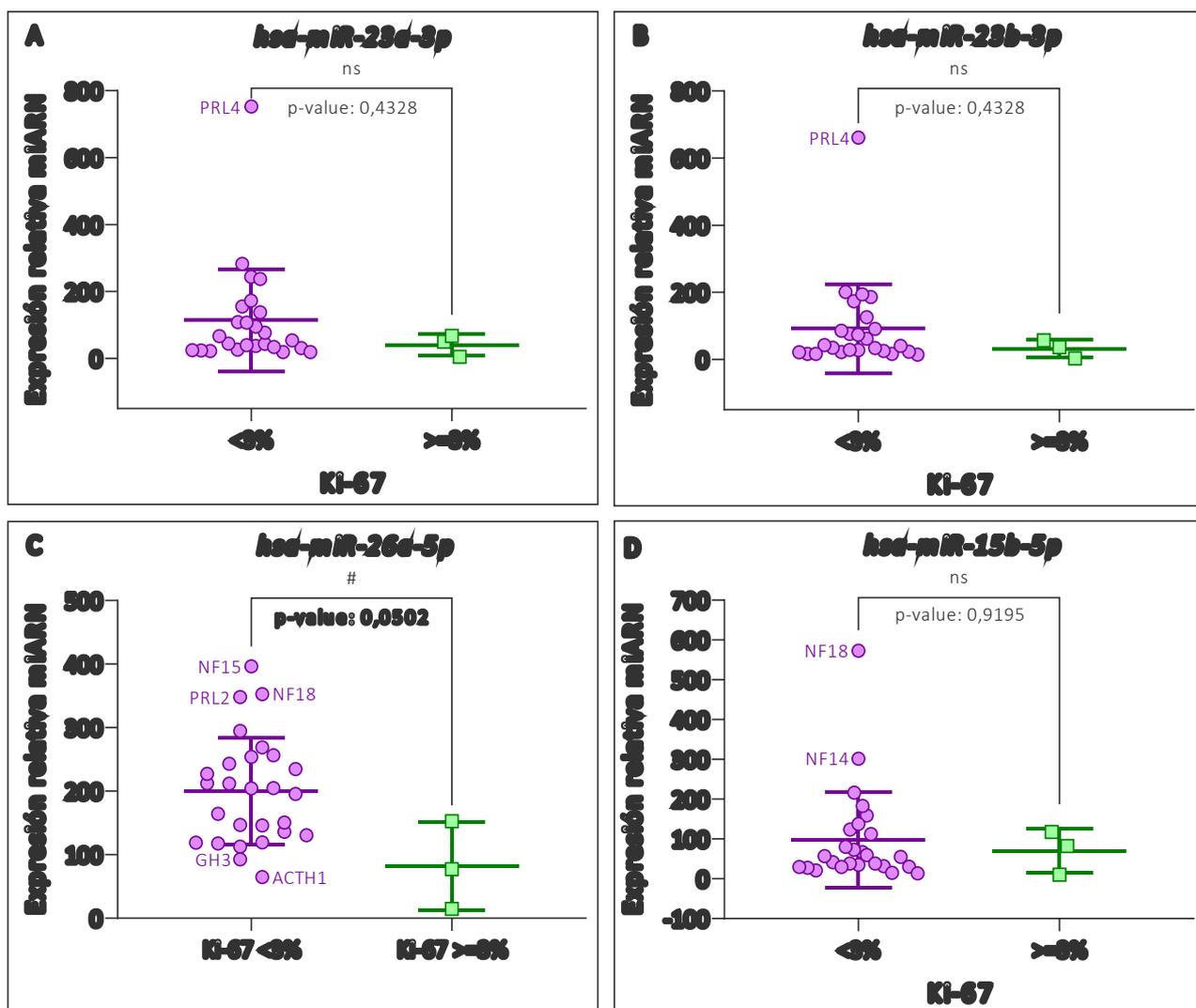


Figura 21 | Expresión de los miARNs determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados según %Ki-67 en $< 3\%$ y $\geq 3\%$: A) hsa-miR-23a-3p $< 3\%$ (n=20) vs $\geq 3\%$ (n=3), B) hsa-miR-23b-3p $< 3\%$ (n=20) vs $\geq 3\%$ (n=3), C) hsa-miR-26a-5p $< 3\%$ (n=21) vs $\geq 3\%$ (n=3) y D) hsa-miR-15b-5p $< 3\%$ (n=20) vs $\geq 3\%$ (n=3). Los niveles de expresión del miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNsn del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibratoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y D) p= ns; C) #p= 0,0502.

Al ordenar los datos de porcentaje del índice de proliferación Ki-67 de menor a mayor en un mapa de calor, se pueden observar menores valores de expresión para hsa-miR-26a-5p cuanto mayor es el porcentaje de Ki; mientras que para el resto de los miARNs sus valores de expresión no siguieron un patrón, destacándose la marcada heterogeneidad para el caso del hsa-miR-15b-5p (Figura 22).

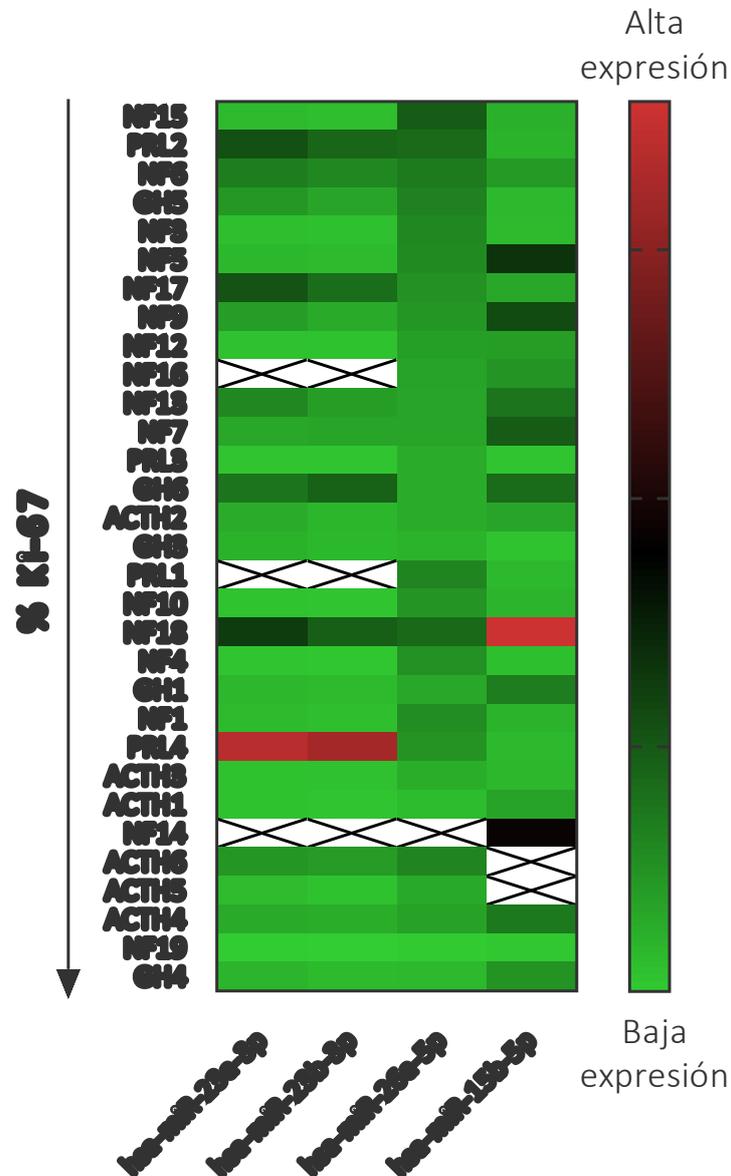


Figura 22 | Mapa de calor en el que se muestra la relación entre la expresión de los miARNs y el % de Ki-67 de los tumores. En base a los datos del índice de proliferación Ki-67 de las historias clínicas, los tumores se ordenaron de menor a mayor, y se muestra para cada uno de ellos el perfil de expresión de los miARNs evaluados. El color verde claro indica bajos niveles y el color rojo claro indica elevados niveles.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE miARNs EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS Y LA RECURRENCIA TUMORAL

Además de estudiar la expresión de los miARNs con respecto a la invasividad, el grado de Knosp y el índice Ki-67 de los tumores, realizamos un análisis en relación a la recurrencia de los mismos separándolos en tumores recurrentes y no recurrentes. Encontramos una expresión significativamente más baja en los tumores recurrentes con respecto a aquellos no recurrentes, para los cuatro miARNs evaluados (Figura 23 A-D). Sin embargo, debería aumentarse el número de tumores recurrentes de la cohorte para verificar estas diferencias, ya que contamos con un número muy pequeño de este tipo de muestras (n=3). Por su parte, este resultado es particularmente relevante ya que evidenciaría un potencial uso de estos cuatro miARNs como biomarcadores de recurrencia en tumores hipofisarios humanos.

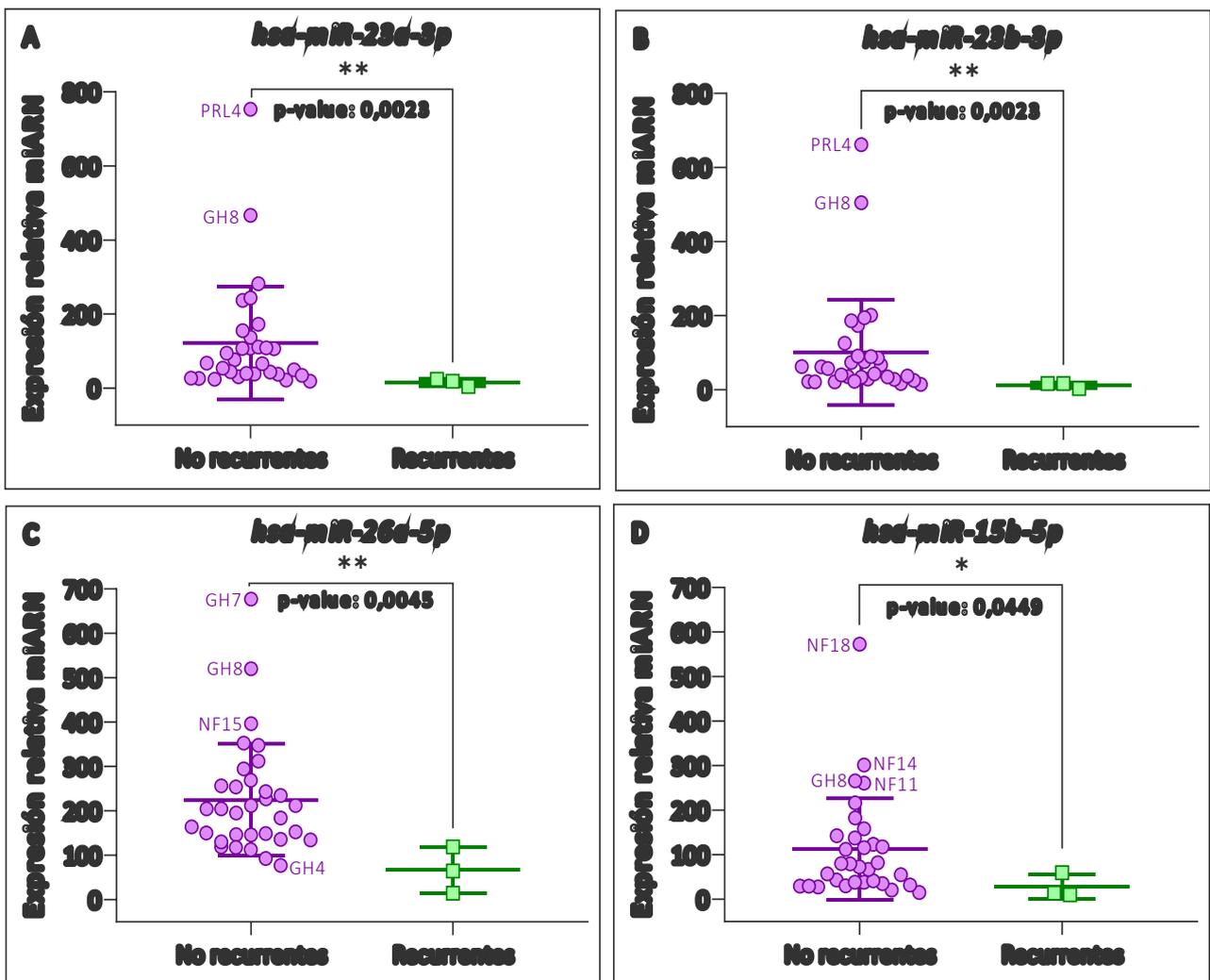


Figura 23 | Expresión de los miARNs determinada por Stem-Loop RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en recurrentes (R) y no recurrentes (NR): A) hsa-miR-23a-3p R (n=3) vs NR (n=31), B) hsa-miR-23b-3p R (n=3) vs NR (n=31), C) hsa-miR-26a-5p R (n=3) vs NR (n=33) y D) hsa-miR-15b-5p R (n=3) vs NR (n=32). Los niveles de expresión del miARN en cada muestra fueron normalizados al ARNs del gen de referencia *SNORD44* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A) **p= 0,0023; B) **p= 0,0023; C) **p= 0,0045 y D) *p= 0,0049.

EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS

La vía de señalización Wnt/ β -Catenina es una de las señales celulares estudiadas en nuestro laboratorio, sobre la cual parte del equipo ha publicado trabajos respecto a su implicancia en prolactinomas y corticotropinomas hipofisarios, con especial énfasis en el estudio del componente clave de la señal canónica: β -Catenina [50], [97]. Además, se sabe que distintos componentes la señalización de Wnt están regulados por miARNs en distintos tipos de cáncer, incluidos los tumores de hipófisis [66], [77], [78].

De manera interesante, en los tumores hipofisarios utilizados en el presente trabajo (Tabla 6) en los cuales determinamos la expresión de hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p y hsa-miR-15b-5p, se evaluó también la expresión del ARNm de los genes *CTNNB1*, *CTNNBIP1* y *CCND1* de la vía Wnt/ β -Catenina. Observamos niveles de expresión variables dentro del mismo histotipo tumoral para todos ellos (Figura 24 A-C). No encontramos diferencias significativas al evaluar la expresión entre los distintos histotipos para ninguno de los ARNm (no se muestra).

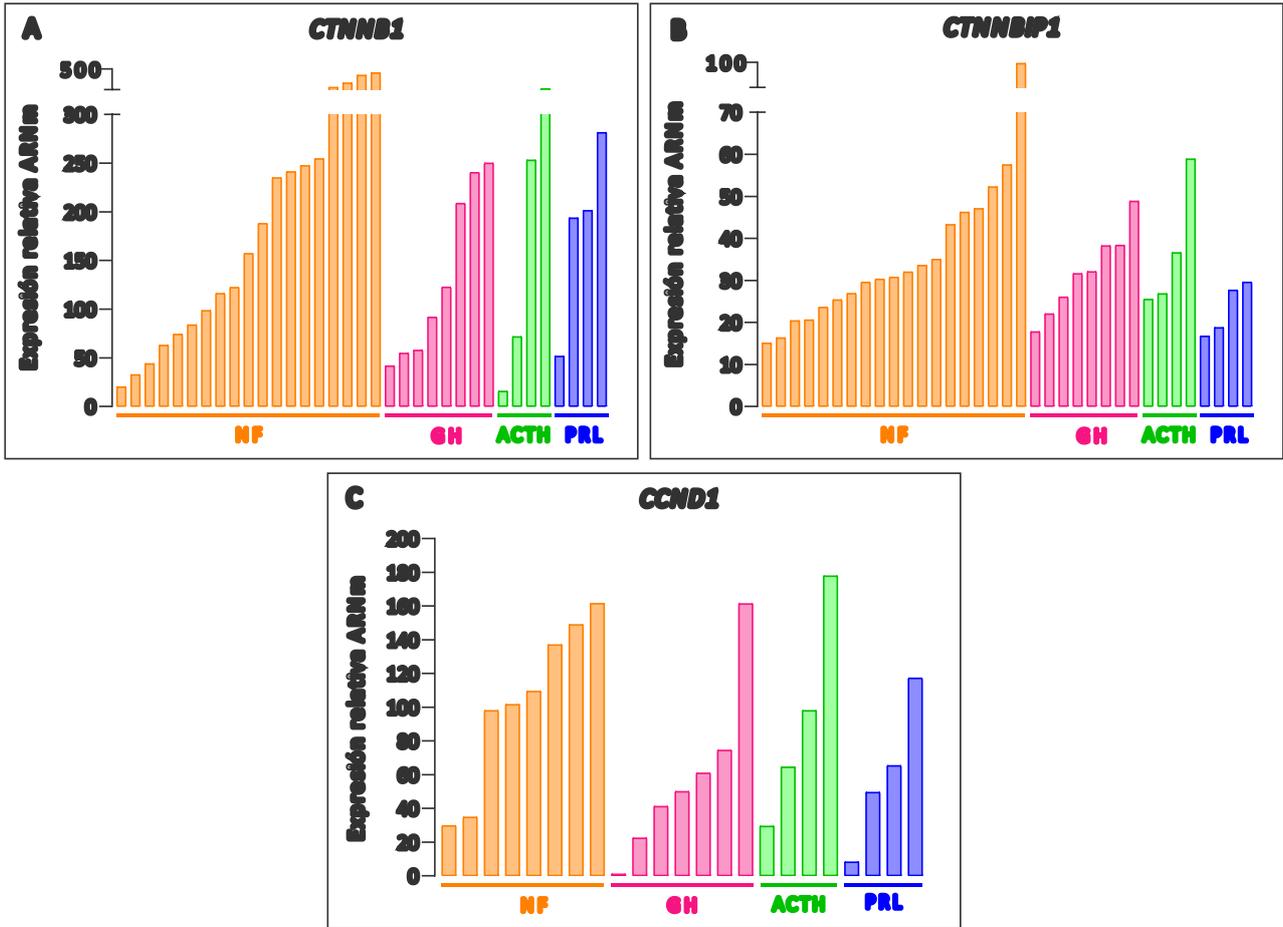


Figura 24 | Expresión de los ARNm de los componentes de la vía Wnt/ β -Catenina determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) *CTNNB1* (n=35), B) *CTNNBIP1* (n=35) y C) *CCND1* (n=23). Los niveles de expresión de cada ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. NF = no funcionante, GH = somatotropinoma, ACTH = corticotropinoma, PRL = prolactinoma.

Al estudiar su expresión en los tumores funcionantes (F) en comparación a los no funcionantes (NF), no hallamos diferencias significativas para ninguno de los ARNm (Figura 25 A-C).

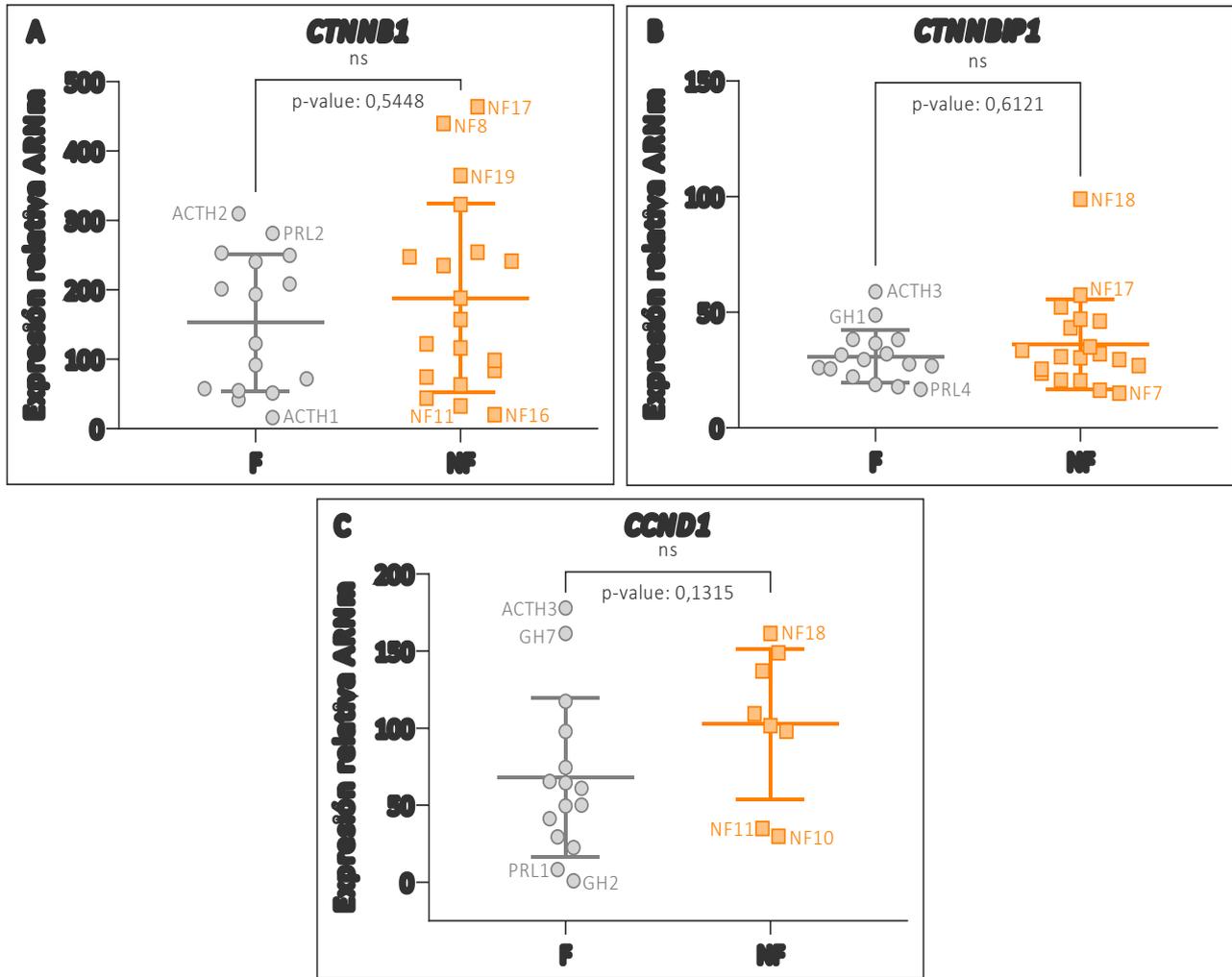


Figura 25 | Expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en funcionantes (F) y no funcionantes (NF): A) *CTNNB1* F (n=16) vs NF (n=19), B) *CTNNBIP1* F (n=16) vs NF (n=19) y C) *CCND1* F (n=15) vs NF (n=8). Los niveles de expresión de los ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y C) p=ns.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y EL TAMAÑO TUMORAL

Además, analizamos la expresión de estos ARNm y su relación con el tamaño de los tumores, nuevamente dividiéndolos en microadenomas y macroadenomas. En este caso, no encontramos diferencias significativas para ninguno de los mensajeros entre estos grupos (Figura 26 A-C).

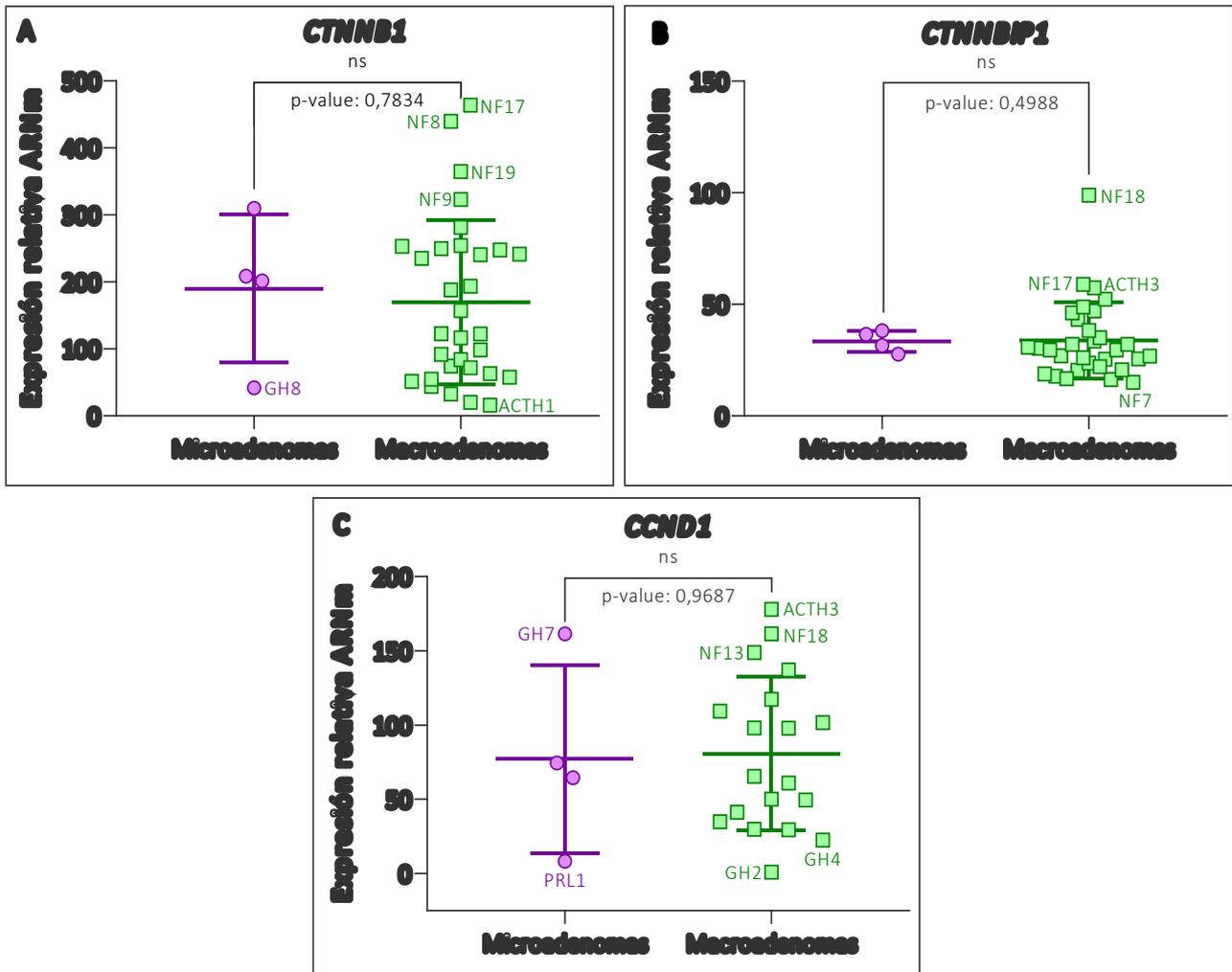


Figura 26 | Expresión de los ARNm determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en microadenomas y macroadenomas: A) *CTNNB1* micro (n=4) vs macro (n=31), B) *CTNNBIP1* micro (n=4) vs macro (n=31) y C) *CCND1* micro (n=4) vs macro (n=19). Los niveles de expresión de los ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y C) p=ns.

Por otro lado, al visualizar los datos de expresión de los ARNm ordenando los tumores de menor a mayor tamaño (mm) en un mapa de calor, se observaron mayores niveles de expresión (indicado en verde oscuro) del ARNm de *CTNNB1* al aumentar el tamaño de los tumores; mientras que para los otros dos ARNm no se observó ningún patrón, sino una expresión heterogénea y en general baja (indicado en verde claro) a través de los distintos tamaños tumorales (Figura 27). No encontramos correlación entre la expresión de ninguno de los mensajeros estudiados y el tamaño tumoral (mm) (Figura 28 A-C).

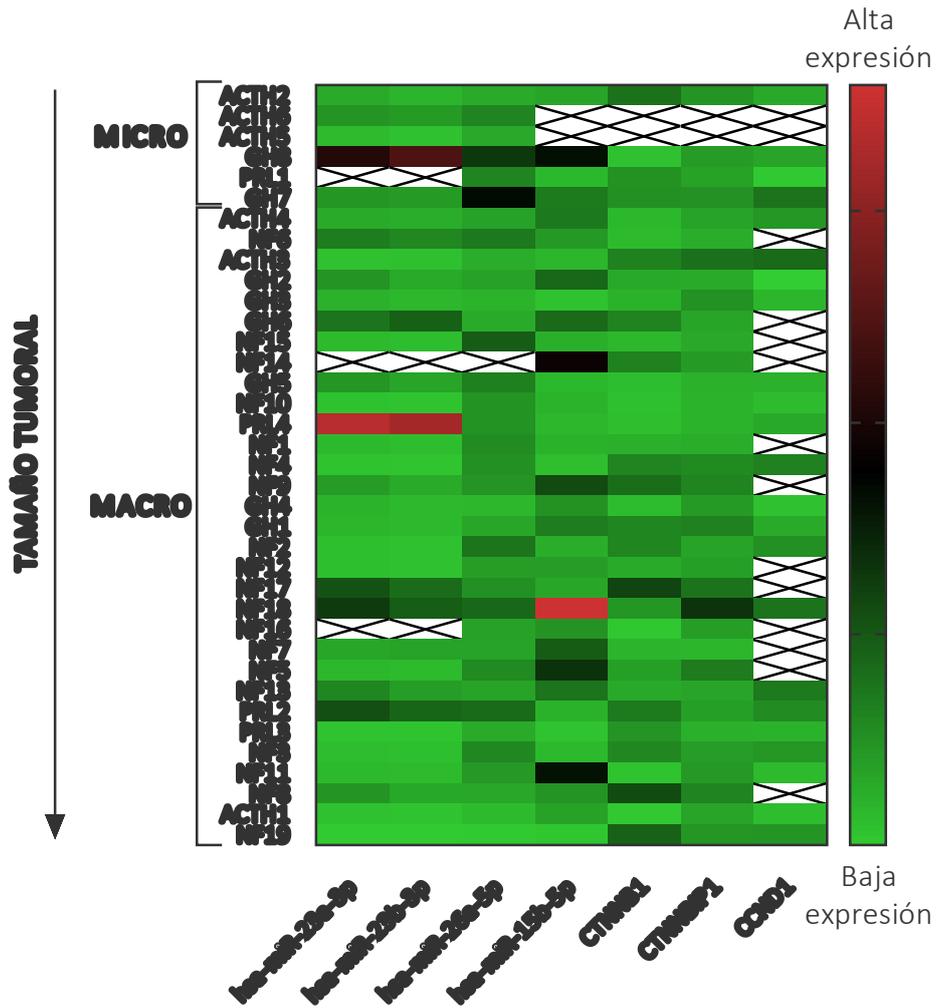


Figura 27 | Mapa de calor en el que se muestra la relación entre la expresión de los miARNs y ARNm y el tamaño de los tumores. En base a los datos del tamaño en mm de las historias clínicas, los tumores se ordenaron de menor a mayor, y se muestra para cada uno de ellos el perfil de expresión de los miARNs y ARNm evaluados. El color verde claro indica bajos niveles y el color rojo claro indica elevados niveles.

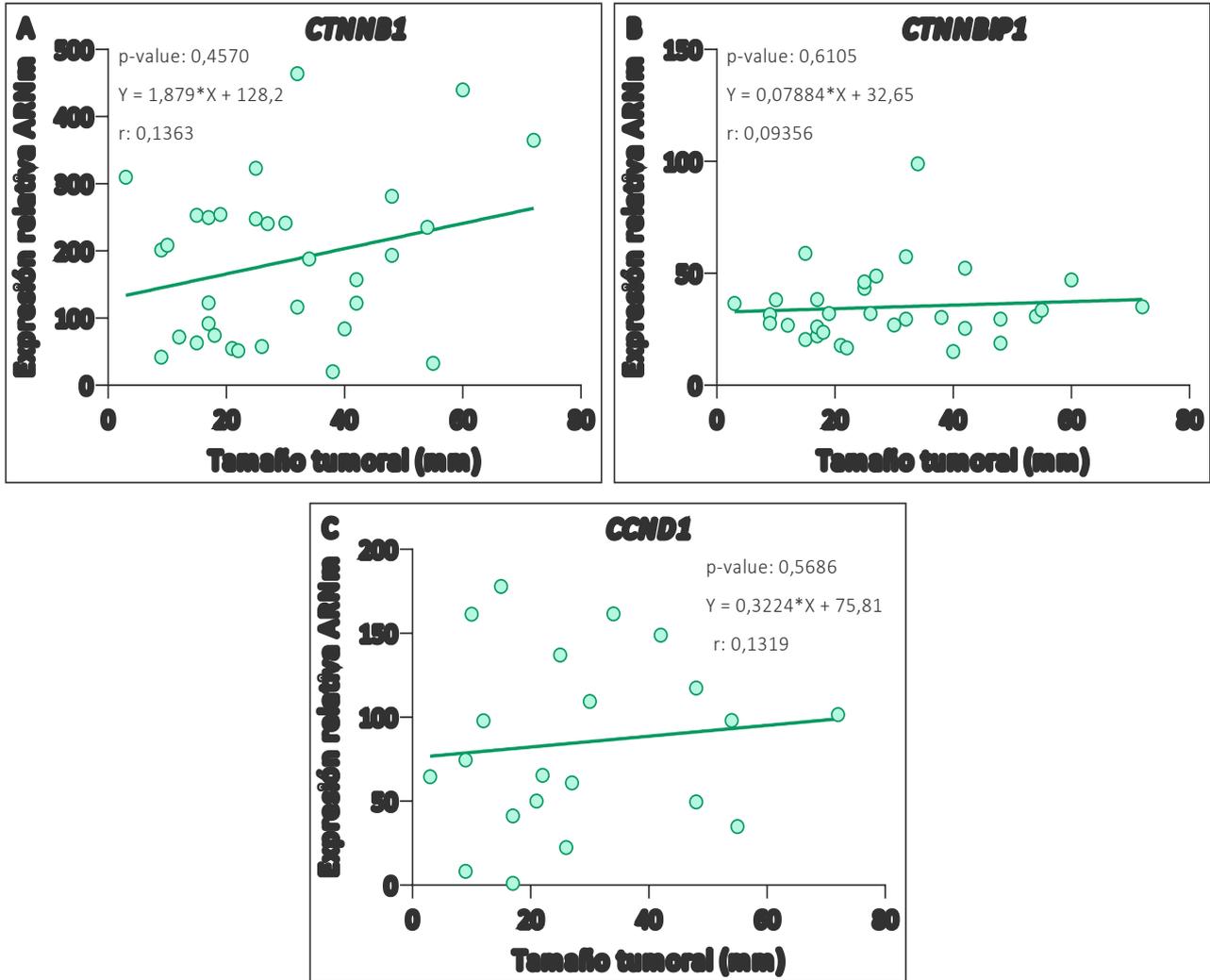


Figura 28 | Correlaciones entre los niveles de expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina con el tamaño tumoral (en mm) en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) *CTNNB1* (n= 35), B) *CTNNBIP1* (n= 35) y C) *CCND1* (n=23). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramétrico: A), B) y C) no hay correlación, p=ns.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y LA INVASIVIDAD TUMORAL

También evaluamos la posible relación entre los ARNm y la invasividad de los tumores, para lo cual los dividimos en invasivos y no invasivos. No encontramos diferencias significativas entre estos grupos para ningún ARNm estudiado (Figura 29 A-C); sin embargo se observó una fuerte tendencia a una menor expresión del ARNm del inhibidor *CTNNBIP1* en los tumores invasivos respecto a los no invasivos (p= 0,0562) (Figura 29 B).

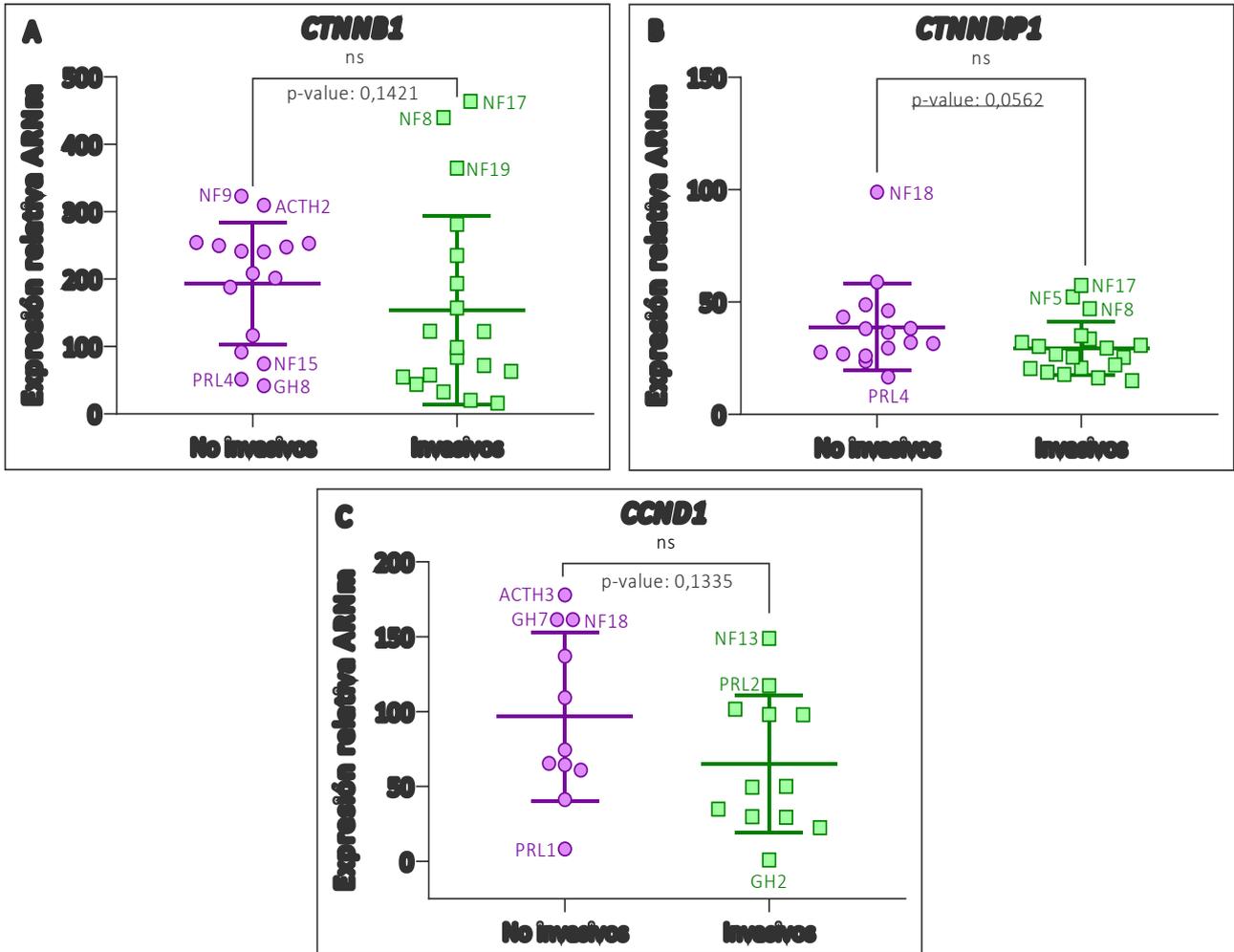


Figura 29 | Expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en invasivos (I) y no invasivos (NI): A) *CTNNB1* I (n=18) vs NI (n=17), B) *CTNNBIP1* I (n=18) vs NI (n=17), C) *CCND1* I (n=11) vs NI (n=12) y D) *CTNNBIP1* I (n=6) vs NI (n=10) en tumores funcionantes (F) en particular. Los niveles de expresión de los ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y C) p=ns.

Al agrupar a los tumores según su grado de Knosp en 0, 1, 2, 3 y 4, tampoco encontramos diferencias significativas para ningún ARNm evaluado (Figura 30 A-C).

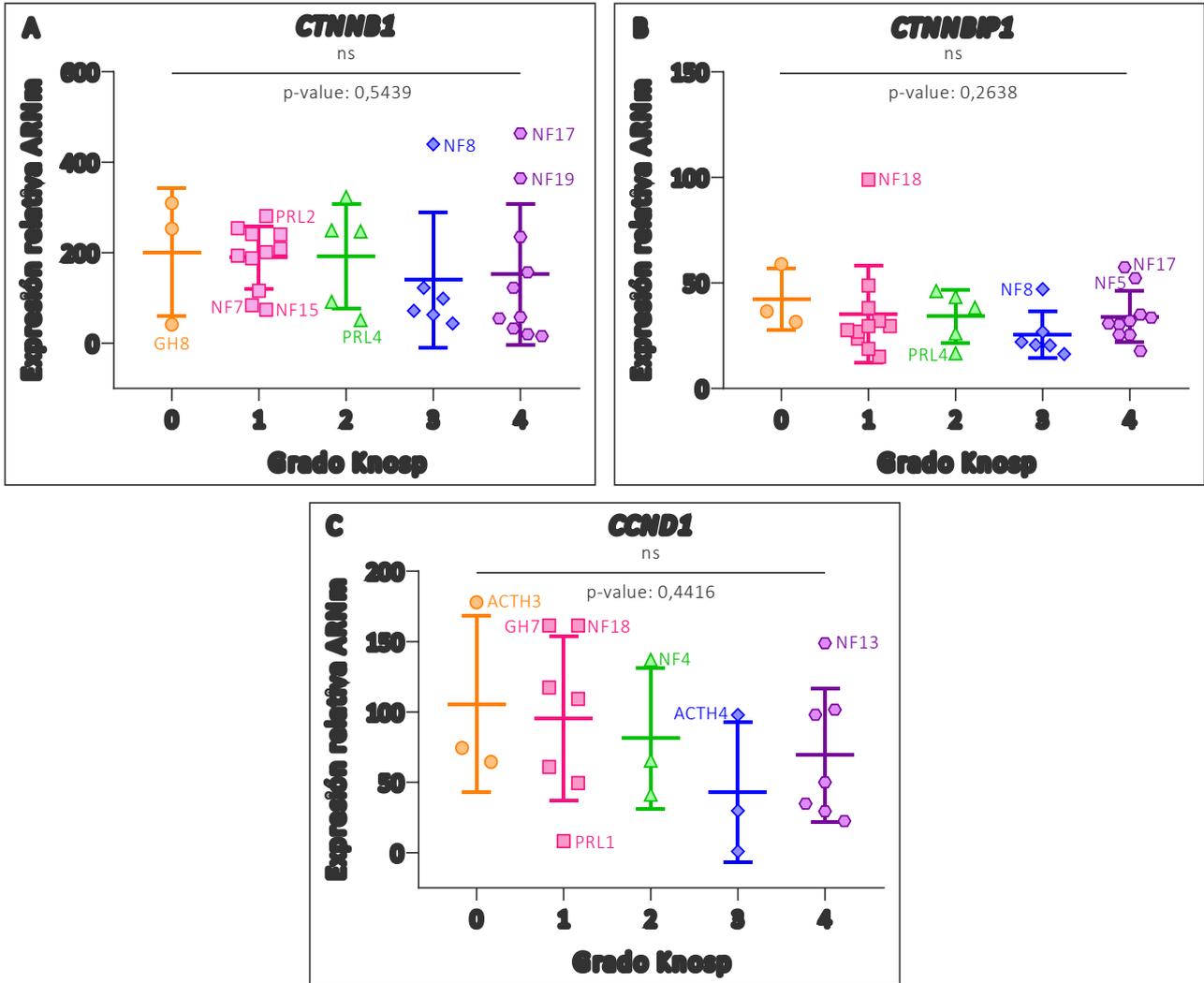


Figura 30 | Expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados según el grado de Knosp (0, 1, 2, 3 y 4): A) *CTNNB1* 0 (n=3), 1 (n=11), 2 (n=5), 3 (n=6) y 4 (n=10), B) *CTNNBIP1* 0 (n= 3), 1 (n=11), 2 (n=5), 3 (n=6) y 4 (n=10) y C) *CCND1* 0 (n=3), 1 (n=7), 2 (n=3), 3 (n=3) y 4 (n=7). Los niveles de expresión de los ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibratoras. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y C) p=ns.

Por otro lado, analizamos la existencia de correlación entre la expresión de cada ARNm y el grado de Knosp en los tumores de nuestra cohorte. Si bien no hallamos correlación para ningún mensajero (Figura 31 A-C), al ordenar los datos de menor a mayor grado Knosp en un mapa de calor pudimos visualizar cualitativamente (indicado en verde claro) menor expresión del ARNm de *CTNNB1* y *CCND1* a mayores grados de Knosp (Figura 32).

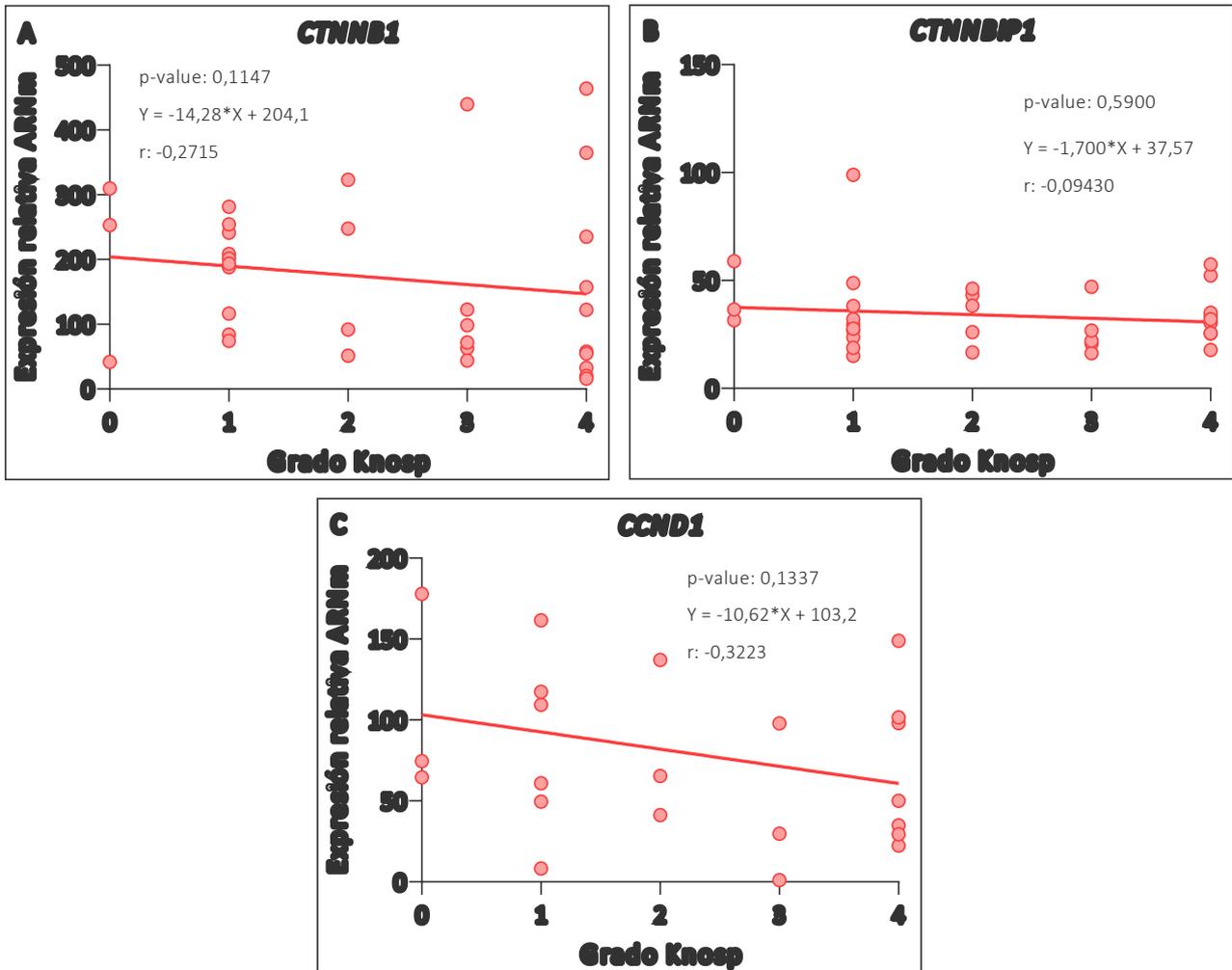


Figura 31 | Correlaciones entre los niveles de expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina con los grados de Knosp (0, 1, 2, 3 y 4) en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) *CTNNB1* (n= 35), B) *CTNNBIP1* (n= 35) y C) *CCND1* (n=23). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramético: A), B) y C) no hay correlación, p=ns.

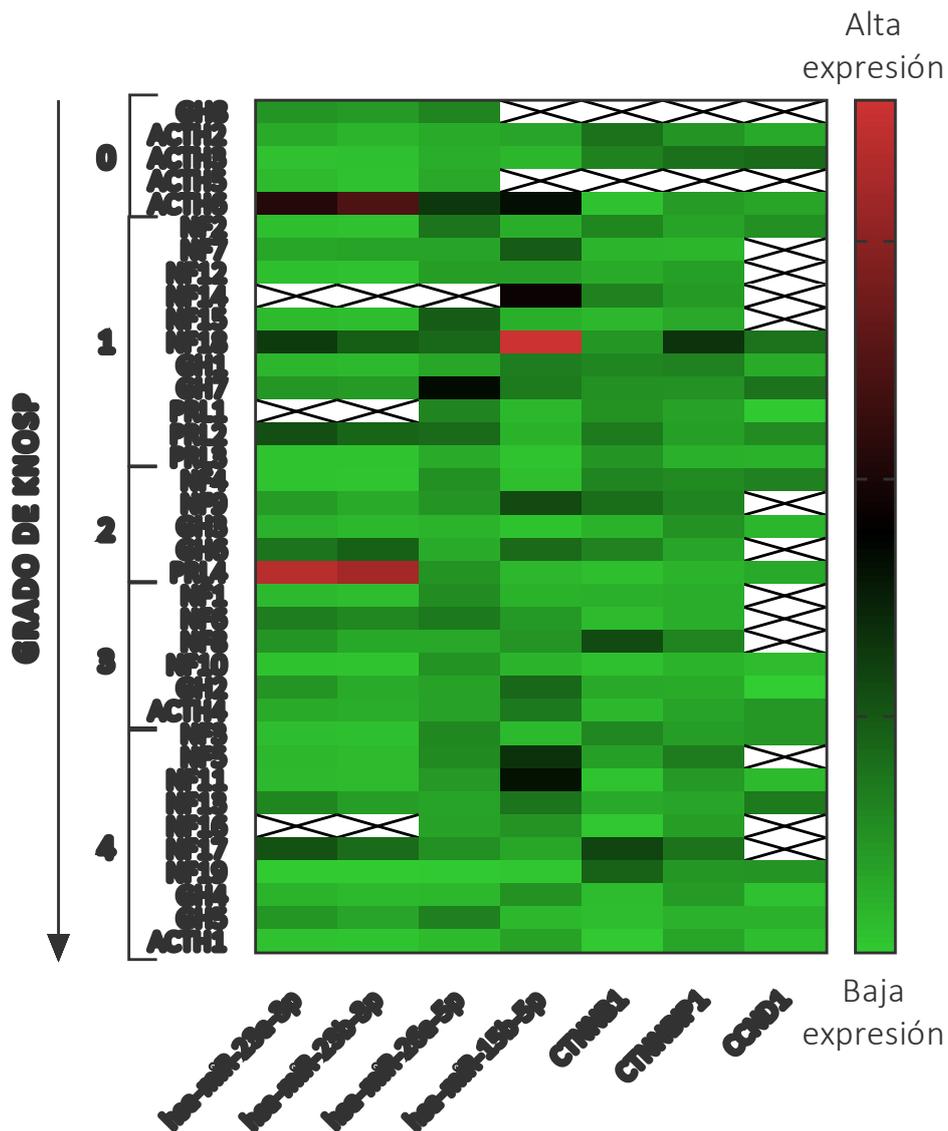


Figura 32 | Mapa de calor en el que se muestra la relación entre la expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina y el grado de Knosp de los tumores. En base a los datos del grado de Knosp de las historias clínicas, los tumores se ordenaron de menor a mayor, y se muestra para cada uno de ellos el perfil de expresión de los ARNm evaluados. El color verde claro indica bajos niveles y el color rojo claro indica elevados niveles.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y EL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN KI-67

Respecto a la relación con el % de Ki-67, no hallamos diferencias significativas entre los dos grupos de tumores establecidos (Ki-67 <3% y Ki-67 \geq 3%) para ninguno de los ARNm en estudio (Figura 33 A-C).

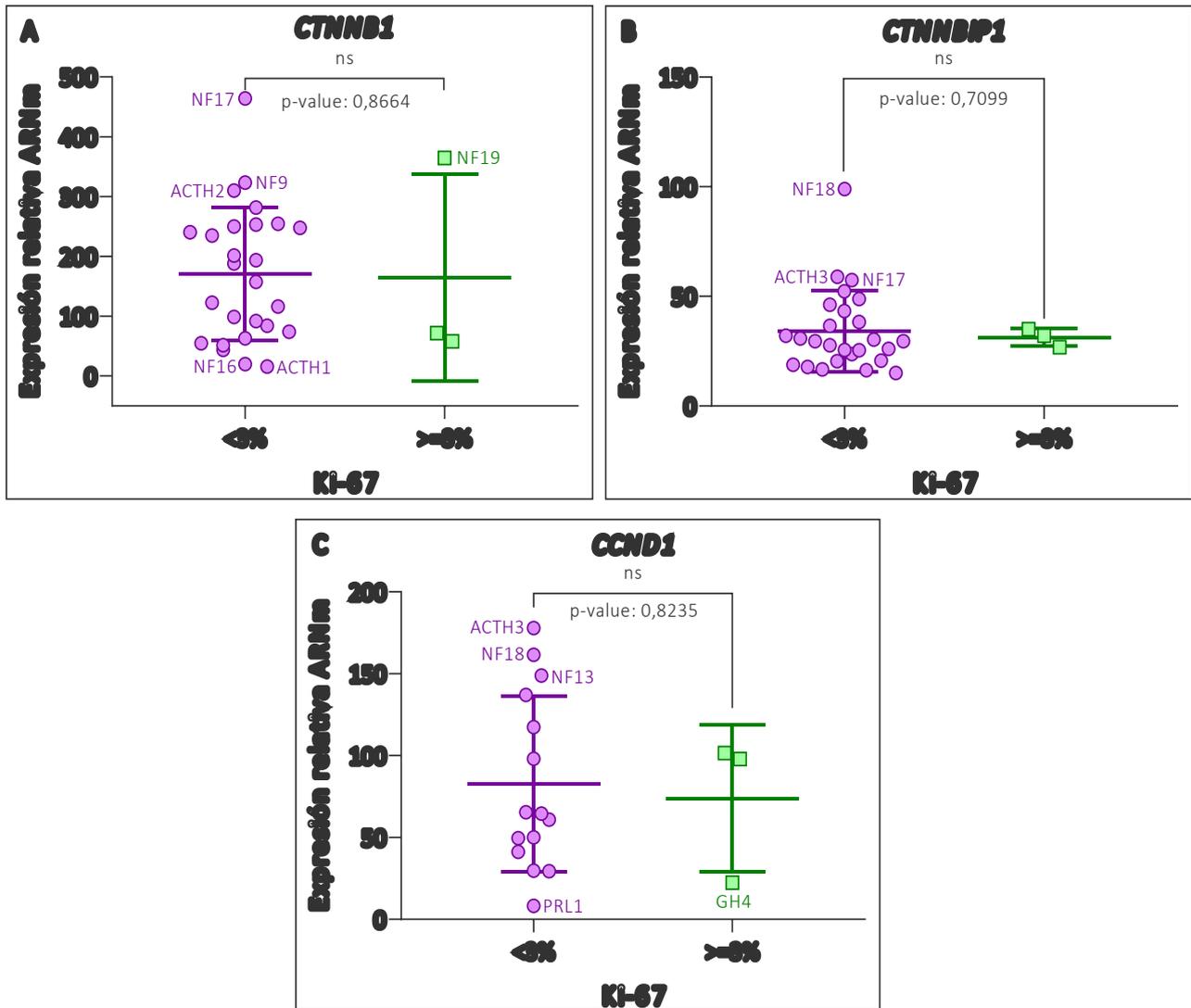


Figura 33 | Expresión de los ARNm determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados según %Ki-67 en <3% y ≥3%: A) *CTNNB1* <3% (n=20) vs ≥3% (n=3), B) *CTNNBIP1* <3% (n=20) vs ≥3% (n=3) y C) *CCND1* <3% (n=13) vs ≥3% (n=3). Los niveles de expresión de los ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y C) p=ns.

RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE COMPONENTES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS Y LA RECURRENCIA TUMORAL

En cuanto a la recurrencia, contrariamente a lo que pudimos ver para los cuatro miARNs estudiados, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los mensajeros (Figura 34 A-C).

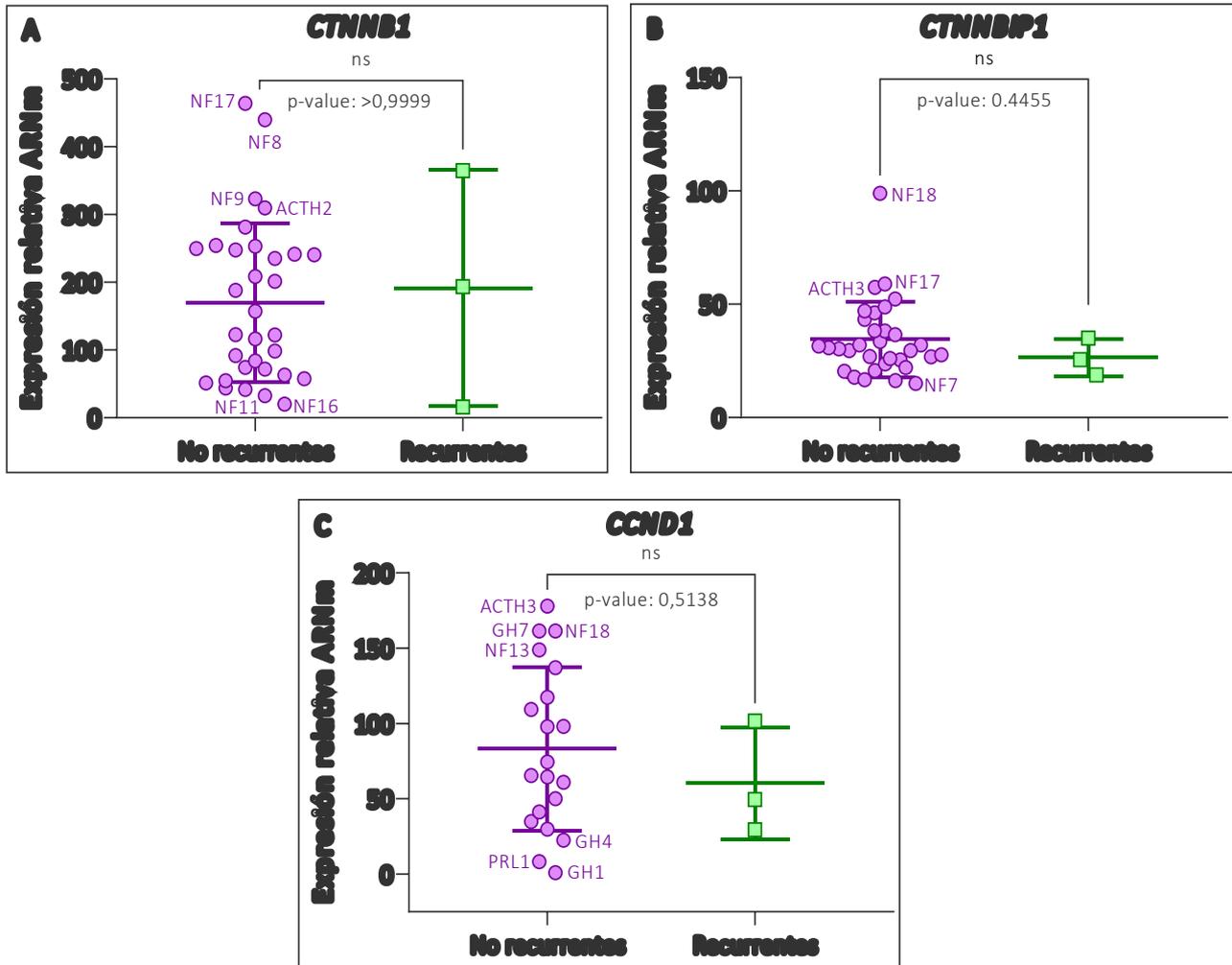


Figura 34 | Expresión de los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina determinada por RT-qPCR en muestras de tumores hipofisarios humanos agrupados en recurrentes (R) y no recurrentes (NR): A) *CTNNB1* R (n=3) vs NR (n=32), B) *CTNNBIP1* R (n=3) vs NR (n=32) y C) *CCND1* R (n=3) vs NR (n=20). Los niveles de expresión de los ARNm en cada muestra fueron normalizados al ARNm del gen de referencia *GAPDH* y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibradoras. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para evaluar las diferencias entre los grupos: A), B) y C) p= ns.

RELACIÓN ENTRE LOS miARNs hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR15b-5p Y LOS ARNm DE LOS GENES *CTNNB1*, *CTNNBIP1* Y *CCND1* DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA EVALUADOS EN MUESTRAS DE TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS

Debido a que los cuatro miARNs evaluados en este trabajo presentan relaciones predichas por miRSystem con el ARNm del inhibidor de la vía Wnt/ β -Catenina *CTNNBIP1*, decidimos analizar en la cohorte de estudio la existencia de posibles relaciones entre los miARNs y el mensajero del inhibidor, como así también con los ARNm de los componentes clave de la vía *CTNNB1* y *CCND1*, y si esto tenía algún tipo de impacto en la activación de la vía.

Para esto, analizamos las correlaciones entre los niveles de expresión de cada mensajero y los de cada uno de los miARNs. En primer lugar, no encontramos correlaciones significativas entre el ARNm de *CTNNB1* y ninguno de los miARNs (Figura 35 A-D).

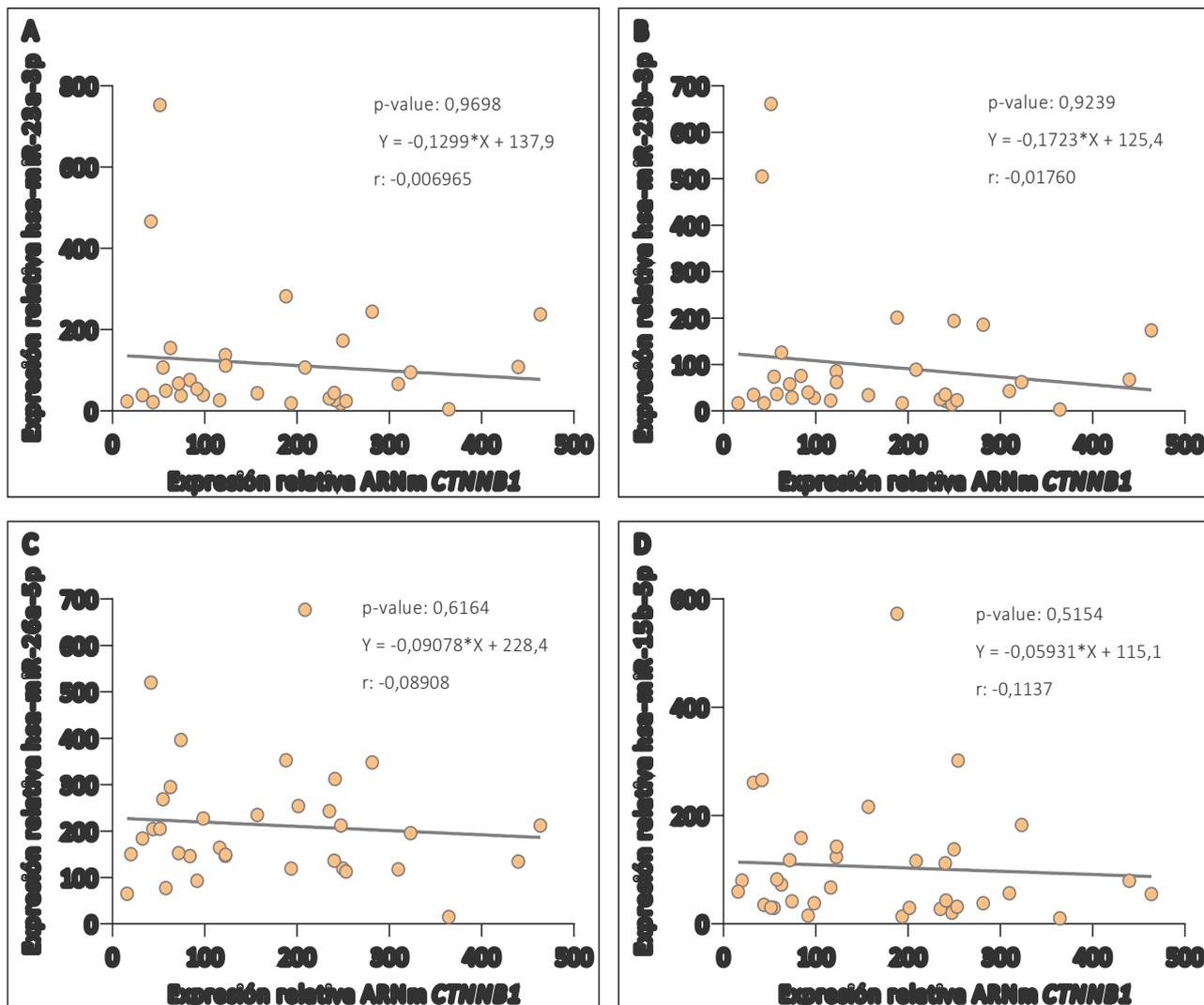


Figura 35 | Correlaciones entre los niveles de expresión del ARNm del gen de la vía Wnt/ β -Catenina *CTNNB1* con los niveles de expresión de los miARNs en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) hsa-miR-23a-3p (n= 32), B) hsa-miR-23b-3p (n= 32), C) hsa-miR-26a-5p (n=34) y D) hsa-miR-15b-5p (n= 35). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramético: A), B), C) y D) no hay correlación, p=ns.

Tampoco hallamos correlaciones significativas entre los niveles de expresión relativa del ARNm del inhibidor *CTNNBIP1* y ninguno de los miARNs en estudio (Figura 36 A-D); aunque podría tener una asociación positiva con hsa-miR-15b-5p, si bien el coeficiente r es bajo y el valor p no alcanza la significancia estadística (Figura 36 D).

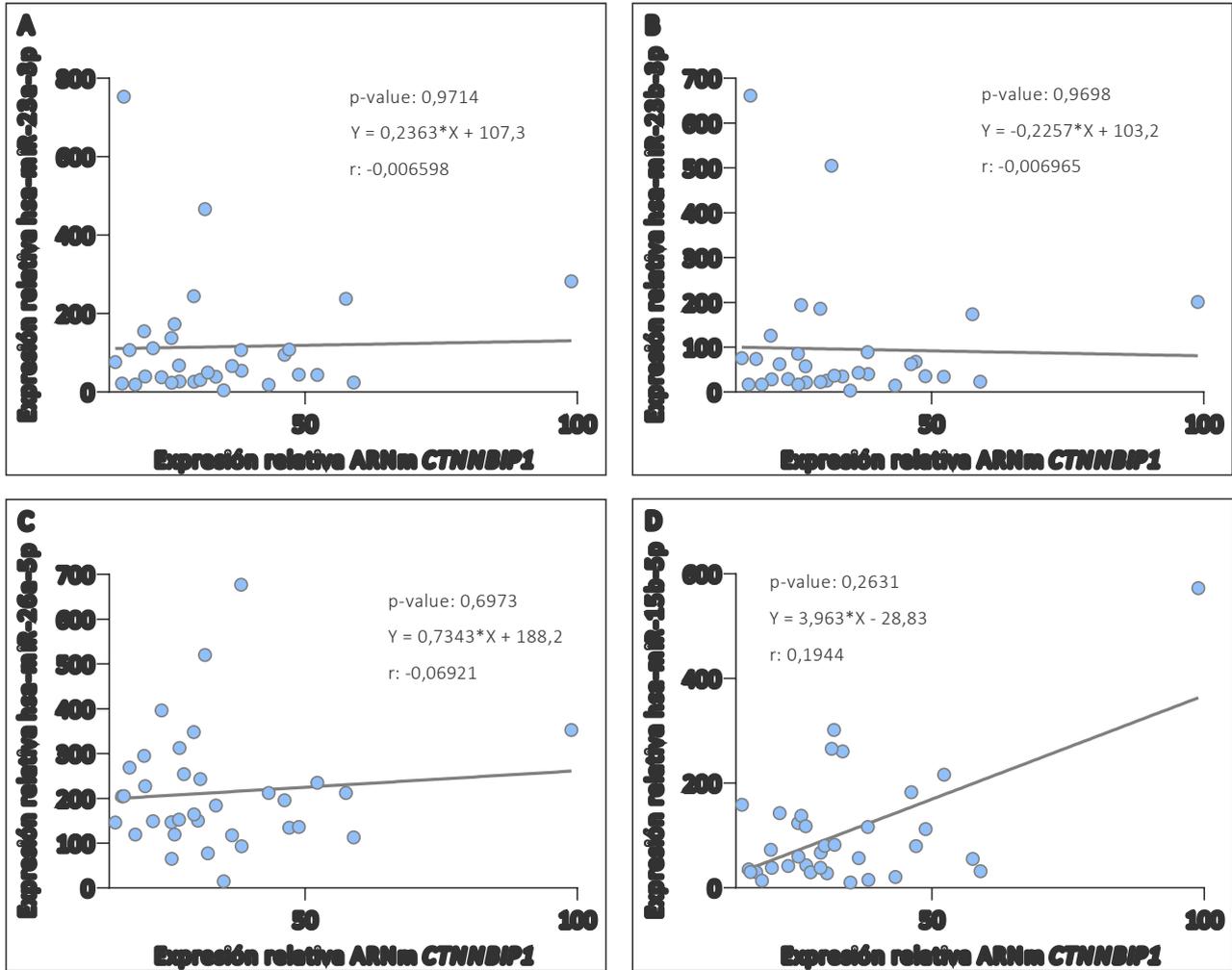


Figura 36 | Correlaciones entre los niveles de expresión del ARNm del gen de la vía Wnt/ β -Catenina *CTNNBIP1* con los niveles de expresión de los miARNs en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) hsa-miR-23a-3p (n= 32), B) hsa-miR-23b-3p (n= 32), C) hsa-miR-26a-5p (n=34) y D) hsa-miR-15b-5p (n= 35). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramético: A), B), C) y D) no hay correlación, p=ns.

Por último, con respecto a la expresión relativa del mensajero de *CCND1*, vimos que no correlacionó significativamente con la expresión de ninguno de los cuatro miARN (Figura 37 A-D). No obstante, podría existir una asociación positiva entre el ARNm de *CCND1* y hsa-miR-26a-5p, aunque si bien no es significativa, presenta un valor p más bajo y un coeficiente r más alto que el resto (Figura 37 C).

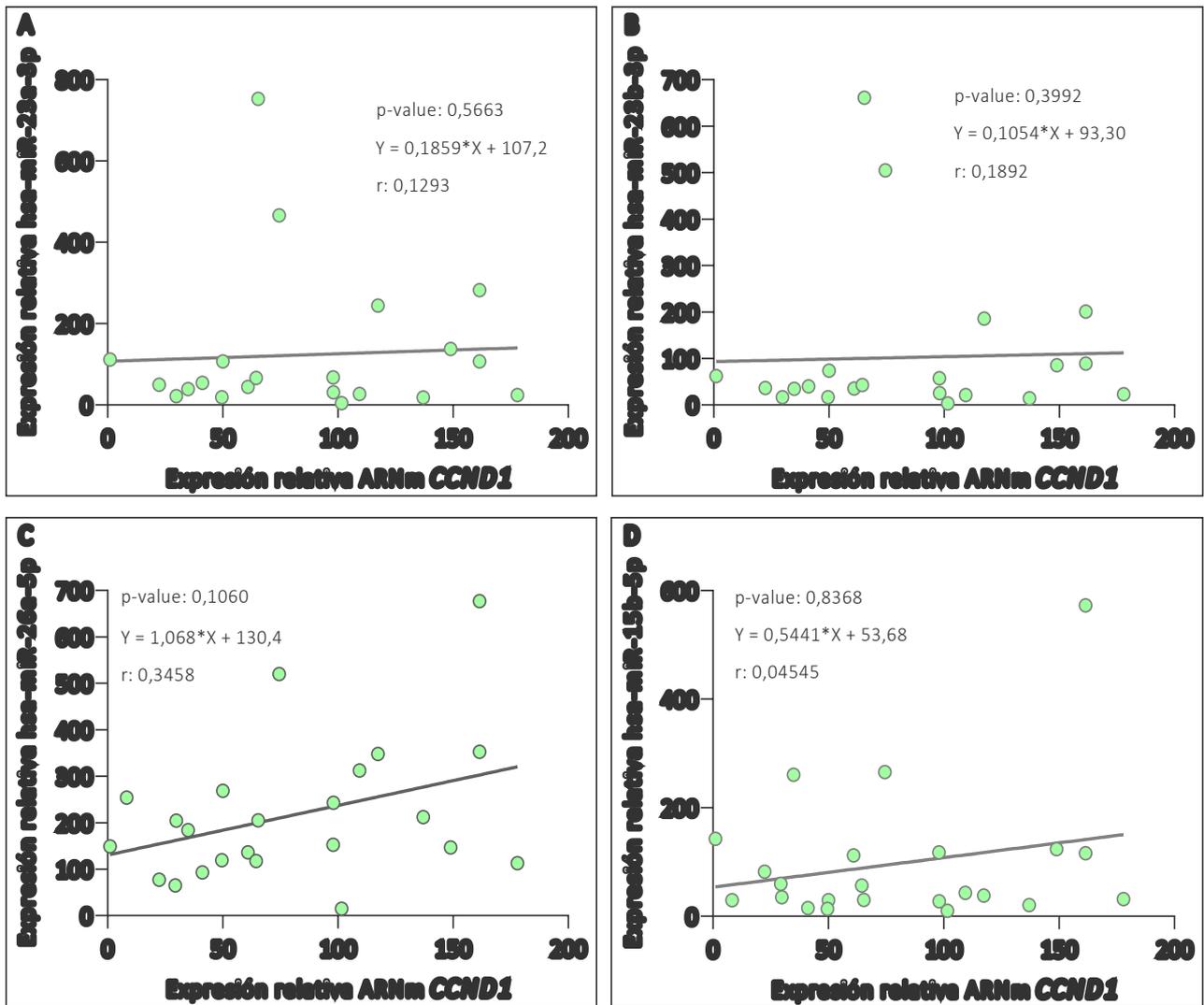


Figura 37 | Correlaciones entre los niveles de expresión del ARNm del gen de la vía Wnt/ β -Catenina *CCND1* con los niveles de expresión de los miARNs en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) hsa-miR-23a-3p (n= 22), B) hsa-miR-23b-3p (n= 22), C) hsa-miR-26a-5p (n=23) y D) hsa-miR-15b-5p (n= 23). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramético: A), B), C) y D) no hay correlación, p=ns.

Por otro lado, también analizamos posibles relaciones entre los niveles de expresión relativa de los mensajeros de la vía Wnt/ β -Catenina entre sí. En este sentido, encontramos correlaciones positivas y estadísticamente significativas entre los niveles de expresión relativa de los ARNm para todas las combinaciones evaluadas (Figura 38 A-C).

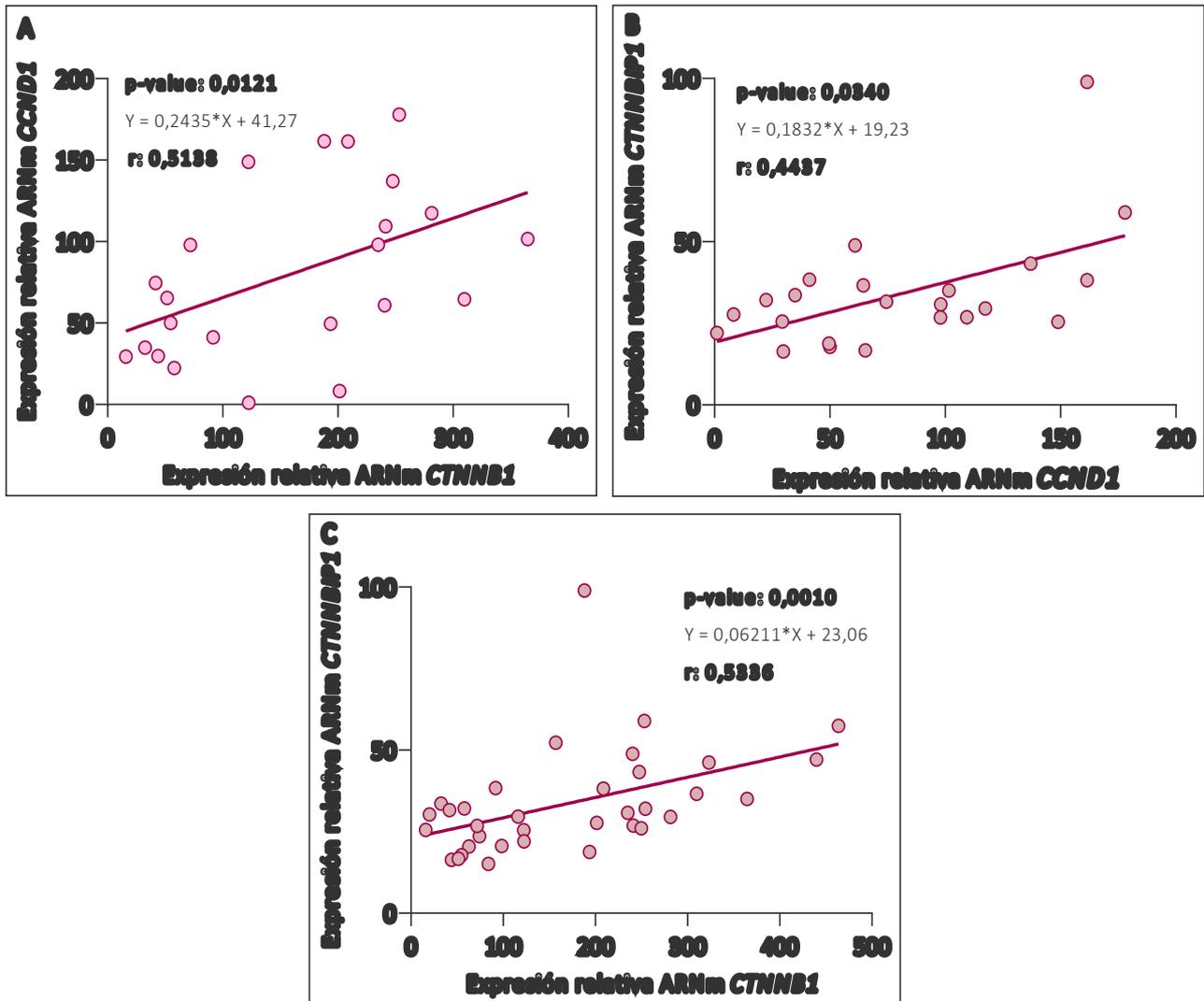


Figura 38 | Correlaciones entre los niveles de expresión del ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina en muestras de tumores hipofisarios humanos: A) *CTNNB1* vs *CCND1* (n= 23), B) *CCND1* vs *CTNNBIP1* (n= 23) y C) *CTNNB1* vs *CTNNBIP1* (n=35). En cada gráfico se muestra el valor p, la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de correlación r de Spearman no paramétrico: en todos los casos se observan correlaciones positivas y significativas A) *p= 0,0121, B) *p= 0,0340 y C) ***p= 0,0010.

Otra forma de visualizar los datos y encontrar posibles relaciones entre ellos es ordenándolos en mapas de calor, como muestra la Figura 39. En esta figura se pueden observar tres mapas de calor, cada uno de ellos con los datos de expresión de los cuatro miARNs y dos de los mensajeros ordenados según la expresión relativa del ARNm de *CCND1* (Figura 39 A), de *CTNNBIP1* (Figura 39 B) y de *CTNNB1* (Figura 39 C).

En concordancia con los resultados de la Figura 37 C, en el mapa de calor con los datos ordenados por expresión del ARNm de *CCND1* (Figura 39 A), se observó que a mayores niveles de expresión del mensajero de *CCND1*, hubo mayores niveles de expresión relativa del hsa-miR-26a-5p (en tonalidades

de verde cada vez más oscuro y negro). Además, en el mismo mapa de calor y de acuerdo con la **Figura 38 A-B**, se ve que ya que a mayores niveles de expresión del mensajero de *CCND1* hay mayor expresión de los mensajeros de *CTNNB1* y *CTNNBIP1* (en verde oscuro) (**Figura 39 A**).

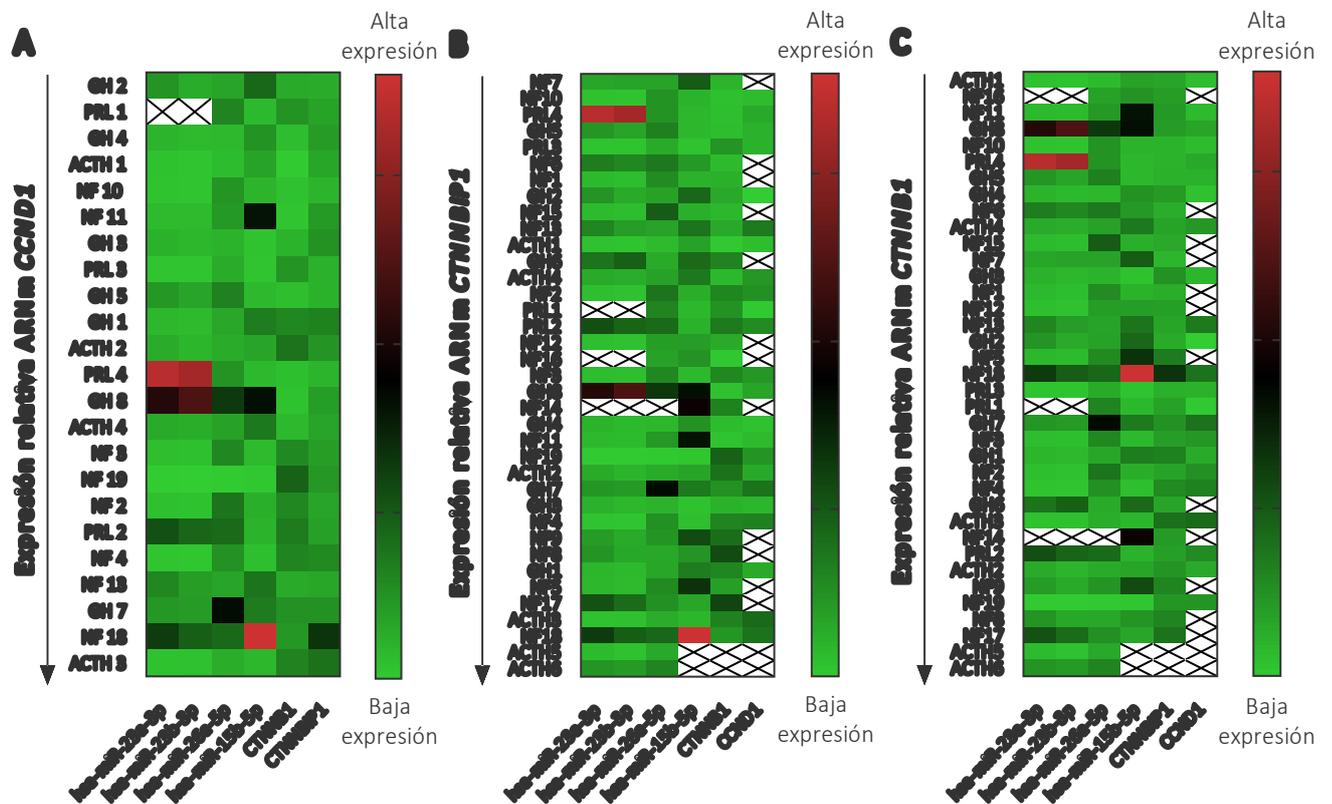


Figura 39 | Mapas de calor en el que se muestran las relaciones entre la expresión de los miARNs/ARNm y la expresión relativa de cada ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina. En base a los datos expresión relativa del ARNm de A) *CCND1*, B) *CTNNBIP1* y C) *CTNNB1*, los tumores se ordenaron de menor a mayor, y se muestra para cada uno de ellos el perfil de expresión de los miARNs y ARNm evaluados. El color verde claro indica bajos niveles y el color rojo claro indica elevados niveles.

Por otro lado, el mapa de calor de la **Figura 30 B** con los datos ordenados de menor a mayor según la expresión del mensajero de *CTNNBIP1* muestra que a mayores niveles del mismo, hubieron en general mayores niveles de expresión del hsa-miR-15b-5p (en concordancia con **Figura 36 D**), así como también del ARNm de *CTNNB1* y *CCND1* (como se observó en las correlaciones positivas y significativas de la **Figura 38 B-C**).

Por último, el mapa de calor de la **Figura 39 C** también concuerda con lo observado en la **Figura 35 D**; ya que a mayores niveles de expresión del mensajero de *CTNNB1*, hubieron en general menores niveles de expresión del hsa-miR-15b-5p. Por el contrario, y en concordancia con las correlaciones

positivas en la **Figura 38 A, C**; encontramos mayores niveles de expresión relativa de los mensajeros de *CTNNBIP1* y *CCND1* a mayor expresión del ARNm de *CTNNB1* (**Figura 39 C**).

Además, nos propusimos evaluar qué sucedía con la expresión de los miARNs o mensajeros en grupos de tumores que presentaban una expresión “alta” o “baja” para uno de ellos en particular. Para esto, establecimos como punto de corte la mediana del valor de expresión del ARNm o miARN específico, y consideramos como “bajos” a aquellos tumores con valores de expresión por debajo de la mediana, y “altos” a aquellos que tenían una expresión igual o mayor al valor de la mediana de ese grupo. Luego observamos dentro de esos grupos de valores “altos” o “bajos”, la expresión de los miARNs y ARNm restantes; y se calculó el porcentaje de tumores que superaban o no la media del grupo (este análisis se llevó a cabo en todas las combinaciones posibles, y se muestran sólo los resultados que consideramos relevantes).

Para el grupo con valores altos del mensajero de *CTNNBIP1*, la mayoría de éstos tuvieron una expresión por debajo del promedio para hsa-miR-26a-5p (70.6%) (**Figura 40 A**), mientras que para aquellos tumores con valores bajos del ARNm de *CTNNBIP1*, el 70.6% mostró niveles de expresión por debajo de la media para el ARNm de *CTNNB1* (**Figura 40 B**). Por último, al realizar el mismo análisis pero estableciendo los puntos de corte en los miARNs, observamos que en el grupo con hsa-miR-15b-5p bajo, el 81.25% del mismo presentó una expresión por debajo de la media para hsa-miR-23a-3p y el 75% una expresión menor al promedio para hsa-miR-23b-3p (**Figura 40 C**).

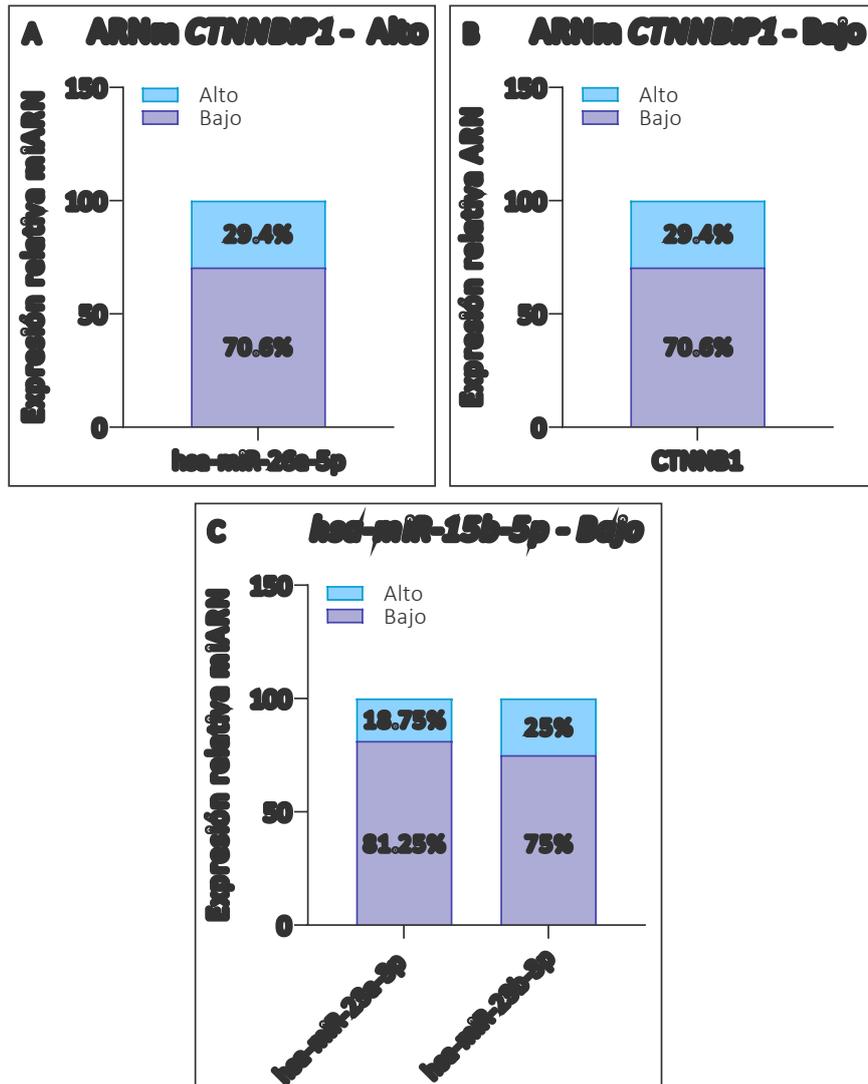


Figura 40 | Expresión de miARNs y ARNm determinada por Stem-Loop RT-qPCR o RT-qPCR, respectivamente, en muestras de tumores hipofisarios humanos, analizada dentro del grupo de: A) ARNm de *CTNNBIP1* alto, B) ARNm de *CTNNBIP1* bajo y C) ARNm de hsa-miR-15b-5p bajo (bajo = grupo de tumores con valores por debajo de la mediana de la expresión del mensajero; alto = grupo con valores iguales o por encima de la mediana de la expresión del ARNm). Los niveles de expresión de los miARNs en cada muestra fueron normalizados al ARNs del gen de referencia *SNORD44*, y los niveles de ARNm al ARNm del gen de referencia *GAPDH*; y posteriormente se relativizaron con respecto al promedio de muestras seleccionadas como calibratoras. En cada barra se indica con una línea la media de la expresión del miARN o ARNm analizado, y el porcentaje de tumores con una expresión mayor (alto, celeste) o menor (bajo, violeta) a esa media dentro del grupo especificado en el título del gráfico.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA β -CATENINA EN TUMORES HIPOFISARIOS HUMANOS

También analizamos la expresión de β -Catenina a nivel de la proteína por inmunohistoquímica en muestras de pacientes obtenidas por cirugía. Para ello determinamos el porcentaje de células β -

Catenina positivas en la membrana plasmática en relación al número total de células, en un nuevo grupo conformado por muestras de tejido hipofisario tumoral e hipófisis normales.

Cuando comparamos la expresión de la proteína de membrana en el tejido tumoral versus hipófisis normales, no encontramos diferencias significativas entre estos grupos; como así tampoco al evaluar el tejido hipofisario normal respecto a los NF, GH y ACTH por separado (no se muestra). No obstante, al comparar las hipófisis normales con el grupo de prolactinomas, observamos la misma disminución estadísticamente significativa en PRL reportada en un trabajo de nuestro grupo de laboratorio [50] (no se muestra).

Además, al separar a los tumores en grupos según su histotipo y compararlos entre ellos, tampoco encontramos diferencias significativas. Se observa que el conjunto de prolactinomas presenta, en promedio, los menores porcentajes de membranas positivas para β -Catenina (Figura 41 A).

De manera interesante para los objetivos de la presente tesis, cuando analizamos la marca de la proteína en dos grupos: los tumores con Ki <3% y aquellos con Ki \geq 3%, hallamos una disminución significativa en el porcentaje de membranas β -Catenina positivas en aquellos tumores con Ki \geq 3% respecto al grupo con Ki <3% (Figura 41 B).

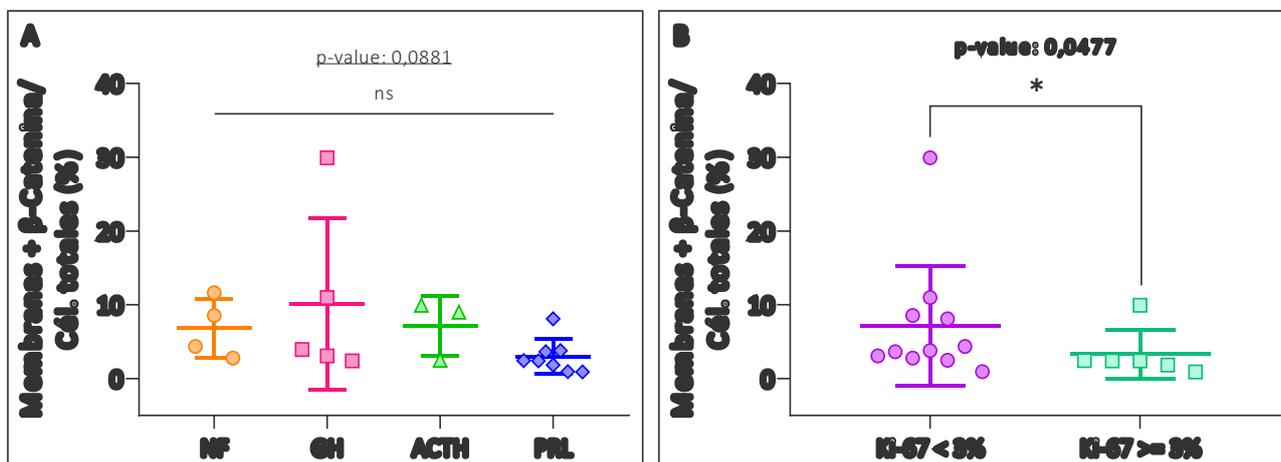


Figura 41 | Expresión de la proteína β -Catenina determinada por inmunohistoquímica. Porcentaje de membranas positivas calculado sobre el número de células totales en tumores hipofisarios humanos agrupados en: A) NF (n=4), GH (n=5), ACTH (n=3) y PRL (n=8) y B) Ki <3% (n=11) y Ki \geq 3% (n=6). Se realizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis en A) y U de Mann-Whitney en B) para evaluar las diferencias entre los grupos. A) No existe diferencia entre los grupos: p= ns; B) Diferencias significativas: *p= 0,0477. NF = no funcionante, GH = somatotropinoma, ACTH = adenocorticotropinoma y PRL = prolactinoma.

A futuro pretendemos analizar la relación entre la expresión de β -Catenina en células tumorales hipofisarias, los cuatro miARNs y los ARNm de los genes de la vía Wnt/ β -Catenina evaluados en este trabajo (*CTNNB1*, *CTNNBIP1* y *CCND1*). Los resultados de inmunohistoquímica de la **Figura 41** corresponden a un grupo de 17 tumores de los cuales sólo 3 también forman parte de la cohorte de 37 muestras que se utilizó para la determinación de los miARNs y ARNm. De esta manera, iniciamos la evaluación y contamos con resultados preliminares de miARN, ARNm e IHQ de β -Catenina para estos 3 pacientes y se muestran en la siguiente figura (**Figura 42**):

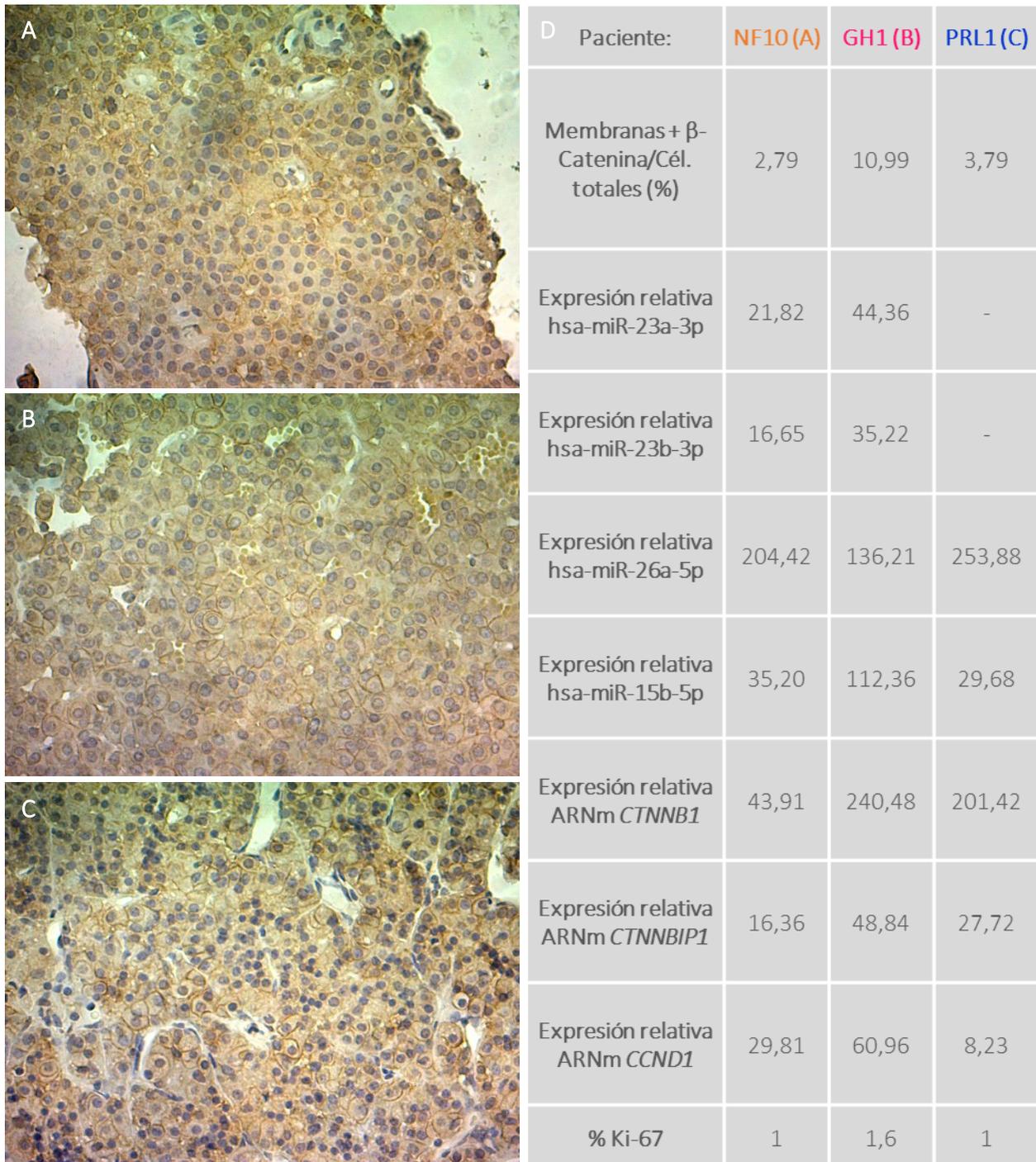


Figura 42 | Expresión de la proteína β -Catenina determinada por inmunohistoquímica. A), B) y C) Imágenes representativas de células teñidas para β -Catenina en la membrana de células tumorales hipofisarias. D) Tabla resumen para los pacientes NF10, GH1 y PRL1 con los datos de: % de membranas + para β -Catenina respecto al nº de células totales, valores de expresión de los miARNs y ARNm determinados por Stem-Lopp RT-qPCR y RT-qPCR, respectivamente y % Ki-67. NF = no funcionante, GH = somatotropinoma y PRL = prolactinoma.

En la Figura 42 A, B y C se muestran imágenes representativas de células teñidas para la proteína β -Catenina y su localización en las membranas de células tumorales hipofisarias. En la tabla de la derecha (Figura 42 D) se resumen los valores tanto del porcentaje de membranas positivas para β -Catenina,

como los de expresión relativa de cada miARN y ARNm evaluado en cada uno de los tres pacientes (NF10, GH1 y PRL1). En el caso de PRL1 no fue posible medir hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-23b-3p debido a inconvenientes durante el paso de retrotranscripción. La tabla muestra una concordancia entre el porcentaje de membranas positivas para β -Catenina y la expresión del ARNm de *CTNNB1*, ya que a mayores valores de uno se observan mayores valores del otro (en el mismo orden entre pacientes). Lo mismo se observó en relación al ARNm de *CTNNBIP1* (en el mismo orden entre pacientes), *CCND1* y hsa-miR-15b-5p. Para el hsa-miR-26a-5p, en cambio, encontramos que cuanto mayor es su expresión de, menor es la del ARNm de *CCND1*; y respecto a *CTNNB1* y *CTNNBIP1*, su aumento o disminución no coincide en el mismo orden de pacientes que aumenta o disminuye hsa-miR-26a-5p, por lo que no se observa un patrón claro. Necesitamos ampliar la determinación de β -Catenina por IHQ a un número de muestras mayor para resultados concluyentes.

DISCUSIÓN

Los tumores hipofisarios son considerados benignos debido a la ausencia de metástasis, sin embargo, causan considerable morbilidad y mortalidad debido a la hipersecreción hormonal o a los efectos de masa sobre distintas estructuras cerebrales adyacentes a la hipófisis [1], [4]. Existen distintos tratamientos para estos tumores dependiendo del histotipo, sin embargo, en todos los casos se observa un porcentaje que no responde a las terapias convencionales y que pueden convertirse en tumores más agresivos con mayor crecimiento e invasividad, resultando en un manejo clínico difícil [19], [98], [99]. Por esto, es necesario incorporar nuevos marcadores moleculares que permitan predecir el comportamiento tumoral y proporcionar una terapia más efectiva en cada caso [100]. En la búsqueda de estos nuevos biomarcadores nos propusimos estudiar la expresión de microARNs (miARNs) específicos y su relación con la vía de señalización Wnt/ β -Catenina, en una cohorte de distintos tipos de tumores hipofisarios humanos, con el fin de dilucidar su potencial uso como marcadores con capacidad predictiva de la agresividad y recurrencia para proporcionar un diagnóstico y pronóstico más eficaz para cada paciente.

Los miARNs son una clase de ARN no codificante que regula la expresión génica a nivel post-transcripcional, al unirse a la 3'-UTR del ARNm diana, ocasionando su degradación o inhibiendo su traducción. Poseen roles importantes en distintos procesos biológicos como el ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La desregulación de los miARNs es una característica de las células tumorales, y éstos pueden actuar como supresores tumorales u oncomiRNAs dependiendo del contexto celular. En la última década, han surgido trabajos que demuestran la expresión diferencial de miARNs en diversos tipos de cáncer en humanos, incluidos los tumores hipofisarios [60].

En condiciones normales, la vía de señalización Wnt/ β -Catenina participa en el desarrollo y la homeostasis de tejidos embrionarios y adultos. Está involucrada en procesos celulares clave como la proliferación, la adhesión celular, la morfogénesis y la autorrenovación, entre otros. Además, su activación se encuentra desregulada en muchos tipos de cáncer, incluidos los tumores hipofisarios, en los cuales varios componentes, tanto de la vía canónica como de la no canónica de Wnt, han sido asociados con el desarrollo tumoral [50]. Se ha descrito la acción de los miARNs sobre las señales celulares [101]–[103]. En particular, para interés de nuestro laboratorio, la vía de señalización Wnt/ β -Catenina está modulada por miARNs en tumores hipofisarios; por ejemplo, miR-543 promueve la

invasión celular e inhibe la apoptosis al activar a la vía Wnt/ β -Catenina mediante la regulación negativa de Smad7 [78].

En base a estos antecedentes, en el presente trabajo evaluamos la expresión de un grupo de miARNs seleccionados según su posible interacción con genes asociados a crecimiento e invasividad tumoral [81]. Estos miARNs fueron predichos a través de la herramienta miRSystem [80]: hsa-miR-424-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p y hsa-miR-15b-5p. El hsa-miR-424-5p no pudo ser amplificado durante la puesta a punto de la Stem-Loop RT-qPCR, por lo cual no fue medido en nuestra cohorte de tumores. Como describieron Zhou *et al.* en su trabajo, este miARN se encuentra subexpresado en el tejido de tumores hipofisarios invasivos en comparación a no invasivos e hipófisis normales [104]. Por lo cual, podría suceder que su detección sea haya dificultado debido a sus bajos niveles, ya que no sólo probamos extraerlo con Trizol (con el cual se realiza una extracción de ARN total tradicional, pero incubando overnight para mejorar la precipitación de los miARNs) sino que también se intentó una extracción más limpia y específica con un kit comercial (miRVana miRNA Isolation Kit), en la cual lo que se obtiene como producto final es la fracción de miARNs por separado.

Respecto al hsa-miR-26a, el grupo de Yu *et al.* no encontró relaciones significativas entre sus niveles de expresión y el tamaño del tumor al evaluarlo en tejido de pacientes con distintos histotipos de tumores hipofisarios mediante RT-qPCR, si bien a diferencia nuestra los análisis fueron realizados utilizando hipófisis normales como control [105]. Bosna *et al.* tampoco hallaron una relación entre el tamaño tumoral y la expresión del miR-26a determinada por qPCR en sangre periférica de pacientes con acromegalia y un grupo control de individuos sanos [106]. En el mismo sentido, en el presente trabajo nosotros no observamos diferencias en la expresión del hsa-miR-26a-5p en macroadenomas respecto a microadenomas. Sin embargo, al ordenar nuestros datos de menor a mayor tamaño tumoral en un mapa de calor, evidenciamos una menor expresión de este miARN al aumentar el tamaño de los tumores. Más aún, en el grupo de tumores no funcionantes en particular (todos macroadenomas), encontramos una correlación negativa y estadísticamente significativa entre su expresión relativa y el tamaño tumoral. Al igual que en nuestro trabajo, se reportaron correlaciones negativas entre la expresión de otros miARNs como miR-450b, miR-424, miR-503, miR-542-3p, miR-629 y miR-214 y el tamaño de estos tumores, cuya expresión fue evaluada mediante TLDA (Taqman Low Density Array) Human MicroRNA Panel, aunque este trabajo no tiene validación experimental [107]. Por otro lado, Nikolova *et al.* reportaron a miR-186, miR-17 y miR-210-3p subexpresados y miR-

9 sobreexpresado en un grupo de 5 tumores no funcionantes gigantes en comparación a otro de 15 macroadenomas, cuya expresión fue determinada en el tejido tumoral mediante RT-qPCR [70].

Además, en el presente trabajo encontramos expresión de hsa-miR-26a-5p en tumores invasivos y no invasivos, aunque no hallamos diferencias significativas entre estos grupos al analizar toda la cohorte. Sin embargo, al realizar la misma evaluación sólo en el grupo de tumores no funcionantes, el valor p disminuyó considerablemente, sugiriendo la existencia de una tendencia a una menor expresión del mismo en los tumores no funcionantes invasivos. Contrariamente a nuestros hallazgos, Yu *et al.* reportaron una expresión significativamente mayor del miR-26a en tumores hipofisarios invasivos respecto a no invasivos, evaluada mediante RT-qPCR en tejido hipofisario tumoral e hipófisis normales. En este trabajo, el criterio de “invasividad” fue tomado a través del índice de Hardy y otros parámetros (análisis de imagen antes de la cirugía, infiltración tumoral determinada por examen patológico, perforación de la pared interna del seno cavernoso durante la cirugía endoscópica) [105]; a diferencia de nuestro trabajo en el que usamos el índice de Knosp para determinar la invasividad. Es posible que las discrepancias descritas en la expresión del hsa-miR-26a-5p entre tumores invasivos y no invasivos se deban a los criterios utilizados para la determinación de “la invasividad” en ambos trabajos.

De manera interesante, también encontramos que para el hsa-miR-26a-5p la expresión resultó significativamente menor para los tumores con un índice de proliferación alto (Ki-67 $\geq 3\%$) respecto a Ki $< 3\%$. Nuestros hallazgos concuerdan con los resultados de Vicchio *et al.*, quienes encontraron una correlación negativa y significativa entre el % Ki-67 y la expresión del miR-26b-5p determinada por RT-qPCR en tejido de tumores hipofisarios no funcionantes, funcionantes e hipófisis normales como control [108]. Si bien nosotros medimos el hsa-miR-26a-5p y ellos el 26b-5p, en humanos estos miARNs pertenecen a la familia miR-26, que se encuentra ampliamente conservada e incluye al miR-26a, miR-26b, miR-1297 y miR-4465, los cuales comparten una secuencia semilla idéntica entre los vertebrados [54]. Pese a que los miR-26a y b-5p difieren en dos bases en su secuencia nucleotídica madura, la gran similitud entre ellos podría estar ocasionando este comportamiento similar de su expresión en relación al % Ki-67.

Por todo lo mencionado anteriormente, la detección de bajos niveles de hsa-miR-26a-5p podría asociarse con un peor pronóstico para pacientes con tumores no funcionantes en particular, ya que esto estaría relacionado con un mayor tamaño, capacidad invasora e índice de proliferación, y por lo tanto agresividad. En este sentido, podemos hipotetizar que el hsa-miR-26a-5p podría estar actuando como un miARN supresor tumoral en la tumorigénesis hipofisaria.

Nuestros resultados respecto a la reducción significativa en la expresión relativa del hsa-miR-15b-5p en prolactinomas al compararlos con la totalidad de tumores de la cohorte, con los tumores no funcionantes y con el resto de funcionantes hallada en nuestro trabajo muestran una característica distintiva de los prolactinomas resistentes a los agonistas dopaminérgicos, entidades complejas de controlar en la clínica. Van en concordancia con lo reportado por Palmieri *et al.*, quienes estudiaron la interacción entre éste y otros miARNs y *HMGA1* y *HMGA2*, que codifican para las proteínas del grupo A 1 y 2 de alta movilidad involucradas en la transformación neoplásica de las células hipofisarias. La sobreexpresión de estas proteínas es una característica de las neoplasias malignas humanas. Palmieri *et al.* en su trabajo demuestran que los ARNm de *HMGA1* y *HMGA2* son targets directos de miR-15 (entre otros miARNs). Además, ellos determinaron por RT-qPCR que la expresión de miR-15 se redujo drásticamente en casi todos los tumores hipofisarios humanos analizados, independientemente del histotipo, en comparación con la glándula normal, mientras que la expresión de los ARNm de *HMGA1* y *HMGA2* aumentó. De esta manera, al igual que Palmieri *et al.* [109], podría proponerse la restauración de los niveles de hsa-miR-15b-5p para disminuir los niveles de las proteínas HMGA como posible abordaje terapéutico para el tratamiento de los tumores hipofisarios más agresivos.

Debido a que este miARN puede inhibir la progresión del ciclo celular [109], su subexpresión podría estar favoreciendo la proliferación descontrolada de los lactotopos tumorales en los prolactinomas resistentes, generando en consecuencia un tumor más agresivo. Por todo esto, la detección de bajos niveles hsa-miR-15b-5p en prolactinomas humanos podría asociarse con una mayor agresividad.

Los miARNs hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-23b-3p presentaron un patrón de expresión muy similar en todos los análisis realizados. Cada uno pertenece a un parálogo del cluster miR-23 presente en mamíferos: hsa-miR-23a-3p pertenece al cluster 23a~27a~24-2 y hsa-miR-23b-3p al cluster 23b~27b~24-1. Dado que las secuencias maduras de estos parálogos son similares, se podría especular que tengan targets superpuestos, lo cual ocurre para miR-23a y miR-23b; y también se sabe que ambas isoformas pueden estar sobreexpresadas o subexpresadas simultáneamente, y llevar a cabo funciones afines (por ejemplo al regular el mismo gen target, como ocurre con Smad3 implicado en la vía TGF- β , el cual es regulado por miR-23a y miR-23b) [52], [53].

Por lo tanto, es posible que el patrón de expresión similar que encontramos para hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-23b-3p en los análisis realizados en este trabajo sean consecuencia de la cercanía evolutiva de los clusters de los cuales derivan. A pesar de esto, el motivo de seleccionar ambos para su evaluación fue que al momento de realizar el tercer filtro para la selección de los miARNs a medir, el

hsa-miR-23a-3p cumplía el criterio 3 incluyendo a *HES1*, y el hsa-miR-23b-3p cumplía el tercer criterio incluyendo a *NOTCH1*, genes clave de la vía Notch que de otra forma no hubieran sido incluidos en el análisis a través de los miARNs restantes. Si bien la vía Notch no fue evaluada en este trabajo, es una de las dos vías principales en las que trabaja nuestro laboratorio.

Si bien los resultados de los análisis para estos miARNs estuvieron, en general, lejos de alcanzar la significancia estadística al analizar su relación con alguna característica clínica en particular, sí encontramos una correlación negativa y estadísticamente significativa entre la expresión relativa del hsa-miR-23a-3p y el hsa-miR-23b-3p y el tamaño tumoral dentro del grupo de somatotropinomas, aunque se debería aumentar el número de tumores de este histotipo en particular en nuestra cohorte para corroborar estas correlaciones, dado que contamos con 8 tumores. Bottoni *et al.* reportaron que en somatotropinomas y prolactinomas humanos existe una correlación inversa entre el diámetro del tumor y la expresión de miR-15a y miR-16, evaluados mediante Northern blot [110]. En línea con nuestros resultados pero en otros tipos de cáncer, Chen *et al.* evaluaron mediante qPCR muestras de tejido de tumores de páncreas primarios humanos en comparación al tejido adyacente no tumoral, y reportaron una correlación negativa entre el tamaño del tumor y la expresión de miR-23a [111]. En el mismo sentido, He *et al.* reportaron una reducción significativa del 60% en el volumen tumoral de ratones *nude* inyectados con células de osteosarcoma MG-63 y un *mimic* del miR-23a, al comparar con los controles [112]. Sin embargo, no hay trabajos en la literatura que hayan reportado asociaciones entre el tamaño del tumor y hsa-miR-23a-3p o hsa-miR-23b-3p en tumores hipofisarios, por lo que nuestros resultados aportan al conocimiento de la expresión y el rol que este par de miARNs tendrían en la patología.

De manera interesante los 4 miARNs mostraron una expresión significativamente reducida en los tumores recurrentes respecto a los no recurrentes para los cuatro miARNs evaluados: hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p y hsa-miR-15b-5p. No obstante, cabe aclarar que contamos con muy pocos tumores recurrentes en nuestra cohorte (n=3), por lo cual se debería aumentar el n de los mismos para verificar estas diferencias. Sin embargo, este número de tumores recurrentes es importante y de relevancia clínica ya que se sabe que aproximadamente el 10% de los pacientes con tumores hipofisarios tienen una recurrencia durante un período de 10 años después de la cirugía [5], lo cual dificulta la obtención de los mismos para su estudio en investigación. Otros grupos han intentado identificar biomarcadores relacionados a la recurrencia de tumores hipofisarios con el objetivo de direccionar eficazmente el diagnóstico clínico de los pacientes, y la terapia a llevar a cabo.

No obstante, aunque algunos marcadores evidencian un potencial valor predictivo, su efectividad debe ser verificada con más estudios. Hasta el momento no existen marcadores que presenten una capacidad predictiva del comportamiento recurrente de los tumores hipofisarios [113]. No obstante, Németh *et al.* han reportado que en pacientes con gonadotropinomas, la disminución de los niveles plasmáticos del miR-143-3p luego de la cirugía se asoció con una mejor resección del tumor, lo cual condujo a un aumento significativo de la supervivencia libre de recidivas [114]. Además, Amaral *et al.* reportaron que aquellos pacientes con corticotropinomas que presentaron bajos niveles del miR-141 mostraron una mejor remisión del tumor luego de la cirugía [115].

Por lo tanto, se necesitan más estudios con un mayor número de tumores recurrentes para verificar el uso de hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-26a-5p y hsa-miR-15b-5p como potenciales biomarcadores de recurrencia en tumores hipofisarios humanos que encontramos en el presente trabajo.

En la presente tesis, además, analizamos la expresión de mensajeros clave de la vía de señalización Wnt/ β -Catenina dando continuidad a una de las líneas del laboratorio. Para esto evaluamos los ARNm de *CTNNB1*, *CTNNBIP1* y *CCND1*. Encontramos una menor expresión del mensajero del inhibidor de la vía Wnt *CTNNBIP1* y no para *CTNNB1* y *CCND1* en tumores hipofisarios invasivos respecto a aquellos que no lo son. No se encuentran trabajos en la literatura sobre el rol de este inhibidor de la señalización Wnt/ β -Catenina en la tumorigénesis hipofisaria. Sin embargo, en un trabajo en el cual se estudió la estructura de *ICAT* (o *CTNNBIP1*) y analizaron sus mutaciones en 178 tumores humanos desarrollados en órganos con una frecuente acumulación nuclear de β -Catenina y/o pérdida de heterocigosidad (LOH) en 1p36 (donde se localiza el gen *ICAT*), se reportó que el mismo no se encontró alterado en tumores hipofisarios, aunque se sugiere que mecanismos diferentes a la alteración genética pueden ser los responsables de su inactivación [116], [117]. Zhang *et al.* reportaron que en gliomas humanos, la expresión del ARNm de *ICAT* es significativamente menor en aquellos tumores de alto grado en comparación a los de bajo grado y controles normales, y que para pacientes con alta expresión de este mensajero se predijeron periodos de supervivencia más largos. Además, confirmaron que *in vitro* *ICAT* inhibió la proliferación e invasión celular, e indujo el arresto del ciclo celular en G1 y la apoptosis en líneas celulares de glioma, mientras que *in vivo* en un modelo de xenotransplante de glioblastoma enlenteció el crecimiento tumoral [118]. Chang *et al.* analizaron los niveles de expresión del ARNm de *CTNNBIP1* de un set de datos de microarray de 204 pacientes con cáncer de pulmón, y encontraron que los niveles más bajos de este mensajero se asociaron en general con un peor pronóstico y una

supervivencia libre de recidivas reducida [119]. Por lo tanto, los trabajos de Zhang y Chang *et al.* concuerdan con nuestro hallazgo de una menor expresión del ARNm de *CTNNBIP1* en tumores hipofisarios invasivos, aunque se trate de otros tipos de cáncer. En cuanto a la proteína codificada por *CTNNBIP1*, Qi *et al.* determinaron por inmunohistoquímica que la expresión de la misma fue menor en pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadio IIIa pobremente diferenciado en comparación a aquellos tumores bien diferenciados. Además, encontraron una correlación negativa entre la expresión de Ki-67 y la proteína de *CTNNBIP1*, y que aquellos pacientes con altos niveles de esta última presentaron períodos de supervivencia más largos que los pacientes con bajos niveles [120]. Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos diferencias al comparar la expresión del mensajero de *CTNNBIP1* en el grupo de tumores hipofisarios con Ki <3% respecto del grupo con Ki ≥3%. Por el contrario, Hu *et al.* reportaron que la expresión de *ICAT* es mayor en el tejido tumoral de cáncer colorrectal en comparación al tejido adyacente no tumoral, y que aquellos pacientes con alta expresión de *ICAT* presentan mejor pronóstico [121]. De la misma forma, Zhang *et al.* determinaron que la expresión de *ICAT* es significativamente mayor en tejido de pacientes con carcinoma hepatocelular al comparar con el tejido no tumoral [122].

Por lo tanto, nuestro trabajo aporta al escaso conocimiento que existe en la literatura sobre la expresión del ARNm de *CTNNBIP1*, inhibidor de la vía Wnt/ β -Catenina, en muestras de tumores hipofisarios humanos, y propone una posible relación inversa entre la expresión del mismo y la invasividad tumoral, ya que en aquellos tumores de nuestra cohorte clasificados como invasivos su expresión se encuentra disminuida al comparar con aquellos no invasivos, lo que conllevaría a una menor capacidad por parte de las células tumorales de regular negativamente la actividad transcripcional de los genes diana de la vía.

Por su parte encontramos una correlación positiva y en todos los casos entre: *CTNNB1-CCND1*, *CTNNBIP1-CCND1* y *CTNNBIP1-CTNNB1*. De éstas, la correlación *CTNNB1-CCND1* sugiere que β -Catenina actúa a través de ciclina D1 en tumores hipofisarios humanos, ya que a mayor expresión del mensajero de *CTNNB1*, se supone mayor síntesis de la proteína β -Catenina, la cual luego se transloca al núcleo y activa la transcripción de los genes diana de la vía. Cabe destacar que la correlación *CTNNB1-CCND1* obtenida en este trabajo no está reportada en la literatura en tumores hipofisarios humanos, y que además apoya los resultados obtenidos en el modelo de lactotropos MMQ que recientemente publicó nuestro laboratorio [50]. Elston *et al.* han reportado que el mensajero de *CCND1* se encuentra sobreexpresado en tumores hipofisarios no funcionantes en particular, al

comparar con hipófisis normales [50]; y el grupo de Kremenevskaya *et al.* reportó una mayor expresión de los ARNm de *CTNNB1* y *CCND1* en NCPAs (tumores hipofisarios de células nulas) y tumores secretores de ACTH al comparar con hipófisis normales [48], [49]. Por el contrario, en el presente trabajo no encontramos diferencias en la expresión del ARNm de *CCND1* al comparar tumores hipofisarios funcionantes y no funcionantes, o entre los distintos histotipos. Semba *et al.* encontraron una acumulación nuclear anormal de β -Catenina a nivel de la proteína en el 57% de los tumores hipofisarios secretores que estudiaron, y dentro de este grupo reportaron algunos tumores con mutaciones somáticas en el exón 3 del gen *CTNNB1* [46]. Howng *et al.* detectaron la expresión del ARNm de β -Catenina en tumores hipofisarios, aunque sin encontrar un perfil de expresión diferencial al comparar con otros tumores cerebrales [47]. Nuestro trabajo junto a los trabajos mencionados de la literatura demuestran activación de la vía Wnt en tumores hipofisarios humanos.

En cuanto a las correlaciones positivas que encontramos entre *CTNNBIP1-CCND1* y *CTNNBIP1-CTNNB1*, éstas nos resultaron contradictorias dado que se esperaría que a mayor expresión del ARNm del inhibidor *CTNNBIP1* hubiese una menor expresión del mensajero de *CCND1* debido a que la proteína codificada por *CTNNBIP1* impide la unión de β -Catenina a los TCF en el núcleo celular, regulando negativamente la actividad transcripcional de los genes diana de la vía como *CCND1*.

Como se mencionó anteriormente, no hay trabajos en la literatura que aborden el rol de este inhibidor en la tumorigénesis hipofisaria, sin embargo sí se han estudiado otros inhibidores de la vía Wnt/ β -Catenina. Elston *et al.* han reportado la subexpresión de los ARNm de los inhibidores *WIF1*, *SFRP2*, frizzled B (*FZDB*) o *SFRP3* y *SFRP4* en tumores hipofisarios en comparación a hipófisis normales [123]. Al relacionar esto a la sobreexpresión reportada en la literatura mencionada anteriormente para el ARNm de *CCND1* en tumores hipofisarios, se evidencia una posible relación inversa entre la expresión de estos inhibidores y este gen target, lo cual podría suceder también para *CTNNBIP1*, aunque nuestros resultados muestran lo opuesto. En concordancia con esto, Elston *et al.* y a diferencia nuestra, Wang *et al.* han reportado una correlación negativa entre los ARNm de *CTNNBIP1* y *CCND1* dentro del tejido lesionado por psoriasis [124]. También, Hu *et al.* demostraron que la sobreexpresión estable de *ICAT* en células de adenocarcinoma colorrectal humanas (SW480) inhibe la expresión de la proteína Ciclina D1. Además, al analizar datos del TCGA (The Cancer Genome Atlas), encontraron una correlación negativa entre *ICAT* y los genes target clásicos de la vía Wnt *CCND1* y *MYC* [121]. No obstante, nuestros resultados apuntan a lo contrario.

La correlación positiva entre los ARNm de *CTNNBIP1-CTNNB1* también llamó nuestra atención. Sin embargo, la proteína que se traduce a partir de mensajero de *CTNNBIP1* inhibe la transcripción de los genes diana de la vía Wnt a nivel de la proteína de β -Catenina. Por lo tanto, ya que el mecanismo inhibitorio de *CTNNBIP1* o *ICAT* es a nivel proteico, podría suceder que la correlación positiva que observamos entre los ARNm se deba a que se transcribe y traduce más ARNm de *CTNNBIP1* como mecanismo compensatorio, para impedir la unión de los altos niveles de la proteína β -Catenina a los TCF en el núcleo y en consecuencia la activación de genes diana de la vía como *CCND1*.

Determinamos por inmunohistoquímica la expresión de β -Catenina en otra cohorte de pacientes. Entre los trabajos que existen en la literatura, la determinación de la expresión de β -Catenina presenta ciertas contradicciones. Por ejemplo, el grupo de Buslei *et al.* no pudo determinar la expresión de β -Catenina en el núcleo de tumores hipofisarios funcionantes y no funcionantes, cuya marca estaba presente exclusivamente en las membranas celulares y muy débilmente en el citoplasma [44]. Elston *et al.* reportaron expresión de β -Catenina en membrana tanto de tumores hipofisarios como de hipófisis normales [123]. Qian *et al.* reportaron una fuerte expresión de β -Catenina en membrana de prolactinomas e hipófisis normales, mientras que no encontraron marca en núcleo ni en citoplasma [125]. En concordancia con estos reportes, en nuestro trabajo determinamos expresión de β -Catenina en membrana de muestras de tumores hipofisarios humanos, sin encontrar marca nuclear de la misma. De nuestro laboratorio, Demarchi *et al.* han reportado una expresión significativamente menor de β -Catenina en membrana de prolactinomas humanos al comparar con hipófisis normales [50]. A diferencia de Demarchi *et al.*, en el presente trabajo encontramos una disminución estadísticamente significativa en la expresión de β -Catenina en la membrana (lo cual se traduciría en activación de la vía Wnt) de tumores hipofisarios humanos de distintos histotipos con Ki-67 \geq 3% en comparación a aquellos con Ki-67 $<$ 3%, con lo cual aportamos un resultado novedoso a dicha línea de investigación de nuestro laboratorio.

Por último, analizamos la posible relación entre la expresión de los miARNs con la de los mensajeros clave de la vía Wnt/ β -Catenina evaluados en este trabajo. Si bien no hemos encontrado asociaciones directas entre ellos, estas relaciones sí existen para otros miARNs en tumores de hipófisis, y para éstos y otros miARNs en otros tipos de cáncer. Por ejemplo, miR-137 podría tener un papel crítico en la regulación de la señalización Wnt en tumores hipofisarios, al afectar el estado de metilación del promotor del inhibidor *WIF1* [74]. Por otro lado, este mismo miARN posee un rol supresor de la invasividad tumoral con valor pronóstico en prolactinomas, al regular *MITF* y la vía Wnt/ β -Catenina

[77]. El miARN miR-543 promueve la invasión celular e impide la apoptosis en tumores hipofisarios al activar la vía Wnt mediante la regulación negativa de Smad7 [78]. Respecto a esta relación en otros tipo de cáncer, miR-23b-3p afecta el crecimiento celular, la migración y la invasión al regular a *CB1R* a través de la señalización Wnt/ β -Catenina en el carcinoma gástrico [126]. Los miARN del cluster miR23a/27a/24-2 estimulan la progresión del cáncer de pulmón de células no pequeñas en las etapas tempranas mediante la estimulación simultánea de la señalización Wnt/ β -Catenina y el silenciamiento de genes supresores tumorales mediante la metilación de sus promotores [127]. miR-26a induce el crecimiento celular y la metástasis en osteosarcoma a través de la vía de señalización Wnt/ β -Catenina [128], y promueve el crecimiento del colangiocarcinoma al activar a β -Catenina [129]. miR-15b regula post-transcripcionalmente a WNT7A, el cual podría estar subexpresado mediante la hipermetilación de su promotor en el cáncer de ovario [130].

A futuro se deberían realizar experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar la funcionalidad de estos miARNs, como así también validar las interacciones predichas por miRSystem entre ellos y los mensajeros de la vía Wnt y de existir dicha interacción, cómo impacta esa regulación en el estado de activación de la señalización Wnt/ β -Catenina. Además, necesitamos analizar la expresión de los mismos en muestras de sangre pre y postquirúrgica de pacientes con tumores hipofisarios, debido a que ésta sería la metodología ideal a abordar para el realizar diagnóstico, pronóstico y seguimiento de los pacientes de una manera más eficaz debido a su practicidad y la no invasividad en la toma de la muestra, entre otras ventajas [60].

CONCLUSIÓN

En conjunto, nuestros resultados demuestran la expresión de miARNs específicos en muestras de tumores hipofisarios humanos, así como de mensajeros de componentes clave de la vía Wnt/ β -Catenina y de la proteína β -Catenina, confirmando parcialmente la hipótesis planteada ya que encontramos una asociación entre la expresión de algunos miARNs con características clínicas determinantes de agresividad, como lo son el tamaño tumoral, la invasividad y el % del índice de proliferación Ki-67, y con la recurrencia tumoral, en histotipos específicos o en el total de la cohorte. Sin embargo, sería interesante incrementar el número de tumores en determinados grupos para reforzar nuestros hallazgos. De todos modos, nuestros resultados evidencian el posible uso de estos miARNs como biomarcadores de agresividad y recurrencia en tumores hipofisarios humanos, si bien se necesitan más estudios a futuro para corroborar nuestros hallazgos.

Además, el presente trabajo contribuye a una de las líneas en las que trabaja nuestro laboratorio, la de la señalización Wnt/ β -Catenina; pero principalmente aporta los primeros resultados en el estudio de los miARNs, que abren una nueva línea de investigación para seguir profundizando. Y lo que es igual o más importante, se ha incorporado a partir de esta tesis la técnica de la Stem-Loop RT-qPCR al laboratorio, lo que permitirá seguir adelante en la detección de los miARNs intratumorales en estos y otros tumores, y además determinar miARNs circulantes a partir de biopsia líquida, herramienta crucial para los tumores en los que la biopsia no es una opción, como los tumores hipofisarios y otros tumores cerebrales.

AGRADECIMIENTOS

No quiero dejar de agradecer a todas las personas que me acompañaron durante estos años de formación en la UNNOBA, una hermosa etapa de la cual (además de formación académica) me llevo grandes amigas y amigos que pareciera conocer de toda la vida.

En primer lugar a mi familia. A mi mamá Marita, que hizo hasta lo imposible para darme la oportunidad de estudiar. A mi hermano Esteban, que siempre estuvo al pie del cañón también. Horacio, Ale y Luli, que estuvieron ahí para cualquier cosa que necesitara. A mis abuelos, tíos y primos que también fueron un gran sostén. A Adriano, que me acompañó siempre y especialmente en los momentos en los que pensaba que no podía más.

También a mis amigas. A esas de toda la vida que se bancaron muchas ausencias todos estos años, siempre comprendiendo, bancando y empujando: Lara, Luisi, Toli, Nai, Coya, Flo, Emi, Nati, Sofi, Ro, Pachu y Giuli. Y a esas que me llevo de la UNNOBA, que también parecen ser de toda la vida: Julini, Bren, Juli H, Juli G, Juli P y Carli; con quienes compartí muchísimos momentos alegres y estresantes, presentes siempre e incondicionalmente.

A las mejores compañeras de laboratorio y amigas que me pudieron haber tocado: Agus, Na, Sofi V, Sofi P, Gia y Lu. Gracias a ellas aprendí absolutamente todo el conocimiento de mesada que me llevo, y muchas otras cosas más. Definitivamente hicieron que todo el trabajo diario sea mucho más llevadero, agradable y divertido. También a Eli, que sin tener por qué hacerlo me ofreció su ayuda con total predisposición.

A Caro por darme el lugar para poder desarrollar mi tesina y así llevarme un montón de aprendizaje. A toda la gente del CIBA, que son un hermoso grupo de personas y que también facilitaron el trabajo en el día a día.

Y por último a la UNNOBA, por siempre acompañar a sus estudiantes de diferentes maneras durante todos los años de carrera. Definitivamente aguante la universidad pública.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] G. K. Hong, S. C. Payne, and J. A. Jane, "Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland," *Otolaryngol. Clin. North Am.*, vol. 49, no. 1, pp. 21–32, 2016, doi: 10.1016/j.otc.2015.09.002.
- [2] C. Perez-Castro, U. Renner, M. R. Haedo, G. K. Stalla, and E. Arzt, "Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology," *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 1, pp. 1–38, 2012, doi: 10.1152/physrev.00003.2011.
- [3] Z. Karaca, B. A. Laway, H. S. Dokmetas, H. Atmaca, and F. Kelestimur, "Sheehan syndrome," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.92.
- [4] C. T. Lim and M. Korbonits, "Update on the clinicopathology of pituitary adenomas," *Endocr. Pract.*, vol. 24, no. 5, pp. 473–488, 2018, doi: 10.4158/EP-2018-0034.
- [5] S. Melmed, "Pituitary-Tumor Endocrinopathies," *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, no. 10, pp. 937–950, 2020, doi: 10.1056/nejmra1810772.
- [6] O. Mete and M. B. Lopes, "Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors," *Endocr. Pathol.*, vol. 28, no. 3, pp. 228–243, 2017, doi: 10.1007/s12022-017-9498-z.
- [7] G. U. Mehta and R. R. Lonser, "Management of hormone-secreting pituitary adenomas," *Neuro. Oncol.*, vol. 19, no. 6, pp. 762–773, 2017, doi: 10.1093/neuonc/now130.
- [8] S. L. Asa, O. Mete, A. Perry, and R. Y. Osamura, "Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors," *Endocr. Pathol.*, vol. 33, no. 1, pp. 6–26, 2022, doi: 10.1007/s12022-022-09703-7.
- [9] S. Melmed, "Pathogenesis of pituitary tumors," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 7, no. 5, pp. 257–266, 2011, doi: 10.1038/nrendo.2011.40.
- [10] S. L. Asa and S. Ezzat, "The pathogenesis of pituitary tumors," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 4, pp. 97–126, 2009, doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092259.
- [11] S. Rostad, "Pituitary adenoma pathogenesis: An update," *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, vol. 19, no. 4, pp. 322–327, 2012, doi: 10.1097/MED.0b013e328354b2e2.
- [12] T. Hosoyama *et al.*, "A postnatal pax7+ progenitor gives rise to pituitary adenomas," *Genes and Cancer*, vol. 1, no. 4, pp. 388–402, 2010, doi: 10.1177/1947601910370979.
- [13] D. Solari, L. M. Cavallo, and P. Cappabianca, *Surgical approach to pituitary tumors*, 1st ed., vol. 124. Elsevier B.V., 2014.
- [14] D. Solari *et al.*, "Pituitary Adenomas: What Are the Key Features? What Are the Current Treatments? Where Is the Future Taking Us?," *World Neurosurg.*, vol. 127, pp. 695–709, 2019, doi: 10.1016/j.wneu.2019.03.049.
- [15] S. Petersenn, "Management of Aggressive Pituitary Tumors – A 2019 Update Author Definition of Aggressive Pituitary Tumors," pp. 755–764, 2019.
- [16] M. E. Molitch, "Diagnosis and treatment of pituitary adenomas: A review," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 317, no. 5, pp. 516–524, 2017, doi: 10.1001/jama.2016.19699.
- [17] G. U. Mehta and J. A. Jane, "Pituitary tumors," *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 25, no. 6, pp. 751–755, 2012,

doi: 10.1097/WCO.0b013e3283587bed.

- [18] L. Kasuki and G. Raverot, "Definition and diagnosis of aggressive pituitary tumors," pp. 4–9, 2019.
- [19] M. D. Ilie, E. Jouanneau, G. H. Est, and G. H. Est, "Aggressive pituitary adenomas and carcinomas," *Endocrinol Metab Clin North Am*, vol. 49(3):, pp. 505-515., 2020.
- [20] H. Nishioka and N. Inoshita, "New WHO classification of pituitary adenomas (4th edition): assessment of pituitary transcription factors and the prognostic histological factors," *Brain Tumor Pathol.*, vol. 35, no. 2, pp. 57–61, 2018, doi: 10.1007/s10014-017-0307-7.
- [21] M. Araujo-Castro, V. R. Berrocal, and E. Pascual-Corrales, "Pituitary tumors: epidemiology and clinical presentation spectrum," *Hormones*, vol. 19, no. 2, pp. 145–155, 2020, doi: 10.1007/s42000-019-00168-8.
- [22] A. R. T. I. C. Le *et al.*, "Risk of Recurrence in Pituitary Neuroendocrine Tumors ;," vol. 102, no. September, pp. 3368–3374, 2017, doi: 10.1210/jc.2017-00773.
- [23] G. Raverot, P. Burman, A. McCormack, A. Heaney, S. Petersenn, and V. Popovic, "European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas," 2018.
- [24] A. Di Ieva, F. Rotondo, L. V. Syro, M. D. Cusimano, and K. Kovacs, "Aggressive pituitary adenomas—diagnosis and emerging treatments," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 10, no. 7, pp. 423–435, 2014, doi: 10.1038/nrendo.2014.64.
- [25] E. Knosp, E. Steiner, K. Kitz, and C. Matula, "Pituitary Adenomas with Invasion of the Cavernous Sinus Space: A Magnetic Resonance Imaging Classification Compared with Surgical Findings," *Neurosurgery*, vol. 33, no. 4, pp. 610–618, 1993.
- [26] J. Hardy, "Transphenoidal microsurgery of the normal and pathological pituitary.," *Clin. Neurosurg.*, vol. 16, pp. 185–217, 1969, doi: 10.1093/neurosurgery/16.cn_suppl_1.185.
- [27] H. J and V. JL, "Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm.," *Adv. Neurol.*, vol. 15, pp. 261–273, 1976.
- [28] H. J, "Transsphenoidal microsurgery of prolactinomas: Report on 355 cases, in Tolis G, Stefanis C, Mountokalakis T.," *Prolactin and Prolactinomas*, no. New York, Raven Press, pp. 431–440, 1983.
- [29] G. Mohr, J. Hardy, R. Comtois, and H. Beauregard, "Surgical management of giant pituitary adenomas," *Can. J. Neurol. Sci.*, vol. 17, no. 1, pp. 62–66, 1990, doi: 10.1016/S0531-5131(03)01412-2.
- [30] S. Nisar *et al.*, "Exploring Dysregulated Signaling Pathways in Cancer," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 26, no. 4, pp. 429-445 (17), 2020, doi: <https://doi.org/10.2174/138161282666200115095937>.
- [31] B. Taciak, I. Pruszyńska, L. Kiraga, M. Bialasek, and M. Krol, "Wnt Signaling Pathway in Development and Cancer," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 69, no. 2, pp. 185–196, 2018, doi: 10.26402/JPP.2018.2.07.
- [32] T. A. Graham, W. K. Clements, D. Kimelman, and W. Xu, "The crystal structure of the β -catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 563–571, 2002, doi: 10.1016/S1097-2765(02)00637-8.
- [33] M. Katoh and M. Katoh, "WNT signaling pathway and stem cell signaling network," *Clin. Cancer Res.*,

vol. 13, no. 14, pp. 4042–4045, 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2316.

- [34] Y. Kawano and R. Kypta, “Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway,” *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. 13, pp. 2627–2634, 2003, doi: 10.1242/jcs.00623.
- [35] C. Kioussi *et al.*, “Identification of a WntDv-Catenin → Pitx2 Pathway.pdf,” *Cell*, vol. 111, no. 5, pp. 673–685, 2002, [Online]. Available: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12464179&retmode=ref&cmd=prlinks%0Apapers3://publication/uuid/809B6CD6-FB86-4A04-8644-0F3E649FB5BF>.
- [36] J. Huelsken and J. Behrens, “The Wnt signalling pathway,” *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. 21, pp. 3977–3978, 2002, doi: 10.1242/jcs.00089.
- [37] A. Trejo Cordova, C. Navarro Maldonado, and A. Rosado García, “Catenina Beta : características estructurales y funcionales,” *Contacto*, pp. 15–20, 2010, [Online]. Available: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n75ne/catenina.pdf>.
- [38] Y. Kam and V. Quaranta, “Cadherin-bound β -catenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: Evidence for an intersection between β -catenin pools,” *PLoS One*, vol. 4, no. 2, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004580.
- [39] T. Couffignal, P. Dufourcq, and C. Dupl a, “ β -catenin nuclear activation: Common pathway between wnt and growth factor signaling in vascular smooth muscle cell proliferation?,” *Circ. Res.*, vol. 99, no. 12, pp. 1287–1289, 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000253139.82251.31.
- [40] R. L. Daugherty, C. J. Gottardi, A. J. Physiol, L. Cell, and M. Physiol, “Phospho-regulation of B-Catenin Adhesion and Signaling Functions,” *October*, pp. 303–309, 2009.
- [41] M. S. Elston and R. J. Clifton-Bligh, “Identification of Wnt family inhibitors: A pituitary tumor directed whole genome approach,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 326, no. 1–2, pp. 48–54, 2010, doi: 10.1016/j.mce.2010.02.039.
- [42] S. Sekine *et al.*, “Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor β -Catenin gene mutations,” *Am. J. Pathol.*, vol. 161, no. 6, pp. 1997–2001, 2002, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64477-X.
- [43] S. Semba, S. Y. Han, H. Ikeda, and A. Horii, “Frequent nuclear accumulation of β -catenin in pituitary adenoma,” *Cancer*, vol. 91, no. 1, pp. 42–48, 2001, doi: 10.1002/1097-0142(20010101)91:1<42::AID-CNCR6>3.0.CO;2-7.
- [44] R. Buslei *et al.*, “Common mutations of β -catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region,” *Acta Neuropathol.*, vol. 109, no. 6, pp. 589–597, 2005, doi: 10.1007/s00401-005-1004-x.
- [45] C. Gaston-Massuet *et al.*, “Increased Wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 28, pp. 11482–11487, 2011, doi: 10.1073/pnas.1101553108.
- [46] Y. Zhang, Y. Tan, H. Wang, M. Xu, and L. Xu, “Long non-coding RNA plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) enhances proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of pituitary adenoma cells by activating β -catenin, c-Myc, and cyclin D1 expression,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 25, pp. 7652–7659, 2019, doi: 10.12659/MSM.917110.
- [47] S. L. Howng *et al.*, “Differential expression of Wnt genes, β -catenin and E-cadherin in human brain

- tumors," *Cancer Lett.*, vol. 183, no. 1, pp. 95–101, 2002, doi: 10.1016/S0304-3835(02)00085-X.
- [48] Y. Long, M. Lu, T. Cheng, X. Zhan, and X. Zhan, "Multiomics-Based Signaling Pathway Network Alterations in Human Non-functional Pituitary Adenomas," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 10, no. December, pp. 1–30, 2019, doi: 10.3389/fendo.2019.00835.
- [49] Z. R. Qian *et al.*, "Role of E-Cadherin, α -, β -, and γ -Catenins, and p120 (Cell Adhesion Molecules) in Prolactinoma Behavior. 15, 1357–1365 (2002).," *Mod. Pathol.*, vol. 15, pp. 1357–1365, 2002.
- [50] G. Demarchi *et al.*, " β -Catenin is reduced in membranes of human prolactinoma cells and it is inhibited by temozolomide in prolactin secreting tumor models," vol. 44, pp. 85–105, 2022, doi: 10.3233/TUB-211500.
- [51] L. M. Colli *et al.*, "Components of the Canonical and Non-Canonical Wnt Pathways Are Not Mis-Expressed in Pituitary Tumors," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0062424.
- [52] J. Quan *et al.*, "MicroRNA-23a/24-2/27a as a potential diagnostic biomarker for cancer: A systematic review and meta-analysis," *Mol. Clin. Oncol.*, pp. 159–169, 2017, doi: 10.3892/mco.2017.1492.
- [53] R. Chhabra, R. Dubey, and N. Saini, "Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases," *Mol. Cancer*, vol. 9, pp. 1–16, 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-232.
- [54] C. Li *et al.*, "miR-26 family and its target genes in tumorigenesis and development," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 157, p. 103124, 2021, doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.103124.
- [55] C. Turco, S. Donzelli, and G. Fontemaggi, "miR-15/107 microRNA Gene Group: Characteristics and Functional Implications in Cancer," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. June, pp. 1–8, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00427.
- [56] F. Russo *et al.*, "MiRandola 2017: A curated knowledge base of non-invasive biomarkers," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D354–D359, 2018, doi: 10.1093/nar/gkx854.
- [57] A. Di Ieva *et al.*, "MicroRNAs as biomarkers in pituitary tumors," *Neurosurgery*, vol. 75, no. 2, pp. 181–188, 2014, doi: 10.1227/NEU.0000000000000369.
- [58] B. Zhang, X. Pan, G. P. Cobb, and T. A. Anderson, "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors," *Dev. Biol.*, vol. 302, no. 1, pp. 1–12, 2007, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028.
- [59] L. J. Y. M. Swier, A. Dzikiewicz-Krawczyk, M. Winkle, A. van den Berg, and J. Kluiver, "Intricate crosstalk between MYC and non-coding RNAs regulates hallmarks of cancer," *Mol. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 26–45, 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12409.
- [60] O. Beylerli *et al.*, "Mirnas as noninvasive biomarkers and therapeutic agents of pituitary adenomas," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 19, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/ijms21197287.
- [61] M. Acunzo *et al.*, "MiR-130a targets MET and induces TRAIL-sensitivity in NSCLC by downregulating miR-221 and 222," *Oncogene*, vol. 31, no. 5, pp. 634–642, 2012, doi: 10.1038/onc.2011.260.
- [62] X. B. Shi *et al.*, "An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 50, pp. 19983–19988, 2007, doi: 10.1073/pnas.0706641104.

- [63] M. Zhou *et al.*, "MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 28, pp. 21496–21507, 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.083337.
- [64] A. Lal *et al.*, "p16INK4a translation suppressed by miR-24," *PLoS One*, vol. 3, no. 3, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0001864.
- [65] A. Malhas, N. J. Saunders, and D. J. Vaux, "The nuclear envelope can control gene expression and cell cycle progression via miRNA regulation," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 3, pp. 531–539, 2010, doi: 10.4161/cc.9.3.10511.
- [66] W. Hu *et al.*, "Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 by MicroRNA miR-504," *Mol. Cell*, vol. 38, no. 5, pp. 689–699, 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.027.
- [67] T. Frixa, S. Donzelli, and G. Blandino, "Oncogenic MicroRNAs: Key players in malignant transformation," *Cancers (Basel)*, vol. 7, no. 4, pp. 2466–2485, 2015, doi: 10.3390/cancers7040904.
- [68] F. Bahreini, P. Jabbari, W. Gossing, F. Aziziyan, M. Frohme, and N. Rezaei, "The role of noncoding RNAs in pituitary adenoma," *Epigenomics*, vol. 13, no. 17, 2021, doi: <https://doi.org/10.2217/epi-2021-0165>.
- [69] T. M. Grzywa *et al.*, "Lineage-dependent role of miR-410-3p as oncomiR in gonadotroph and corticotroph pituitary adenomas or tumor suppressor miR in somatotroph adenomas via MAPK, PTEN/AKT, and STAT3 signaling pathways," *Endocrine*, vol. 65, no. 3, pp. 646–655, 2019, doi: 10.1007/s12020-019-01960-7.
- [70] E. Nikolova *et al.*, "MiRNA signatures related to invasiveness and recurrence in patients with non-functioning pituitary adenomas," *Res. Sq.*, pp. 1–18, 2022, doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1656363/v1>.
- [71] A. Wierinckx, M. Roche, C. Legras-Lachuer, J. Trouillas, G. Raverot, and J. Lachuer, "MicroRNAs in pituitary tumors," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 456, pp. 51–61, 2017, doi: 10.1016/j.mce.2017.01.021.
- [72] O. Beylerli *et al.*, "Differential non-coding RNAs expression profiles of invasive and non-invasive pituitary adenomas," *Non-coding RNA Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 115–122, 2021, doi: 10.1016/j.ncrna.2021.06.004.
- [73] W. J. Su, J. S. Wang, M. D. Ye, W. L. Chen, and C. X. Liao, "Expression and clinical significance of miR-193a-3p in invasive pituitary adenomas," *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 24, no. 14, pp. 7673–7680, 2020, doi: 10.26355/eurrev_202007_22268.
- [74] S. Donati *et al.*, "MicroRNAs as potential biomarkers in pituitary adenomas," *Non-coding RNA*, vol. 7, no. 3, pp. 1–22, 2021, doi: 10.3390/ncrna7030055.
- [75] F. Rahmani, A. Avan, S. I. Hashemy, and S. M. Hassanian, "Role of Wnt/ β -catenin signaling regulatory microRNAs in the pathogenesis of colorectal cancer," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 2, pp. 811–817, 2018, doi: 10.1002/jcp.25897.
- [76] A. Sharma, R. Mir, and S. Galande, "Epigenetic Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Cancer," *Front. Genet.*, vol. 12, no. September, 2021, doi: 10.3389/fgene.2021.681053.
- [77] C. Lei *et al.*, "MiR-137's Tumor Suppression on Prolactinomas by Targeting MITF and Modulating Wnt Signaling Pathway," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 104, no. 12, pp. 6391–6402, 2019, doi: 10.1210/jc.2018-02544.

- [78] D. W. Shen, Y. L. Li, Y. J. Hou, Z. D. Xu, Y. Z. Li, and J. Y. Chang, "MicroRNA-543 promotes cell invasion and impedes apoptosis in pituitary adenoma via activating the Wnt/ β -catenin pathway by negative regulation of Smad7," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 83, no. 6, pp. 1035–1044, 2019, doi: 10.1080/09168451.2019.1591260.
- [79] L. He, H. Zhou, Z. Zeng, H. Yao, W. Jiang, and H. Qu, "Wnt/ β -catenin signaling cascade: A promising target for glioma therapy," *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 3, pp. 2217–2228, 2019, doi: 10.1002/jcp.27186.
- [80] T. P. Lu *et al.*, "MiRSystem: An integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042390.
- [81] R. Peculis, H. Niedra, and V. Rovite, "Large scale molecular studies of pituitary neuroendocrine tumors: Novel markers, mechanisms and translational perspectives," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 6, pp. 1–28, 2021, doi: 10.3390/cancers13061395.
- [82] L. H. Yang *et al.*, "Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0115293.
- [83] C. Chen *et al.*, "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 20, pp. 1–9, 2005, doi: 10.1093/nar/gni178.
- [84] M. F. Kramer, "Stem-loop RT-qPCR for miRNAs," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, no. SUPPL. 95, pp. 1–22, 2011, doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
- [85] M. Taher, S. S. Shaari, D. Susanti, D. Arbain, and Z. A. Zakaria, "Genus ophiorrhiza: A review of its distribution, traditional uses, phytochemistry, biological activities and propagation," *Molecules*, vol. 25, no. 11, 2020, doi: 10.3390/molecules25112611.
- [86] K. Gopalakrishnan, S. Krishnan, and K. Peringattulli Narayanan, "Tissue culture studies and estimation of camptothecin from *Ophiorrhiza prostrata* D. Don," *Indian J. Plant Physiol.*, vol. 23, no. 3, pp. 582–592, 2018, doi: 10.1007/s40502-018-0391-7.
- [87] X. D. Wu *et al.*, "Effect of aerobic exercise on miRNA-TLR4 signaling in atherosclerosis," *Int. J. Sports Med.*, vol. 35, no. 4, pp. 344–350, 2014, doi: 10.1055/s-0033-1349075.
- [88] L. Giusti *et al.*, "microRNAs differentially modulated in response to heat and drought stress in durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency," *Funct. Integr. Genomics*, vol. 17, no. 2–3, pp. 293–309, 2017, doi: 10.1007/s10142-016-0527-7.
- [89] L. Hong *et al.*, "Down-regulation of miR-378a-3p induces decidual cell apoptosis: A possible mechanism for early pregnancy loss," *Hum. Reprod.*, vol. 33, no. 1, pp. 11–22, 2018, doi: 10.1093/humrep/dex347.
- [90] C. Cristina *et al.*, "Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice," *Endocrinology*, vol. 146, no. 7, pp. 2952–2962, 2005, doi: 10.1210/en.2004-1445.
- [91] H. Schwarzenbach, A. M. Da Silva, G. Calin, and K. Pantel, "Data normalization strategies for microRNA quantification," *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 11, pp. 1333–1342, 2015, doi: 10.1373/clinchem.2015.239459.
- [92] S. Perrone *et al.*, "Notch system is differentially expressed and activated in pituitary adenomas of distinct histotype, tumor cell lines and normal pituitaries," *Oncotarget*, vol. 8, no. 34, pp. 57072–57088, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.19046.

- [93] F. Mertens *et al.*, "Pituitary tumors contain a side population with tumor stem cell-associated characteristics," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 22, no. 4, pp. 481–504, 2015, doi: 10.1530/ERC-14-0546.
- [94] I. García-Tornadú *et al.*, "Hypothalamic orexin, OX1, α MSH, NPY and MCRs expression in dopaminergic D2R knockout mice," *Neuropeptides*, vol. 43, no. 4, pp. 267–274, 2009, doi: 10.1016/j.npep.2009.06.002.
- [95] M. I. Perez-Millan *et al.*, "Enhanced nestin expression and small blood vessels in human pituitary adenomas," *Pituitary*, vol. 16, no. 3, pp. 303–310, 2013, doi: 10.1007/s11102-012-0421-9.
- [96] G. M. Luque, M. I. Perez-Millán, A. M. Ornstein, C. Cristina, and D. Becu-Villalobos, "Inhibitory effects of antivascular endothelial growth factor strategies in experimental dopamine-resistant prolactinomas," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 337, no. 3, pp. 766–774, 2011, doi: 10.1124/jpet.110.177790.
- [97] G. Demarchi *et al.*, "Case Report: Progression of a Silent Corticotroph Tumor to an Aggressive Secreting Corticotroph Tumor, Treated by Temozolomide. Changes in the Clinic, the Pathology, and the β -Catenin and α -SMA Expression," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 13, no. July, pp. 1–10, 2022, doi: 10.3389/fendo.2022.870172.
- [98] E. Chatzellis, K. I. Alexandraki, I. I. Androulakis, and G. Kaltsas, "Aggressive pituitary tumors," *Neuroendocrinology*, vol. 101, no. 2, pp. 87–104, 2015, doi: 10.1159/000371806.
- [99] G. Raverot *et al.*, "Aggressive pituitary tumours and pituitary carcinomas," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 17, no. 11, pp. 671–684, 2021, doi: 10.1038/s41574-021-00550-w.
- [100] D. Xu and L. Wang, "The Involvement of miRNAs in Pituitary Adenomas Pathogenesis and the Clinical Implications," *Eur. Neurol.*, pp. 171–176, 2022, doi: 10.1159/000521388.
- [101] Y. Chen *et al.*, "JAG1, Regulated by microRNA-424-3p, Involved in Tumorigenesis and Epithelial–Mesenchymal Transition of High Proliferative Potential-Pituitary Adenomas," *Front. Oncol.*, vol. 10, no. December, pp. 1–13, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.567021.
- [102] Q. Ma *et al.*, "MicroRNA-34c-5p exhibits anticancer properties in gastric cancer by targeting MAP2K1 to inhibit cell proliferation, migration, and invasion," *Biomed Res. Int.*, vol. 2022, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1155/2022/7375661.
- [103] X. Lou, Y. Cai, H. Zheng, and Y. Zhang, "MicroRNA-146b-5p/EPHA7 axis regulates cell invasion, metastasis, proliferation, and temozolomide-induced chemoresistance via regulation of IRAK4/TRAF6/NF- κ B signaling pathway in aggressive pituitary adenoma," *Histol. Histopathol.*, vol. 37, no. 1, pp. 21–33, 2022, doi: 10.14670/HH-18-391.
- [104] K. Zhou *et al.*, "LncRNA XIST depletion prevents cancer progression in invasive pituitary neuroendocrine tumor by inhibiting bFGF via upregulation of microRNA-424-5p," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 12, pp. 7095–7109, 2019, doi: 10.2147/OTT.S208329.
- [105] C. T. Yu, J. X. Li, F. N. Sun, J. P. Cui, H. L. Fang, and G. L. Sui, "Expression and clinical significance of miR-26a and pleomorphic adenoma gene 1 (PLAG1) in invasive pituitary adenoma," *Med. Sci. Monit.*, vol. 22, pp. 5101–5108, 2016, doi: 10.12659/MSM.898908.
- [106] I. C. Bosna *et al.*, "The clinical effects of miR-26a, miR-16, let-7, miR-128a and miR-223 in acromegaly patients," *Endocr. Abstr.*, vol. 73, no. OC8.5, 2021, doi: 10.1530/endoabs.73.OC8.5.

- [107] H. Butz *et al.*, "MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas," *Pituitary*, vol. 14, no. 2, pp. 112–124, 2011, doi: 10.1007/s11102-010-0268-x.
- [108] T. M. Vicchio *et al.*, "MicroRNAs expression in pituitary tumors: differences related to functional status, pathological features, and clinical behavior," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 43, no. 7, pp. 947–958, 2020, doi: 10.1007/s40618-019-01178-4.
- [109] D. Palmieri *et al.*, "Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis," *Oncogene*, vol. 31, no. 34, pp. 3857–3865, 2012, doi: 10.1038/onc.2011.557.
- [110] A. Bottoni, D. Piccin, F. Tagliati, A. Luchin, M. C. Zatelli, and E. C. D. Uberti, "miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas," *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 1, pp. 280–285, 2005, doi: 10.1002/jcp.20282.
- [111] B. Chen *et al.*, "miR-23a suppresses pancreatic cancer cell progression by inhibiting PLK-1 expression," *Mol. Med. Rep.*, vol. 18, no. 1, pp. 105–112, 2018, doi: 10.3892/mmr.2018.8941.
- [112] Y. He, C. Meng, Z. Shao, H. Wang, and S. Yang, "MiR-23a functions as a tumor suppressor in osteosarcoma," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 34, no. 5, pp. 1485–1496, 2014, doi: 10.1159/000366353.
- [113] L. Lu, X. Wan, Y. Xu, J. Chen, K. Shu, and T. Lei, "Prognostic Factors for Recurrence in Pituitary Adenomas: Recent Progress and Future Directions," *Diagnostics*, vol. 12, no. 4, 2022, doi: 10.3390/diagnostics12040977.
- [114] K. Németh *et al.*, "Comprehensive analysis of circulating miRNAs in the plasma of patients with pituitary adenomas," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 104, no. 9, pp. 4151–4168, 2019, doi: 10.1210/jc.2018-02479.
- [115] F. C. Amaral *et al.*, "MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, no. 1, pp. 320–323, 2009, doi: 10.1210/jc.2008-1451.
- [116] M. Imai, T. Nakamura, T. Akiyama, and A. Horii, "Infrequent somatic mutations of the ICAT gene in various human cancers with frequent 1p-LOH and/or abnormal nuclear accumulation of β -catenin," *Oncol. Rep.*, vol. 12, no. 5, pp. 1099–1103, 2004, doi: <https://doi.org/10.3892/or.12.5.1099>.
- [117] M. Gueorguiev and A. B. Grossman, "Pituitary gland and β -catenin signaling: From ontogeny to oncogenesis," *Pituitary*, vol. 12, no. 3, pp. 245–255, 2009, doi: 10.1007/s11102-008-0147-x.
- [118] K. Zhang *et al.*, "ICAT inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing Wnt/ β -catenin activity," *Cancer Lett.*, vol. 357, no. 1, pp. 404–411, 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.047.
- [119] J. M. Chang, A. C. D. Tsai, W. R. Huang, and R. C. Tseng, "The alteration of ctnnbip1 in lung cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 22, 2019, doi: 10.3390/ijms20225684.
- [120] W. Qi *et al.*, "Targeting the Wnt-Regulatory Protein CTNNBIP1 by microRNA-214 Enhances the Stemness and Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells in Lung Adenocarcinomas," *Stem Cells*, vol. 33, no. 12, pp. 3423–3436, 2015, doi: 10.1002/stem.2188.
- [121] J. Hu *et al.*, "Overexpression of ICAT Inhibits the Progression of Colorectal Cancer by Binding with β -Catenin in the Cytoplasm," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 20, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1177/15330338211041253.

- [122] Y. Zhang *et al.*, “MiR-424-5p reversed epithelial-mesenchymal transition of anchorage-independent HCC cells by directly targeting ICAT and suppressed HCC progression,” *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1038/srep06248.
- [123] M. S. Elston *et al.*, “Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors,” *Endocrinology*, vol. 149, no. 3, pp. 1235–1242, 2008, doi: 10.1210/en.2007-0542.
- [124] C. Wang *et al.*, “CTNNBIP1 modulates keratinocyte proliferation through promoting the transcription of β -catenin/TCF complex downstream genes,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 35, no. 2, pp. 368–379, 2021, doi: 10.1111/jdv.16725.
- [125] Q. ZR *et al.*, “Role of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenins, and p120 (cell adhesion molecules) in prolactinoma behavior,” *Mod. Pathol.*, vol. 15, pp. 1357–1365, 2002.
- [126] X. Xian, L. Tang, C. Wu, and L. Huang, “MiR-23b-3p and miR-130a-5p affect cell growth, migration and invasion by targeting CB1R via the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric carcinoma,” *Oncol. Targets. Ther.*, vol. 11, pp. 7503–7512, 2018, doi: 10.2147/OTT.S181706.
- [127] X. Fan, S. Tao, Q. Li, B. Deng, Q. Y. Tan, and H. Jin, “The miR-23a/27a/24-2 cluster promotes postoperative progression of early-stage non-small cell lung cancer,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 24, no. March, pp. 205–217, 2022, doi: 10.1016/j.omto.2021.12.014.
- [128] F. Qu *et al.*, “MicroRNA-26a induces osteosarcoma cell growth and metastasis via the Wnt/ β -catenin pathway,” *Oncol. Lett.*, vol. 11, no. 2, pp. 1592–1596, 2016, doi: 10.3892/ol.2015.4073.
- [129] J. Zhang, C. Han, and T. Wu, “MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin,” *Gastroenterology*, vol. 143, no. 1, pp. 246–256, 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2012.03.045.
- [130] J. A. MacLean, M. L. King, H. Okuda, and K. Hayashi, “WNT7A regulation by miR-15b in ovarian cancer,” *PLoS One*, vol. 11, no. 5, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0156109.