



**RIDAA**  
Repositorio Institucional  
Digital de Acceso Abierto de la  
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

Faraoni, Erika Yanil

# Función del eje gonadotrófico y de los miembros de la familia TGF $\beta$ en normal y patológica del lactotrofo



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

*Faraoni, E. Y. (2019) Función del eje gonadotrófico y de los miembros de la familia TGF $\beta$  en normal y patológica del lactotrofo. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/988>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Función del eje gonadotrófico y de los miembros de la familia TGF $\beta$ en la función normal y patológica del lactotrofo**

*TESIS DOCTORAL*

**Erika Yanil Faraoni**

erika.faraoni@gmail.com

### **Resumen**

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más frecuentes y se caracterizan por presentar una hiperplasia e hipertrofia de lactotrofos y una secreción excesiva de PRL. Aproximadamente entre un 15% de los tumores hipofisarios hipersecretores de PRL no responden a un tratamiento con agonistas de la DA, son considerados resistentes y para su tratamiento aún no existen terapias médicas alternativas. Dado que alteraciones en la expresión de diversos miembros de la familia TGF $\beta$  afectan la diferenciación y proliferación del lactotrofo, favoreciendo el desarrollo de un prolactinoma, el objetivo de la presente Tesis fue estudiar el rol de TGF $\beta$ 1 y activinas en tres modelos experimentales de prolactinoma: 1) ratones deficientes en el receptor dopaminérgico D2 (Drd2 $^{-/-}$ ); 2) ratones con sobreexpresión de la subunidad  $\beta$  de hCG (hCG $\beta$ ); y 3) ratas tratadas crónicamente con estrógenos, con el objetivo de comprender la funcionalidad de estos componentes en la tumorigénesis hipofisaria y en las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo. Demostramos que una disminución en la actividad de TGF $\beta$ 1 en hipófisis de hembras hCG $\beta$ + se encuentra involucrada en el desarrollo de prolactinomas en este grupo. Más aún, demostramos que un tratamiento *in vivo* en hembras hCG $\beta$ + que logra recuperar los niveles de TGF $\beta$ 1 activo en hipófisis, logra prevenir el desarrollo tumoral y normalizar los niveles séricos de PRL. Postulamos que una disminución de activinas hipofisarias en hembras hCG $\beta$ + y Drd2 $^{-/-}$ (ko) estaría involucrada en el desarrollo de prolactinomas y evidenciamos que la disponibilidad de activinas se encuentra regulada de modo diferencial en dichas hipófisis, encontrándose comprometida por unión a FST288 en hembras hCG $\beta$ + y el antagonismo por inhibinas en hembras ko. Asimismo, proponemos que la mayor expresión hipofisaria de los componentes de los sistemas inhibitorios TGF $\beta$ 1 y activinas-inhibinas en machos podrían estar protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinomas en ambos modelos murinos. Por último, demostramos que, luego de una OVX, no solo se ven modificados los niveles de estrógenos y

progesterona circulantes, sino que también se modifica fuertemente la expresión hipofisaria del sistema activinas-inhibinas en los 3 modelos experimentales utilizados, evitando el desarrollo tumoral y, por ende, posicionando a las activinas como un importante sistema inhibitorio de la proliferación del lactotrofo, así como también de la síntesis y secreción de PRL.

**Palabras clave:** Hipófisis, prolactinoma, prolactina, TGF $\beta$ 1, activinas, inhibinas.



# **Función del eje gonadotrófico y de los miembros de la familia TGF $\beta$ en la función normal y patológica del lactotrofo**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la  
Universidad Nacional de Quilmes en Ciencia y Tecnología

Lic. Erika Yanil Faraoni

Directora de tesis: Dra. Graciela Díaz-Torga

Instituto de Biología y Medicina Experimental. IBYME-CONICET  
Buenos Aires, Febrero 2019

Parte de los resultados presentados en esta tesis forman parte del trabajo ganador del **Premio Carlos Lantos 2016**, otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica:

“Diferencias sexuales en el desarrollo de un prolactinoma en ratones que sobreexpresan hCG $\beta$ : rol de TGF $\beta$ 1”

Faraoni Erika Yanil, Camilletti M. Andrea, Abeledo-Machado Alejandra, Ratner Laura, Rulli Susana, Díaz-Torga Graciela

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

1. Sex differences in the development of prolactinoma in mice overexpressing hCG $\beta$ : Role of TGF $\beta$ 1. Faraoni EY, Camilletti MA, Abeledo Machado AI, Ratner LD, De Fino F, Huhtaniemi IT, Rulli SB, Díaz-Torga G. **J Endocrinol. 2017 Mar;232(3):535-546**
2. Sex differences in the pituitary TGF $\beta$ 1 system: The role of TGF $\beta$ 1 in prolactinoma development. Recouvreux MV, Faraoni EY, Camilletti MA, Ratner L, Abeledo-Machado A, Rulli SB, Díaz-Torga G. **Front Neuroendocrinol. 2018 Jul;50:118-122**

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

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS**

<b><i>μg</i></b>	Microgramo
<b><i>μl</i></b>	Microlitro
<b><i>μm</i></b>	Micro molar
<b><i>ACTH</i></b>	Hormona Adenocorticotropa
<b><i>ADN</i></b>	Ácido desoxirribonucleico
<b><i>ADNc</i></b>	ADN copia
<b><i>ALK</i></b>	Quinasa similar al receptor de activina (por Activin receptor-like-kinase)
<b><i>ANOVA</i></b>	Análisis de la varianza
<b><i>ARN</i></b>	Ácido ribonucleico
<b><i>ARNasa</i></b>	Ribonucleasa
<b><i>ARNm</i></b>	ARN mensajero
<b><i>BSA</i></b>	Seroalbúmina bovina
<b><i>C</i></b>	Grado Celsius
<b><i>cpm</i></b>	Cuentas por millón
<b><i>CT</i></b>	Ciclo umbral
<b><i>DA</i></b>	Dopamina
<b><i>DAB</i></b>	3,3'-diaminobenzidina
<b><i>DES</i></b>	Dietilestilbestrol
<b><i>dNTP</i></b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b><i>Drd2<sup>-/-</sup></i></b>	Ratones deficientes en el receptor dopaminérgico D2
<b><i>DTT</i></b>	Ditiotreitol
<b><i>E2</i></b>	Estradiol
<b><i>EA</i></b>	Albúmina de huevo
<b><i>EDTA</i></b>	Ácido etilendiaminotetra-acético
<b><i>ELISA</i></b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b><i>ESM</i></b>	Error estándar de la media
<b><i>FSH</i></b>	Hormona estimulante de folículos
<b><i>FSHβ</i></b>	subunidad β de FSH
<b><i>FST</i></b>	Folistatina
<b><i>g</i></b>	Gramos
<b><i>GAPDH</i></b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b><i>GH</i></b>	Hormona de crecimiento
<b><i>GnRH</i></b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b><i>GnRHR</i></b>	Receptor de GnRH
<b><i>hCG</i></b>	Gonadotropina coriónica humana
<b><i>hCGβ<sup>+</sup></i></b>	Ratones con sobreexpresión de la subunidad β de hCG
<b><i>HPLC</i></b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b><i>HRP</i></b>	Peroxidasa de rabanito
<b><i>hs</i></b>	Horas
<b><i>IgG</i></b>	Inmunoglobulina gamma
<b><i>IHQ</i></b>	Inmunohistoquímica
<b><i>ip</i></b>	Intraperitoneal
<b><i>kDa</i></b>	Kilo Dalton
<b><i>kg</i></b>	Kilogramo

---

<b>ko</b>	<i>knock out</i>
<b>I</b>	Litro
<b>LAP</b>	Proteína asociada de latencia
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>LH<math>\beta</math></b>	Subunidad $\beta$ de LH
<b>LLC</b>	Complejo Latente mayor (por Large latent complex)
<b>LTBP</b>	Proteína de unión a TGF $\beta$ latente
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NIH</b>	Instituto nacional de la salud de los Estados Unidos
<b>ns</b>	No significativo
<b>OVX</b>	Ovariectomía
<b>P4</b>	Progesterona
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PBS-T</b>	PBS con Tween 0,05%
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pg</b>	Picogramo
<b>PHDA</b>	Neuronas periventriculares hipofisarias dopaminérgicas
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>pSMAD</b>	SMAD fosforilada
<b>RD2</b>	Receptor de dopamina tipo 2
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Retro transcripción
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>SDS</b>	Do decil sulfato de sodio
<b>SLC</b>	Complejo Latente menor (por Small latent complex)
<b>SMAD</b>	Small Mothers Against Decapentaplegic
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>THDA</b>	Neuronas tuberohipofisarias dopaminérgicas
<b>TIDA</b>	Neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas
<b>TSH</b>	Hormona liberadora de tirotropina
<b>TSP1</b>	Trombospondina 1
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>vs.</b>	Versus
<b>wb</b>	Western blot
<b>wt</b>	<i>Wild type</i> (salvaje)

# INDICE GENERAL

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Eje hipotálamo - hipofisario</b> .....	<b>1</b>
<b>Prolactina (PRL)</b> .....	<b>3</b>
<b>Regulación de la secreción de PRL</b> .....	<b>3</b>
<b>Adenomas hipofisarios</b> .....	<b>7</b>
<b>Prolactinomas</b> .....	<b>7</b>
<b>Hiperprolactinemia. Tratamientos</b> .....	<b>8</b>
<b>Prolactinomas resistentes a agonistas Dopaminérgicos (DARPs)</b> .....	<b>9</b>
<b>Factores de crecimiento y adenomas hipofisarios</b> .....	<b>10</b>
<b>Miembros de la familia TGF<math>\beta</math>: su rol en hipófisis</b> .....	<b>11</b>
<b>Modelos experimentales de prolactinomas: herramientas de estudio</b> .....	<b>12</b>
<b>Ratones hCG<math>\beta</math>: Modelo de sobreexpresión de la subunidad beta de la hormona hCG</b> .....	<b>13</b>
<b>Ratones deficientes para el receptor dopaminérgico D2 (Drd2<math>^{-/-}</math>)</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>15</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
Capítulo I .....	15
Capítulo II .....	15
Capítulo III .....	15
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>16</b>
<b>Modelos animales</b> .....	<b>16</b>
Modelo de ratones con sobreexpresión de hCG (hCG $\beta$ ) .....	16
Ratones con delección del receptor dopaminérgico D2 (Drd2 $^{-/-}$ ) .....	16
Ovariectomía (OVX) en ratones hCG $\beta$ y Drd2 $^{-/-}$ .....	17
Ratas hembra Sprague Dawley .....	17
Ratas hembra con administración crónica de estrógenos (DES) .....	18
Ratas ovariectomizadas (OVX) .....	19
<b>Experimentos in vivo</b> .....	<b>19</b>
Tratamiento in vivo con ABT-898 en ratones hCG $\beta$ .....	19
<b>Técnicas utilizadas</b> .....	<b>20</b>
Expresión de genes de interés en hipófisis por PCR semicuantitativa (sqPCR) y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	20

PCR semicuantitativa (sqPCR) .....	21
PCR cuantitativa en tiempo real (qRTPCR).....	22
Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qRTPCR) .....	24
Medición hormonal por Radioinmunoanálisis (RIA) .....	26
RIA para hormonas proteicas (PRL, FSH, LH) .....	26
Hormona PRL .....	27
Hormona luteinizante (LH).....	28
Hormona foliculoestimulante (FSH).....	29
RIA para hormonas esteroideas (P4) .....	29
ELISA para la detección de TGF $\beta$ 1 activo y total .....	30
Western blot (wb).....	32
Determinación de la concentración de dopamina en los hipotálamos de ratones hembra hCG $\beta$ por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	34
Inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de ActRIB .....	35
Inmunofluorescencia (IF) indirecta doble para la detección de ActRIB y PRL .....	36
Análisis estadístico .....	37
<b>Capítulo I: Diferencias sexuales en el desarrollo de un prolactinoma en ratones que sobreexpresan hCG<math>\beta</math>: rol de TGF<math>\beta</math>1 .....</b>	<b>38</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>38</b>
Gonadotropina coriónica humana.....	38
Ratones hCG $\beta$ .....	38
TGF $\beta$ 1 en hipófisis.....	39
Biología de TGF $\beta$ 1 .....	40
TGF $\beta$ 1: Receptores y efectores intracelulares .....	42
TGF $\beta$ 1 en el desarrollo de un prolactinoma .....	44
<b>Objetivo I .....</b>	<b>45</b>
Objetivos específicos .....	45
<b>Resultados I.....</b>	<b>46</b>
Dimorfismo sexual en el desarrollo de un prolactinoma en ratones hCG $\beta$ .....	46
Contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 activo y total .....	47
Actividad biológica de TGF $\beta$ 1.....	48
Expresión de receptores y efectores intracelulares de TGF $\beta$ 1 .....	49
Expresión de otras proteínas reguladoras de la biología del sistema TGF $\beta$ 1: Furina y LTBP5 .....	52
Evaluación de posibles alteraciones en el tono dopaminérgico .....	53
Conclusiones parciales:.....	56

Efecto de un tratamiento farmacológico tendiente a restaurar los niveles hipofisarios disminuidos de TGFβ1 en prolactinomas .....	56
Otros miembros de la familia TGFβ .....	61
<b>Discusión I .....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusión I .....</b>	<b>69</b>
<b><i>Capítulo II: Sistema activinas-inhibinas hipofisario y su relación con el desarrollo de un prolactinoma. Diferencias sexuales .....</i></b>	<b>71</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>71</b>
Activinas e inhibinas: miembros de la familia TGFβ .....	71
Síntesis y secreción .....	71
Activinas: Receptores y efectores intracelulares .....	74
Antagonismo por proteínas de unión .....	76
Inhibinas: mecanismo de acción y antagonismo .....	77
Activinas e inhibinas en hipófisis .....	78
Menina, supresor tumoral en hipófisis .....	81
<b>Objetivo II .....</b>	<b>83</b>
Objetivos específicos .....	83
<b>Resultados II .....</b>	<b>84</b>
Expresión de las subunidades α, βA y βB en ratones hCGβ y Drd2 <sup>-/-</sup> .....	84
Expresión hipofisaria de antagonistas funcionales de activinas: FST y betaglicano .....	91
Expresión hipofisaria de receptores de activinas de tipo 1 y tipo 2 .....	94
Expresión hipofisaria de reguladores del crecimiento del lactotrofo y la secreción de PRL: pit-1 y menina .....	100
<b>Discusión II .....</b>	<b>105</b>
<b>Conclusión II .....</b>	<b>113</b>
<b><i>Capítulo III: Efectos de una ovariectomía en el sistema activinas-inhibinas hipofisario y su relación con el desarrollo de un prolactinoma. ....</i></b>	<b>116</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>116</b>
Ovariectomía: efectos en la síntesis y secreción de PRL .....	116
Alteraciones en el eje gonadotrófico: rol de activinas e inhibinas .....	117
Activinas e inhibinas en OVX .....	119
<b>Objetivo III .....</b>	<b>120</b>
Objetivos específicos .....	120

---

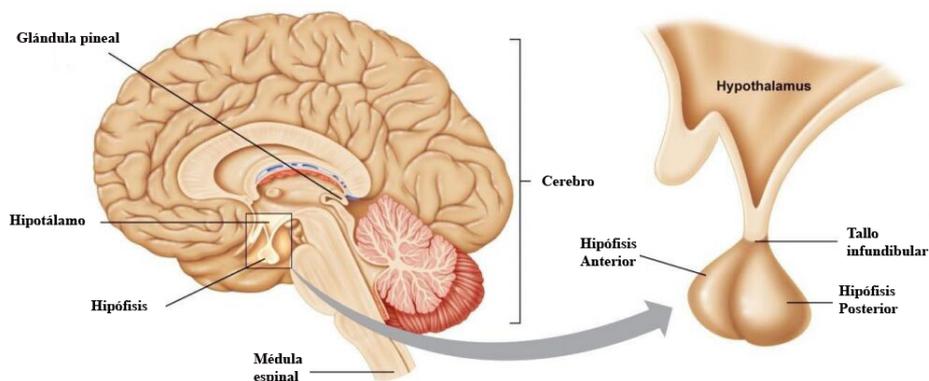
<b>Resultados III: Parte I</b> .....	<b>121</b>
<b>Sistema activinas-inhibinas en ratas DES y OVX</b> .....	<b>121</b>
Desarrollo de un prolactinoma .....	121
Expresión de las subunidades $\alpha$ , $\beta A$ y $\beta B$ .....	122
Expresión de FST: antagonista funcional de activinas .....	123
Expresión hipofisaria de receptores de activinas de tipo I y tipo II .....	123
Expresión hipofisaria de reguladores del crecimiento del lactotrofo y la secreción de PRL: pit-1 y menina .....	125
<b>Resultados III: Parte II</b> .....	<b>127</b>
<b>Sistema activinas-inhibinas en ratones hCG<math>\beta</math> y Drd2<sup>-/-</sup>: Efectos de una OVX</b> .....	<b>127</b>
Peso hipofisario y niveles séricos de PRL .....	127
Expresión de las subunidades $\alpha$ , $\beta A$ y $\beta B$ .....	131
Expresión hipofisaria de antagonistas funcionales de activinas: FST y betaglicano .....	133
Expresión hipofisaria de receptores de activinas de tipo 1 y tipo 2 .....	136
Expresión hipofisaria de reguladores de la función del lactotrofo: pit-1 y menina .....	139
<b>Discusión III</b> .....	<b>142</b>
<b>Conclusión III</b> .....	<b>146</b>
<b>Conclusión general</b> .....	<b>148</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>150</b>

## INTRODUCCIÓN

### EJE HIPOTÁLAMO - HIPOFISARIO

El eje hipotálamo-hipofisario es un sistema que contribuye a mantener el equilibrio del organismo a través de la integración de señales provenientes del medio externo e interno. Este sistema ejerce su regulación mediante la producción y liberación de hormonas o neurohormonas que, luego de alcanzar sus órganos blanco, controlan procesos que van desde el crecimiento, la reproducción y la lactancia hasta el balance hídrico y el metabolismo energético (Lechan & Toni, 2000).

La glándula hipófisis se encuentra en la base del cerebro, en una cavidad del hueso esfenoides, denominada silla turca. En esta glándula pueden diferenciarse anatómicamente 2 lóbulos de diferente origen embriológico: el lóbulo anterior o adenohipófisis, y el lóbulo posterior o neurohipófisis. La neurohipófisis incluye la pars nervosa, el tallo infundibular y la eminencia media. La pars nervosa está formada por terminales axónicas de neuronas hipotalámicas, cuyos somas se sitúan en los núcleos supraóptico y paraventricular. Estas neuronas sintetizan principalmente oxitocina y vasopresina, dos neurohormonas que son transportadas por los axones que atraviesan la eminencia media y el tallo infundibular, hasta la hipófisis posterior donde son almacenadas en las terminales y finalmente secretadas frente a estímulos específicos (Figura 1).

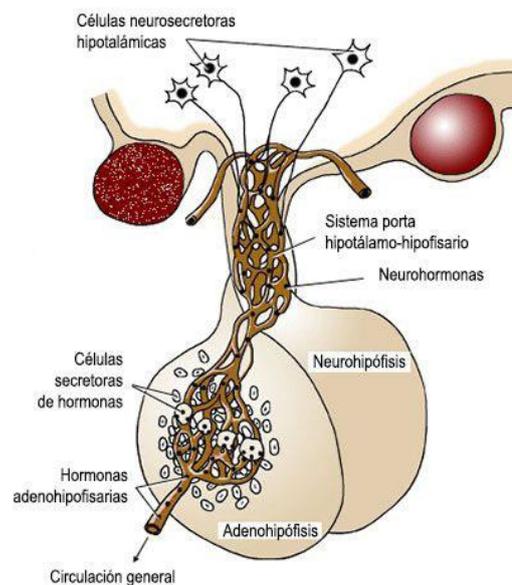


**Figura 1. Esquema de localización de la glándula hipófisis.** Imagen tomada y modificada de Ross y Pawlina, Histología, Texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, 6ta Edición.

La adenohipófisis puede dividirse anatómicamente en tres zonas: la pars distalis que comprende la mayor parte del lóbulo anterior de la glándula, la pars tuberalis que rodea el tallo infundibular y la pars intermedia que, si bien en otras especies aparece más diferenciada, en humanos no forma una estructura anatómica *per sé*, sino que permanece como células dispersas dentro de la pars distalis.

En la adenohipófisis pueden distinguirse cinco tipos celulares principales que se especializan en la producción y secreción de hormonas que actúan como mensajeros en distintas partes del organismo; los lactotrofos secretan prolactina (PRL), los somatotrofos liberan hormona de crecimiento (GH), los corticotrofos producen hormona adenocorticotropa (ACTH), los tirotrofos secretan hormona tirotrópica (TSH) y los gonadotrofos son los responsables de la producción y secreción de las hormonas gonadotróficas: hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Otro tipo celular presente en la glándula corresponde a las células foliculo estrelladas, no secretoras de hormonas, pero que sintetizan numerosos factores con funciones autocrinas, y paracrinas (Lechan & Toni, 2000).

La glándula hipófisis posee regulación hipotalámica a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario (Figura 2).



**Figura 2. Esquema del sistema portal hipotálamo-hipofisario.** Imagen tomada y modificada de Ross y Pawlina, Histología, Texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, 6ta Edición.

Este sistema portal permite una comunicación fluida y directa entre el hipotálamo y la hipófisis, ya que muchos de los factores producidos en núcleos pertenecientes al hipotálamo son liberados a este sistema de circulación portal, brindando una regulación positiva o negativa sobre la secreción de las hormonas adenohipofisarias. Por otro lado, un sistema portal de vasos cortos media la comunicación entre la neurohipófisis y la adenohipófisis (Grattan, 2015).

A lo largo de este trabajo nos centraremos en la funcionalidad y regulación de las células de la hipófisis anterior especializadas en la producción y secreción de prolactina: los lactotrofos.

## **PROLACTINA (PRL)**

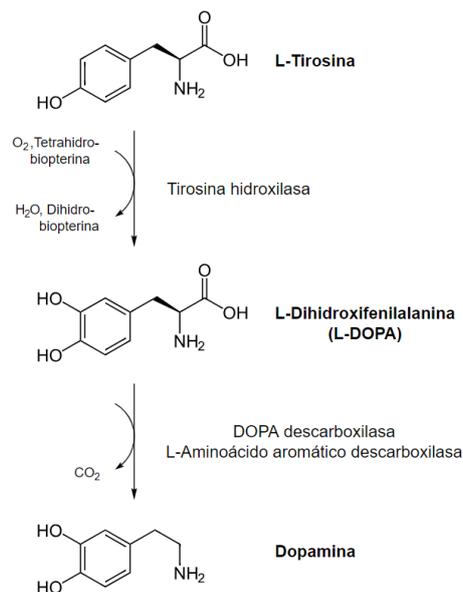
La prolactina es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada principalmente por los lactotrofos. Fue descrita por primera vez en el año 1930 por Riddle y colaboradores, y su nombre se debe a su habilidad para promover la proliferación de la glándula mamaria y la lactancia en respuesta al estímulo de succión (Riddle, Bates, & Dykshorn, 1933). Además de la glándula hipofisaria, la PRL es sintetizada en diferentes sitios como el miometrio uterino, la decidua placentaria y diversas células del sistema inmunológico, entre otros (Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000). Esta hormona actúa de manera pleiotrópica, a través de su interacción con receptores específicos de membrana que se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo, contribuyendo a la homeostasis y ejerciendo diversos efectos biológicos, como el control de la función reproductiva, el metabolismo y crecimiento, la inmunorregulación, la osmorregulación y el comportamiento (Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart, & Kelly, 1998).

## **REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PRL**

Los lactotrofos poseen una elevada actividad secretoria intrínseca de PRL. Por este motivo la dopamina hipotalámica, su principal factor regulador, es de carácter inhibitorio. Al no haber un órgano blanco endocrino discreto, la regulación de su secreción carece de un sistema de retroalimentación negativo clásico y, en su lugar, es regulado por un mecanismo de retroalimentación

corto, en donde es la misma PRL la que estimula la secreción hipotalámica de dopamina.

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico que se produce en todo el Sistema Nervioso Central (SNC). La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante de su producción y es la encargada de convertir la L-tirosina en el L-DOPA, la cual es convertida finalmente en dopamina por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (Moore, 1987) (Figura 3).



**Figura 3. Esquema de la síntesis de DA.** Imagen tomada de Bahena et al. (Bahena-Trujillo R, Flores G, 2000).

Existen tres poblaciones principales de neuronas dopaminérgicas que participan en la regulación de la secreción de PRL. Estas neuronas se ubican en los núcleos paraventricular y arcuato del hipotálamo. Estas tres poblaciones neuronales, si bien difieren en la anatomía de sus proyecciones, actúan en la adenohipófisis como una unidad funcional inhibitoria de la secreción de PRL.

Las neuronas tuberoinfundibulares (TIDA) son la principal fuente de dopamina que recibe la hipófisis, y se proyectan desde el núcleo arcuato dorso medial hacia la zona externa de la eminencia media, produciendo una descarga clásica de neurotransmisor hacia el espacio perivascular que rodea los capilares del sistema porta-hipofisario (Peters, Hofer, & Ben-Jonathan, 1981).

Por su parte, las neuronas tubero-hipofisarias (THDA) y periventricular-hipofisarias (PHDA) se proyectan desde la cara rostral del núcleo arcuato y desde el núcleo periventricular respectivamente, hacia el lóbulo intermedio y la neurohipófisis, alcanzando la adenohipófisis a través de los vasos portales cortos (Holzbauer & Racke, 1985);(Goudreau, Lindley, Lookingland, & Moore, 1992).

Los efectos fisiológicos de la dopamina están mediados por cinco subtipos diferentes de receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (GPCRs). Los receptores del subtipo D1 (RD1 y RD5) se acoplan a la proteína Gs promoviendo la activación de la adenilato ciclasa; mientras que los del subtipo D2 (RD2, RD3 y RD4) se encuentran acoplados generalmente a una proteína Gi, inhibiendo la adenilato ciclasa y la vía de la proteína quinasa A (PKA), al mismo tiempo que activan los canales de potasio (K<sup>+</sup>), dando como resultado una disminución de Ca<sup>2+</sup> y AMP cíclico (AMPC) intracelular (Missale, Nash, Robinson, Jaber, & Caron, 1998).

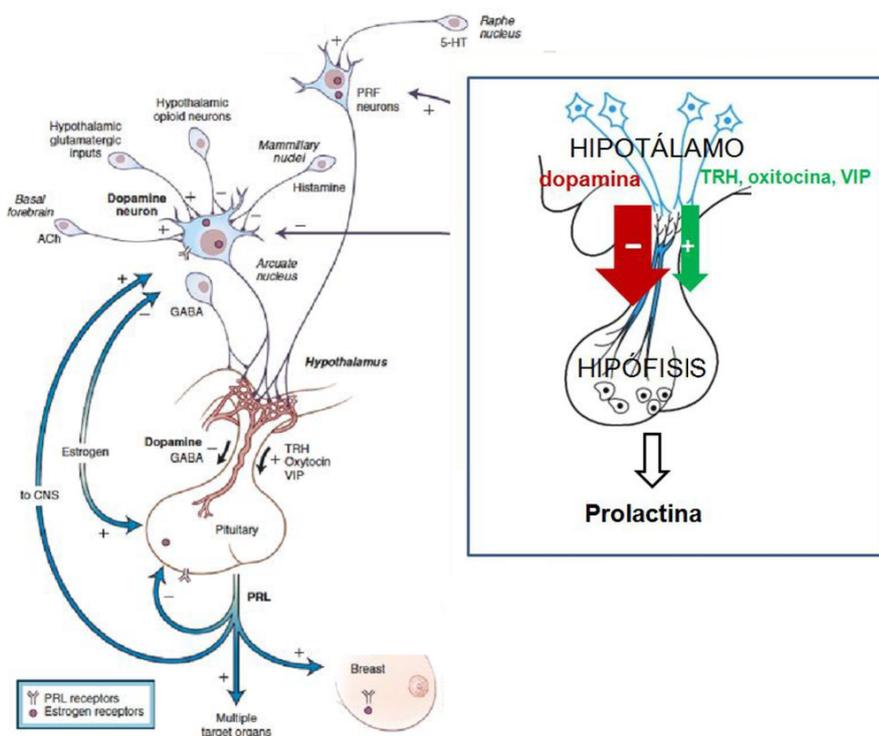
En hipófisis el principal receptor de dopamina es el tipo 2 (RD2), con alta expresión en células lactotropas (Gonzalez-Iglesias, Murano, Li, Tomic, & Stojilkovic, 2008). La dopamina liberada por el hipotálamo impacta sobre los receptores RD2 y regula negativamente la síntesis y secreción de PRL, al mismo tiempo que inhibe la proliferación de los lactotropos. Es por esto, que ratones deficientes en el receptor RD2 (Drd2<sup>-/-</sup>) desarrollan hiperplasia de lactotropos e hiperprolactinemia (Kelly et al., 1997).

Si bien la regulación de la síntesis y liberación de PRL es principalmente hipotalámica e inhibitoria, existen factores que promueven su secreción. Entre ellos, se encuentran los estrógenos que actúan como un potente estimulador de las funciones del lactotrofo.

El estradiol (E2) actúa tanto a nivel hipotalámico como a nivel hipofisario, regulando la síntesis y secreción de dopamina y prolactina, respectivamente. En el hipotálamo, el E2 inhibe a la función de las neuronas TIDA y regula negativamente la expresión y actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) (Morrell et al., 1989);(Pasqualini, Guibert, & Leviel, 1993), logrando así una disminución de la liberación de dopamina al sistema hipotálamo-hipofisario (CRAMER, PARKER RICHARD.C, & PORTER, 1979), provocando un aumento en la

secreción de PRL. A nivel hipofisario, el E2 aumenta la proliferación de los lactotrofos, favorece la conversión de somato-mamotrofos a lactotrofos puros, y promueve un aumento en la síntesis de PRL por estimulación génica (Scully et al., 1997). Las acciones estrogénicas son claramente contrarias a las de la dopamina, y del balance entre ambos factores depende, en gran parte, la regulación de la función de los lactotrofos.

Sin embargo, existen a su vez, acciones mediadas por otros factores intra-hipofisarios e hipotalámicos que regulan la función de los lactotrofos de manera paracrina y autocrina (Denef, 2008). Algunos de los mecanismos reportados corresponden a la PRL misma, la oxitocina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y diversos miembros de la familia de factores de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) tales como TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3, activinas, inhibinas y FGF-2 (Schwartz, 2000). Además, si bien el principal control hipotalámico de la secreción de prolactina es inhibitorio, éste se encuentra balanceado por diversos factores estimuladores, tales como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de la regulación de la secreción de PRL.** Imagen tomada y modificada de Ben-Jonathan et al. (N Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

Todos estos mecanismos de regulación mencionados convergen simultáneamente sobre los lactotopos y determinan la actividad secretora y proliferativa final de estas células adenohipofisarias. El correcto funcionamiento de estos mecanismos resulta de suma importancia para mantener la homeostasis de la glándula, dado que la proliferación descontrolada de los lactotopos resulta en la formación de prolactinomas, los adenomas hipofisarios más frecuentes.

## **ADENOMAS HIPOFISARIOS**

Los adenomas hipofisarios son las neoplasias más frecuentes de la región selar, representan un 15% del total de los tumores intracraneales y su prevalencia en la población es de 1/1000 (Mete, Cintosun, Pressman, & Asa, 2018). Estos adenomas son considerados tumores benignos de proliferación lenta y uniforme y, si bien en algunos casos se vuelven invasivos y altamente proliferativos, solo se definen como verdaderos carcinomas aquellos que presentan metástasis cráneo-espinal y/o sistémica, lo cual ocurre con una incidencia de menos del 0,5% de entre todos los tumores hipofisarios (Kovacs, Horvath, & Vidal, 2001). Clínicamente, dependiendo del grado de aumento de tamaño, estos adenomas pueden manifestarse con síntomas que van desde ligeros dolores de cabeza hasta severas complicaciones visuales, ambas producto del efecto de masa del tumor que puede causar daño en los tejidos adyacentes por compresión. En su mayoría, estos tumores traen aparejada una desregulación en la secreción de hormonas, provocando cambios en la homeostasis del cuerpo (Farrell, 2006).

Los adenomas hipofisarios pueden derivar de la proliferación descontrolada de cualquiera de los tipos celulares secretores de la adenohipófisis. De particular interés para esta tesis son los prolactinomas, adenomas hipofisarios hipersecretores de la hormona PRL.

## **PROLACTINOMAS**

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más frecuentes (alrededor del 40%) y se caracterizan por presentar una hiperplasia e hipertrofia de lactotopos y una secreción excesiva de PRL (Gillam, Molitch, Lombardi, &

Colao, 2006). Su incidencia es mayor en la población adulta joven (18 a 35 años) y tiende a disminuir con la edad (Mete et al., 2018). A su vez, su aparición difiere entre ambos sexos, afectando en mayor medida a mujeres en edad reproductiva, siendo esta diferencia equiparada entre ambos sexos recién a partir de la cuarta y quinta década de vida (Mindermann & Wilson, 1994);(Colao et al., 2003).

Debido a las diferencias sexuales en la sintomatología, en las mujeres estos adenomas suelen detectarse con mayor frecuencia como microprolactinomas, ya que los síntomas de alteraciones del ciclo menstrual y/o galactorrea permiten una detección temprana en comparación con aquellos síntomas de detección tardía que suelen presentar los hombres en su primer consulta, relacionados directamente con el tamaño tumoral, indicando la presencia de un macroprolactinoma (Fainstein Day et al., 2010). Estos últimos representan un 10% del total de los prolactinomas encontrados en la clínica (Wong, Eloy, Couldwell, & Liu, 2015b).

## **HIPERPROLACTINEMIA. TRATAMIENTOS**

Junto al desarrollo de un prolactinoma, deviene un aumento desmedido en la síntesis y secreción de PRL al torrente sanguíneo que puede provocar, entre otros síntomas, infertilidad, así como también ausencia, prolongación o acortamiento de la menstruación y una reducción en la actividad de ovarios y testículos que reduce la producción de hormonas sexuales masculinas y femeninas generando hipogonadismo (Bachelot & Binart, 2007);(Nira Ben-Jonathan, LaPensee, & LaPensee, 2008).

Los objetivos principales de los tratamientos ante la aparición de un prolactinoma son: normalizar los niveles de prolactina en sangre, restaurar la fertilidad, reducir el tamaño del tumor y mejorar los síntomas del hipogonadismo (Seilicovich et al., 2005);(Gillam et al., 2006);(Schlechte, 2007).

El diagnóstico de este tipo de tumor es ante todo clínico y se confirma por una resonancia magnética hipofisaria. Durante mucho tiempo, la cirugía transesfenoidal fue el tratamiento de primera línea, ya que presentaba un elevado índice de efectividad con una remisión de un 50-75% de los casos (Arafah, Kailani, Nekl, Gold, & Selman, 1994);(Castinetti & Brue, 2010).

Asimismo, la radioterapia fue ampliamente utilizada, pero conforme la medicina avanzó, comenzaron a utilizarse abordajes alternativos menos invasivos, dejando a la radioterapia como un tratamiento de tipo adyuvante (Arafah & Nasrallah, 2001). Actualmente, la prevalencia indica que hace ya más de 40 años, un tercio de los tumores hipofisarios secretores de PRL son abordados de manera farmacológica (Mete et al., 2018).

Como se mencionó previamente, la principal vía de regulación de la secreción de PRL es la acción tónica inhibitoria por DA. En general, los prolactinomas conservan la capacidad de respuesta a esta acción inhibitoria, razón por la cual estos tumores son tratados efectivamente con agonistas dopaminérgicos del RD2. En la actualidad estas drogas representan el pilar del tratamiento de los prolactinomas en la clínica (J. K. Liu & Couldwell, 2004);(Colao & Savastano, 2011).

A lo largo de los años se han utilizado distintos agonistas dopaminérgicos, uno de ellos es la bromocriptina, utilizada durante 30 años con excelentes resultados, pero con numerosos efectos secundarios. Actualmente, en la mayoría de los casos, este tratamiento ha sido reemplazado por la cabergolina, debido a que recupera de modo más eficiente los niveles normales de PRL y los ciclos ovulatorios con efectos secundarios menos frecuentes y menos severos que la bromocriptina (Webster et al., 1994);(Di Sarno et al., 2001);(dos Santos Nunes, El Dib, Boguszewski, & Nogueira, 2011). A la fecha, existen otros agonistas dopaminérgicos cuya eficacia ha sido demostrada clínicamente (pergolida, quinagolida y lisurida), sin embargo, no son del todo recomendados por los efectos secundarios que producen como en el caso de la pergolida o bien, no están aprobados aun por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA-) para su uso en el tratamiento de prolactinomas (quinagolida, lisurida) (Wong, Eloy, Couldwell, & Liu, 2015a);(Wong et al., 2015b).

### **PROLACTINOMAS RESISTENTES A AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS (DARPS)**

Aproximadamente entre un 15-20% de los tumores hipofisarios hipersecretores de PRL no responden a un tratamiento con agonistas de la DA

y son considerados resistentes. El tratamiento para este tipo de prolactinomas sigue siendo un desafío, y si bien en estos casos suele utilizarse un abordaje multimodal, en muchos casos estos no resultan efectivos y los niveles de PRL no logran ser del todo normalizados (Musolino & Passos, 2005). Los abordajes más utilizados incluyen una sustitución o aumento de la dosis de la droga en cuestión, una cirugía transesfenoidal y/o radioterapia, siendo el uso de esta última el más controvertido ya que conlleva respuestas lentas y riesgos elevados para el paciente que van desde la posibilidad de desarrollar hipopituitarismo y daño al nervio óptico, hasta efectos neurológicos secundarios no deseables y desarrollo de neoplasias secundarias (Wong et al., 2015b).

Los mecanismos que desarrollan esta resistencia no se encuentran del todo elucidados y las respuestas entre pacientes suelen ser variadas; mientras que algunos de ellos reducen el tamaño tumoral pero son incapaces de normalizar los niveles de PRL en circulación, otros manifiestan incapacidad en reducir el tamaño del tumor aún en presencia de concentraciones sanguíneas normales de hormona (Anagnostis et al., 2012). Asimismo, no existe un consenso sobre cuál es la dosis máxima de agonista a la cual considerar a los tumores como resistentes (Oh & Aghi, 2011).

Por esta razón, es de primera necesidad para los pacientes con DARPs la elucidación de los mecanismos subyacentes a la patogénesis en el desarrollo de estos prolactinomas, su dimorfismo sexual, así como también la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos (Gillam et al., 2006).

## **FACTORES DE CRECIMIENTO Y ADENOMAS HIPOFISARIOS**

Es sabido que la ausencia o sobreexpresión de diversos factores de crecimiento, o la de sus receptores, afectan la diferenciación y proliferación del lactotrofo impactando de manera directa en el microambiente tumoral, favoreciendo el desarrollo de un prolactinoma (Vasilev, Daly, Vroonen, Zacharieva, & Beckers, 2011). Se ha demostrado que tanto el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF2), como el gen transformante tumoral hipofisario (PTTG) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son algunos de los factores postulados que podrían estar relacionados al

proceso de tumorigénesis hipofisaria (Cristina et al., 2005);(Carolina Cristina et al., 2007).

Es así, como dentro de este marco, cobran importancia los miembros de la familia de TGF $\beta$ . Estos factores, son sintetizados de manera local en la hipófisis y su participación en la regulación del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis y biosíntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC) ha permitido relacionarlos con los mecanismos involucrados en el desarrollo de estos adenomas.

### **MIEMBROS DE LA FAMILIA TGF $\beta$ : SU ROL EN HIPÓFISIS**

Los miembros de la familia de TGF $\beta$  poseen una expresión ubicua en el organismo y cumplen funciones de vital importancia en la embriogénesis, el desarrollo y la homeostasis de tejidos adultos, siendo por ello indispensables para la vida. Pertenecen a esta familia los factores de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ s), las activinas e inhibinas, las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y la hormona antimülleriana (AMH), entre otros (Massague, 1990).

En mamíferos, pueden encontrarse tres isoformas del factor de crecimiento transformante  $\beta$ : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3. En hipófisis, estas citoquinas son sintetizadas por diversos tipos celulares y secretadas a la matriz extracelular como precursores inactivos. Para ser funcionales, estas citoquinas requieren de un delicado proceso denominado activación biológica.

TGF $\beta$ 1 participa en el desarrollo hipofisario, ejerciendo un control inhibitorio en la funcionalidad de los lactotrofos, su proliferación y secreción de PRL (S. Hentges, Pastorcic, De, Boyadjieva, & Sarkar, 2000);(D K Sarkar, Chaturvedi, Oomizu, Boyadjieva, & Chen, 2005). Recientemente, ha sido demostrado que la actividad hipofisaria de TGF $\beta$ 1 se encuentra disminuida en modelos experimentales de prolactinomas y que dopamina y estradiol no sólo regulan la síntesis de esta citoquina sino que también modulan el proceso de regulación de su activación (Recouvreux, Guida, Rifkin, Becu-Villalobos, & Diaz-Torga, 2011);(Recouvreux et al., 2013).

Por otro lado, las activinas, al igual que TGF $\beta$ 1, son también sintetizadas como precursores inactivos y dependen de su correcta activación para poder

ejercer su función biológica inhibitoria en la proliferación de diversos tipos celulares hipofisarios (Lacerte et al., 2004);(J.-J. Lebrun, 2009). Las funciones locales de esta citoquina en hipófisis son, a su vez, moduladas en forma autocrina y paracrina por inhibina y folistatina (FST) (Louise M Bilezikjian et al., 2004). Las activinas fueron conocidas inicialmente debido a su rol estimulador en la secreción de FSH en hipófisis. En la actualidad, se sabe que estas proteínas intervienen además en la formación y progresión de tumores en otros órganos, en particular a través de sus acciones sobre el microambiente tumoral (Antsiferova & Werner, 2012). Si bien en hipófisis, su relación con las células secretoras de PRL aún no se encuentra del todo dilucidada, ha sido demostrado que tanto las activinas como sus receptores de membrana, se encuentran alterados en diversos adenomas hipofisarios (J.-J. Lebrun, 2009);(Antsiferova& Werner, 2012).

Ambos factores miembros de la familia TGF $\beta$ , una vez activos, actúan de manera autocrina y paracrina en la glándula y su respuesta puede ser modulada por modificaciones en la MEC, células vecinas y otras citoquinas.

## **MODELOS EXPERIMENTALES DE PROLACTINOMAS: HERRAMIENTAS DE ESTUDIO**

El uso de modelos animales en investigación es de vital importancia a la hora de estudiar mecanismos relacionados con la iniciación tumoral, patogénesis y evaluar la potencial aplicación de un tratamiento como terapia.

Uno de los modelos experimentales más utilizados para el estudio de prolactinomas es aquel en el que el adenoma es inducido por un tratamiento crónico con estrógenos. El mismo ha sido ampliamente desarrollado en varias cepas de rata, tanto en machos como en hembras (Piroli, Lima, Diaz-Torga, & De Nicola, 1994);(Banerjee, Sarkar, Weston, De, & Campbell, 1997). La cepa de rata más utilizada para este modelo es la Fisher 344, debido a que presenta una mayor sensibilidad a los estrógenos respecto de otras cepas. El tratamiento estrogénico crónico induce una hiperplasia, hipertrofia y desgranulación de los lactotropos, acompañada de hiperprolactinemia y pérdida en la proporción de otros tipos celulares hipofisarios. Estudios bioquímicos señalan que alrededor de la cuarta semana de tratamiento

estrogénico, esta hiperplasia deriva en un adenoma de lactotopos o prolactinoma (De Nicola, von Lawzewitsch, Kaplan, & Libertun, 1978);(Phelps & Hymer, 1983).

Con el avance de la biología molecular, ha sido posible el desarrollo de numerosos modelos experimentales de prolactinomas a partir de ratones genéticamente modificados. A la fecha, podemos mencionar diversos modelos murinos transgénicos que desarrollan adenomas hipofisarios hipersecretores de PRL, algunos ejemplos son los ratones que presentan sobreexpresión de galanina (Cai, Hayes, Patel, & Hyde, 1999), de TGF $\alpha$  (McAndrew, Paterson, Asa, McCarthy, & Kudlow, 1995) y del factor de crecimiento neural (NGF) (Borrelli, Sawchenko, & Evans, 1992), así como también ratones que sobreexpresan de manera constitutiva la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (ratones hCG $\beta$ +) (Rulli et al., 2002) y ratones transgénicos carentes de receptor funcional RD2 (ratones Drd2 $^{-/-}$ ) (Kelly et al., 1997).

Durante el desarrollo de esta tesis hemos utilizado principalmente dos modelos de ratones transgénicos: los ratones hCG $\beta$ + y los ratones Drd2 $^{-/-}$ . Ambos modelos son de particular interés, ya que presentan un fenotipo de hiperplasia hipofisaria sexualmente dimórfica, donde las hembras evidencian en edad adulta un marcado desarrollo de prolactinomas en comparación con los machos (Rulli et al., 2002);(Carolina Cristina et al., 2006).

### **RATONES HCG $\beta$ : MODELO DE SOBREEXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD BETA DE LA HORMONA HCG**

La generación de un modelo de ratón transgénico que secreta elevados niveles de gonadotropina coriónica humana (hCG) permitió identificar un fenotipo novedoso tanto en hembras como en machos (Rulli et al., 2002);(Rulli et al., 2003). En este modelo los elevados niveles bioactivos de LH/hCG producen una elevada estimulación ovárica con un consecuente aumento en la secreción de progesterona (hembras hCG $\beta$ + 200 nmol/l vs. hembras wt 'salvajes' 10 nmol/l). Las hembras hCG $\beta$ + presentan pubertad precoz e infertilidad, defectos uterinos y ováricos y exhiben un aumento transitorio de estradiol durante la peripubertad, mientras que, en la adultez, los niveles de estradiol alcanzan valores fisiológicos normales.

Es importante destacar que solo las hembras hCG $\beta$ + desarrollan prolactinomas de gran tamaño a edades avanzadas (Ahtiainen et al., 2010), característica que permite presentar a este modelo experimental como una buena herramienta para estudiar el dimorfismo sexual en el desarrollo de un prolactinoma.

## **RATONES DEFICIENTES PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 (DRD2<sup>-/-</sup>)**

Estos ratones carecen de receptores RD2 funcionales. Esto determina que las hembras Drd2<sup>-/-</sup> (ko) desarrollen hiperplasia hipofisaria de lactotrofos progresiva con un aumento del peso de la hipófisis de 2 a 3 veces respecto a las hembras Drd2<sup>+/+</sup> (wt) a los 8 meses de edad. A los 17-18 meses de edad, las hembras Drd2<sup>-/-</sup> desarrollan adenomas hipofisarios evidenciados por la presencia de nódulos multifocales, agrandamiento de la glándula con aumento del peso de unas 30 veces respecto a las hembras Drd2<sup>+/+</sup> y destrucción de las fibras de reticulina, característica típica de los adenomas. Por su parte, los machos Drd2<sup>-/-</sup> de la misma edad presentan nódulos multifocales pequeños que, si bien presentan ruptura de la red de reticulina indicando el desarrollo de múltiples microadenomas focales, éstos no se ven acompañados de una marcada hiperplasia hipofisaria (Asa, Kelly, Grandy, & Low, 1999).

Debido a la ausencia del receptor dopaminérgico RD2, este modelo resulta ideal para la búsqueda de terapias alternativas para prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos y, a su vez, surge como una buena herramienta para estudiar el dimorfismo sexual en el desarrollo de un prolactinoma.

**Dada la importancia del rol que cumplen los miembros de la familia TGF $\beta$  en las funciones relacionadas al desarrollo y patogénesis hipofisaria, es de particular interés para esta tesis profundizar los conocimientos en la participación de TGF $\beta$ 1 y activinas en el desarrollo de un prolactinoma, y las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo.**

---

## OBJETIVO GENERAL

En base a los antecedentes mencionados y, sabiendo que los factores que desencadenan el desarrollo del prolactinoma no están completamente dilucidados, nos propusimos estudiar el rol de diversos miembros de la familia TGF $\beta$  en la función normal y patológica del lactotrofo en tres modelos experimentales de prolactinoma con el objetivo de comprender la funcionalidad de estos componentes en la tumorigénesis hipofisaria y en las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

### CAPÍTULO I

Estudiar el rol del sistema TGF $\beta$ 1 hipofisario en el desarrollo de un prolactinoma en el modelo de ratones hCG $\beta$  y las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo.

---

### CAPÍTULO II

Estudiar la expresión hipofisaria de los componentes del sistema activinas e inhibinas y su relación con el desarrollo tumoral en dos modelos experimentales de prolactinoma: ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup>, así como también las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo.

---

### CAPÍTULO III

Estudiar la expresión hipofisaria de los componentes del sistema activinas e inhibinas y su relación con el desarrollo tumoral en ratas hembra estrogenizadas, ratas ovariectomizadas y ratas hembra adultas de dos modelos experimentales de prolactinoma: hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> divididos, a su vez, en dos: ovariectomizados y no ovariectomizados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MODELOS ANIMALES

Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales reguladas por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET), bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz (7:00 - 19:00) y 12 horas de oscuridad (19:00 - 7:00) a una temperatura de 22C con ventilación permanente y libre acceso de agua y alimento balanceado (Gepsa Feeds, Grupo Pilar). Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por el comité de Ética del IByME-CONICET.

---

#### MODELO DE RATONES CON SOBREEXPRESIÓN DE HCG (HCG $\beta$ )

Para los capítulos 1 y 2 de esta tesis se utilizaron hembras y machos de ambos genotipos a los 6 meses de edad. Los ratones hCG $\beta$  fueron generados mediante técnica de microinyección pronuclear del transgén en oocitos fertilizados de ratones de la cepa FVB/N, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Turku (Finlandia) y posteriormente transportados y mantenidos en reproducción en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires) desde el año 2002. Los ratones simple transgénicos hCG $\beta$  se obtuvieron a través de cruzamientos entre machos hCG $\beta$ + y hembras de la cepa salvaje FVB/N (wt). Los ratones fueron eutanizados mediante decapitación con guillotina. En cada experimento, se colectó suero, se extrajeron las adenohipófisis, hipotálamos y ovarios, se pesaron y se conservaron a -70C hasta el momento de uso.

---

#### RATONES CON DELECIÓN DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 (DRD2<sup>-/-</sup>)

Fueron utilizados en el capítulo 2 animales de 8 meses de edad de ambos sexos y genotipos. Los ratones con denominación oficial de cepa *B6;129S2Drd2<sup>tm1low/J</sup>*, a cargo del Induced Mutant Resource en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME), son ratones *knock-out* (ko) deficientes para el receptor de dopamina tipo 2 y fueron generados por mutagénesis dirigida para el gen RD2 en células D3 embrionarias. Su background genético es de carácter mixto y proviene de una cruce entre ratones de las cepas 129/SvEvTac

(Taconic Farms) y C57BL/6J (Jackson Laboratories) (Kelly et al., 1997). Los ratones fueron eutanizados mediante decapitación con guillotina. En cada experimento, se colectó suero, se extrajeron las adenohipófisis y ovarios, se pesaron y se conservaron a -70C hasta el momento de uso.

---

### **OVARIECTOMÍA (OVX) EN RATONES HCG $\beta$ Y DRD2<sup>-/-</sup>**

Se utilizaron en el capítulo 3 ratones hembra de ambos modelos experimentales de prolactinoma: hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup>. A los 2 meses de edad los ratones hCG $\beta$ + y ko fueron sometidos quirúrgicamente a una ovariectomía bilateral (OVX) bajo anestesia inyectable con una mezcla de Ketamina:Xilacina (dosis: 90mg/kg:10mg/kg), administrada de forma intraperitoneal (ip) y elegida por su profundidad anestésica y duración prolongada (S. T. Hentges & Low, 2002);(Ahtiainen et al., 2010).

Los controles para cada grupo fueron ratones Sham-OVX, a los cuales se les administro el mismo procedimiento anestésico preparativo. Llegada la edad de sacrificio, 6 meses para ratones hembra hCG $\beta$  y 8 meses para ratones hembra Drd2<sup>-/-</sup>, los ratones fueron eutanizados mediante decapitación con guillotina. En cada experimento, se colecto suero, se extrajeron las adenohipófisis, se pesaron y se conservaron a -70C hasta el momento de uso.

---

### **RATAS HEMBRA SPRAGUE DAWLEY**

Ratas hembra adultas (60 días) de la cepa Sprague Dawley (SD), criadas en el bioterio del IByME-CONICET, fueron utilizadas en el capítulo 3 de esta tesis. Las ratas fueron divididas en tres grupos experimentales: grupo diestro (control), grupo DES y grupo OVX (ver descripciones más adelante en esta sección).

El grupo diestro utilizado como control de los grupos DES y OVX, consistió en ratas de la misma cepa y edad, en diestro al momento del sacrificio (grupo Di), a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento. Se eligió esta etapa del ciclo estral (diestro) para disminuir la variabilidad en los controles, debido a que es el momento del ciclo estral de menor concentración hormonal (E2, PRL, P4). Las etapas del ciclo estral fueron determinadas mediante el análisis de las

proporciones de los distintos tipos celulares presentes en muestras de frotis vaginal observados al microscopio óptico durante 2 ó 3 ciclos consecutivos.

Para cada grupo experimental (grupos diestro, DES y OVX) se colectó suero, se extrajeron las adenohipófisis y se conservaron a -70C hasta el momento de uso.

---

### **RATAS HEMBRA CON ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ESTRÓGENOS (DES)**

Los prolactinomas inducidos por un tratamiento crónico con estrógenos han sido ampliamente utilizados en varias cepas de rata, tanto en machos como en hembras (Piroli et al., 1994). El tratamiento estrogénico crónico induce una hiperplasia, hipertrofia y desgranulación de los lactotopos, acompañada de hiperprolactinemia y pérdida en la proporción de otros tipos celulares hipofisarios. Estudios bioquímicos señalan que alrededor de la cuarta semana, esta hiperplasia deriva en un adenoma de lactotopos o prolactinoma. Este modelo experimental permite realizar un seguimiento de los efectos tumorogénicos de los estrógenos sobre las células del lactotopo, al mismo tiempo que permite evaluar su participación en el desarrollo de nueva vasculatura con suministro directo de sangre arterial a la hipófisis, ya que ha sido demostrado que los tumores hipofisarios secretores de PRL inducidos por estradiol son altamente angiogénicos (Heaney, Fernando, & Melmed, 2002). Si bien la cepa de rata más utilizada para este modelo es la Fisher 344 (De Nicola et al., 1978);(De Nicola et al., 1978), un tratamiento de cuatro semanas en la cepa Sprague Dawley evidencia aumento en los niveles séricos de PRL, así como también un incremento en el tamaño de la hipófisis que puede duplicar o triplicar a las hipófisis normales (Phelps & Hymer, 1983).

En nuestro laboratorio, este modelo experimental consiste en la administración en forma subcutánea de un pellet de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES, Sigma) en la zona dorsal de ratas hembras adultas de la cepa Sprague Dawley que induce en alrededor de 4-6 semanas un prolactinoma. Este procedimiento es realizado bajo anestesia: (dosis: 50 mg/kg ketamina + 10mg/kg xilazina, ip) (Recouvreux, Camilletti, Rifkin, Becu-Villalobos, & Diaz-Torga, 2012). Luego de cuatro semanas de exposición al pellet DES, las ratas fueron eutanizadas mediante decapitación con guillotina.

Se recolectó sangre troncal para corroborar por técnica de radio inmunoensayo el fenotipo hiperprolactinémico. El tratamiento por cuatro semanas con DES resultó en el desarrollo de una hiperplasia hipofisaria acompañada de un concomitante incremento en los niveles circulantes de PRL.

### **RATAS OVARIECTOMIZADAS (OVX)**

La castración de ratas hembra adultas (60 días) de la cepa Sprague Dawley fue realizada bajo anestesia quirúrgica inducida por Ketamina (k) y Xilacina (x) según dosis recomendada por personal veterinario (ver dosis grupo DES). Los ovarios fueron removidos por región dorsal procurando conservar la integridad muscular de la zona y posteriormente se suturó la incisión de forma tal de facilitar el proceso de cicatrización. Los animales recibieron analgésico en el agua de bebida durante los 5 días subsiguientes, post cirugía.

## **EXPERIMENTOS IN VIVO**

### **TRATAMIENTO IN VIVO CON ABT-898 EN RATONES HCG $\beta$**

El péptido sintético ABT-898, análogo de trombospondina 1 (TSP1), fue provisto por los Laboratorios Abbott en el marco del convenio de estudios pre-clínicos en el área de oncología bajo el nombre de “Extracellular matrix and pituitary tumorigenesis II” (MTA37310, 2010-2011, Investigational Product: A-428898). La droga fue disuelta en dextrosa al 5% y administrada intraperitonealmente (ip) a una dosis de 100mg/kg, según indicaciones de Laboratorios Abbott. El tratamiento fue llevado a cabo en hembras hCG $\beta$ + de 4 meses de edad. El grupo de hembras hCG $\beta$ + tratado con ABT-898, recibió una administración de tres inyecciones por semana durante tres semanas, mientras que el grupo transgénico control recibió con la misma frecuencia inyecciones vehículo con dextrosa al 5%. Pasadas las 24 horas luego de la última inyección, los animales fueron sacrificados y se recolectó adenohipófisis, hipotálamo y sangre troncal para posteriores mediciones. En simultáneo, se sacrificaron animales wt de la misma edad sin ningún tipo de tratamiento (ver esquema de tratamiento detallado en capítulo 1, Figura 1.13).

## TÉCNICAS UTILIZADAS

### EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS EN HIPÓFISIS POR PCR SEMICUANTITATIVA (sqPCR) Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

#### OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> de 6 y 8 meses de edad, respectivamente, de ambos sexos y genotipos (wt y transgénicos) fueron eutanizados mediante decapitación por guillotina y se les recolectó la glándula hipófisis (Hf), el hipotálamo (Ht) y los ovarios (Ov) para distintas determinaciones de expresión génica. Las ratas Sprague Dawley en diestro, grupo DES y grupo OVX fueron eutanizadas por guillotina y se recolectaron sus hipófisis. Los distintos tejidos se colocaron en tubos con 100  $\mu$ l de Trizol (Invitrogen) y se conservaron a -70C hasta el momento de la extracción de ARN.

#### EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para la extracción del ARN total del tejido, se homogeneizaron las muestras bajo campana y se agregaron 20  $\mu$ l de cloroformo. Se mezclaron las muestras por inversión y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron durante 15 minutos a 12000g a 4C y se transfirieron las fases acuosas a tubos de 0,6 ml. Para precipitar el ARN, se adicionó isopropanol (50  $\mu$ l por cada 100  $\mu$ l de Trizol utilizado) y se realizó una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 4C durante 10 minutos a 12000g y se descartó el sobrenadante. Para lavar el precipitado se agregaron 100  $\mu$ l de Etanol al 75% (diluido en agua libre de ARNasas) y se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 7500g y 4C. Finalmente se descartaron los sobrenadantes y se dejaron secar los precipitados a temperatura ambiente durante unos minutos. Por último, se agregó a cada tubo 5  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y se solubilizaron los precipitados colocando los tubos en placa térmica durante 10 minutos.

#### CUANTIFICACIÓN DE ARN

En todos los casos, se cuantificó la cantidad de ARN obtenido mediante la medición de la absorbancia a 260 nm de 1  $\mu$ l de muestra en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La

calidad y pureza del ARN extraído se determinó mediante la relación de las absorbancias 260/280 nm y se utilizaron aquellas muestras donde dicha relación fue mayor a 1,8.

---

#### OBTENCIÓN DE ADN COPIA (ADN<sub>c</sub>) POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

Se realizó la retrotranscripción de 1 µg de ARN total por muestra, en una reacción con volumen final de 20 µl en presencia de 100 ng de primers aleatorios (Biodynamics, Random primer hexamers, REF B070-200) a 70C por 5 minutos en un termociclador. Al cabo del tiempo transcurrido, luego de darles un spin, se colocaron los tubos en hielo y se agregó a cada muestra 1 µl de la enzima retrotranscriptasa MMLV-RT (Promega, REF M1701), buffer 5X de la enzima (4 µl/muestra), una mezcla de dNTPs (Solis Biodyne, 20 mM cada uno) y H<sub>2</sub>O estéril libre de ARNasas. La reacción se llevó a cabo según el siguiente programa: 37C por 60 minutos y 95C por 5 minutos. El ADN<sub>c</sub> obtenido se mantuvo a (-20C) hasta el momento de su utilización.

Para verificar que no existiera contaminación con ADN genómico, en todos los casos, se omitió la transcriptasa reversa en los controles y se completó el volumen con agua libre de ARNasas. La ausencia de fragmentos de ADN amplificados por PCR en estos controles indicó el aislamiento de ARN libre de ADN genómico.

---

#### PCR SEMICUANTITATIVA (sqPCR)

La sqPCR se realizó agregando a cada tubo 2 µl ADN<sub>c</sub>, producto de la reacción de retrotranscripción (RT), a una mezcla de reacción conteniendo: buffer de reacción (Green GoTaq reaction buffer Promega 2X, volumen óptimo para un ensayo de 50 µl), primer sentido 1 µM y primer antisentido 1 µM específicos para el gen blanco: folistatina (FST) o el gen de expresión constitutiva (GAPDH), dNTPs 0,2 mM y 1 UI de ADN polimerasa (GoTaq, Promega). Como control negativo se utilizó un tubo de reacción sin templado. Los primers utilizados fueron: primer sentido 5'CCAGAACATCATCCCTGCAT3' y primer antisentido 5'GTTCAGCTCTGGGATGACCTT3' para GAPDH (gen de expresión constitutiva) y un primer comercial denominado Mm\_Fst\_1\_SG (QIAGEN, Catálogo número QT00105483) para amplificar el gen de FST.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad con los siguientes tiempos y temperaturas de reacción: 4 minutos a 94C; 35 ciclos (GAPDH) ó 40 ciclos (FST) durante 30 segundos a 94C, 1 minuto a 60C y 1 minuto 30 segundos a 72C, seguidos por un ciclo final de 6 minutos a 72C. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TBE (EDTA 0,01 M, Ácido bórico 0,44 M, Tris base 0,45 M) conteniendo bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz UV. Los geles con las bandas obtenidas se fotografiaron y la intensidad de cada banda se cuantificó con el software ImageJ (NIH, National Institutes of Health, USA). Los resultados se presentaron como el valor de intensidad promedio relativo a GAPDH  $\pm$  error estándar de la media (ESM) para cada grupo.

---

## PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

---

### DISEÑO DE PRIMERS

Para la amplificación del ADNc de cada gen, los primers sentido y antisentido utilizados fueron diseñados mediante una herramienta informática denominada Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir de la secuencia nucleotídica de cada gen publicada por GenBank (NIH). Los oligos diseñados cumplían con los siguientes requisitos: temperatura de disociación cercana a los 60C, composición de nucleótidos GC del 50%, no generaban dímeros y al menos uno de los primers de cada gen era complementario a una secuencia de unión entre dos exones, con el fin de evitar la amplificación de ADN genómico. En todos los casos, los amplicones generados tenían un tamaño de entre 80 y 180 pares de bases (pb). Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo utilizando primers sentido y anti-sentido específicos para el gen de interés, los oligos se encuentran detallados en Tabla 1 para ratón y Tabla 2 para rata.

**Tabla 1. Secuencias de primers de ratón utilizados para evaluar expresión de genes de interés en tejidos mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR).**

Gen	Número acceso GenBank	Primer sentido 5'-3'	Primer antisentido 5'-3'
<b>Ratón</b>			
<i>ciclofilinaB</i>	NM_011149.2	GACCCTCCGTGGCCAACGAT	ACGACTCGTCCTACAGATTCATCTC
<i>TβR2</i>	NM_009371.3	CCAAGTCGGATGTGGAATGG	TGTCGCAAGTGGACAGTCTC
<i>Tmepai</i>	NM_022995.3	TGTCTCGGAAGGATGCCTCTGG	CAGCGAGTCGGTCAGTGGGC
<i>Klf14</i>	NM_001135093.1	CAGCTCGTCTGGCTCCAA	AGGCACTCGGCAGCGAA
<i>Alk5</i>	NM_001312869.1	TCCAAACCACAGAGTAGGCAC	TCATGGATTCCACCAATAGAACA
<i>Alk1</i>	NM_001277259.1	GCGTTGACCAGCAGACACCC	CAGTGCGGTGAGGCGAGCAG
<i>Smad4</i>	NM_008540.3	CACCCGCCAAGTAATCGCGCA	CTGGCCGGCTGACTTGTGGAAG
<i>Smad7</i>	NM_001042660.1	AACCCCGAGCTGGTGTGCTG	TGGACAGCCTGCAGTTGGTTTGA
<i>Furina</i>	NM_011046.3	TCCTAGAGATTGAAAATACCAGTGAAG	GGCTGTGCCATACAGAACGA
<i>Ltbp3</i>	NM_008520.3	ACGGCCTCAGTTGCATAGAC	AAAGAGCCTGGTGTGTTCGT
<i>Ltbp1</i>	NM_019919.4	GGAGCCCGAAGTGGTAACAG	AAACTGTGGGTGCAGATGAA
<i>Th</i>	NM_009377.2	CCAGAGAGGACAAGGTTCCC	ATACGCCTGGTCAGAGAAGC
<i>Drd2</i>	NM_010077.3	ATCGTCTCGTTCTACGTGCC	GTTGCCCTTGAGTGGTGTC
<i>Tgfβ3</i>	NM_009368.3	TGAGCTCTTCCAGATACTTCGAC	GGATGCTGATTTCCAGACCCA
<i>Bmp4</i>	NM_001316360.1	TTGCAGCTTTCTAGAGGTCCC	TCAGCATTCCGTTACCAGGAA
<i>Inhba</i>	NM_008380.2	GATCATCACCTTTGCCGAGT	TGGTCTGGTTCTGTTAGCC
<i>Inhbb</i>	M_008381.4	TCAGCTTTGCAGAGACAGATGG	ACACCTTGACCCGTACCTTC
<i>Inha</i>	NM_010564.5	GGGGATCCTGGAATAAGGCG	GTGGCACCTGTAGCTGGGAA
<i>ActRIB</i>	NM_007395.4	CAAATCAGAGGGTGGGGACC	TGGACTCCTCCAGAATTGCAT
<i>ActRIIB</i>	NM_007397.3	TTTGCTGCGTTTGGAAAGCTC	ACGACTGCTTGTCTGAAGTGG
<i>ActRIC</i>	NM_001111030.1	AGGTGTTCAAGTGGAGGAGT	ATCTTCCCATGACCCGAG
<i>Betaglicano</i>	NM_011578.4	AGCTGCCAAAGTGTGTGACTC	CGGACTGGACTCCTTCATGTT
<i>Menina</i>	NM_001168488.1	CACTGTGCAACCGAAATGTGC	ATCCTCCCGGCAGTAGTTGTAGTC
<i>Pit-1</i>	NM_008849.5	GTGATGTCCACAGCGACAGG	ACTCAGGGTGTGGTCTGGAA
<i>P15</i>	NM_007670.4	TCTGCAGCTGGATCTGGTCC	TCCTGAAAGGTAGAGGGCCC
<i>P18</i>	NM_001301368.1	GTGAACAAGGGACCCTAAAGA	GGCAATCTCCGATTTCCAAG
<i>P27</i>	NM_009875.4	CAGACGTAACAGCTCCGAATTA	TCAGTGCTTATACAGGATGTCCA

**Tabla 2. Secuencias de primers de rata utilizados para evaluar expresión de genes de interés en tejidos mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR).**

Gen	Número acceso GenBank	Primer sentido 5'-3'	Primer antisentido 5'-3'
<b>Rata</b>			
<i>Inhba</i>	NM_017128.2	GGAGATAGAGGACGACATTGG	CCAGACTTCTGCACGCTCCAC
<i>Inhbb</i>	NM_080771.1	CAGCTTTGCAGAGACAGATGG	AGGTTCTGGTTGCCTTCGTT
<i>Inha</i>	NM_012590.2	CTTTTCCCAGCCACAGGTGC	GTTGGGATGGCCGGAATACA
<i>ActRIB</i>	NM_199230.1	ATCAGAGGGTGGGAACCAAAC	TTCATGGACTCCTCCAGAATTG
<i>ActRIIA</i>	NM_031571.2	TACTCAGGACCCTGGACCAC	TCATTCTGCCAGGACTGTTTGT
<i>ActRIIB</i>	NM_031554.1	GCTCAGCTCATGAACGACTTTGTG	ACGACTGCTTGTCTGAAGTGG
<i>ActRIA</i>	NM_024486.1	GCTGTTTGGCACAGATCGAA	GCTCCTCATCTCCATACTCGG
<i>ActRIC</i>	NM_139090.1	ACCCAGAATCCTAAAGTG	CAACAAGTCTCCAAGTGAAC
<i>BMPRII</i>	NM_080407.1	TGTTGACAGGAGACAGGAAACAG	CTCCATATCGACCCCGTCCA
<i>FST</i>	NM_012561.2	TAAGTCGGATGAGCCCGTCT	TCCGAGATGGAGTTGCAAGA
<i>Menina</i>	NM_019208.3	GGAAGTTGGCAGACCTGGAG	GCTGAGGCAATCCCCTTGT
<i>Smad4</i>	NM_019275.3	TTTGCCTCACCACAAAACG	TTCAGGAGCAGGATGATTGGA
<i>Pit-1</i>	NM_013008.3	CGTGATGTCCACAGCGACAG	GGGGAGGAAACCCATGACTC
<i>P18</i>	NM_131902.3	GTGAACAAGGGACCCTAAAGA	GGCAATCTCCGGATTCCCAA
<i>P27</i>	NM_031762.3	CCTTCGACGCCAGACGTAAA	TTCAATGGAGTCAGCGATATGT

### ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos, selladas con film óptico adherente, en un termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Se cargaron 3 µl de una dilución 1/20 en agua libre de ARNasas de los ADNc de cada muestra, junto con 5 µl de kit comercial Fast Start Universal SYBR Green Master Rox (Roche, catálogo número 04913850001) y 0,6 µl de una mezcla 10 µM de primers sentido y antisentido específicos para el gen de interés, en un volumen final de 10 µl por pocillo. El programa de amplificación se encuentra detallado en la Tabla 3.

**Tabla 3. Programa de PCR en tiempo real.**

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Activación inicial de enzima FastStart Taq ADN Polimerasa (1X)	95C	10 minutos
Desnaturalización, apareamiento de primers y extensión (40X)	95C 60C	15 segundos 1 minuto
Curva de disociación (1X) (*Incremento de temperatura de 0,5C a partir del ciclo 2)	60C-95C	10 segundos

Para la cuantificación relativa se utilizó como control endógeno al gen de la CiclofilinaB, detectado en la misma placa que el gen de interés durante la reacción de amplificación. Los datos fueron analizados con el programa CFX Manager Software (Bio-Rad), mediante el cual el incremento en la fluorescencia detectada por el equipo fue considerado proporcional al aumento en el número de copias de ADN a lo largo de la reacción de PCR. El valor de ciclo umbral (CT), donde el incremento de fluorescencia es lineal, fue establecido para cada muestra y mediante el método de delta-delta CT se estableció la expresión relativa de cada gen comparando los valores de CT del gen de interés con los valores de CT del control endógeno y este valor fue a su vez comparado con un calibrador interno (delta-delta CT). El calibrador interno fue la hembra *wild type* (wt) cuando se comparó el efecto del tratamiento *in vivo* con ABT-898 en ratones hCG $\beta$ , el efecto de una OVX en ratones hCG $\beta$  y ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> y cuando se compararon muestras de ratones hembras y machos de ambos genotipos en ambos modelos experimentales (ratones hCG $\beta$  y *Drd2*<sup>-/-</sup>). En el caso de los experimentos con ratas, el calibrador interno fueron las hembras en diestro. El método delta-delta CT toma como supuesto que la eficiencia de la reacción de PCR es igual para el gen de interés y para el gen de referencia. La eficiencia de reacción para cada uno de los genes se determinó utilizando una curva de concentraciones decrecientes de ADN. Las eficiencias fueron similares para los genes de interés y para los de referencia en todos los casos.

---

## MEDICIÓN HORMONAL POR RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

---

### OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

**Sueros:** Al eutanizar a los ratones y ratas adultas, por decapitación, se recolectó la sangre troncal, se colocó en tubos de 1,5 ml y se dejó coagular a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas. Luego se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos y se transvasó el suero (fase superior) a un tubo de 0,6 ml. Los sueros así obtenidos, se guardaron a -20C hasta la medición de las hormonas (PRL, LH, FSH, P4) por RIA.

**Tejidos:** Para la medición del contenido adenohipofisario de PRL, las Hf fueron homogeneizadas en 100 µl de buffer fosfosalino compuesto por buffer fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M y azida sódica 0.01% pH 7,4, con inhibidores de proteasas [fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich) 1/100 y otra mezcla preformada de los inhibidores TPCK, TAME, ZPCK y TLCK (Sigma-Aldrich), 1/100], en hielo mediante un micro-homogeneizador manual. El contenido de proteínas en cada muestra fue determinado por el método de Lowry (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR, & RANDALL, 1951) y los resultados determinaron la alícuota de homogenato que luego fue medida por RIA.

---

### RIA PARA HORMONAS PROTEICAS (PRL, FSH, LH)

El contenido adenohipofisario de PRL y los niveles séricos de PRL, LH y FSH fueron determinados por RIA por doble anticuerpo (Libertun, 1980). Los niveles de PRL de rata y ratón se determinaron en 10 µl de suero por duplicado. Para las muestras provenientes de ratones hembra hCGβ+, la determinación hormonal se realizó en una dilución 1/10 del suero, debido a la alta concentración de PRL característica de este fenotipo. Para los homogenatos de hipófisis se utilizaron alícuotas de 2 µl. Las diluciones se llevaron a cabo con buffer EA: PBS (buffer fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0,01% azida sódica, pH 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA, por egg albumin). Las determinaciones de LH y FSH se evaluaron por duplicado en alícuotas de 75 µl de suero de ratón. A continuación, se detalla el protocolo para PRL de ratón, siendo éste esencialmente el mismo para PRL de rata, LH y FSH.

---

## HORMONA PRL

Las hormonas trazadoras utilizadas fueron AFP10777D para ratón y NIDDK-anti-rPRL-RP-3, ambos provistos por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK), Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos (NIH, USA). La marcación se efectuó en tubos de vidrio, bajo campana. Se usó  $^{125}\text{I}$  (NEN), libre de portador y apto para marcar proteínas. Las soluciones que se emplearon fueron: buffer fosfato 0,5 M pH 7,5; buffer fosfato 0,05 M pH 7,5; PBS; solución de transferencia: 100 mg de IK, 0,8 g de sacarosa y cantidad suficiente de  $\text{H}_2\text{O}$  para alcanzar un volumen final de 10 ml; solución de cloramina-T: 100 mg/100 ml de buffer fosfato 0,05 M preparada inmediatamente antes de su uso; solución de metabisulfito de sodio: 100 mg/10 ml de buffer fosfato 0,05 M. Se procedió a la separación la hormona marcada del  $^{125}\text{I}$  libre mediante una columna de tamiz molecular de Bio-gel P-10 gel (Bio-rad Laboratories, CA, EEUU), en buffer fosfato 0,05 M. Los sitios activos de dicha columna fueron saturados previamente mediante el pasaje de 1ml de PBS con EDTA 0,05 M y 2% de BSA.

---

## PROCEDIMIENTO DE MARCACIÓN

A la hormona disuelta en PBS se le añadieron 10  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato 0,5 M y luego 0,5 mCi de  $^{125}\text{I}$ . La oxidación se efectuó con 11,25  $\mu\text{l}$  de la solución de cloramina-T, bajo agitación suave durante 60 segundos. La reacción se detuvo con 6,25  $\mu\text{l}$  de metabisulfito de sodio. Luego se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución de transferencia (que verifica si hubo un exceso de agente oxidante), y el contenido del tubo de marcación fue pasado por la columna de separación. Para la corrida se utilizó buffer fosfato 0,05 M. Se recogieron aproximadamente 500  $\mu\text{l}$  de eluido por tubo, y se registró la radioactividad de 10  $\mu\text{l}$  de cada uno de los tubos en un contador gamma Packard para determinar dónde se encontraba el pico de hormona marcada. Con las columnas empleadas se obtuvo una buena separación de los picos de hormona marcada, que sale con el  $V_0$  y de  $^{125}\text{I}$ , no incorporado a la proteína, que es incluido en la columna. Los tubos de marcación conteniendo la hormona marcada se reunieron en uno y se congelaron en alícuotas para su posterior uso en RIA.

---

## PROTOCOLO DE RIA

El primer antisuero fue IgG policlonal de conejo anti-PRL de ratón AFP131078, dilución inicial 1:140000. El estándar de referencia fue PRL purificado de ratón (mPRL-AFP6476C). La curva de concentraciones del estándar de referencia (de 0,02 a 5 ng por tubo) y la dilución de las muestras (suero u homogenato de adenohipófisis) fueron realizadas en PBS con 1% de albúmina de huevo (buffer EA). La separación se logró por segundo anticuerpo, usando antisuero de oveja contra globulina de cabra diluido en PBS-polietilenglicol 6000 8%, en diluciones de trabajo establecidas previamente (dilución inicial 1:360). Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de PRL de mPRL-AFP6476C de ratón. La sensibilidad del ensayo fue de 0,67 ng/ml, y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 7,8% y 12,14%, respectivamente. El protocolo de rutina fue el siguiente: se agregaron 100 µl del primer anticuerpo (diluido en PBS-EDTA) y 100 µl de la hormona trazadora (entre 17000 y 20000 cpm por tubo) a la curva patrón y a las alícuotas experimentales preparadas en buffer EA (400 µl final); luego de una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se agregaron 500 µl del segundo anticuerpo en polietilenglicol 6000 8%. Se incubaron los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente y durante 1 hora a 4C. Se separó la hormona libre de la unida, por centrifugación refrigerada (4C, Beckmman Instruments) a 2000 rpm, durante 30 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se leyó la radiactividad asociada al precipitado, correspondiente al complejo hormona-anticuerpo en un contador gamma Packard (Palo Alto, CA, EEUU). Los RIA para FSH y LH fueron elaborados de manera muy similar, por lo que se describirá en los próximos, sólo aquellos puntos que difieran.

---

## HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

La hormona LH se cuantificó usando el kit de reactivos provistos por el NIDDK (EE. UU.). Se utilizó 2,5 µg de LH purificada, r-LH-I10 (NIDDK). La hormona liofilizada se disolvió en una solución de buffer fosfosalino compuesto por buffer fosfato 0,01 M, NaCl 0,15 M y azida sódica 0,01% pH final 7,4 (PBS) 0,01 M a una concentración final de 100 µg/ml. El primer antisuero contra LH de rata fue NIDDK-Anti-Rat-LH-S-11 obtenido al inmunizar conejos con LH de rata

altamente purificada semejante a la NIDDK-rLH-I-10. El anticuerpo se diluyó en PBS, EDTA 0,05 M con 0,25% de suero de conejo normal, pH 7,4, a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo. La dilución inicial fue de 1:274400. El estándar de referencia fue LH purificada de hipófisis de rata (NIDDK-Rat-LH-RP3), con un mínimo de contaminante de FSH y TSH. La curva de concentraciones del estándar de referencia (de 0,015 a 8 ng por tubo) y la dilución de las muestras (suero) fueron realizadas en PBS con 1% de albúmina de huevo (buffer EA). Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de LH de rata RP3, ya que está demostrada la reactividad cruzada con LH de ratón. La sensibilidad del ensayo fue de 0,21 ng/ml (suero) y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron de 7,2% y 11,4% respectivamente.

---

#### **HORMONA FOLICULOESTIMULANTE (FSH)**

La hormona FSH trazadora fue NIDDK-rat-FSH-I-9. El método de marcación fue semejante al descrito para PRL. El protocolo utilizado para la medición fue similar al empleado para PRL. El primer antisuero contra FSH de rata (NIDDK-Anti Rat FSH Serum-11) fue obtenido al inmunizar conejos con FSH de rata altamente purificada semejante a la NIDDK-rFSH-I-9. Se diluyó a la concentración previamente establecida como óptima de trabajo, siendo la dilución inicial de 1:42000. El estándar de referencia fue FSH purificado de rata (NIDDK-RatFSH-RP2), con una contaminación casi nula de LH y TSH. La curva patrón se extiende de 0,12 a 15 ng por tubo. Los resultados fueron expresados en términos de los estándares de FSH de rata RP2, dado que FSH de rata también cruza con ratón. La sensibilidad del ensayo fue 4,8 ng/ml (suero). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo para fueron de 8.0% y 13.2% respectivamente.

---

#### **RIA PARA HORMONAS ESTEROIDEAS (P4)**

---

##### **EXTRACCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS**

Se realizaron extracciones de esteroides con éter etílico a partir de 75 µl de suero. Para ello se cargaron los sueros en tubos cónicos de vidrio, y a cada tubo se le agregó 1 ml de éter. Luego de mezclar con vórtex las muestras,

durante 1 minuto se llevaron los tubos a -70C a fin de congelar la fracción acuosa insoluble en éter. Al cabo de 30 minutos, se traspasó la fase etérea a nuevos tubos de vidrio. Se repitió el procedimiento de extracción agregando 1 ml de éter a fase acuosa. Para evaporar el éter se colocaron los tubos en un baño térmico a 40C. La fracción de esteroides extraída se conservó a -20C hasta el momento de determinación de niveles hormonales por RIA.

---

#### PROCEDIMIENTO DE RIA PARA DETECCIÓN DE P4

Se determinaron los niveles de P4 en 100 µl de la fracción de esteroides extraída a partir del suero por duplicado en tubos de polipropileno, en un volumen final de 500 µl de buffer RIA progesterona ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  70mM, gelatina 0,1%, pH 7,5). Para la cuantificación se utilizó una curva de calibración en concentraciones crecientes de P4 en un rango entre 12,5 y 6400 pg. La unión no específica se determinó incubando el marcador radioactivo ( $^3\text{H}$ ) en ausencia de primer anticuerpo. A los tubos patrones y de muestra, se agregaron 100 µl de la hormona marcada (aproximadamente 1000 cpm/tubo, diluida en buffer RIA progesterona). La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos en centrífuga refrigerada y, de los sobrenadantes obtenidos que contenían el esteroide unido al anticuerpo, se tomaron 0,7 ml que se colocaron en viales junto con 1,5 ml de solución de centelleo para la determinación de la radioactividad unida. Se midió la radioactividad en un contador beta Perkin Elmer. Se utilizó antisuero progesterona en una dilución 1:800.

---

#### ELISA PARA LA DETECCIÓN DE TGFβ1 ACTIVO Y TOTAL

---

##### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las adenohipófisis enteras de ratón fueron recolectadas en 100 µl de buffer de extracción (BE, ver composición en Tabla 4) y una mezcla de inhibidores de proteasas (PSMF, TPCK, TAMA, ZPCK, TLCK). El buffer de extracción utilizado no contiene agentes reductores y lleva un detergente no iónico (Tritón X-100) para minimizar la activación de TGFβ1 durante el procesamiento de las muestras. Las muestras fueron homogeneizadas con un homogeneizador manual durante un minuto y el homogenato resultante se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4C para separar las proteínas. Se descartó el pellet y

se conservó el sobrenadante, conteniendo la fracción proteica, a -20°C hasta el momento de uso. Para la detección de TGFβ1 activo (libre de sus complejos latentes), se sembraron volúmenes de muestra correspondientes a 300-750 µg de proteína total y se las llevó a un volumen final de 100 µl con buffer RD, compuesto por suero bovino delipidizado 1,4% en PBS 1X de ELISA (ver Tabla 4) con 0,05% de Tween 20. Por otro lado, para la detección de citoquina TGFβ1 total (TGFβ1 activo + latente) se sembraron volúmenes de muestra correspondientes a 35-80 µg de proteína total, y se las llevó a un volumen final de 80 µl con buffer RD. Para liberar a la citoquina de sus complejos latentes, se realizó una extracción ácida de las muestras llevándolas a pH 3 con HCl 1N por 20 minutos. Luego se normalizó el pH a 7,6 con NaOH 1N y se agregó el buffer correspondiente para cada kit hasta completar los 100 µl que fueron sembrados en cada pocillo. La acidificación de la muestra produce la liberación de todo el contenido de TGFβ1 que se encontraba en estado latente almacenado en la matriz extracelular.

**Tabla 4. Composición de buffers utilizados para la preparación de las muestras en ELISA y WB.**

Buffer de extracción (BE)		PBS ELISA 1X		Buffer de carga 5X	
Componente	Concentración	Componente	Concentración	Componente	Concentración
Tris-base	50 mM	NaCl	173 mM	Tris-HCl	150 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	KCl	2,7 mM	SDS	10%
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM	Azul de bromofenol	0,02%
Tritón X-100	1%	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM		
<i>pH ajustado a 7,6</i>		<i>pH 7,2-7,4</i>		<i>pH 6,8</i>	

## DETECCIÓN DE TGFβ1

Las determinaciones fueron realizadas con el ensayo comercial TGFβ1 Duo Set ELISA development system (DY1679, R&D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mínima dosis detectable con este kit es de 7,3 pg/ml y no muestra reactividad cruzada con otros péptidos. El kit utiliza el sistema “sándwich” de detección utilizando dos anticuerpos anti-TGFβ1 que reconocen distintos epítopes de la molécula. Con el primer anticuerpo (monoclonal) se recubren los pocillos de la placa y se “capturan” las moléculas de TGFβ1 presentes en las muestras. Luego el segundo anticuerpo (policlonal) reconoce las moléculas de TGFβ1 que ya estaban unidas al primer anticuerpo.

Por último, se utiliza un sistema de detección basado en una reacción colorimétrica catalizada por la enzima HRP (enzima peroxidasa del rábano) utilizando como sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina -TMB- (Sigma-Aldrich, T4444). El producto de la reacción, proporcional a la cantidad de TGF $\beta$ 1 en la muestra, se detecta por absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA. Dado que la técnica se basa en una reacción colorimétrica que detecta cantidades desconocidas de TGF $\beta$ 1, se realizó de manera simultánea una curva estándar de referencia, confeccionada a partir de una solución madre de TGF $\beta$ 1 provista por el kit, para determinar por extrapolación la concentración de TGF $\beta$ 1 presente en las muestras. El contenido de TGF $\beta$ 1 activo y total fue expresado como pgTGF $\beta$ 1/mg proteína.

---

## WESTERN BLOT (WB)

---

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las adenohipófisis de ratón fueron recolectadas en 100  $\mu$ l de buffer de extracción (ver Tabla 4) y una mezcla de inhibidores de proteasas (PSMF, TPCK, TAMA, ZPCK, TLCK). En una alícuota del sobrenadante se determinó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford. Se tomó de cada muestra el volumen correspondiente a 40  $\mu$ g de proteína y se agregó buffer de carga 5X (ver Tabla 4) y DTT 0,5 M hasta un volumen final 25  $\mu$ l. Las muestras se calentaron a 95C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

---

### SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

Se sembraron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%, 25  $\mu$ l de cada muestra y 5  $\mu$ l de los marcadores de peso molecular (preteñidos y biotinilados). La separación de proteínas según su peso molecular (PM) se realizó mediante la técnica de electroforesis vertical en una cuba conteniendo buffer de corrida (ver Tabla 5), conectada a una fuente de poder. El voltaje se mantuvo constante a 90V hasta que las proteínas ingresaron al gel separados, momento en el cual el voltaje se subió a 120V manteniéndose constante durante aproximadamente 2 horas hasta visualizar la migración del frente de corrida al final del gel. A continuación, las muestras fueron transferidas de los geles a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante transferencia húmeda,

en buffer de transferencia (ver Tabla 5) durante 75 minutos en una cuba conectada a una fuente de poder con un amperaje constante de 350A, en frío y con agitación magnética.

**Tabla 5. Composición de buffers utilizados para separación de muestras en WB.**

Buffer de corrida		Buffer de transferencia	
Componente	Concentración	Componente	Concentración
Tris-base	0,3%	Tris-base	0,3%
Glicina	1,44%	Glicina	1,44%
SDS	0,1%	Metanol	20%
<i>pH 8,3</i>			

### INCUBACIÓN DE MEMBRANAS

Luego de la transferencia, se bloquearon los sitios inespecíficos de las membranas con leche en polvo 5% preparada en PBS-T (PBS con Tween 20 0,05%), durante una hora a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, se incubaron las membranas con los distintos anticuerpos primarios (ver Tabla 6) diluidos en BSA (albúmina sérica bovina) preparados en PBS-T, durante toda la noche a 4C. Al día siguiente, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP, también preparado en PBS-T BSA, durante una hora a temperatura ambiente. Luego de realizar 3 lavados con PBS-T 0,05% durante 10 minutos se procedió al revelado.

**Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para WB.**

Anticuerpos primarios				
Antígeno	IgG	Dilución	Núm. catálogo	Proveedor
TβRII	Conejo	1:300	220	Santa Cruz
pSMAD3	Conejo	1:200	11789	Santa Cruz
FST	Ratón	1:150	365003	Santa Cruz
Anticuerpos secundarios acoplados a HRP				
Antígeno	Dilución	Núm. catálogo	Proveedor	
Anti-IgG conejo	1:3000	7074	Cell signaling	
M-IgGk	1:200	516102	Santa Cruz	

### REVELADO DE MEMBRANAS

Las bandas inmunorreactivas se revelaron mediante la detección de la quimioluminiscencia liberada por la oxidación del sustrato luminol (250 mM), en

presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta reacción es catalizada por la enzima HRP que se encuentra acoplada al anticuerpo secundario. La quimioluminiscencia emitida por las membranas en contacto con el reactivo de revelado se detectó en el equipo Gbox Chemi HR16 (Syngene). La intensidad de las bandas (en píxeles) se cuantificó por medio del programa Image J. Los valores de intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas de interés se relativizaron al valor de intensidad de la banda de GAPDH (control de carga) en la misma muestra y dicha relación se expresó en unidades arbitrarias (u.a.). Entre incubaciones con distintos anticuerpos primarios se realizó sobre la membrana una incubación con buffer de stripping (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 100 mM, pH 6,7) durante 40 min a 50C, y luego se repitió el proceso de incubación de las membranas descripto anteriormente.

---

#### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DOPAMINA EN LOS HIPOTÁLAMOS DE RATONES HEMBRA HCGβ POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

Los hipotálamos de los tres grupos experimentales utilizados en el tratamiento *in vivo* con ABT-898 se recolectaron y mantuvieron a -70C hasta el momento de uso. La escisión de dicho tejido se realizó considerando un área limitada anteriormente por el quiasma óptico, lateralmente por las fisuras hipotalámicas, posteriormente por el borde caudal de los cuerpos mamilares y superiormente por el surco hipotalámico. Los hipotálamos fueron pesados, homogeneizados y desproteinizados en un buffer 0,2 N de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>). Se centrifugaron los homogenatos y se inyectó 50 µl del sobrenadante obtenido en una columna de fase reversa de 12,5 cm x 4 mm de Nova-Pak C18 (Waters). Se utilizó una fase móvil compuesta por NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O de concentración 0,076 M, EDTA de concentración 0,99 mM, 5,24 ml/l de PICB8 y 6% de metanol. El potencial del electrodo se fijó en 0,7V y se evaluó la concentración del neurotransmisor mediante un detector electroquímico BAS LC-4C acoplado a un equipo de HPLC modelo Varian 5000. Los valores se cuantificaron en base a curvas estándar producidas por el mismo sistema de datos y la concentración de dopamina se determinó en función del peso húmedo del tejido.

---

## INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) PARA LA DETECCIÓN DE ACTRIB

---

### PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Los tejidos fueron fijados en formalina 4% (formol 4% en PBS). Posteriormente fueron sometidos a deshidratación en alcoholes de gradación creciente (EtOH 70%, 96%, 100%) y xilol y fueron finalmente embebidos en parafina derretida a 60C. Los tacos de parafina fueron seccionados en un micrótopo en secciones de 4 µm de espesor y se montaron en portaobjetos de vidrio. Los vidrios se utilizaron posteriormente para detectar la expresión y localización de las proteínas de interés mediante inmunohistoquímica.

---

### PROTOCOLO

La desparafinación de los cortes se realizó con SafeClear II (Fischer Scientific) con 3 cambios de 15 min cada uno, luego se hidrataron con alcoholes de graduación decreciente (Fischer Scientific) (2 cambios de 5 min cada uno). Se realizó el bloqueo de peroxidasas endógenas con una solución al 0,3% de agua oxigenada en etanol 70% durante 25 min a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada (3 cambios de 5 min cada uno) y luego se realizaron lavados con PBS 1X (Thermofisher, catálogo núm AM9625) (3 cambios de 5 min cada uno). Posteriormente, se realizó la exposición de antígenos colocando los cortes en una solución de citrato de sodio 10 mM en calor de microondas durante 2 min a una potencia del 100% y 14 min a una potencia del 20%. Se dejaron reposar durante 15 min y se realizaron lavados con agua destilada (3 cambios de 5 min cada uno) y con PBS 1X (3 cambios de 5 min cada uno). Luego se realizó un bloqueo de inespecíficos con 2,5% de BSA en PBS a temperatura ambiente durante 30 min. Sin lavar, se incubaron los cortes toda la noche a 4C con el anticuerpo primario (ActRIB, Abcam) en una dilución 1:1000 de 2,5% de BSA en PBS. Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS 1X (3 cambios de 5 min cada uno) y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector Laboratories, dilución 1/100) durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados con PBS 1X (3 cambios de 5 min cada uno). Luego se incubaron los cortes con la Streptavidina unida a peroxidasa (ABC Kit Elite Universal, Vector, catálogo PK6100) a temperatura ambiente durante 30 min. Se realizaron lavados con

PBS 1X (3 cambios de 5 min cada uno) y finalmente se reveló con diaminobenzidina (SIGMAFAST™) durante 3 minutos y se frenó la reacción con agua doblemente destilada. Se realizó una contratinción con hematoxilina (Sigma, catálogo 51275) durante 1 min y se realizó un lavado profundo con agua corriente durante 15 min. Por último, se montaron los cortes con previa deshidratación en alcoholes de graduación creciente (10 minutos cada pasaje, con 2 cambios en ETOH 100° y dos de xilol). Finalmente se montaron con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack). Los cortes fueron analizados con un escáner digital ScanScope de Leica (Aperio).

---

### **INMUNOFLUORESCENCIA (IF) INDIRECTA DOBLE PARA LA DETECCIÓN DE ACTRIB Y PRL**

Para la realización de las IF nos pusimos en contacto con la Dra. Silvina Gutiérrez y el Dr. Pablo Pérez del Centro de Microscopía de la Universidad Nacional de Córdoba quienes tienen vasta experiencia en técnicas histológicas. Siguiendo la metodología propuesta por la Dra. Gutiérrez y el Dr. Pérez, descrita en Pérez et al. (Perez et al., 2015), realizamos cortes en criostato de de las hipófisis de los distintos grupos experimentales e incubamos con las soluciones de bloqueo en cámara húmeda 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, incubamos los cortes con los anticuerpos específicos anti-ActRIB (Abcam) y anti-PRL (AF65191) en una dilución de 1:150 y 1:1000, respectivamente, durante toda la noche a 4C en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron dos lavados en PBS-Tritón 0,2% durante 5 minutos en agitación y se incubaron los cortes con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Texas Red (anti-rb-TEXRED) y anti-guinea pig conjugado a fluoresceína (anti-gp-FITC) (Chemicon International, Temecula, CA., USA) durante 1 hora en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, retirando el excedente, se realizaron pasajes sucesivos de 5 min con PBS-Tritón 0,2% y se sembraron aproximadamente 20 µl por corte de una dilución 1:5000 de DAPI (stock: 5mg/mL; Molecular probes) en PBS 1X y se dejaron incubando durante 5 minutos en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizaron dos lavados en agitación con PBS 1X durante 5 minutos y con agua destilada durante 1-2 minutos. Se utilizó

Prolong (Molecular probes) para el montaje. Una vez secos los cortes, se visualizó la marca en los mismos con un microscopio de fluorescencia Nikon.

---

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el programa GraphPad Prism 6. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar (ESM). Las pruebas estadísticas utilizadas en cada caso se describen en la leyenda de la figura correspondiente. Se consideraron diferencias significativas cuando el  $p < 0,05$ . En todos los casos se verificó que se cumplieran los supuestos de los modelos estadísticos utilizados: normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) y homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de Levene ( $p > 0,05$ ). En ciertos casos, los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos para aplicar test paramétricos, aplicándose transformaciones logarítmicas o raíz cuadrada. A lo largo de la tesis, se aplicaron los siguientes pruebas paramétricas: a) prueba t de Student, para comparar las medias de dos grupos independientes; b) análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor, para comparar las medias de 3 o más grupos independientes; c) ANOVA de 2 factores, en aquellos casos donde se deseó evaluar el efecto de 2 factores y su interacción (sexo y genotipo, genotipo y ovariectomía). Para efectuar las comparaciones múltiples de a pares luego del ANOVA de 2 factores, se aplicó la prueba post-hoc de Bonferroni, el cual permite el análisis de modelos no balanceados. Para los ANOVA de 1 factor se utilizó el post-test de Dunnett y de Tuckey, según se compararan los valores experimentales obtenidos respecto de un grupo control o según se quisieran comparar todos los grupos experimentales entre sí, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Para todos los gráficos de este tesis fueron consideradas las siguientes significancias: a,  $p = 0,05$ ; b,  $p = 0,01$ ; c,  $p = 0,001$ ; d,  $p = 0,0001$ , acorde a lo establecido en GraphPad Prism 6. En el caso de repetirse una misma significancia para dos variables distintas en el mismo gráfico se procedió a distinguirlas de la siguiente manera: a (\*); b (\*\*); c (\*\*\*); d (\*\*\*\*).

# CAPÍTULO I: DIFERENCIAS SEXUALES EN EL DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA EN RATONES QUE SOBREENPRESAN HCG $\beta$ : ROL DE TGF $\beta$ 1

## INTRODUCCIÓN

### GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA

La gonadotropina coriónica humana (hCG), secretada normalmente por la placenta, es una hormona que pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas junto con FSH, LH y TSH (Sterner-Kock et al., 2002);(Cahoreau, Klett, & Combarous, 2015). Estas glicoproteínas comparten similitudes estructurales, todas ellas son heterodímeros de subunidades alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) que se unen por enlaces no covalentes. La subunidad  $\alpha$  es compartida por las cuatro hormonas, mientras que la subunidad  $\beta$  es hormono-específica y responsable de la actividad biológica. La formación del heterodímero es un evento esencial para la correcta funcionalidad de estas glicoproteínas.

Dentro de esta familia, hCG actúa sobre el mismo receptor que la hormona LH (RLH), promoviendo la síntesis de esteroides ováricos y la ovulación en hembras, así como la producción de andrógenos en machos (Gharib, Wierman, Shupnik, & Chin, 1990).

### RATONES HCG $\beta$

Como mencionamos anteriormente, los ratones que sobreexpresan la subunidad  $\beta$  de hCG presentan un marcado dimorfismo sexual. Mientras que los machos hCG $\beta$ + son fértiles y evidencian una correcta espermatogénesis a pesar de un tamaño testicular reducido, las hembras hCG $\beta$ + presentan pubertad precoz, infertilidad, estructura uterina anormal y una elevada esteroidogénesis ovárica (Rulli et al., 2003).

A su vez, en este modelo experimental, solo las hembras hCG $\beta$ + desarrollan prolactinomas, siendo el crecimiento de la glándula evidente a partir de los 2 meses de vida, llegando a presentarse como un adenoma de gran tamaño hacia los 8-10 meses, acompañado de una severa hiperprolactinemia (Rulli et al., 2002). Además, estas hembras hCG $\beta$ + adultas, presentan elevados niveles

de progesterona (P4) en circulación de hasta 50-100 veces más que en sus pares salvajes (wt) y un aumento de 3 a 6 veces más de testosterona.

La participación de la progesterona en el desarrollo de un prolactinoma es controvertida. En un principio, los elevados niveles de P4 sérica en hembras hCG $\beta$ + adultas fueron propuestos como principales responsables del desarrollo tumoral; sin embargo, se demostró que dicho desarrollo era, en realidad, dependiente de la presencia de estrógenos (Ahtiainen et al., 2010). Si bien es sabido que una exposición crónica a elevados niveles de estrógenos promueve el desarrollo de un prolactinoma experimental (Heaney, Horwitz, Wang, Singson, & Melmed, 1999);(Heaney et al., 2002), las hembras hCG $\beta$ + adultas poseen niveles séricos fisiológicos de esta hormona. Por otro lado, la exposición crónica a progesterona no produce prolactinomas per sé (Rulli et al., 2002).

Por esta razón, otros factores además de progesterona y estradiol estarían involucrados en el desarrollo de un prolactinoma en este modelo experimental.

---

## TGF $\beta$ 1 EN HIPÓFISIS

TGF $\beta$ 1 es una citoquina que se presenta como un homodímero de 25 kDa. Su secuencia aminoacídica se ha mantenido altamente conservada en distintas especies a lo largo de la evolución y sus funciones son muy similares tanto en humanos como en otros animales, relacionándose principalmente con la proliferación celular, la diferenciación y el crecimiento (Kajdaniuk, Marek, Borgiel-Marek, & Kos-Kudla, 2013). Si bien en hipófisis la síntesis de TGF $\beta$ 1 se da principalmente en los lactotopos, esta citoquina es también sintetizada por células folículo estrelladas (Burns & Sarkar, 1993);(Jin, Tsumanuma, Ruebel, Bayliss, & Lloyd, 2001).

En hipófisis, TGF $\beta$ 1 ha sido descrito como un factor inhibitorio de la proliferación de los lactotopos y de la síntesis y secreción de PRL. Además, su expresión y actividad se han encontrado reducidas en modelos experimentales de prolactinomas, sugiriendo la participación de esta citoquina en el desarrollo tumoral (Pastorcic, De, Boyadjieva, Vale, & Sarkar, 1995);(Recouvreux et al., 2012);(Recouvreux et al., 2013).

## BIOLOGÍA DE TGFβ1

La biología de TGFβ1 es compleja. Esta citoquina es sintetizada como un precursor inactivo (pro-TGFβ1) que contiene un pro-dominio N-terminal conocido como proteína asociada de latencia (LAP). Si bien la unión entre LAP y TGFβ1 es clivada en el trans-Golgi por enzimas de tipo furina (Dubois, Laprise, Blanchette, Gentry, & Leduc, 1995); el dímero TGFβ1 permanece asociado a LAP de forma no covalente, aún luego del clivaje, formando el complejo latente menor (SLC, Small Latent Complex) (Annes, Munger, & Rifkin, 2003). La unión a LAP es suficiente para conferirle latencia a TGFβ1.

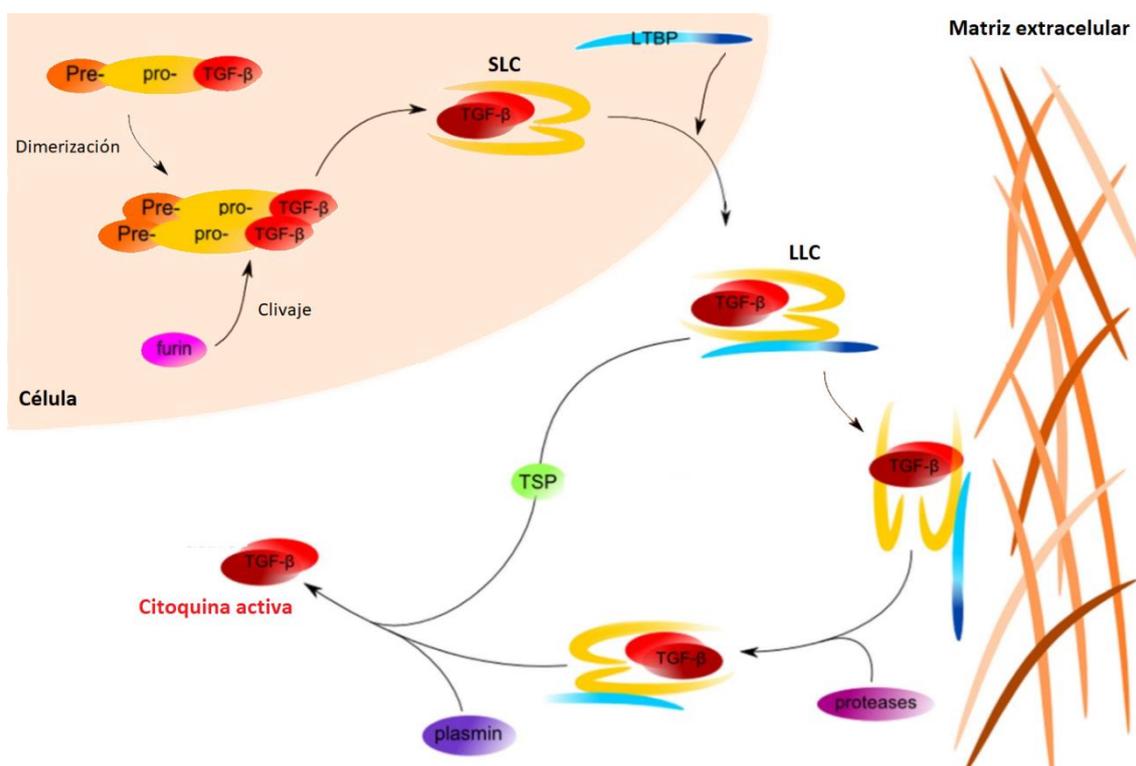
Antes de ser secretado, este pequeño complejo latente se asocia en forma covalente con una proteína de unión a TGFβ latente, LTBP (Latent TGFβ Binding Protein) (Figura 1.1). Esta unión se da a través de puentes disulfuro entre residuos cisteína presentes tanto en la proteína LAP como en la proteína LTBP, dando lugar a la formación del complejo latente mayor (LLC, Large Latent Complex).

En mamíferos hay cuatro isoformas de LTBPs (LTBP1-4), de las cuales sólo LTBP1, LTBP3 y LTBP4 se asocian a LAP. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la interacción de LTBP con TGFβ1 latente es fundamental para el correcto plegamiento y secreción del complejo (Miyazono, Olofsson, Colosetti, & Heldin, 1991);(Sterner-Kock et al., 2002);(Y. Chen et al., 2003). Además, las LTBPs son importantes mediadoras de la disponibilidad extracelular de TGFβ1, ya que intervienen no sólo en su secreción y activación, sino también en su localización dentro de la matriz extracelular (MEC) (Rifkin, 2005). El complejo latente mayor (LTPB-LAP-TGFβ1) es secretado al exterior de la célula e incorporado a la MEC a través de uniones covalentes entre las LTBPs y distintas fibras de la matriz (Annes, Chen, Munger, & Rifkin, 2004).

Luego de ser secretado, TGFβ1 permanece inactivo a modo de reserva dentro del complejo, anclado a la MEC. La actividad biológica de la citoquina dependerá de la liberación de sus proteínas de latencia, proceso que se conoce bajo el nombre de activación (Yoshinaga et al., 2008). (Figura 1.1).

Se han descrito varios activadores de TGFβ1, incluyendo proteasas, trombospondina 1 (TSP1), integrinas αVβ6 y αVβ8 y especies reactivas de oxígeno, entre otros. Estas moléculas “activadoras” disocian a TGFβ1 de sus

complejos latentes y, si bien su importancia biológica individual en la liberación de la citoquina y su regulación local en diferentes tejidos aún no están completamente dilucidados, todas estas moléculas responden a perturbaciones en la MEC (Annes et al., 2004);(Kubiczkova, Sedlarikova, Hajek, & Sevcikova, 2012). Por otro lado, ha sido descrito que la acidificación del pH ( $\text{pH} < 4$ ) *in vitro*, es un factor que promueve la liberación de TGFβ1 de sus complejos latentes, posiblemente debido a la desnaturalización de LAP (Oreffo, Mundy, Seyedin, & Bonewald, 1989).



**Figura 1.1. Representación esquemática de la síntesis y activación de TGFβ1.** SLC, complejo latente menor; LTBP, proteína de unión a TGFβ latente; LLC, complejo latente mayor. TSP, trombospondina. Imagen tomada y modificada de Kubiczkova et al. (Kubiczkova et al., 2012).

Dentro de los mecanismos de activación propuestos, las proteasas (plasmina, MMP9, calicreínas) activarían a TGFβ1 desestabilizando a los complejos latentes mediante la proteólisis de sitios sensibles ubicados dentro de las LTBPs y/o de las proteínas LAP, favoreciendo la liberación de la citoquina y su consecuente activación (Lyons, Gentry, Purchio, & Moses, 1990);(Yu & Stamenkovic, 2000).

Por otro lado, se postula que TSP1 interactúa directamente con LAP modificando su conformación, permitiendo así la liberación de TGFβ1 (Ribeiro, Poczatek, Schultz-Cherry, Villain, & Murphy-Ullrich, 1999).

Si bien el rol de TSP1 en el desarrollo de un prolactinoma no se encuentra del todo dilucidado, ha sido descrito que esta proteína, además de su potencial rol como proteína estructural de la MEC, posee también secuencias repetitivas (TSR tipo 1) que intervienen en la activación del receptor CD-36 presente en las células endoteliales promoviendo la inhibición de la angiogénesis acompañado de efectos antiproliferativos (Guo, Kruttsch, Inman, Shannon, & Roberts, 1997).

---

### **TGFβ1: RECEPTORES Y EFECTORES INTRACELULARES**

Una vez liberado de sus proteínas de latencia, TGFβ1 se encuentra habilitado para ejercer su actividad biológica mediante unión a sus receptores transmembrana presentes en los lactotopos, el receptor de tipo 1 (TβRI) también denominado ALK (Activin receptor-like kinase) y el receptor de tipo 2 (TβRII). Ambos receptores poseen actividad de serin/treonin quinasa y son los iniciadores de la transducción de señales intracelulares (Massague, 1998).

La unión de TGFβ1 a TβRII, constitutivamente fosforilado, provoca el reclutamiento y la fosforilación específica del TβRI. Este receptor, a su vez, fosforila y activa a los factores de transcripción intracelulares citoplasmáticos denominados proteínas SMAD (Small Mothers Against Decapentaplegic) que regulan la transcripción de los genes blanco de TGFβ1 en el núcleo (Figura 1.2).

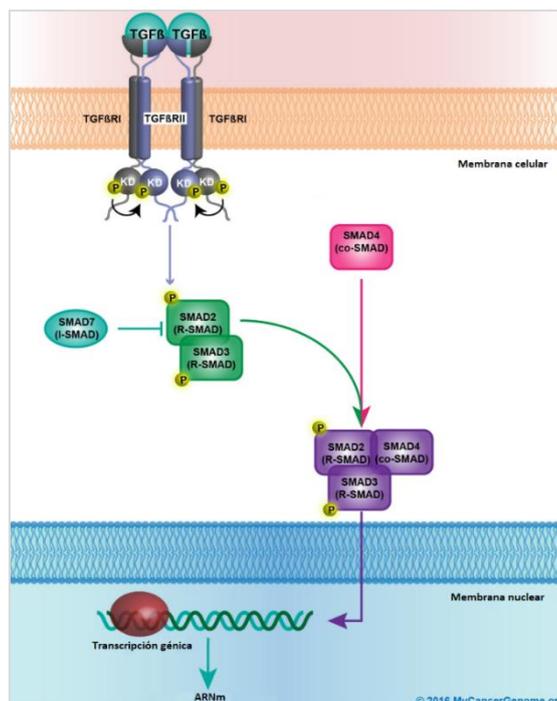
Dos de los genes blanco descritos para TGFβ1 son: KLF14 (Kruppel Like Factor 14) y TMEPAI (Transmembrane Protein Androgen Induced 1). KLF14 codifica para una proteína que funciona como un correpresor transcripcional, cuya inducción por TGFβ1 promueve una represión de la expresión del TβRII (Truty, Lomberg, Fernandez-Zapico, & Urrutia, 2009). Por otro lado, TMEPAI codifica una proteína transmembrana que responde a TGFβ1 e interfiere con la señalización de TβRI (Watanabe et al., 2010).

Debido a que la vía de las proteínas SMADs es compartida por otros miembros de la familia TGFβ, la especificidad de acción de cada citoquina

estará determinada por la activación diferencial de distintos tipos de SMADs que, a su vez, estarán determinados según el tipo de receptor tipo 1 que esa citoquina haya reclutado, fosforilado y activado.

Existen tres grupos de proteínas SMADs, las R-SMADs (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8) que son activadas por el receptor al que se asocian, la co-SMAD o SMAD común denominada SMAD4 y las I-SMADs (SMAD6 y SMAD7) que poseen función inhibitoria. Tanto las R-SMADs como la co-SMAD poseen un dominio de unión a ADN que les permite modular la transcripción a través de los sitios de unión a SMADs denominados SBE (Smad Binding Elements). Por el contrario, las I-SMADs carecen de este dominio de unión a ADN y, en cambio, compiten con las R-SMAD por la unión a SMAD4, funcionando como antagonistas intracelulares de las R-SMADs, impidiendo la formación del complejo que activa a los genes blanco (Wrana et al., 1992).

Mientras que en la mayoría de las células, el subtipo de TβRI al cual se une TGFβ1 es ALK5 cuya señalización se lleva a cabo a través de la fosforilación de SMAD2 y SMAD3, en células endoteliales TGFβ1 puede activar tanto a ALK5 como a ALK1, el cual señaliza, en cambio, a través de SMAD1 (Derynck & Feng, 1997).



**Figura 1.2. Representación esquemática de la señalización de TGFβ1.** Imagen tomada y modificada de mycancergenome.org.

A lo largo de esta tesis nos referiremos al “sistema TGFβ1” como el conjunto de los distintos componentes aquí descritos que participan en la regulación de la actividad biológica de esta citoquina, desde su síntesis, ensamblaje en complejos latentes, secreción y activación en la MEC, hasta sus receptores y efectores intracelulares.

---

## **TGFβ1 EN EL DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA**

Como mencionamos anteriormente, los principales reguladores del lactotrofo son la dopamina (DA) y los estrógenos. Sin embargo, si bien es sabido que una desregulación de estos factores conlleva al desarrollo de un prolactinoma, existen también otras moléculas secretadas por la hipófisis que contribuyen a la regulación de este tipo celular y entre ellas se encuentra TGFβ1. Ha sido demostrado que tanto DA como los estrógenos, regulan también la síntesis y activación de esta citoquina, así como la expresión de los distintos componentes de su sistema: proteínas de unión, receptores, efectores intracelulares, entre otros (Recouvreux et al., 2011);(Recouvreux et al., 2013); mientras que DA aumenta la expresión de TGFβ1 en los lactotrofos, los estrógenos disminuyen su síntesis y liberación, así como también la expresión de su receptor (Pastorcic et al., 1995);(D K Sarkar et al., 2005).

A su vez, la expresión y actividad de TGFβ1 se han encontrado reducidas en modelos experimentales de prolactinomas (Pastorcic et al., 1995);(Recouvreux et al., 2012);(Recouvreux et al., 2013).

Sumado a estos factores, se sabe que existe una diferencia sexual en la incidencia de los prolactinomas en la clínica, afectando en mayor medida a mujeres en edad reproductiva comparado con los hombres de la misma edad (relación 10:1), equiparándose esta diferencia una vez establecida la menopausia (relación 1:1) momento en el cual los niveles estrogénicos en las mujeres decaen. Esto podría sugerir una relación entre los niveles hormonales y la disponibilidad de la citoquina en hipófisis (Mindermann & Wilson, 1994);(Colao et al., 2003).

## OBJETIVO I

En base a los antecedentes mencionados, y ante la evidencia de que el modelo experimental que sobreexpresa la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana (hCG $\beta$ ) presenta un marcado dimorfismo sexual en el desarrollo de prolactinomas y, sabiendo que los factores que desencadenan el desarrollo del prolactinoma en hembras hCG $\beta$ + adultas no están completamente dilucidados, nos propusimos estudiar el rol del sistema TGF $\beta$ 1 hipofisario en el desarrollo de un prolactinoma en este modelo de ratón transgénico y las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo.

---

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

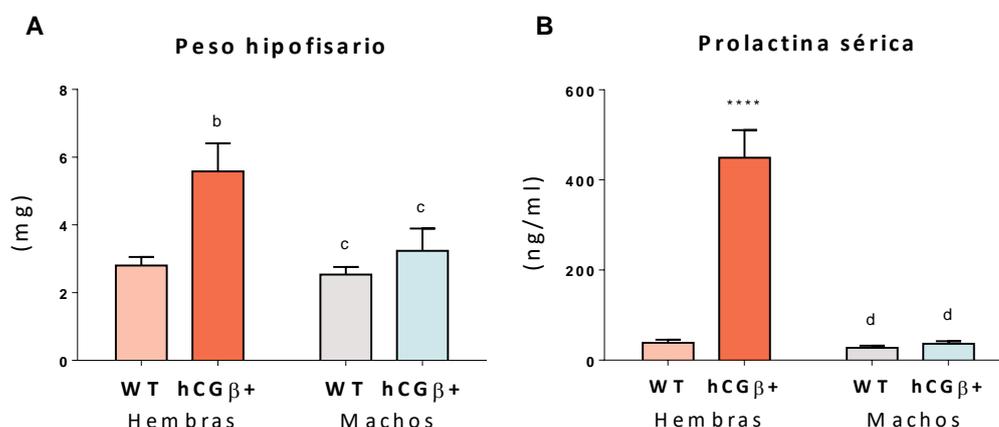
- ❖ Estudiar las diferencias sexuales en el desarrollo de un prolactinoma en ratones hCG $\beta$ .
- ❖ Evaluar el contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 activo y total en ratones hCG $\beta$  de ambos sexos y genotipos.
- ❖ Estudiar la expresión de los distintos componentes del sistema TGF $\beta$ 1 (receptores, efectores intracelulares, proteínas de latencia, genes blanco) comparativamente entre sexos y genotipos en ratones hCG $\beta$ .
- ❖ Evaluar el efecto de un tratamiento *in vivo* con un análogo a trombospondina 1 (activador de TGF $\beta$ 1) en hembras hCG $\beta$ + sobre el desarrollo de un prolactinoma.

## RESULTADOS I

### DIMORFISMO SEXUAL EN EL DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA EN RATONES hCG $\beta$

Comenzamos nuestro trabajo evaluando el peso hipofisario (Figura 1.3A) en ratones hCG $\beta$  de ambos sexos y genotipos a los 6 meses de edad. Corroboramos, acorde a lo previamente descrito (Rulli et al., 2002), que en este modelo experimental sólo las hembras hCG $\beta$ + desarrollan prolactinomas, teniendo un aumento de hasta 15 veces el peso hipofisario de sus pares wt y de los machos de ambos genotipos.

Mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) evaluamos los niveles séricos de prolactina en estos animales y evidenciamos que, concomitante al desarrollo tumoral, las hembras hCG $\beta$ + presentan una marcada hiperprolactinemia, con niveles de PRL de hasta 600 nanogramos por mililitro, lo cual confirma el fenotipo de un prolactinoma. Este aumento en los niveles séricos de PRL no se observó en machos, independientemente de su genotipo (Figura 1.3B).



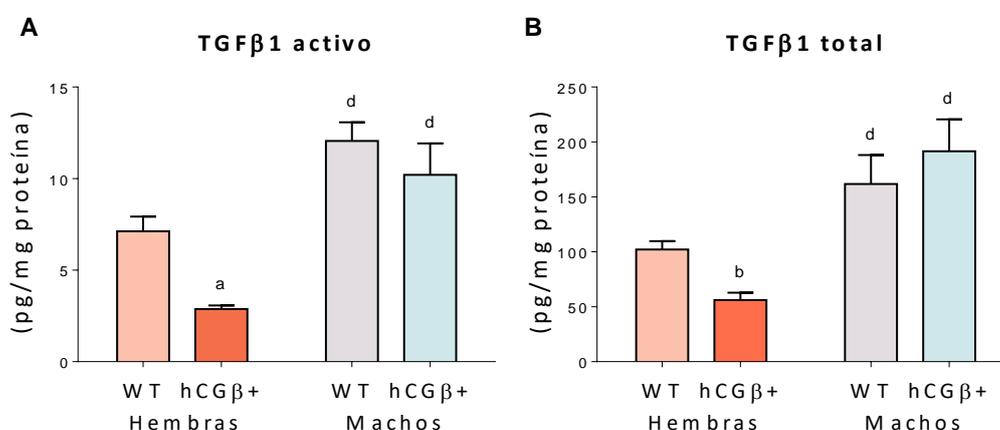
**Figura 1.3. Peso hipofisario y PRL sérica en ratones hCG $\beta$  de 6 meses de edad de ambos sexos y genotipos.** n=11-12/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** Peso hipofisario (mg). Interacción p=0,0097; b, p<0,01 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; c, p<0,001 machos vs. hembras. **B)** Prolactina sérica determinada por RIA (ng/ml). Interacción p<0,0001; \*\*\*\*, p<0,0001 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001 machos vs. hembras.

## CONTENIDO HIPOFISARIO DE TGF $\beta$ 1 ACTIVO Y TOTAL

Sabiendo que en hipófisis TGF $\beta$ 1 actúa como un inhibidor de la proliferación de las células lactotropas y de la secreción de prolactina, estudiamos el contenido hipofisario de la citoquina activa (libre de proteínas de latencia) y total mediante el ensayo de ELISA en homogenatos de hipófisis de hembras y machos de 6 meses de edad, de ambos genotipos.

Encontramos que los niveles hipofisarios de TGF $\beta$ 1 activo se encuentran significativamente disminuidos en hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt. Por otro lado, las hipófisis de machos presentan un elevado contenido de TGF $\beta$ 1 activo respecto de las hembras wt, sin diferencias significativas entre genotipos (Figura 1.4A).

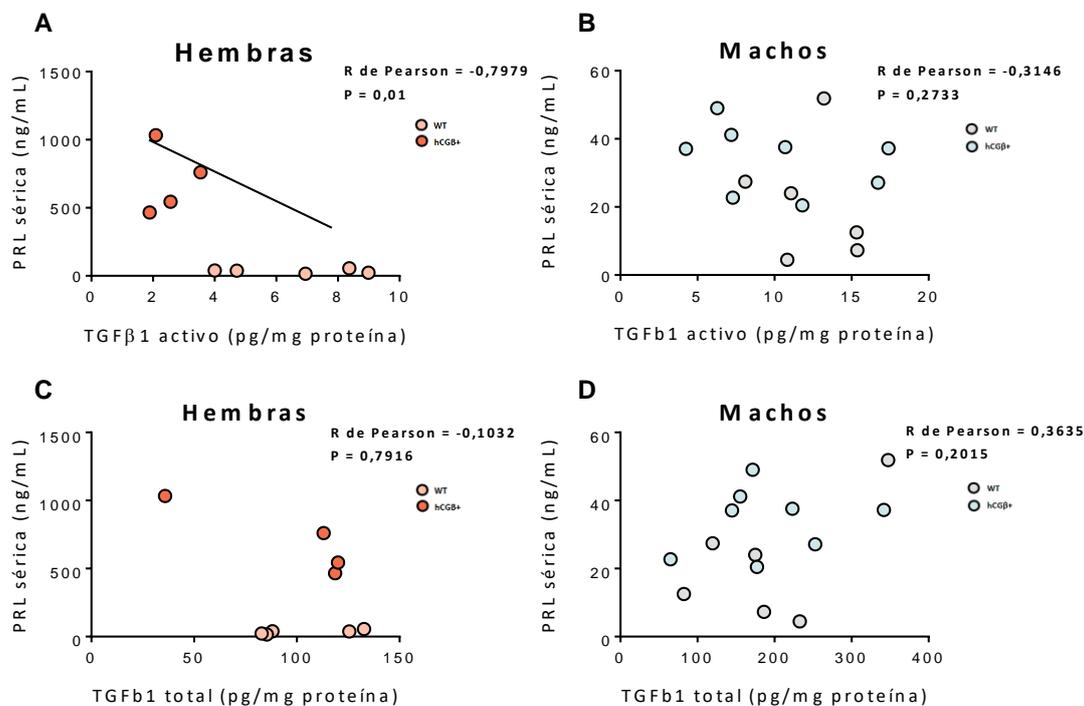
Al evaluar los niveles de citoquina total, pudimos evidenciar el mismo patrón observado para el contenido de citoquina activa, con valores significativamente disminuidos en hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt, y con niveles elevados en machos en comparación a las hembras wt, independientemente de su genotipo (Figura 1.4B).



**Figura 1.4. Contenido hipofisario de citoquina total y activa en ratones hCG $\beta$  de 6 meses de edad de ambos sexos y genotipos.** n=8-9/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** Contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 activo (pg/mg proteína). Interacción p=0,0274; a, p<0,05 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001 machos vs. hembras. **B)** Contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 total (pg/mg proteína). Interacción p=0,0054; b, p<0,001 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001 machos vs. hembras.

Es interesante destacar que encontramos una relación entre los niveles séricos de PRL y el contenido hipofisario de citoquina activa en las hembras hCG $\beta$ . Como puede observarse en la Figura 1.5A, existe una correlación

inversa entre la secreción de PRL y el contenido hipofisario de TGFβ1 activo. Dicha correlación no se observa al evaluar la secreción de PRL y el contenido hipofisario de TGFβ1 total (Figura 1.5C), así como tampoco se observa en machos (Figuras 1.5B y 1.5D).



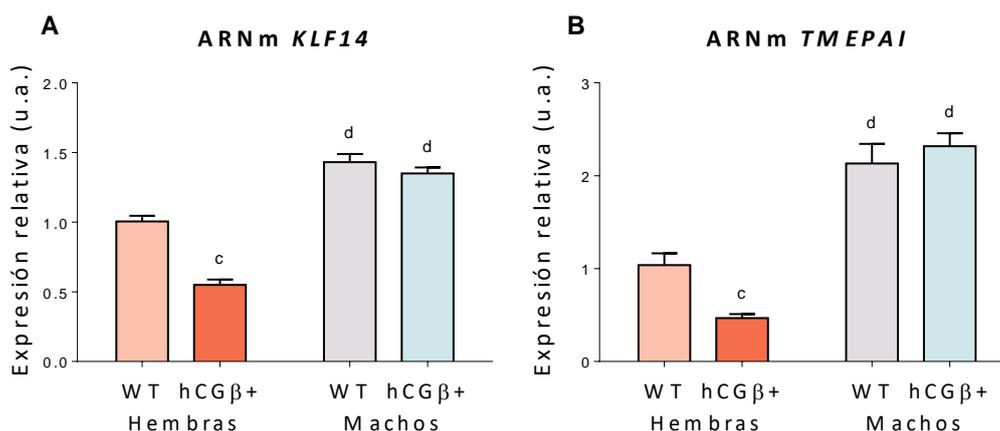
**Figura 1.5. Correlación entre los niveles hipofisarios de TGFβ1 (pg/mg de proteína, medidos por ELISA) y PRL sérica (ng/ml, medidos por RIA) en ratones de 6 meses de edad de ambos sexos y genotipos. n=4-8/grupo. Análisis estadístico: test de correlación de Pearson. TGFβ1 activo en hembras (A) y machos (B). TGFβ1 total en hembras (C) y machos (D).**

## ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TGFβ1

Como mencionamos anteriormente, una vez activo, TGFβ1 interactúa con sus receptores de membrana induciendo una cascada de señalización intracelular que tienen como objetivo regular, entre otros parámetros, la transcripción de genes blanco en el núcleo.

Para estudiar la actividad biológica de la citoquina en estos ratones, evaluamos por PCR cuantitativa en tiempo real los niveles de expresión relativa del ARNm de dos genes blanco de TGFβ1: KLF14 y TMEPAI (Truty et al., 2009);(Watanabe et al., 2010) (Figuras 1.6A y 1.6B, respectivamente).

Encontramos que la expresión hipofisaria de ambos genes sigue el mismo perfil observado en los niveles de contenido hipofisario TGF $\beta$ 1 activo. Las hembras hCG $\beta$ + presentan menor expresión de *KLF14* y *TMEPAI* respecto de sus pares wt y los machos presentan niveles de expresión relativa elevados respecto de las hembras wt, sin diferencia entre genotipos.



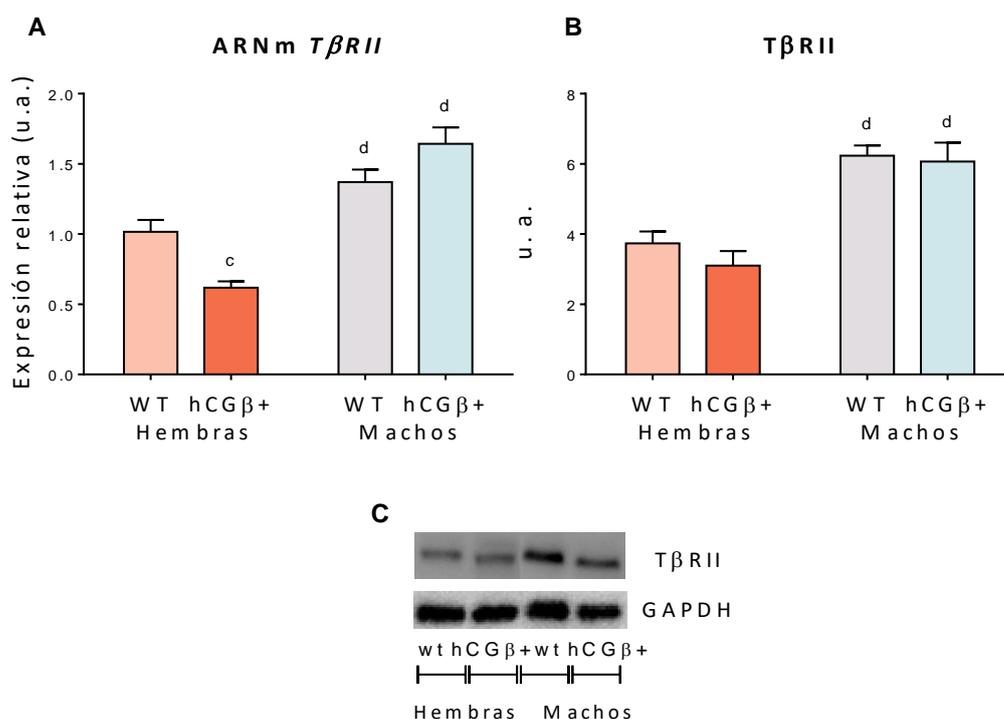
**Figura 1.6. Expresión relativa de genes blanco de TGF $\beta$ 1 evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real.** Valores amplificados con oligos específicos para cada gen y normalizados a CiclofilinaB. Los resultados están relativizados a hembras wt. n=7-11/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** *KLF14*. Interacción p=0,0036; c, p<0,001 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001. **B)** *TMEPAI*. Interacción p<0,0003; c, p<0,001 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001.

## EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y EFECTORES INTRACELULARES DE TGF $\beta$ 1

Para poder analizar si la disminución en la actividad biológica de la citoquina podía deberse, además, a una disminución en la expresión de sus receptores y/o efectores intracelulares, evaluamos por PCR cuantitativa en tiempo real los niveles hipofisarios de expresión relativa de los ARNm de los receptores de tipo 2 y de tipo 1 de TGF $\beta$ 1 (T $\beta$ RII, ALK5 y ALK1) y de dos proteínas SMAD involucradas en la señalización de estos receptores (SMAD4 y SMAD7). Además, analizamos mediante técnica de western blot (wb) la expresión proteica hipofisaria del receptor T $\beta$ RII.

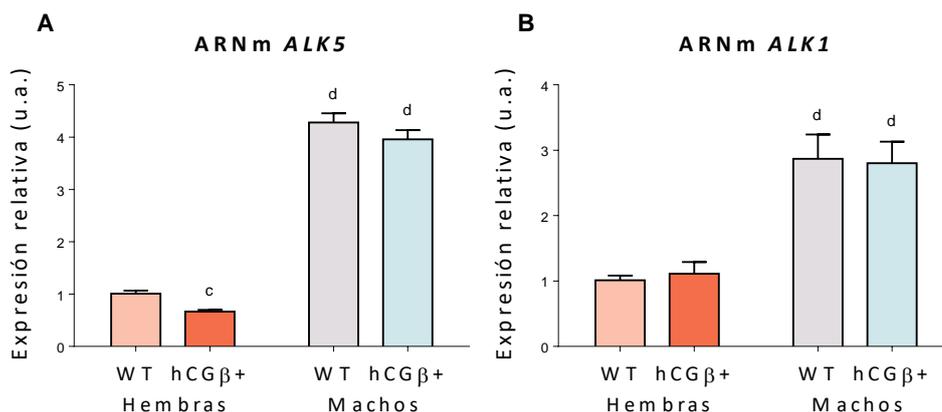
Encontramos que la expresión relativa del ARNm del T $\beta$ RII, se encuentra significativamente disminuida en hembras hCG $\beta$ + (prolactinoma) respecto de sus pares wt (Figura 1.7A). Sin embargo, dicha disminución no se refleja en los

niveles proteicos, luego de ser evaluada mediante técnica de wb (Figura 1.7B). Por otro lado, pudimos observar que la expresión del receptor T $\beta$ RII, evaluada tanto por PCR en tiempo real como por técnica de wb, posee una marcada diferencia sexual, con niveles de expresión elevados en machos respecto de las hembras, independientemente de su genotipo (Figuras 1.7A y 1.7B).



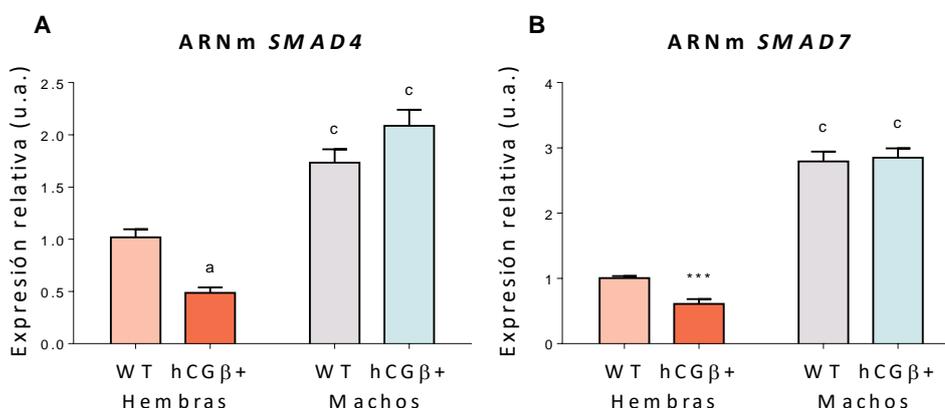
**Figura 1.7. Expresión hipofisaria del receptor T $\beta$ RII.** Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** Expresión relativa del ARNm normalizado a *CiclofilinaB* medido por PCR cuantitativa en tiempo real. Valores relativizados a hembras wt. n=7-12/grupo. Interacción p=0,0003; c, p<0,001 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001. **B)** Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de T $\beta$ RII relativa a las de GAPDH. n=3/grupo. Interacción ns; d, p<0,0001. **C)** Imagen representativa de las bandas inmunoreactivas para T $\beta$ RII (65 kDa) y para GAPDH (37 kDa), utilizada como control de carga.

Al evaluar la expresión hipofisaria de ARNm de los receptores de tipo 1, observamos que sólo *ALK5* presenta niveles disminuidos en hembras hCG $\beta$ + respecto sus pares wt (Figura 1.8A), no observándose diferencias entre genotipos en la expresión hipofisaria de *ALK1* en las hembras (Figura 1.8B). Por otro lado, encontramos que los machos presentan niveles marcadamente elevados de expresión relativa tanto de *ALK5* como de *ALK1* respecto de las hembras wt, sin diferencias entre genotipos (Figuras 1.8A y 1.8B, respectivamente).



**Figura 1.8. Expresión relativa de receptores ALK5 y ALK1 evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real.** Valores amplificadas con oligos específicos para cada gen y normalizados a CiclofilinaB. Los resultados están relativizados a hembras wt. n=7-12/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** ALK5. Interacción p=0,0004; c, p<0,001 hembras wt vs. hCGβ+; d, p<0,0001. **B)** ALK1. Interacción ns; d, p<0,0001.

A continuación, evaluamos la expresión relativa de los ARNm correspondientes a las proteínas SMAD4 y SMAD7, ambas relacionadas con la regulación de la señal intracelular que dispara TGFβ1 luego de unirse y activar a su receptor. Observamos que, al igual que sucede con el receptor ALK5, tanto el ARNm de *SMAD4* como el de *SMAD7* presentan niveles de expresión disminuidos en hembras hCGβ+ respecto de sus pares wt (Figuras 1.9A y 1.9B, respectivamente). Por otro lado, los machos presentan niveles de expresión relativa elevados respecto de las hembras wt, sin diferencias entre genotipos.



**Figura 1.9. Expresión relativa de SMAD4 y SMAD7 evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real.** Valores normalizados a CiclofilinaB. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-12/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** SMAD4. Interacción p=0,0027; a, p<0,05 hembras wt vs. hCGβ+; c, p<0,001. **B)** SMAD7. Interacción p=0,0137; \*\*\*p<0,001 hembras wt vs. hCGβ+; c, p<0,001.

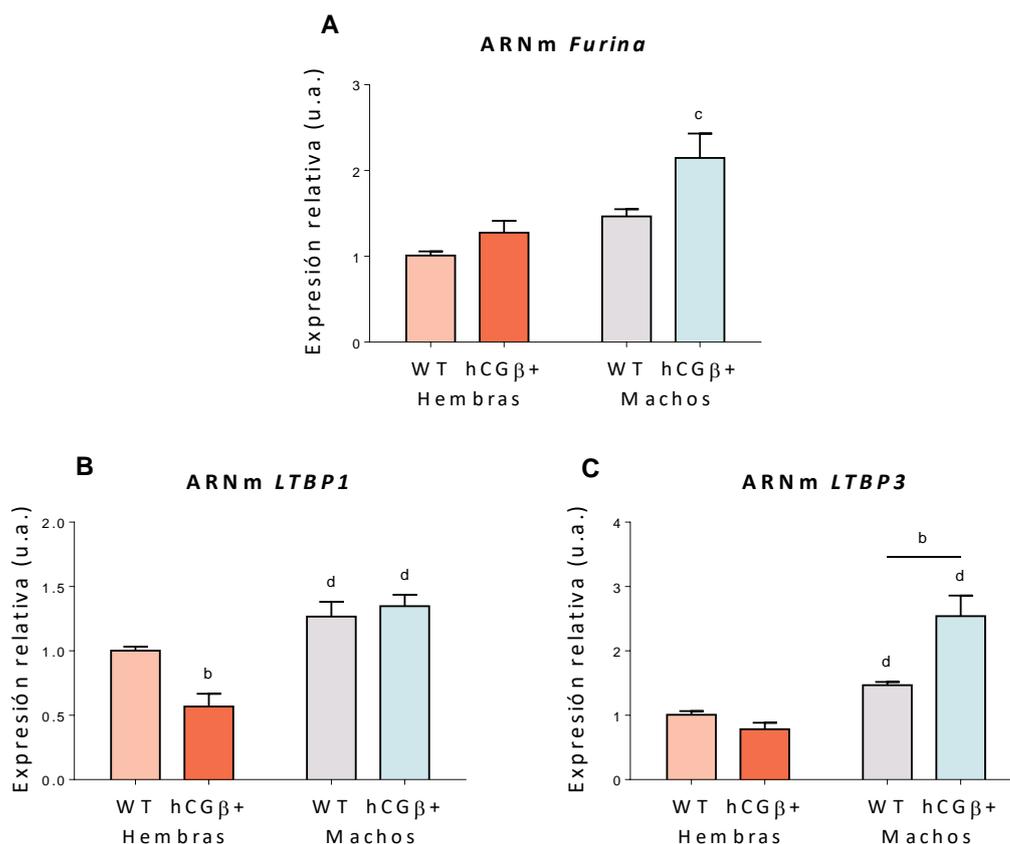
## EXPRESIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA BIOLOGÍA DEL SISTEMA TGF $\beta$ 1: FURINA Y LTBPS

Como mencionamos en la introducción de este capítulo, TGF $\beta$ 1 es sintetizado como un precursor inactivo formado por la citoquina biológicamente activa fusionada a un pro-péptido que le confiere latencia, denominado LAP. Este precursor inactivo contiene una secuencia consenso que es reconocida por la enzima convertasa furina, la cual se encarga de escindir el precursor LAP, separándolo de TGF $\beta$ 1 maduro, en el aparato de Golgi. Por este motivo, la enzima furina constituye el primer paso necesario para la formación del complejo latente de TGF $\beta$ 1 y, por lo tanto, alteraciones en su expresión o función podrían repercutir en un desbalance en la acumulación de precursor inactivo y en la correcta secreción y posterior activación de TGF $\beta$ 1.

Al evaluar la expresión hipofisaria de furina, no encontramos diferencias significativas entre hipófisis wt de ambos sexos (Figura 1.10); sin embargo, observamos niveles elevados del ARNm de los machos hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt.

Por otro lado, al ser las LTBP's componentes importantes del sistema TGF $\beta$ 1, por estar involucrados en el correcto plegamiento, secreción, anclaje en la matriz extracelular y en el control de la reserva de la citoquina y su posterior activación, analizamos las diferencias sexuales y genotípicas en la expresión relativa del ARNm de dos LTBP's que forman parte del complejo latente mayor de TGF $\beta$ 1: LTBP1 y LTBP3.

Encontramos que LTBP1 presenta niveles de expresión disminuidos en hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt (Figura 1.10A). Sin embargo, al evaluar la expresión de LTBP3, sólo encontramos diferencias genotípicas en machos, con niveles de expresión relativa elevados en los hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt (Figura 1.10B). Por otro lado, ambos genes presentan diferencias sexuales, con niveles de expresión relativa elevados en machos respecto de las hembras (Figuras 1.10A y 1.10B, respectivamente).



**Figura 1.10. Expresión relativa de furina, LTBP1 y LTBP3 evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real.** Valores normalizados a CiclofilinaB. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-12/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. **A)** Enzima furina. Interacción ns; c,  $p < 0,001$  machos wt vs. hCG $\beta$ +. **B)** LTBP1. Interacción  $p = 0,01$ ; b,  $p < 0,01$  hembras wt vs. hCG $\beta$ +. **C)** LTBP3. Interacción  $p = 0,0064$ ; b,  $p < 0,01$  machos wt vs. hCG $\beta$ +. d,  $p < 0,0001$ .

## EVALUACIÓN DE POSIBLES ALTERACIONES EN EL TONO DOPAMINÉRGICO

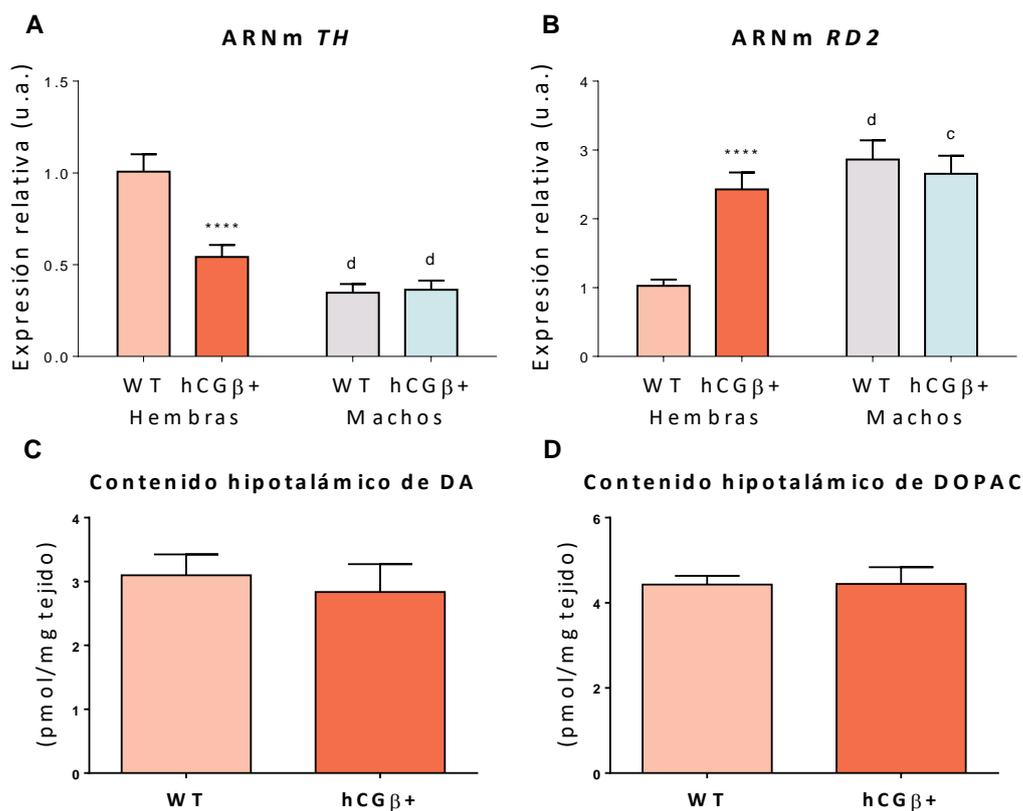
Dado que DA estimula al sistema TGF $\beta$ 1 hipofisario (D K Sarkar et al., 2005), analizamos el tono dopaminérgico en ratones hCG $\beta$  con el objetivo de evaluar si un tono dopaminérgico disminuido podría estar involucrado en la disminución del sistema TGF $\beta$ 1 hipofisario evidenciado en las hembras hCG $\beta$ +, respecto de sus pares wt. Para ello evaluamos en hipotálamos la expresión de tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante en la síntesis de DA), el contenido de DA en hipotálamo, y la expresión de los receptores de dopamina tipo 2 en hipófisis.

En hipotálamos de hembras y machos de ambos sexos y genotipos, estudiamos la expresión relativa del ARNm de la TH mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Observamos que la expresión de esta enzima presenta

diferencias genotípicas en hembras, con niveles de expresión disminuidos en hipotálamos de hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt. Asimismo, observamos diferencias sexuales, con niveles de expresión disminuidos de *TH* en machos respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos (Figura 1.11A).

Por otro lado, al evaluar la expresión hipofisaria de los receptores tipo 2 de DA (RD2), encontramos nuevamente diferencias genotípicas sólo en hembras, con niveles elevados de ARNm en las hipófisis de hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt, siendo estos niveles similares a los observados en machos de ambos genotipos (Figura 1.11B).

Dadas las diferencias genotípicas encontradas, postulamos que un menor tono dopaminérgico en las hembras hCG $\beta$ + podría estar indicando una falta de estímulo por parte del hipotálamo sobre el sistema TGF $\beta$ 1 hipofisario. Para evaluar esta posibilidad, determinamos por cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (High Performance Liquid Chromatography) el contenido de DA y de su metabolito DOPAC en hipotálamos de hembras de ambos genotipos. Sin embargo, como podemos observar en las figuras 1.11C y 1.11D, no encontramos diferencias significativas.



**Figura 1.11. Tono dopaminérgico en ratones hCG $\beta$ .** **A)** Expresión hipotalámica de TH. Valores normalizados a CiclofilinaB. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-7/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. Interacción  $p=0,0021$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$  hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d,  $p<0,0001$ . **B)** Expresión hipofisaria del receptor de DA tipo 2 (RD2). Valores normalizados a CiclofilinaB. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-7/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test post-hoc de Bonferroni. Interacción  $p=0,0021$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$  hembras wt vs. hCG $\beta$ +; c,  $p<0,001$ ; d,  $p<0,0001$ . **C)** Contenido de DA en hipotálamos de hembras de ambos genotipos. n=6/grupo. Análisis estadístico: Test de Student;  $p=0,6334$ ; sin diferencias significativas entre ambos grupos. **D)** Contenido de DOPAC en hipotálamos de hembras de ambos genotipos. n=6/grupo. Análisis estadístico: Test de Student;  $p=0,6334$ ; sin diferencias significativas entre ambos grupos.

## CONCLUSIONES PARCIALES:

Los resultados previos indican que las hembras hCG $\beta$ + con desarrollo de prolactinomas presentan una disminución significativa de:

- ❖ TGF $\beta$ 1 activo y total
- ❖ Actividad biológica de TGF $\beta$ 1: *KLF14* y *TMEPAI*
- ❖ *T $\beta$ RII*
- ❖ *ALK5*
- ❖ *SMAD4*
- ❖ *SMAD7*
- ❖ *LTBP1*

En este contexto, postulamos que el sistema TGF $\beta$ 1 se encuentra involucrado en el desarrollo de un prolactinoma, y que una disminución significativa en la expresión de los componentes de su sistema podría estar colaborando con el desarrollo tumoral en las hembras hCG $\beta$ + de este modelo experimental. Para evaluar esta posibilidad, proponemos que una recuperación farmacológica de los niveles de TGF $\beta$ 1 activo podría aumentar la disponibilidad de citoquina biológicamente activa en matriz extracelular y revertir el desarrollo tumoral en las hipófisis de hembras hCG $\beta$ +.

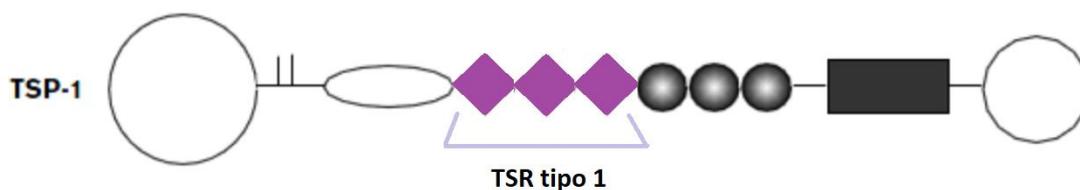
---

## EFFECTO DE UN TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO TENDIENTE A RESTAURAR LOS NIVELES HIPOFISARIOS DISMINUIDOS DE TGF $\beta$ 1 EN PROLACTINOMAS

Como mencionamos previamente en la introducción de este capítulo, trombospondina 1 (TSP1) es una glicoproteína que se encuentra localizada en matriz extracelular y es considerada un activador endógeno de TGF $\beta$ 1. TSP1 está compuesta por tres cadenas homólogas que contienen diferentes dominios estructurales denominados secuencias repetitivas (TSRs) y las hay de tipo 1, 2 o 3 (Lawler, 2002). Las TSR de tipo 1 (TSR1) contienen un sitio de unión a la proteína CD36 y son capaces de promover la inhibición de la angiogénesis acompañada de efectos antiproliferativos (Guo et al., 1997). Por este motivo, las TSR1 captaron la atención de diversos laboratorios farmacéuticos que comenzaron a desarrollar péptidos miméticos de estas secuencias con el objetivo de mimetizar específicamente la actividad

antiangiogénica de esta compleja glicoproteína y estudiar su efectos en tratamientos contra el cáncer (Henkin & Volpert, 2011).

Es interesante destacar que las secuencias TSR1 son también responsables de la activación de TGFβ1 por TSP1, ya que contienen las secuencias capaces de unir a LAP (proteína encargada de brindarle latencia a TGFβ1 en MEC) y desestabilizarlo liberando a TGFβ1 del complejo latente (Figura 1.12).



**Figura 1.12. Esquema representativo de la estructura de TSP1.** Se muestran los dominios TSR tipo 1 (TSR1) incorporados al péptido sintético. Imagen tomada y modificada de Ren y col. (Ren, Yee, Lawler, & Khosravi-Far, 2006).

ABT-510 fue uno de los primeros péptidos miméticos de TSP1, desarrollado por laboratorios ABBOTT, con una potente actividad pro-apoptótica sobre células endoteliales en cultivo y bien tolerado clínicamente (Haviv et al., 2005). Este compuesto fue evaluado en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, linfoma y carcinoma renal, entre otros (Ebbinghaus et al., 2007);(Gordon et al., 2008). En una segunda generación de análogos de TSP-1 surge otro péptido, el ABT-898, cuya ventaja respecto de su predecesor ABT-510, es que presenta una menor tasa de clearance, con lo cual se deseaba que su potencia sea aún mayor que sus antecesores (Garside et al., 2010);(Campbell, Greenaway, Henkin, & Petrik, 2011).

Diseño experimental: Para evaluar si el análogo de TSP1, ABT-898, posee la capacidad de aumentar los niveles de TGFβ1 activo hipofisario, revertir el desarrollo tumoral y la secreción de PRL, se realizó el siguiente protocolo experimental (ejemplificado en la Figura 1.13): Se utilizaron 8 hembras hCGβ+ de 4 meses de edad divididas en dos grupos; un grupo fue tratado con ABT-898 (grupo **ABT-898**, 100 mg/kg, i.p., Laboratorios Abbott) y el otro grupo fue

tratado con el vehículo Dextrosa 5% (grupo **control**). El tratamiento consistió en la administración de 3 inyecciones semanales durante tres semanas. 24 horas luego de la última inyección, se sacrificaron los ratones y se recolectó sangre troncal y la adenohipófisis para posteriores análisis.

Ambos grupos experimentales fueron comparados con hipófisis normales obtenidas de ratones hembra adultas de la misma edad al momento del sacrificio (grupo **wt**).

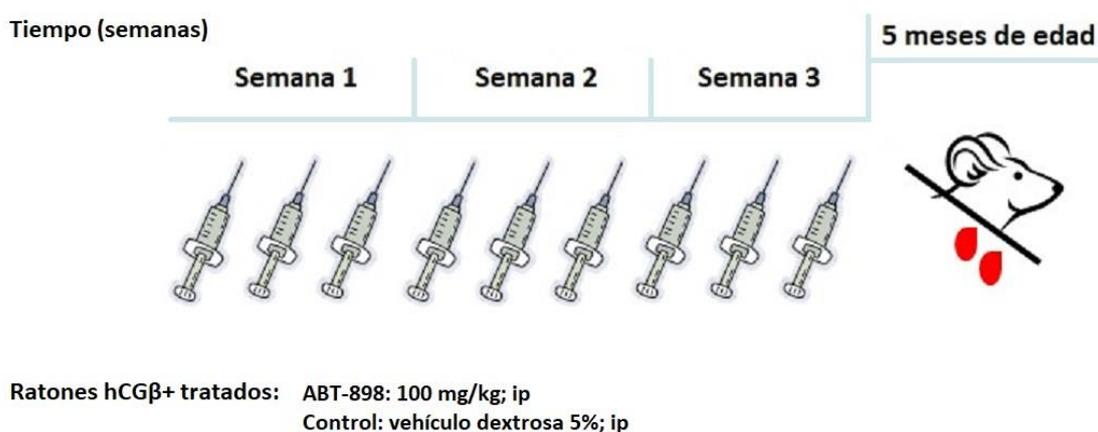


Figura 1.13. Esquema representando el diseño experimental del tratamiento realizado en ratones hCG $\beta$  con el péptido análogo a TSP1, ABT-898.

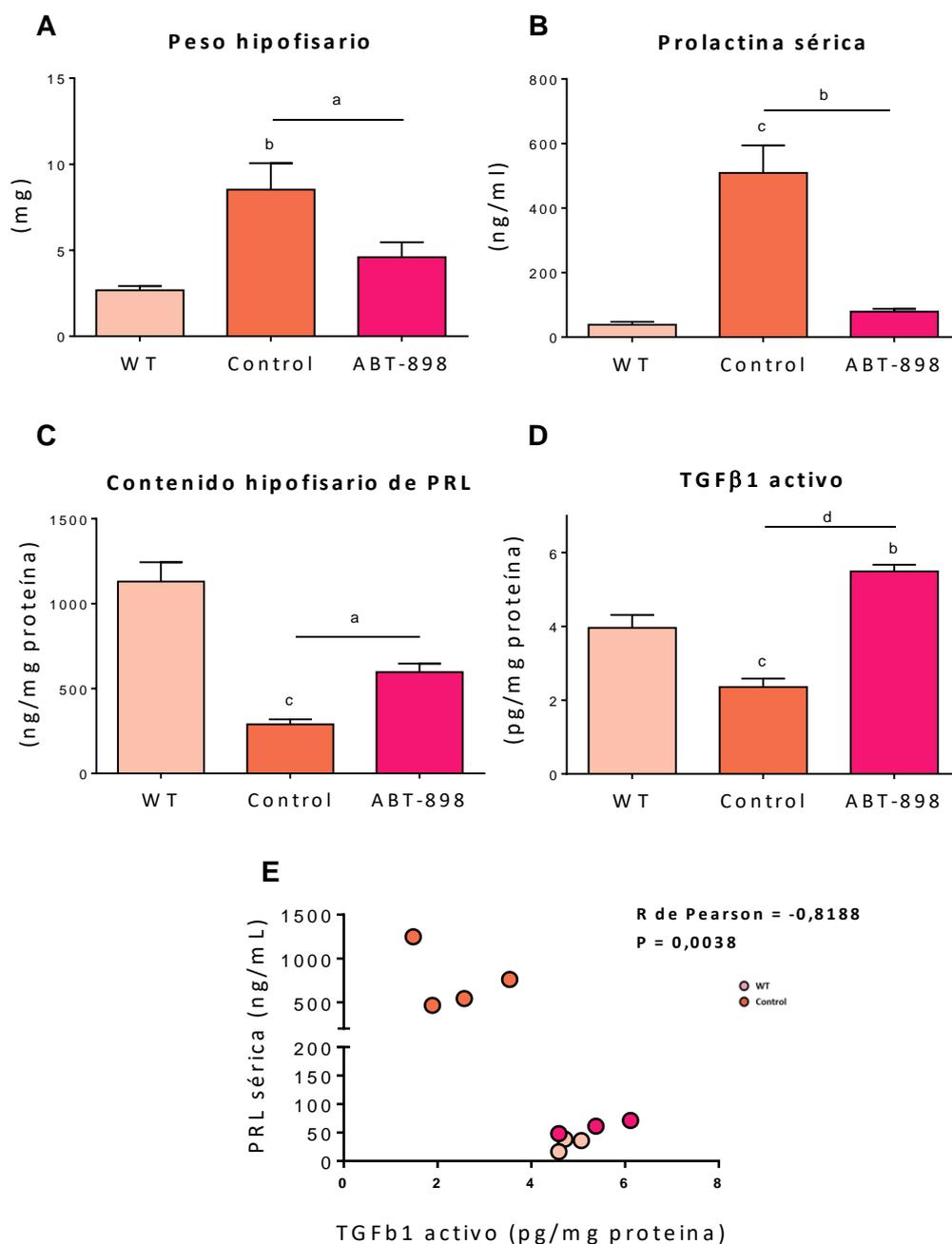
Finalizado el tratamiento, analizamos los pesos hipofisarios de estos animales y corroboramos, acorde a lo previamente expuesto en la figura 1.1 de este mismo capítulo, que el grupo de hembras hCG $\beta$ + desarrolló prolactinomas, evidenciado por un peso hipofisario elevado respecto de las hembras wt. Es interesante destacar que el tratamiento de sólo tres semanas con ABT-898, contrarrestó el crecimiento tumoral en hembras hCG $\beta$ +, observándose en este grupo un peso hipofisario disminuido respecto a las hembras hCG $\beta$ + tratadas con vehículo (Figura 1.14A).

Cuando evaluamos por RIA los niveles séricos de PRL y el contenido hipofisario de esta hormona encontramos que el tratamiento con ABT-898 logró disminuir muy significativamente la hiperprolactinemia característica de las hembras hCG $\beta$ + (Figura 1.14B).

Al evaluar el contenido de PRL en hipófisis, evidenciamos un aumento de contenido hipofisario de esta hormona en las hembras hCG $\beta$ + tratadas con ABT-898, respecto de las hembras hCG $\beta$ + control (Figura 1.14C). Estos resultados sugieren una recuperación en la inhibición de la secreción de hormona sobre el lactotrofo.

En homogenatos de hipófisis analizamos mediante técnica de ELISA el contenido de citoquina activa. Como podemos observar en la figura 1.14D, las hipófisis de hembras hCG $\beta$ + presentaron niveles disminuidos de TGF $\beta$ 1 activo respecto de sus pares wt, como se describió anteriormente en la Figura 1.4 de este mismo capítulo. El tratamiento con ABT-898 logró restaurar los niveles hipofisarios de TGF $\beta$ 1 activo en hipófisis de hembras hCG $\beta$ +, aún por encima de los valores encontrados en hembras wt.

Cuando estudiamos la relación entre los niveles séricos de PRL y el contenido de TGF $\beta$ 1 activo en hipófisis, encontramos nuevamente una correlación inversa entre la secreción de PRL y el contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 activo (Figura 1.14E).



**Figura 1.14. Tratamiento in vivo con ABT-898. n=5-7/grupo. A)** Peso hipofisario (mg). Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Tukey,  $p=0,0054$ ; b,  $p<0,001$  hembras wt vs. control; a,  $p<0,05$  hembras control vs. ABT-898. **B)** PRL sérica medida por RIA (ng/ml). Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Tukey,  $p=0,0001$ ; c,  $p<0,001$  hembras wt vs. control; b,  $p<0,001$  hembras control vs. ABT-898. **C)** Concentración hipofisaria de PRL medida por RIA (ng/mg). Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Tukey,  $p=0,0004$ ; c,  $p<0,001$  hembras wt vs. control; a,  $p<0,05$  hembras control vs. ABT-898. **D)** Contenido hipofisario de citoquina activa (pg/mg proteína) medido por ELISA en ratones wt, control y ABT-898. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Tukey,  $p=0,0007$ ; a,  $p<0,05$  hembras wt vs. control; c,  $p<0,001$  hembras control vs. ABT-898. **E)** Correlación entre los niveles hipofisarios de TGFβ1 (pg/mg de proteína, medidos por ELISA) y PRL sérica (ng/ml, medidos por RIA) en ratones wt, control y ABT-898. Análisis estadístico: test de correlación de Pearson.

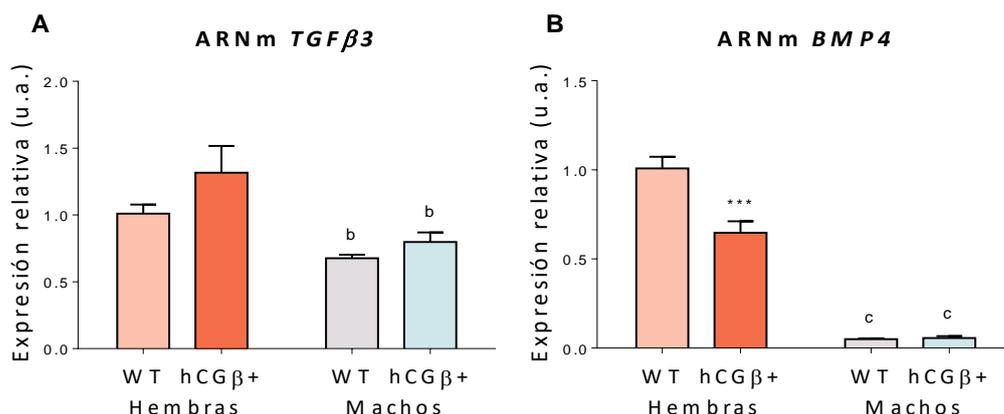
## OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA TGF $\beta$

Como mencionamos en la introducción general, existen otros miembros de la familia TGF $\beta$  que han sido asociados al desarrollo de un adenoma hipofisario, entre ellos, el factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF $\beta$ 3) y la proteína morfogenética del hueso 4 (BMP4, bone morphogenetic protein 4) (Green et al., 1996);(Paez-Pereda et al., 2003). Por esta razón, para evaluar si las alteraciones encontradas en los prolactinomas de las hembras hCG $\beta$ + eran específicamente del sistema TGF $\beta$ 1, analizamos los niveles de expresión relativa de los ARNm de TGF $\beta$ 3 y BMP4 en nuestro modelo experimental.

Como podemos observar en la Figura 1.15A, no encontramos diferencias genóticas en hembras para *TGF $\beta$ 3*. Por otro lado, encontramos que los machos presentan un nivel de expresión relativa disminuida respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos.

Al evaluar los niveles de expresión de *BMP4* y encontramos que las hembras hCG $\beta$ + presentan niveles de expresión disminuidos respecto de sus pares wt. Por otro lado, los machos presentan niveles de expresión significativamente reducidos respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos (Figura 1.15B).

Estos resultados indicarían que TGF $\beta$ 3 no se encontraría relacionado al desarrollo de un prolactinoma en las hembras hCG $\beta$ + de este modelo experimental. Por otro lado, futuros ensayos serían necesarios para evaluar la causa/efecto de los menores niveles de BMP4 en los prolactinomas de hembras hCG $\beta$ +, pero dada la muy baja expresión encontrada en machos, podríamos sugerir que los menores niveles de BMP4 encontrados en hipófisis de hembras hCG $\beta$ + no participarían del desarrollo tumoral.



**Figura 1.15. Expresión relativa TGF $\beta$ 3 y BMP4 evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-7/grupo. **A)** TGF $\beta$ 3. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, interacción  $p=0,9966$ ; b,  $p<0,001$ . **B)** BMP4. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, interacción  $p=0,0055$ ; \*\*\* $p<0,001$  hembras wt vs. hCG $\beta$ +; c,  $p<0,001$ .

## DISCUSIÓN I

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los principales reguladores del lactotrofo, dopamina (DA) y estradiol, son también reguladores de TGF $\beta$ 1 en hipófisis (Recouvreux et al., 2011). Asimismo, se ha remarcado la importancia de TGF $\beta$ 1 hipofisario como factor inhibidor de la funcionalidad de las células del lactotrofo (Recouvreux et al., 2013). Además, una disminución en los niveles de expresión de diversos componentes de este sistema han sido relacionados a la aparición de un prolactinoma (Pastorcic et al., 1995);(Green et al., 1996);(Dipak K Sarkar, 2006).

Con estos antecedentes, en este primer capítulo decidimos estudiar en el modelo de ratones hCG $\beta$  el “sistema TGF $\beta$ 1”, al cual definimos como los distintos componentes implicados en la compleja regulación que presenta esta citoquina, que participan de su síntesis, formación de complejos latentes, secreción, anclaje en la MEC, activación, unión a sus receptores y señalización.

En primer lugar, es sabido que este modelo experimental presenta un dimorfismo sexual en el desarrollo de prolactinomas previamente descrito por Rulli y col. (Rulli et al., 2002), donde sólo las hembras transgénicas (hCG $\beta$ +) adultas presentan un peso hipofisario elevado acompañado de

hiperprolactinemia. En este trabajo encontramos además diferencias genotípicas en el sistema TGF $\beta$ 1 de hipófisis hembras con desarrollo de tumor (hCG $\beta$ +) respecto de sus pares no tumorales (wt), así como también observamos diferencias sexuales en la expresión de varios de los componentes de este sistema.

Estudios previos de nuestro laboratorio, pusieron de manifiesto la necesidad de medir los niveles de TGF $\beta$ 1 activo, y no sólo el contenido total de la citoquina a la hora de analizar la acción de este sistema en diferentes tejidos, debido al desacople temporal que existe entre los eventos de síntesis y activación de la citoquina (Recouvreux et al., 2011). Al estudiar ambos parámetros en nuestro modelo experimental demostramos que las hembras hCG $\beta$ + con desarrollo de prolactinoma presentan un contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 total y activo disminuido respecto de sus pares wt. Más aún, evidenciamos que los niveles de citoquina activa presentes en la glándula representan entre un 5 y un 8% respecto de los niveles de citoquina total. Estos resultados indican que la mayor proporción de TGF $\beta$ 1 hipofisario se encuentra en estado latente, como reserva en la matriz extracelular, donde debe sufrir un proceso de activación altamente regulado para ejercer su función biológica (Yoshinaga et al., 2008).

Es importante destacar que en estas hembras hCG $\beta$ + el contenido hipofisario de TGF $\beta$ 1 activo correlaciona negativamente con los niveles de PRL sérica, sugiriendo una estrecha relación entre ambos factores presente sólo en las hembras, donde la hiperprolactinemia se vio correlacionada a niveles mínimos de citoquina activa en todos los casos analizados. Por otro lado, y de acuerdo a los antecedentes bibliográficos (Fujiwara, Ikeda, & Yoshimoto, 1998);(Recouvreux et al., 2013), demostramos que en hembras hCG $\beta$ + los niveles reducidos en el contenido hipofisario de la citoquina se ven reflejados en una disminución en su actividad biológica, evidenciada por niveles génicos disminuidos de *Klf14* y *Tmepai*.

Trabajos previos demostraron que existe una disminución en la expresión de varios de los componentes del sistema TGF $\beta$ 1 en hipófisis tumorales de dos modelos experimentales de prolactinoma: ratones deficientes para el receptor de dopamina RD2 y ratas Fisher 344 estrogenizadas (Pastorcic et al.,

1995);(Recouvreux et al., 2013). Nosotros verificamos estos resultados en nuestro modelo experimental, donde encontramos una disminución en la expresión hipofisaria de los receptores TβRII y ALK5 en los prolactinomas de hembras hCGβ+, así como también niveles disminuidos de SMAD4 y SMAD7, sugiriendo que la alteración en la expresión hipofisaria de los componentes del sistema TGFβ1 en las hipófisis de hembras hCGβ+ se encuentra relacionada al desarrollo de tumor.

Por otro lado, un correcto clivaje, plegamiento, secreción y disponibilidad extracelular de TGFβ1 depende de proteínas relacionadas a la formación de su complejo latente, tales como furina y LTBP1 (Dubois et al., 1995);(Rifkin, 2005). Uno de los primeros pasos en la formación del complejo latente es el clivaje del pro-péptido LAP del TGFβ1 maduro mediante la acción de la enzima furina. Nuestros resultados descartan que las diferencias encontradas en el contenido de TGFβ1 en hembras se deban a alteraciones en la expresión de *furina*, dado que en nuestro modelo experimental no encontramos diferencias en la síntesis de esta enzima.

Respecto de las LTBP1, se ha descrito que participan en la regulación de la biodisponibilidad y función de TGFβ1 a diferentes niveles: aseguran el correcto plegamiento y secreción, regulan el anclaje temporal y espacial de TGFβ1 en la matriz extracelular y la interacción con otras proteínas de la misma matriz, así como también participan en la activación de la citoquina (Rifkin, 2005);(Todorovic & Rifkin, 2012). De las cuatro LTBP1 descritas, sólo tres unen a TGFβ1: LTBP1, LTBP3 y LTBP4, siendo LTBP1 la de mayor expresión en tejidos. El análisis de la expresión hipofisaria de LTBP1 en ratones de nuestro modelo experimental demostró una marcada disminución en hembras hCGβ+ con desarrollo de tumor. Sin embargo, estos resultados no fueron observados en la expresión de LTBP3, lo cual podría indicar que mientras una disminución en la expresión de LTBP1 podría estar relacionada a las alteraciones observadas en los niveles de citoquina activa, la expresión de LTBP3 no tendría una participación relevante en el desarrollo de los prolactinomas en este modelo. A pesar de que el rol de las LTBP1 en el desarrollo tumoral no se encuentra del todo estudiado, estas proteínas tienen un rol clave en el control de la activación de TGFβ y se ha descrito que

alteraciones en su expresión se encuentran relacionadas al desarrollo de tumores del mesotelio, del intestino medio y tumores pancreáticos (Oklu & Hesketh, 2000). Además, se ha demostrado que las células de tejidos sanos presentan niveles elevados de LTBP1, mientras que una disminución en su expresión suele relacionarse con mayor frecuencia a la aparición de tejidos tumorales, debido a que su disminución limita la disponibilidad local de TGFβ1, dando como consecuencia una falta de efecto supresor por parte de la citoquina sobre la proliferación de células epiteliales (Vehviläinen et al., 2011).

Es importante destacar en este trabajo, que además de las diferencias genóticas observadas en hembras, encontramos un interesante dimorfismo sexual que se extendió más allá de lo observado inicialmente para el peso hipofisario y los niveles de prolactina sérica. A lo largo de este primer capítulo, evidenciamos importantes diferencias sexuales en varios de los componentes del sistema TGFβ1 hipofisario en estos ratones, encontrando en todos los casos una expresión significativamente elevada en machos de ambos genotipos respecto de las hembras y sin diferencias entre genotipos.

El contenido hipofisario total y activo de TGFβ1 se presentó elevado en machos de ambos genotipos, al mismo tiempo que se observó un actividad biológica elevada, evidenciada por una mayor expresión de *Klf14* y *Tmepai* en las hipófisis de machos respecto de las hembras. Esta diferencia sexual se extendió a todos los componentes del sistema TGFβ1 estudiados en esta tesis tales como la expresión de los receptores y efectores intracelulares: TβRII, ALK5, ALK1, SMAD4 y SMAD7, así como también de las proteínas reguladoras de la biología del sistema TGFβ1: furina, LTBP1 y LTBP3.

Estos resultados sugieren que la presencia de un sistema TGFβ1 fuertemente expresado en hipófisis de machos protegería a este sexo del desarrollo de un prolactinoma en este modelo experimental.

Ha sido descripto que los ratones hCGβ+ de ambos sexos presentan alteraciones hormonales. Como mencionamos previamente, hCG actúa sobre el mismo receptor que la hormona LH (RLH) (Gharib et al., 1990), motivo por el cual la sobreexpresión de hCG aumenta la esteroidogénesis en estos ratones, promoviendo en machos un aumento en la producción de testosterona y en

hembras una luteinización masiva de sus ovarios que aumenta significativamente la producción de progesterona (P4) (Rulli et al., 2003).

Si bien la influencia del estradiol en la síntesis y secreción de prolactina, en la proliferación de los lactotopos y en la formación de los prolactinomas es ampliamente reconocida (Heaney et al., 1999);(Heaney et al., 2002), los niveles séricos de esta hormona en la adultez de hembras hCG $\beta$ + permanecen cercanos a los fisiológicos aún en presencia de tumor. Por otro lado, no ha sido comprobada la participación de la progesterona *per se* en el desarrollo de un prolactinoma.

Respecto de los efectos de los andrógenos sobre la transcripción de TGF $\beta$ 1, hay resultados contrapuestos en bibliografía y no se conoce en profundidad su regulación sobre la biología de esta citoquina, mecanismo que podría estar mediando las diferencias sexuales observadas entre hembras y machos, en conjunto con el efecto inhibitorio que ejercen los estrógenos sobre la síntesis de la citoquina (Pastorcic et al., 1995). Se han identificado varios elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en la secuencia del promotor de TGF $\beta$ 1 que, junto a los niveles elevados de testosterona en machos, podrían explicar efectos estimulatorios sobre la síntesis del ARNm y una mayor disponibilidad hipofisaria de TGF $\beta$ 1 total en MEC en machos respecto de las hembras; sin embargo, esto no explicaría la falta de diferencias entre genotipos en machos, con niveles de testosterona más elevados en machos hCG $\beta$ + que no se ven reflejados en mayores niveles de TGF $\beta$ 1 hipofisario respecto a machos wt (Qi, Gao, & Wang, 2008).

Por otro lado, se desconoce hasta el momento si estas secuencias ARE se encuentran en los promotores de otros componentes del sistema TGF $\beta$ 1. Particularmente en esta tesis encontramos que las hipófisis de machos hCG $\beta$ + presentan mayor expresión de furina y LTBP3 respecto a sus pares wt. Futuros estudios serían necesarios para evaluar si las diferencias genotípicas encontradas en estos componentes en hipófisis de machos son debidas a una regulación positiva por testosterona.

Previamente mencionamos que tanto los estrógenos como la DA regulan la síntesis y secreción de TGF $\beta$ 1 en hipófisis, de manera negativa y positiva, respectivamente (Recouvreux et al., 2011). Si bien esto podría explicar que las

hembras, con mayor carga estrogénica que los machos, tengan un sistema TGF $\beta$ 1 más débil, no podría esclarecer la diferencia genotípica observada en hembras, donde el sistema se presenta marcadamente disminuido en hipófisis de hembras tumorales (hCG $\beta$ +) respecto de las que no desarrollan tumor, estando ambas bajo niveles similares de estrógenos en circulación.

Por otro lado, además de sus efectos sobre la hipófisis, es sabido que la P4 actúa también a nivel hipotalámico, inhibiendo la síntesis de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en el núcleo arcuato e inactivando su correcto funcionamiento (L A Arbogast & Voogt, 1993);(Lydia A Arbogast & Voogt, 2002). En este contexto, los altos niveles séricos de P4 en hembras hCG $\beta$ + podrían estar afectando la síntesis de dopamina a nivel hipotalámico. Por este motivo y al ser la TH es una enzima clave en la síntesis de DA, pensamos que las alteraciones observadas en el sistema TGF $\beta$ 1 podrían deberse a alteraciones en el tono dopaminérgico de estos animales. Fue así como demostramos que en hipotálamos de hembras hCG $\beta$ +, con desarrollo de prolactinoma y elevados niveles séricos de P4, los niveles de expresión de TH se encuentran disminuidos respecto de sus pares wt, al mismo tiempo que se encuentra elevada la expresión hipofisaria del receptor de DA de tipo 2 (RD2). Estos resultados podrían indicar un menor efecto de DA en las hipófisis de hembras con desarrollo tumoral y, en consecuencia, una disminución en la inhibición sobre las células del lactotrofo.

Sin embargo, cuando analizamos en hembras de ambos genotipos el contenido hipotalámico de DA y su principal metabolito DOPAC, no evidenciamos diferencias significativas entre ambos grupos, no pudiendo asegurar entonces con estos resultados que el desarrollo tumoral sea producto de un menor efecto de la acción de DA en hipófisis de hembras hCG $\beta$ +

Las diferencias sexuales encontradas en el tono dopaminérgico con una expresión hipotalámica disminuida de TH y un aumento en la expresión hipofisaria del receptor RD2 en machos respecto de las hembras, fueron resultados esperados acorde a la presencia de un mayor tono dopaminérgico en las hembras, previamente descrito por Gudelsky y col. Y Freeman y col. (Gudelsky & Porter, 1981);(Freeman et al., 2000).

Hasta aquí encontramos que las hipófisis de las hembras hCG $\beta$ + expresan niveles significativamente disminuidos en la mayoría de los componentes del sistema TGF $\beta$ 1. Nosotros postulamos que este sistema inhibitorio disminuido facilitaría el desarrollo tumoral. Por lo tanto, un tratamiento farmacológico que fuese capaz de normalizar la actividad hipofisaria de TGF $\beta$ 1 podría revertir o evitar el desarrollo del prolactinoma.

Con ese objetivo en mente, desarrollamos un tratamiento *in vivo* con ABT-898 en ratones hembra de ambos genotipos, con el objetivo de analizar el rol de TGF $\beta$ 1 en el desarrollo de un prolactinoma en este modelo experimental.

Demostramos que un tratamiento de 4 semanas con ABT-898 logró contrarrestar el desarrollo tumoral y normalizar los niveles séricos de PRL en las hembras hCG $\beta$ +. Este tratamiento fue efectivo en recuperar el contenido de TGF $\beta$ 1 activo. Es decir, demostramos que la recuperación de los niveles hipofisarios de TGF $\beta$ 1 en hembras hCG $\beta$ + logró una disminución en el tamaño tumoral y una normalización en los niveles de PRL sérica.

Por otro lado, otros miembros de la familia TGF $\beta$  sintetizados por los lactotropos (TGF $\beta$ 3 y BMP4) han sido relacionados con el desarrollo de un prolactinoma. Por esta razón, concomitante al aumento en la proporción de lactotropos en hipófisis tumorales de hembras hCG $\beta$ +, podría esperarse un aumento en la síntesis hipofisaria de TGF $\beta$ 3. Sin embargo, al evaluar esta citoquina no encontramos diferencias genotípicas en hembras. Por otro lado, encontramos una menor expresión hipofisaria en machos respecto de hembras, esto podría deberse a que el estradiol es un estimulador en la síntesis de TGF $\beta$ 3 (S. Hentges et al., 2000). La ausencia de diferencias genotípicas en hembras podría ser producto de los niveles similares de esta hormona en ambos genotipos, descartando de este modo la participación de TGF $\beta$ 3 en el desarrollo de un prolactinoma en este modelo experimental.

Respecto de BMP4, los resultados en hipófisis son controvertidos. Existen trabajos que demuestran por estudios inmunohistoquímicos, que esta citoquina se encuentra principalmente expresada en somatotropos, corticotropos y tirotropos, siendo raramente detectables el lactotropos (Yacqub-Usman, Duong, Clayton, & Farrell, 2012), al mismo tiempo que otros trabajos demuestran que

existe una sobreexpresión de BMP4 en modelos experimentales de prolactinomas así como también en prolactinomas humanos respecto de la expresión observada en hipófisis normales (Paez-Pereda et al., 2003). Nuestros resultados demuestran una expresión disminuida de BMP4 en las hipófisis tumorales de hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt, así como también evidencian una marcada diferencia sexual, con niveles de citoquina significativamente menores en machos respecto de hembras. Han sido descritos efectos inhibitorios de los andrógenos sobre la expresión de BMP4 en tejido gonadal (Y. Liu et al., 2017), pero aún se desconoce el efecto a nivel hipofisario, podríamos sugerir que los menores niveles de citoquina observados en machos respecto de las hembras podrían ser producto de niveles diferenciales de andrógenos circulantes entre ambos sexos.

Siendo TGF $\beta$ 1 un inhibidor de la función del lactotrofo, los resultados de este primer capítulo nos permiten postular que una disminución en la actividad de TGF $\beta$ 1 en hipófisis de hembras hCG $\beta$ + estaría involucrada en el desarrollo de prolactinomas en este grupo. Mas aún, pudimos demostrar que un tratamiento *in vivo* en hembras hCG $\beta$ + que logra recuperar los niveles de TGF $\beta$ 1 activo en hipófisis, logra prevenir el desarrollo tumoral y una concomitante normalización en los niveles séricos de prolactina.

Asimismo, proponemos que un sistema TGF $\beta$ 1 más fuerte en hipófisis de machos podría estar protegiendo a este sexo de una del desarrollo de un prolactinoma en este modelo experimental.

## CONCLUSIÓN I

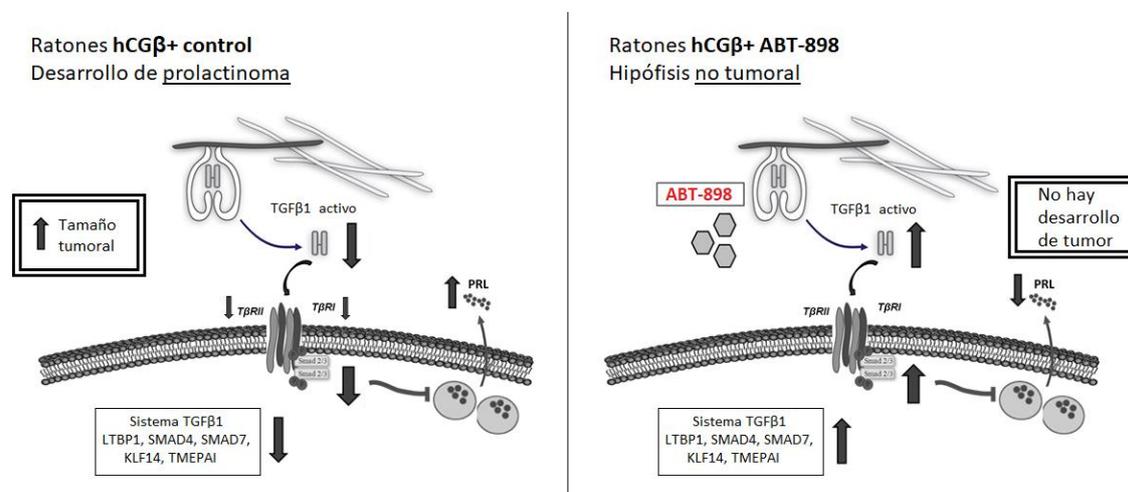
Como conclusión de este capítulo, los resultados demuestran que una disminución en la expresión hipofisaria del sistema TGF $\beta$ 1 se encuentra involucrada en el desarrollo de un prolactinoma en hembras hCG $\beta$ +. Por lo tanto, postulamos que la recuperación de la actividad local de la citoquina revertiría el crecimiento tumoral. Comprobamos nuestra hipótesis mediante un tratamiento *in vivo* con un análogo de TSP1 (activador local de TGF $\beta$ 1), donde demostramos que la recuperación de TGF $\beta$ 1 activo en hipófisis de hembras transgénicas hCG $\beta$ + revierte el desarrollo tumoral y normaliza los niveles de

PRL séricos. Por último, dadas las diferencias sexuales observadas en la expresión de este sistema, que presenta mayores niveles de expresión en hipófisis de machos respecto de las hembras, postulamos que un sistema TGFβ1 más fuerte en hipófisis de machos podría estar protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinoma.

**Tabla 1.1. Resumen de los resultados obtenidos al evaluar la expresión hipofisaria de los componentes del sistema TGFβ1 en ratones hCGβ adultos de ambos sexos y genotipos.**

Componente	Hembras (♀)	Hembras vs. Machos (♀ vs. ♂)
TGFβ1 activo	wt > hCGβ+	♀ << ♂
TGFβ1 total	wt > hCGβ+	♀ << ♂
KLF14	wt > hCGβ+	♀ << ♂
TMEPAI	wt > hCGβ+	♀ << ♂
TβRII	wt > hCGβ+	♀ << ♂
ALK5	wt > hCGβ+	♀ << ♂
SMAD4	wt > hCGβ+	♀ << ♂
SMAD7	wt > hCGβ+	♀ << ♂
LTBP1	wt > hCGβ+	♀ << ♂
LTBP3	wt = hCGβ+	♀ << ♂

**Figura 1.16. Esquema de los resultados obtenidos para el sistema TGFβ1 con el tratamiento *in vivo* con ABT-898 en hembras hCGβ+ de 6 meses de edad. A)** Los componentes del sistema TGFβ1 hipofisarios se encuentran disminuidos en los prolactinomas: menores niveles TGFβ1 activo, de la expresión de sus receptores, de las proteínas de latencia, de sus activadores locales. La baja expresión y función de este sistema inhibitorio induce un aumento en la proliferación de los lactotropos y la secreción de prolactina: prolactinoma. **B)** Un tratamiento con ABT-898, análogo de TSP1, logra recuperar los niveles locales de TGFβ1 activo y la expresión de la mayoría de los componentes del sistema. Se recupera la función inhibitoria de TGFβ1, disminuye significativamente la proliferación celular y la hiperprolactinemia.



## CAPÍTULO II: SISTEMA ACTIVINAS-INHIBINAS HIPOFISARIO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA. DIFERENCIAS SEXUALES

### INTRODUCCIÓN

#### ACTIVINAS E INHIBINAS: MIEMBROS DE LA FAMILIA TGF $\beta$

La inhibinas fueron descritas inicialmente por Mottram y Cramer en el año 1923 como factores solubles secretados por los testículos capaces de regular las funciones hipofisarias (Mottram JC, 1923). Sin embargo, su nombre tal y como lo conocemos hoy fue introducido en la literatura recién en el año 1932 por D. Roy McCullagh (McCullagh, 1932). Finalmente, el aislamiento y purificación de la molécula de inhibina fue realizado a fines de la década del '80 junto a la purificación de la molécula de activina, en fracciones eluidas de fluido folicular porcino. En ambos casos, los nombres describen la capacidad de estas moléculas de estimular (activina) e inhibir (inhibina) la secreción de FSH *in vitro* por parte de gonadotropos hipofisarios (Keogh et al., 1976);(Rivier, Spiess, McClintock, Vaughan, & Vale, 1985);(Ling et al., 1985);(K. Miyamoto et al., 1985);(W Vale et al., 1986);(Ling et al., 1986);(Mason, Berkemeier, Schmelzer, & Schwall, 1989).

Las activinas e inhibinas son compuestos diméricos que pertenecen a la familia TGF $\beta$  y, como tales, intervienen en diversos procesos fisiológicos, siendo vitales para el desarrollo, el crecimiento y la integridad funcional de muchos tejidos, incluyendo el tejido hipofisario. Ha sido descrito, que perturbaciones o disrupciones en su funcionalidad pueden dar origen al desarrollo de tumores endocrinos y neuroendocrinos (Louise M Bilezikjian et al., 2004);(Risbridger, Schmitt, & Robertson, 2001);(Namwanje & Brown, 2016).

#### SÍNTESIS Y SECRECIÓN

Las activinas son homodímeros de subunidades beta ( $\beta$ ). Actualmente, han sido descritas cuatro variedades  $\beta$  en mamíferos denominadas  $\beta$ A,  $\beta$ B,  $\beta$ C y  $\beta$ E y una quinta variedad, encontrada solo en *Xenopus*, denominada  $\beta$ D (Oda, Nishimatsu, Murakami, & Ueno, 1995). Si bien todas las subunidades

conservan una elevada homología estructural, cada subunidad es producto de un único gen (Wada, Medina, Kuwano, & Kojima, 2005).

A la fecha, las activinas más estudiadas son aquellas que se producen por homodimerización de las subunidades  $\beta A$  y  $\beta B$ , denominadas activinas A y B, respectivamente. Estos homodímeros forman la mayor parte de las activinas producidas por el organismo y su deficiencia ha sido relacionada con defectos en el desarrollo gonadal y la esteroidogénesis, así como también con anomalías en la proliferación de islotes pancreáticos (Sun, Li, & Zhang, 2010);(Mendis, Meachem, Sarraj, & Loveland, 2011);(Shelling, 2012);(Bonomi et al., 2012);(M'baye, Hua, Khan, & Yang, 2015).

Por otro lado, los dímeros que contienen las subunidades  $\beta C$  y  $\beta E$  son los menos frecuentes y los ratones con delección funcional de los genes correspondientes a dichas subunidades  $\beta$  no presentaron defectos en su desarrollo y resultaron fenotípicamente normales (Lau, Kumar, Nishimori, Bonadio, & Matzuk, 2000). Ha sido descrito que estas subunidades  $\beta C$  y  $\beta E$  forman homo y heterodímeros cuyas funciones principales se relacionan con la inducción del mesodermo, la insulino-resistencia y el desarrollo prostático (Risbridger et al., 2001);(Ottley et al., 2017);(Sugiyama et al., 2018).

Como mencionamos previamente, las inhibinas son también moléculas dimericas. Sin embargo, a pesar de que comparten las subunidades  $\beta$  con las activinas, son los únicos miembros de la familia TGF $\beta$  compuestos por dos subunidades distintas, una subunidad  $\beta$  ( $\beta A$  o  $\beta B$ ) y otra subunidad denominada alfa ( $\alpha$ ). Su dimerización da como resultado dos heterodímeros comúnmente denominados inhibina A ( $\alpha$ - $\beta A$ ) e inhibina B ( $\alpha$ - $\beta B$ ) (Makanji et al., 2014). Alteraciones en el gen que codifica para esta subunidad  $\alpha$  (*Inha*) han sido asociadas con infertilidad masculina, fallas ováricas prematuras y problemas durante el proceso de implantación (Myers, Middlebrook, Matzuk, & Pangas, 2009);(Shelling, 2012);(Manzoor et al., 2012);(Silveira, Rezende, Ferreira, Del Puerto, & Reis, 2017).

Al igual que otros miembros de la familia TGF $\beta$ , las subunidades que conforman a los dímeros de activinas e inhibinas son sintetizadas como precursores inactivos compuestos por un pro-péptido asociado a un pro-dominio, formando una pro-proteína (pro-proteína  $\alpha$ ,  $\beta A$  y  $\beta B$ ). Estas pro-

proteínas forman homo o heterodímeros mediante la interacción de los prodominios, cuya función principal es brindar estabilidad en el plegamiento y un correcto ensamblaje (Namwanje & Brown, 2016).

Los pro-dominios correspondientes a las pro-proteínas  $\beta$ , son clivados por enzimas tipo convertasa dentro de la célula y, al igual que ocurre con TGF $\beta$ 1, se mantienen unidos al péptido maduro mediante uniones no covalentes (Antenos et al., 2011). Sin embargo, la unión a este pro-dominio, a diferencia de lo que ocurre con TGF $\beta$ 1, no le brinda latencia al péptido maduro sino que, una vez secretado a la MEC favorece su anclaje a proteínas ubicadas en dicha matriz y lo protege ante posibles degradaciones (S. Li et al., 2010). Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con las pro-proteínas  $\beta$ , los pro-propéptidos  $\alpha$  pueden ser secretados a la MEC sin ser clivados de su pro-dominio y ser, a pesar de ello, correctamente funcionales (Mason, Farnworth, & Sullivan, 1996). Por lo tanto, al finalizar el proceso de secreción, tanto las activinas como las inhibinas son moléculas biológicamente activas (Harrison, Al-Musawi, & Walton, 2011).

A lo largo de esta tesis nos centramos en las funciones de las subunidades originadas por las pro-proteínas  $\alpha$ ,  $\beta$ A y  $\beta$ B, cada una de ellas codificadas los genes *InhA* (Inhibina  $\alpha$ ), *Inhba* ( $\beta$ A) e *Inhbb* ( $\beta$ B) (Barton, Yang-Feng, Mason, Seeburg, & Francke, 1989). Figura 2.1

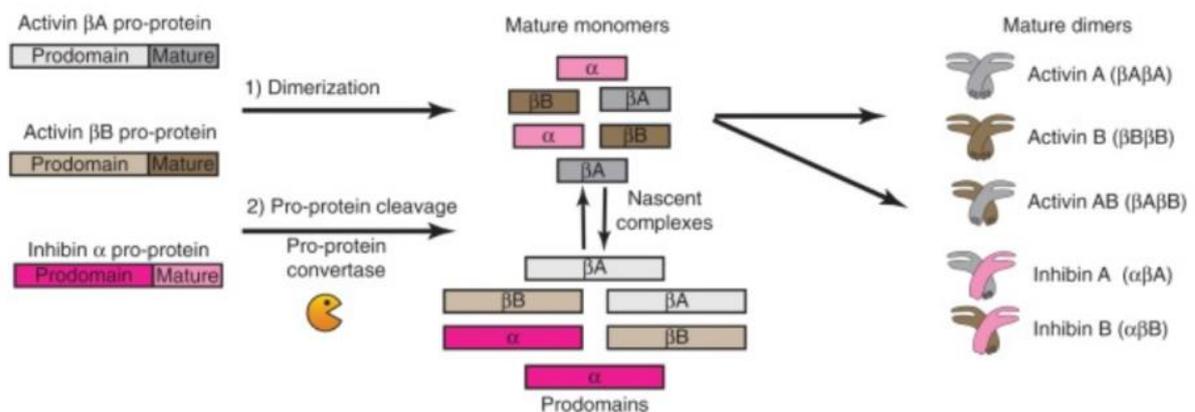


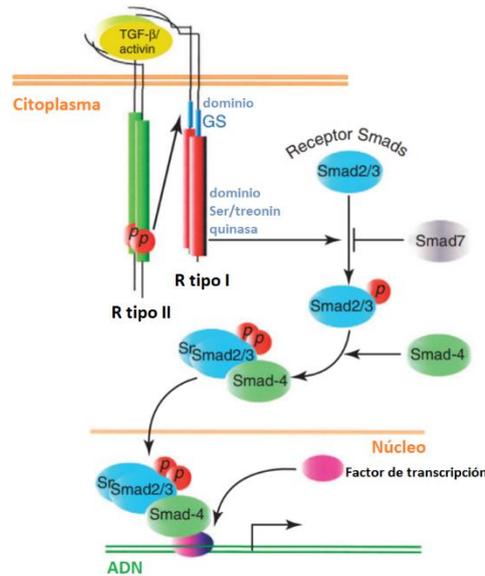
Figura 2.1. Representación esquemática de la síntesis de activinas e inhibinas. Imagen tomada y modificada de Namwanje et al. (Namwanje & Brown, 2016).

## **ACTIVINAS: RECEPTORES Y EFECTORES INTRACELULARES**

Al igual que otros miembros de la familia TGF $\beta$ , las activinas al unirse a sus receptores de membrana, inducen una cascada de señales dentro de la célula mediante un complejo hetero-oligomérico de receptores serin/treonin quinasas y proteínas SMAD intracelulares (Liliana Attisano & Wrana, 2002). Los receptores que interactúan con estas moléculas se encuentran en la superficie celular y se denominan receptores de tipo 2 y receptores de tipo 1 (Massague, 1998);(J. J. Lebrun, Takabe, Chen, & Vale, 1999).

Existen dos tipos de receptores de activinas de tipo 2 que se expresan en hipófisis: ActRII (también conocido como ActRIIA) y ActRIIB, codificados por los genes *Acvr2* y *Acvr2b*, respectivamente (Wrana et al., 1992);(Cameron et al., 1994). La unión de las activinas al receptor de tipo 2 induce el reclutamiento y fosforilación del receptor de tipo 1: ActRIB (también conocido como ALK4), provocando su activación. Este receptor, una vez activo, fosforila y activa a los factores de transcripción intracelulares citoplasmáticos SMAD2 y SMAD3, que se unirán finalmente a la proteína SMAD4 dando como resultado un complejo heteromérico que transloca al núcleo y regula de este modo la transcripción génica (Figura 2.2) (Wrana et al., 1992);(Namwanje & Brown, 2016). Si bien las activinas son capaces de unirse a ambos receptores de tipo 2, se ha reportado que la afinidad por el ActRIIB es de 3 a 4 veces mayor respecto del receptor ActRIIA (L Attisano, Wrana, Cheifetz, & Massague, 1992);(Alexander, Bikkal, Zervas, Laws, & Klibanski, 1996).

A pesar de que ActRIB ha sido descrito como el principal receptor de activinas de tipo 1, existen trabajos que sugieren que las activinas B y AB señalarían preferentemente a través del ActRIC (también conocido como ALK7) (Bernard, Lee, & Santos, 2006), un receptor de tipo 1 conocido principalmente por su expresión en tejidos neuroendocrinos, como ser los islotes pancreáticos (Tsuchida et al., 2004).



**Figura 2.2. Representación esquemática de la señalización SMAD-dependiente compartida entre TGFβ1 y activinas.** Imagen tomada y modificada de (Krieglstein, Zheng, Unsicker, & Alzheimer, 2011).

La vía de señalización de SMAD2/3 posee un mecanismo interno de modulación negativa. Una vez fosforiladas las proteínas SMAD2/3, inducen la activación del promotor de una SMAD inhibitoria denominada SMAD7, promoviendo su expresión (Itoh, Itoh, Goumans, & Ten Dijke, 2000);(Shi & Massague, 2003). En consecuencia, SMAD7 se asocia de modo transitorio con el receptor de tipo 1 fosforilado involucrado en la vía (ALK5 o ALK4) atenuando la acción del ligando y, a su vez, la activación de SMAD2/3 (J. J. Lebrun et al., 1999).

El receptor de activinas tipo 1B, ActR1B, actúa en hipófisis estimulando la síntesis y secreción de FSH en gonadotropos e inhibiendo la de PRL en lactotropos. En ambos casos, el mecanismo de acción se inicia con la unión de activinas al receptor ActR1A ó ActR1B, Se ha demostrado que las activinas señalizan preferentemente a través de pSMAD3 y que la unión de activina B utilizaría también en su señalización al receptor de tipo 1 ActR1C en gonadotropos (Shimizu et al., 1998);(Tsuchida et al., 2004).

En este contexto es interesante mencionar que, si bien la regulación por activinas en ambos tipos celulares hipofisarios son dependientes de la activación de ActR1B, estudios demuestran que la respuesta celular específica

se encuentra determinada por los receptores de tipo 2 presentes en el complejo heteromérico reclutado por activinas en membrana celular (Suszko & Woodruff, 2006);(Olsen et al., 2015).

En lactotrofos la unión de Activina A al receptor ActRIIA inhibe la secreción de PRL y disminuye el número de lactotrofos en hipófisis (S. Miyamoto et al., 1999). En cambio, en gonadotrofos, la Activina B es el principal regulador de la producción de FSH y puede unir tanto a ActRIIA como ActRIIB y activar ambos receptores de tipo 1: ActRIB y ActRIC (Tsuchida et al., 2004);(Bernard et al., 2006). Por otro lado, si bien el rol de Activina A no sería determinante en la síntesis de FSH, ésta participaría en el aumento de la secreción de FSH y el número de gonadotrofos FSH positivos (S. Miyamoto et al., 1999);(Bernard et al., 2006) así como también en la estimulación de la producción hipotalámica de GnRH y la expresión hipofisaria de su receptor (GnRHR) (Kumar, Agno, Janovick, Conn, & Matzuk, 2003).

---

## **ANTAGONISMO POR PROTEÍNAS DE UNIÓN**

Las acciones de las activinas son moduladas mediante un grupo de proteínas de unión o antagonistas, cuya función es limitar el acceso de ligando a sus receptores ubicados en la membrana celular (Phillips, 2001). Folistatina (FST) es uno de los antagonistas funcionales de activinas y de otros miembros de la familia TGF $\beta$ , como BMP2, 4, 6 y 7, entre otros. Sin embargo, la afinidad de FST es máxima con el homodímero de activina y su unión es específica y de tipo irreversible (Glistler, Kemp, & Knight, 2004);(Thompson, Lerch, Cook, Woodruff, & Jardetzky, 2005).

Folistatina es una proteína monomérica y glicosilada, originalmente extraída de fluido folicular ovárico e inicialmente descrita por su capacidad de inhibir la biosíntesis y secreción de FSH por parte de las células gonadotropas de la hipófisis (Esch et al., 1987). Esta glicoproteína posee tres isoformas que difieren en la cantidad de aminoácidos que las conforman debido a variaciones en el procesamiento post-traducciona del extremo carboxilo terminal. La isoformas se denominan FST315, FST303 y FST288 ya que están compuestas por 315, 303 y 288 aminoácidos respectivamente (Shimasaki et al., 1988);(K. Sugino et al., 1993).

Las tres isoformas de FST poseen una afinidad diferencial por los proteoglicanos ubicados en la superficie celular como consecuencia de las modificaciones que poseen en su extremo carboxilo terminal (Lerch, Shimasaki, Woodruff, & Jardetzky, 2007). La mayor afinidad a los proteoglicanos de la superficie celular la posee la isoforma más corta, FST 288, característica que le permite concentrarse por fuera de la membrana plasmática de las células y prevenir la potencial acción autocrina y paracrina de las activinas (C. Welt, Sidis, Keutmann, & Schneyer, 2002). Por el contrario, la isoforma más larga, FST 315, es la de menor afinidad (casi nula) por dichos proteoglicanos y, por esta razón, se la localiza principalmente en circulación (H. Sugino, Sugino, Hashimoto, Shoji, & Nakamura, 1997);(Alan L Schneyer, Wang, Sidis, & Sluss, 2004);(Sepporta et al., 2013).

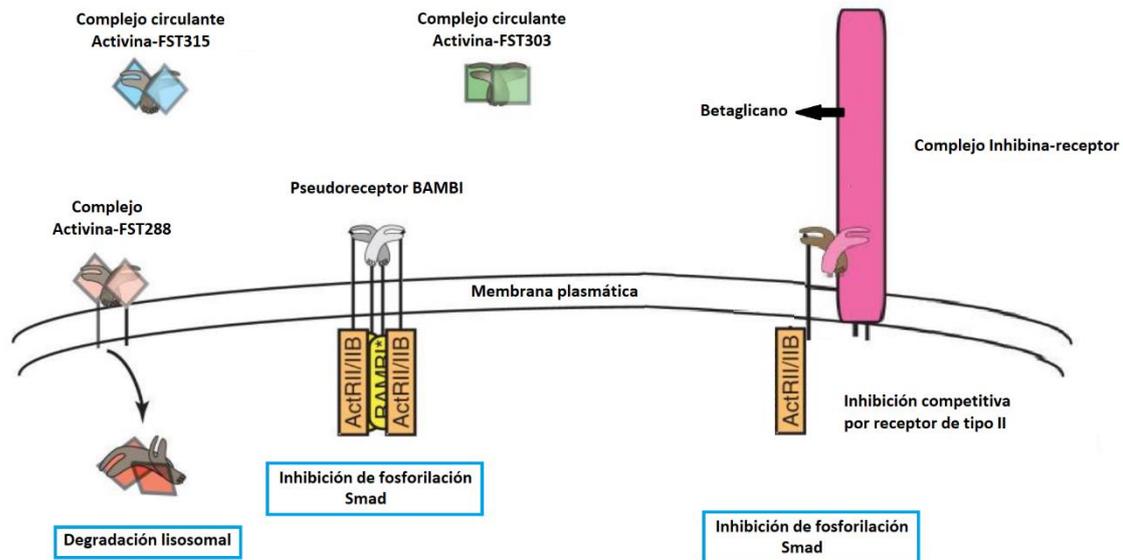
Se ha descrito que, si bien folistatina es capaz de unir activinas A y B, la afinidad por la activina B es diez veces menor respecto de la unión que se establece con las activinas A (A. Schneyer, Schoen, Quigg, & Sidis, 2003);(Walton, Makanji, & Harrison, 2012) Figura 2.3.

---

### **INHIBINAS: MECANISMO DE ACCIÓN Y ANTAGONISMO**

A pesar de que las vías de transducción de señales de las activinas han sido profundamente estudiadas, los mecanismos antagónicos de las inhibinas continúan siendo un área de intensa investigación. Se han propuesto muchos modelos y, entre ellos, el más simple sugiere que la habilidad de las inhibinas de antagonizar los efectos de las activinas es mediante la proporción disponible de subunidades  $\alpha$  en las células y su asociación preferencial con las subunidades  $\beta$  para formar heterodímeros  $\alpha\beta$  en lugar de homodímeros  $\beta\beta$ . Sin embargo, hoy se conoce que los mecanismos antagónicos son más complejos e involucran la interacción de la subunidad  $\beta$  de las inhibinas con los receptores de tipo 2 de activina. A diferencia del primero, este modelo propone un antagonismo funcional de las inhibinas, en donde se genera una competencia entre éstas y las moléculas de activina por la unión a los receptores de membrana ActRII y ActRIIB (J. J. Lebrun & Vale, 1997);(Donaldson, Vaughan, Corrigan, Fischer, & Vale, 1999);(Gray et al., 2000). Como la afinidad de unión de las inhibinas a los receptores de tipo 2 es muy baja, se ha demostrado que

en este tipo de inhibición interviene una proteína denominada betaglicano, también conocida receptor de TGF $\beta$  tipo III (Figura 2.4). A pesar de que muchos tipos celulares hipofisarios expresan betaglicano, ha sido descrito que sólo los gonadotropos poseen una sensibilidad elevada a la presencia de inhibinas (Louise M Bilezikjian, Justice, Blackler, Wiater, & Vale, 2012).



**Figura 2.4. Representación esquemática de la regulación en la señalización de activinas.** Imagen tomada y modificada de (Namwanje & Brown, 2016).

## ACTIVINAS E INHIBINAS EN HIPÓFISIS

Como mencionamos previamente, el origen de las inhibinas es principalmente gonadal y, desde su descubrimiento, fueron consideradas factores endocrinos debido a su capacidad de regular funciones hipofisarias, tal como la inhibición que ejercen sobre la síntesis y secreción de FSH por parte de los gonadotropos (Louise M Bilezikjian et al., 2004);(Andreone et al., 2009). En el ovario, las células de la granulosa y el cuerpo lúteo son los principales responsables de la síntesis de inhibinas, siendo FSH el principal regulador de su producción, seguido de factores como IGF-1, activina A, TGF $\beta$ , entre otros (Zhang, Carson, Herington, Lee, & Burger, 1987);(Fraser & Lunn, 1993);(Lanuza, Groome, Barañao, & Campo, 1999);(C. K. Welt & Schneyer, 2001). Asimismo, la LH ejerce un efecto estimulador sobre la producción de inhibina sobre el cuerpo lúteo (Tsonis, Hillier, & Baird, 1987).

Las activinas, por el contrario, fueron consideradas factores predominantemente autocrinos o paracrinos debido a que su expresión ha sido descrita en numerosos tejidos y sólo se la encuentra en circulación asociada a dos moléculas de folistatina (antagonista funcional) (A L Schneyer, Rzucidlo, Sluss, & Crowley, 1994);(C. Welt et al., 2002);(Refaat, 2014). En hipófisis, las funciones más conocidas de las activinas son la estimulación de la síntesis de FSH por parte de los gonadotropos hipofisarios, la inhibición de la síntesis de GH y ACTH, en los somatotropos y corticotropos, respectivamente (L M Bilezikjian et al., 2001) y la modulación de la síntesis y secreción de PRL en los lactotropos hipofisarios (Lacerte et al., 2004).

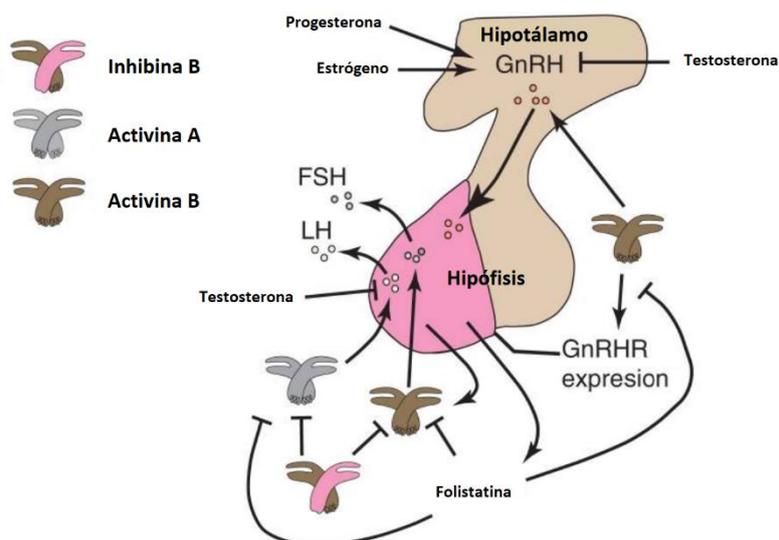
En hipófisis, las subunidades  $\alpha$  fueron detectadas solo en gonadotropos positivos para FSH, mientras que las subunidades  $\beta A$  fueron localizadas además en somatotropos (productores de GH) y lactotropos (productores de PRL). Por otro lado, la subunidad  $\beta B$  fue encontrada en gonadotropos positivos para FSH, tirotropos (productores de TSH) y también en algunos gonadotropos positivos para LH (V. J. Roberts, Peto, Vale, & Sawchenko, 1992);(Uccella, La Rosa, Genasetti, & Capella, 2000).

La localización exclusiva de la subunidad  $\alpha$  en gonadotropos sugiere que la regulación de su síntesis se encuentra íntimamente relacionada a factores reguladores de este tipo celular. Por otro lado, la localización de la subunidad  $\beta A$  (somatotropos y lactotropos hipofisarios) podría indicar que, factores que regulan la función de estos tipos celulares podrían afectar la síntesis de las activinas A (Kitaoka, Kojima, & Ogata, 1988);(Mather, Woodruff, & Krummen, 1992). Ambas son proteínas que se secretan a MEC y pueden potencialmente ejercer efectos autocrinos y paracrinos.

En gonadotropos la síntesis y secreción de LH y FSH se encuentra regulada principalmente por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) producida en el hipotálamo. Como mencionamos en la introducción general, FSH y LH comparten la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas y, por lo tanto, la regulación específica de cada gonadotropina dependerá de la regulación que exista sobre el gen que codifica para las subunidades beta específicas (FSH $\beta$  y LH $\beta$ ). Se ha descrito que la modulación de dichas subunidades beta está relacionada con las frecuencias pulsátiles de GnRH, siendo una frecuencia alta

de pulsos de GnRH la responsable de una máxima expresión del receptor de GnRH (GnRHR), promoviendo al mismo tiempo niveles elevados de subunidad  $\alpha$  y LH $\beta$ ; mientras que una baja frecuencia de pulsos de GnRH induce una disminución en la expresión de GnRHR y, en consecuencia, un aumento en la síntesis de FSH $\beta$  (Kaiser, Sabbagh, Katzenellenbogen, Conn, & Chin, 1995);(Shacham et al., 2001).

Además de la regulación por GnRH, la síntesis de FSH $\beta$  y LH $\beta$  se encuentra influenciada por hormonas de origen gonadal que actúan de manera endocrina (inhibinas, estrógeno, progesterona y testosterona) y por activinas y folistatinas de producción local hipofisaria (Namwanje & Brown, 2016). La folistatina sintetizada localmente por los gonadotropos y las células foliculoestrelladas, disminuyen la disponibilidad biológica de las activinas, frenando su estimulación en la síntesis y secreción de FSH por parte de los gonadotropos (Kaiser et al., 1992). Por otro lado, la activina B estimula la producción de FSH inducida por GnRH, mientras que la activina A estimula la producción de LH, proceso que es, a su vez, antagonizado por la presencia de testosterona (Wylie Vale et al., 2004). Figura 2.5.



**Figura 2.5. Representación esquemática de la regulación de la síntesis de gonadotropinas en gonadotropos.** Imagen tomada y modificada de (Namwanje & Brown, 2016).

Ha sido reportado que, en lactotropos, las activinas vía pSMAD2/3 modulan la expresión de PRL influenciando la transcripción de pit-1 a través de la vía de señalización de p38 y MAP quinasas (Lacerte et al., 2004). Pit-1 es un factor de transcripción esencial para el mantenimiento y desarrollo de las células lactotropas hipofisarias. Este factor regula, durante la embriogénesis, la expresión hipofisaria de los genes que codifican para la subunidad beta de TSH, GH y PRL, regulando así estos linajes celulares (de Guise et al., 2006).

Además, para nuestro interés, ha sido descrito que la acción de las activinas previene el desarrollo de un prolactinoma mediante un mecanismo que involucra a la proteína SMAD3 y al supresor tumoral menina (Lacerte et al., 2004);(J.-J. Lebrun, 2009).

---

### **MENINA, SUPRESOR TUMORAL EN HIPÓFISIS**

Menina, es una proteína comúnmente conocida por su implicancia en las neoplasias endocrinas múltiples de tipo 1, MEN1 (por Multiple Endocrine Neoplasia Type 1), un síndrome autosómico dominante hereditario, cuyas principales manifestaciones son el hiperparatiroidismo y el desarrollo de adenomas adenohipofisarios, principalmente prolactinomas (Vinik, Perry, Hughes, & Feliberti, 2000). Menina es una proteína que se encuentra involucrada en múltiples funciones: es un regulador transcripcional, colabora en la dinámica funcional de la cromatina y es considerada un supresor tumoral debido a su intervención en el control del ciclo celular (Lairmore & Chen, 2009);(Ivo, Corset, Desbourdes, Gaudray, & Weber, 2011).

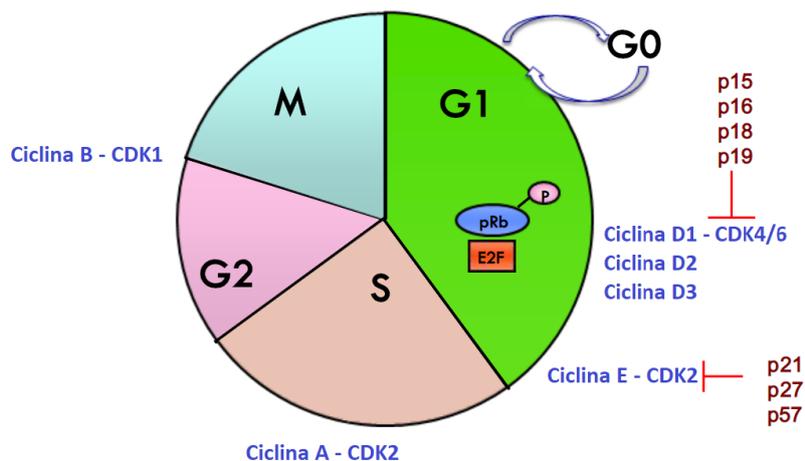
En hipófisis, tanto TGF $\beta$ 1 como activina inducen la fosforilación de SMAD3, el cual se acopla a menina y SMAD4, formando un complejo que trasloca al núcleo donde regula la expresión de genes blanco relacionados, entre otras cosas, con la apoptosis y la reparación del ADN (Hendy, Kaji, Sowa, Lebrun, & Canaff, 2005);(Matkar, Thiel, & Hua, 2013);(Ehrlich et al., 2017).

Si bien el rol de menina en el desarrollo tumoral no está del todo dilucidado, se ha descrito que su expresión se encuentra disminuida en diversos adenomas hipofisarios (Theodoropoulou et al., 2004)(J.-J. Lebrun, 2009).

Menina es un regulador directo de las proteínas CDKN1B (p27) y CDKN2C (p18) ambos inhibidores de quinasa dependientes de ciclina y reguladores de la

fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb) (Balasubramanian & Scacheri, 2009).

Existen dos familias de inhibidores de quinasa dependientes de ciclina: la familia INK a la cual pertenecen p18 y CDKN2B (p15) y la familia WAF/KIP dentro de la cual se encuentra la proteína p27. Si bien ambas familias inhiben el ciclo celular, su mecanismo de acción difiere: mientras las proteínas INK unen a las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 y previenen la fosforilación de Rb inhibiendo la progresión de G1/S, las proteínas de la familia KIP forman complejos heterodiméricos con las quinasas dependientes de ciclinas del G1/S e impiden la activación de los complejos ciclina E/Cdk2 o ciclina D/Cdk4, arrojando a la célula en la fase G1 del ciclo celular (Marinoni & Pellegata, 2011);(Taguchi et al., 2011). (Figura 2.6).



**Figura 2.6. Representación esquemática de la regulación los inhibidores de las familias INK y KIP en la progresión del ciclo celular.** Imagen tomada y modificada de sitio web UCL cancer institute.

## OBJETIVO II

En base a los antecedentes mencionados y ante la evidencia de que existe una marcada diferencia sexual en el sistema TGF $\beta$ 1 hipofisario tanto en los ratones hCG $\beta$  como en ratones Drd2<sup>-/-</sup>, y que dicho sistema se encuentra muy involucrado en el desarrollo de un prolactinoma, nos propusimos estudiar la expresión hipofisaria de los componentes del sistema activinas e inhibinas, dos miembros de la familia TGF $\beta$ , y su relación con el desarrollo tumoral en ambos modelos experimentales de prolactinoma, así como también las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo.

---

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estudiar la expresión de los distintos componentes del sistema activinas-inhibinas hipofisario (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ A y  $\beta$ B, receptores, antagonistas y proteínas de unión, efectores intracelulares) comparativamente entre genotipos en ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup>.
- ❖ Evaluar las diferencias sexuales en el desarrollo de un prolactinoma en ambos modelos experimentales: ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup>.

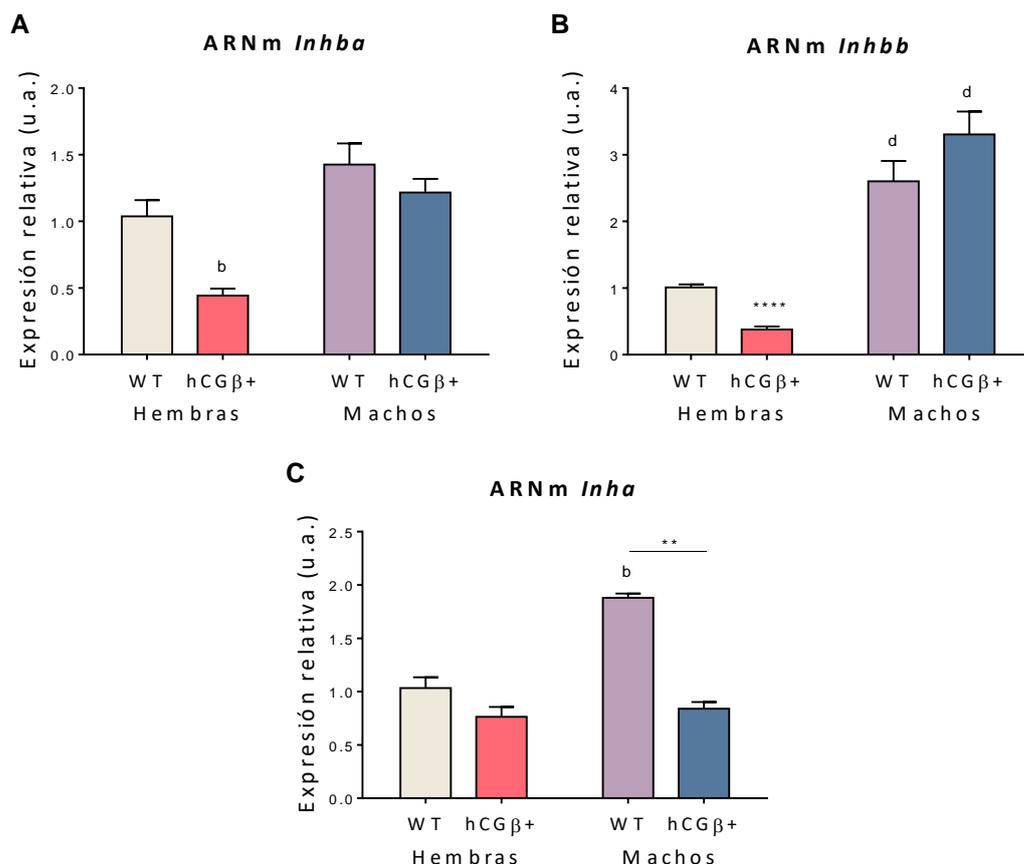
## RESULTADOS II

### EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ , $\beta$ A Y $\beta$ B EN RATONES HCG $\beta$ Y DRD2<sup>-/-</sup>

Con el objetivo de estudiar la producción de activinas e inhibinas hipofisarias, comenzamos evaluando por PCR cuantitativa en tiempo real los niveles de expresión relativa de los ARNm de las tres subunidades que componen a la activina A (*Inhba*), activina B (*Inhbb*), inhibina A (*Inha-Inhba*) e inhibina B (*Inha-Inhbb*) en hipófisis de ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> de ambos sexos y genotipos a los 6 y 8 meses de edad respectivamente.

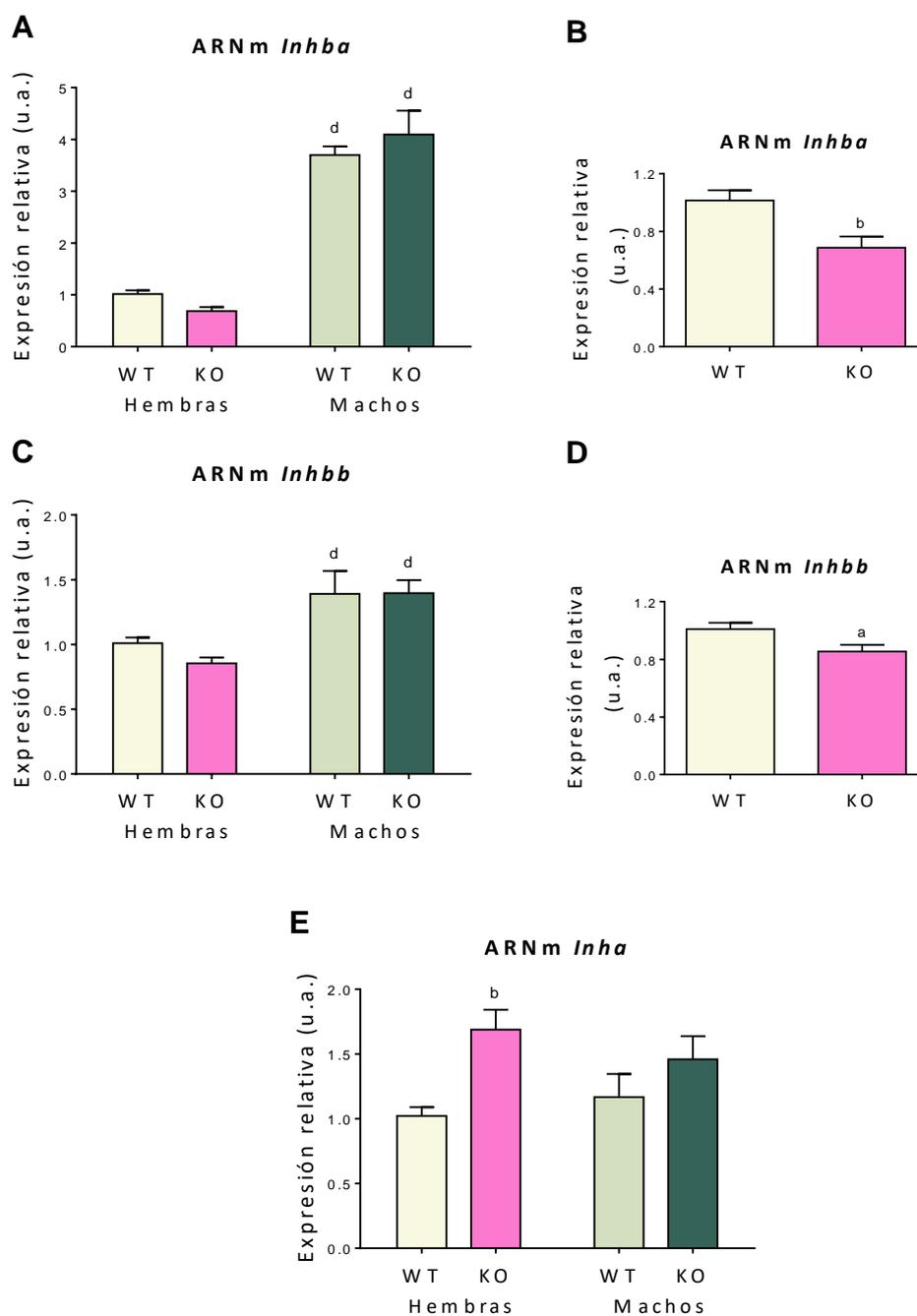
En el modelo de ratones hCG $\beta$  encontramos que la expresión hipofisaria de las subunidades  $\beta$ A (*Inhba*) y  $\beta$ B (*Inhbb*) se encuentra disminuida en las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> (prolactinoma) respecto de sus pares wt (Figuras 2.7A y 2.7B, respectivamente). Por otro lado, en la Figura 2.7B podemos observar que la expresión de *Inhbb* se presenta elevada en machos respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos.

Al evaluar la expresión de la subunidad  $\alpha$  (*Inha*) en estos ratones no observamos diferencias entre genotipos en hembras; pero si encontramos diferencias sexuales, siendo la expresión de esta subunidad mucho más elevada en los machos wt respecto de las hembras. Por otro lado, las hipófisis de machos hCG $\beta$ <sup>+</sup> presentan una menor expresión de *Inha* respecto de machos wt, con valores similares a los encontrados en hembras (Figura 2.7C).



**Figura 2.7. Expresión relativa de subunidades *Inhba*, *Inhbb* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en hipófisis de ratones hCGβ de ambos sexos y genotipos.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=8-10/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** *Inhba*. Interacción ns; b, p<0,001 hembras wt vs. hCGβ+. **B)** *Inhbb*. Interacción p<0,0001; \*\*\*\*p<0,0001 hembras wt vs. hCGβ+; d, p<0,0001. **C)** *Inha*. Interacción p=0,0045; b, p<0,01; \*\*p<0,01 machos wt vs. hCGβ+.

Por otro lado, y similar a lo observado en ratones hCGβ, en el modelo de ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> encontramos una expresión hipofisaria significativamente mayor de subunidades *Inhba* e *Inhbb* en machos de ambos genotipos respecto de las hembras (Figura 2.8A y 2.8C, respectivamente). Esta marcada diferencia sexual en la expresión de ambas subunidades no permite evidenciar claramente en un análisis de doble varianza (donde se evalúan en simultáneo las diferencias genotípicas y sexuales) las diferencias de expresión entre genotipos en las hembras. Por este motivo, en las figuras 2.8B y 2.8D analizamos los valores de las hembras, de forma independiente, y evidenciamos una disminución en la expresión de ambas subunidades en hembras ko respecto de sus pares wt.



**Figura 2.8. Expresión relativa de subunidades *Inhba*, *Inhbb* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en hipófisis de ratones *Drd2<sup>-/-</sup>* de ambos sexos y genotipos.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-10/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni (A, C y E) y test de student (B y D). **A)** *Inhba*. Interacción ns; d, p<0,0001. **B)** *Inhba*. P=0,0094, hembras wt vs. ko. **C)** *Inhbb*. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, interacción ns; d, p<0,0001. **D)** *Inhbb*. P= 0,0250 hembras wt vs. ko. **E)** *Inha*. Interacción ns; b, p<0,01 hembras wt vs. ko.

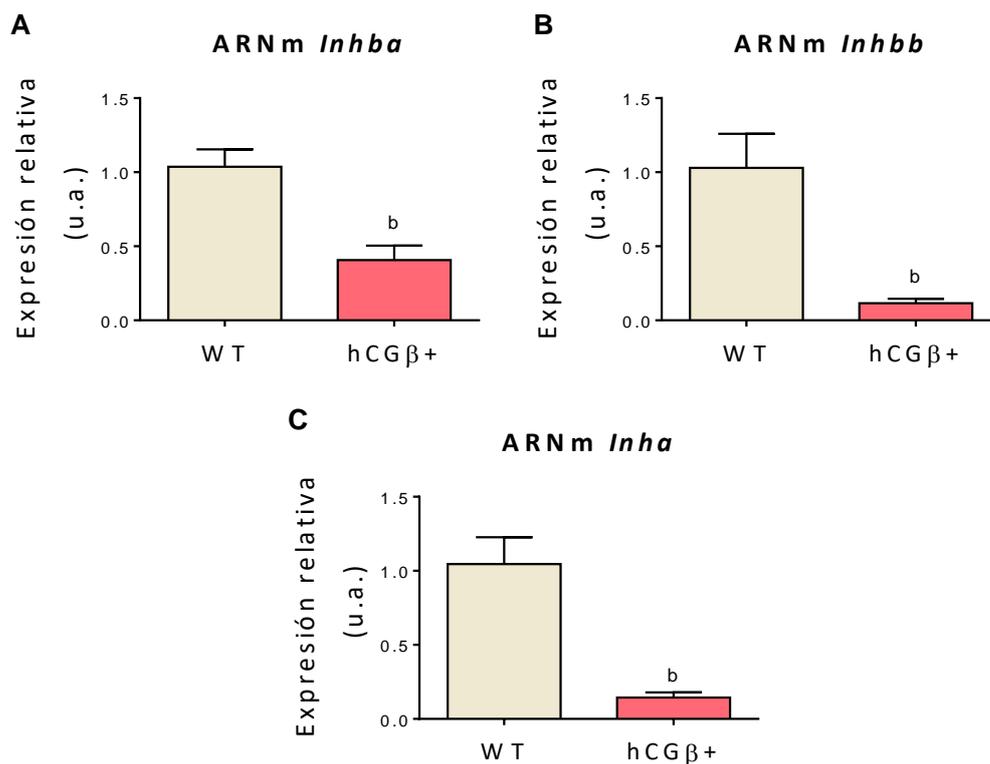
Cuando analizamos la expresión hipofisaria de la subunidad  $\alpha$  (*Inha*) encontramos, a diferencia del modelo hCG $\beta$ , un aumento en la expresión por

parte de las hembras ko respecto de sus pares wt, no observándose diferencias sexuales entre hembras y machos wt ni entre genotipos en machos (Figura 2.8E).

Como mencionamos en la introducción de este capítulo, las inhibinas son principalmente de origen ovárico y su vida media en circulación es de aproximadamente 3-6 minutos para la inhibina A y de 3 minutos para la inhibina B (Makanji et al., 2014). Sin embargo, en nuestros modelos experimentales la función ovárica se encuentra alterada, debido a que los elevados niveles de PRL sérica inhiben a nivel hipotalámico la síntesis y secreción de GnRH, alterando el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal (Grattan, Jasoni, Liu, Anderson, & Herbison, 2007). Además, en ratones hCG $\beta$ , se ha descrito que los elevados niveles circulantes de hCG promueven una luteinización masiva en los ovarios que conlleva elevados niveles séricos de progesterona (Kuorelahti, Rulli, Huhtaniemi, & Poutanen, 2007);(Ahtiainen et al., 2010).

En este contexto, y sabiendo que las inhibinas ováricas han sido descritas como los principales factores antagónicos de la acción de las activinas hipofisarias, quisimos estudiar la producción gonadal de las inhibinas que podría estar alcanzando la glándula hipófisis vía circulación general en nuestros modelos experimentales de prolactinoma. Para ello, evaluamos la expresión ovárica de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ A y  $\beta$ B en hembras de ambos modelos experimentales de prolactinoma: ratones hCG $\beta$  y *Drd2*<sup>-/-</sup> de 6 y 8 meses de edad, respectivamente.

En la Figura 2.9, podemos observar que las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> presentan una disminución significativa en la expresión ovárica de los ARNm correspondientes a las subunidades  $\beta$ A (*Inhba*, figura 2.9A),  $\beta$ B (*Inhbb*, figura 2.9B) y  $\alpha$  (*Inha*, figura 2.9C) respecto de sus pares wt. Estos resultados podrían indicar una disminución global en la producción de las inhibinas ováricas en ratones hembra hCG $\beta$ <sup>+</sup> respecto de sus pares wt.



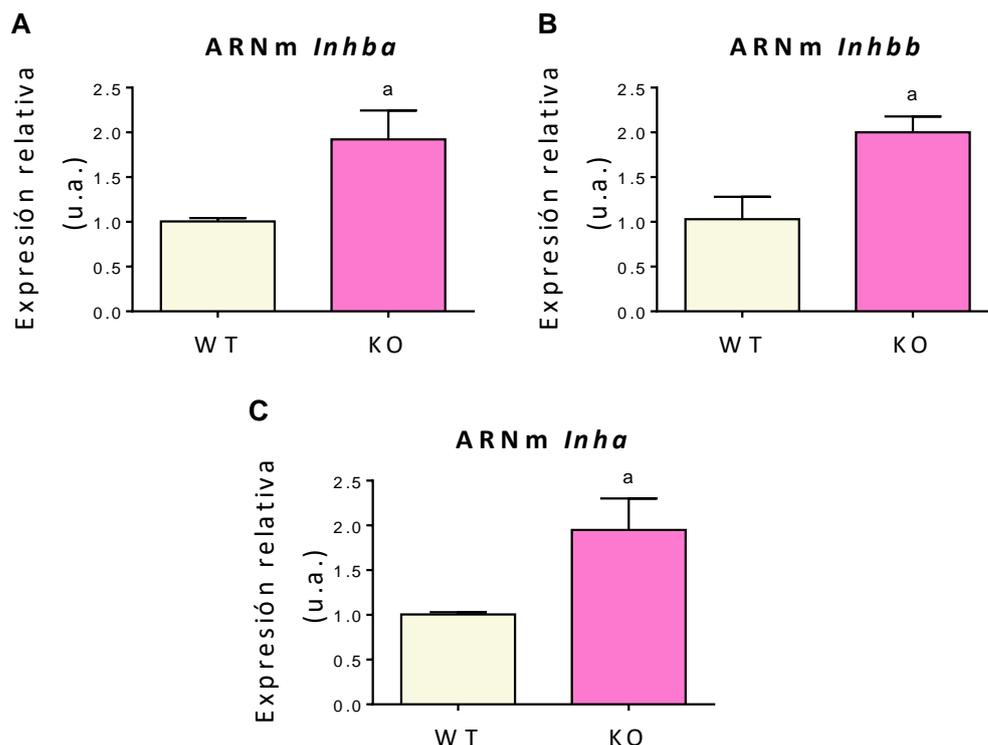
**Figura 2.9. Expresión ovárica de las subunidades *InhbA*, *Inhbb* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hCGβ hembra de 6 meses de edad.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=4/grupo. Análisis estadístico: Test de Student. **A)** *InhbA*. P=0,0021; b, p<0,01 hembras wt vs. hCGβ+. **B)** *Inhbb*. P=0,0035; b, p<0,01 hembras wt vs. hCGβ+. **C)** *Inha*. P=0,0028; b, p<0,01 hembras wt vs. hCGβ+.

Asimismo, pudimos evidenciar mediante técnica de ELISA una ausencia de inhibina A en suero de ratones hembra hCGβ+ a los 6 meses de edad respecto de sus pares wt (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1. Valores de Inhibina A en suero de ratones hembra hCGβ a los 6 meses de edad, medidos por técnica de ELISA.** Datos proporcionados por la Dra. Susana Rulli (grupo colaborador).

Inhibina A (pg/ml)	
wt	hCGβ+
0,657	No detectable
1,104	No detectable
2,358	No detectable
3,087	No detectable
0,8	No detectable
2,12	No detectable

Por el contrario, al evaluar estos parámetros en el modelo de ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> evidenciamos en hembras ko un aumento significativo en la expresión ovárica de todas las subunidades respecto de sus pares wt indicando contrariamente a lo observado en el modelo hCG $\beta$ , una potencial producción elevada de inhibinas en ovarios de ratones ko respecto de sus pares wt (Figura 2.10).

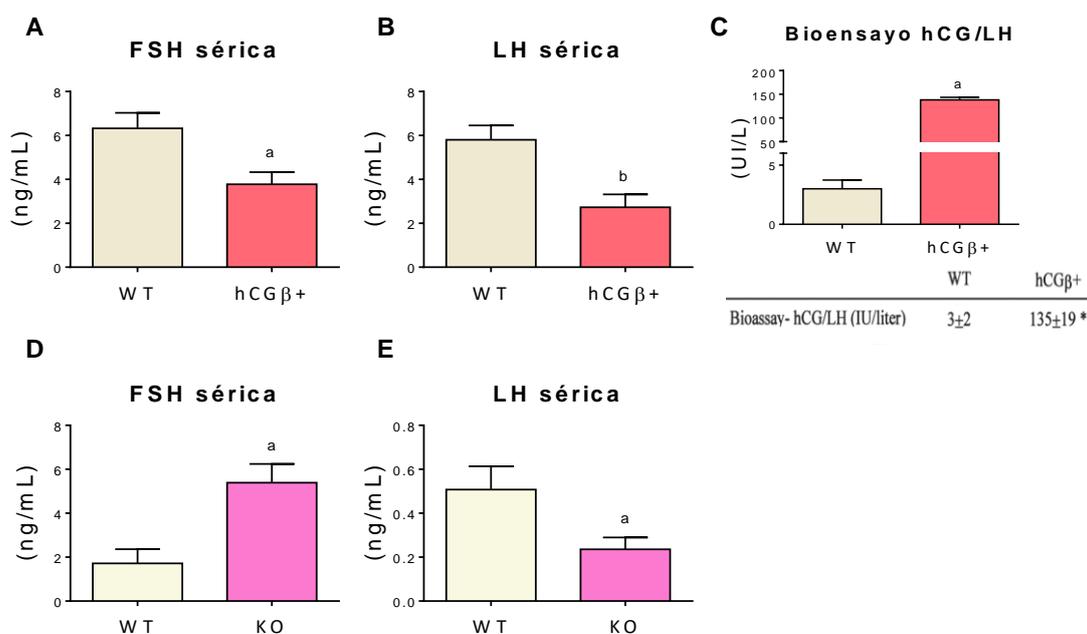


**Figura 2.10. Expresión ovárica de las subunidades *Inhba*, *Inhbb* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> hembra de 6 meses de edad.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=4/grupo. **A)** *Inhba*. Análisis estadístico: Test de Student; p= 0,0301; a, p<0,05 hembras wt vs. ko. **B)** *Inhbb*. Análisis estadístico: Test de Student; p= 0,0346; a, p<0,05 hembras wt vs. ko. **C)** *Inha*. Análisis estadístico: Test de Student; p= 0,0363; a, p<0,05 hembras wt vs. ko.

Dado que la síntesis de inhibinas se encuentra íntimamente relacionada a la producción de gonadotrofinas (especialmente de FSH) estudiamos los niveles séricos de FSH y LH en hembras de ambos genotipos en ambos modelos experimentales y observamos que los perfiles hormonales difieren entre modelos. Mientras los niveles de FSH son menores en hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> (con desarrollo de prolactinoma) respecto de sus pares wt (Figura 2.11A), las hembras ko (con desarrollo de prolactinoma) presentan mayores niveles de

FSH respecto de sus pares wt (Figura 2.11D). Por otro lado, si bien las hembras transgénicas hCG $\beta$ <sup>+</sup> y ko presentan menores niveles de LH en circulación respecto de sus pares wt (Figuras 2.11B y 2.11D, respectivamente), es importante destacar que en el modelo de ratones hCG $\beta$ , la sobreexpresión de hCG posee un impacto de hasta 30 veces el impacto de LH endógena sobre el receptor de LH (Figura 2.11C).

Con estos resultados podemos apreciar que el patrón de expresión que presentan las inhibinas responde a los niveles séricos de FSH en ambos modelos experimentales, y por ello, postulamos que las diferencias encontradas en la expresión de inhibinas entre ambos modelos experimentales podrían deberse, al menos en parte, a las diferencias observadas en los perfiles hormonales de ambos grupos.



**Figura 2.11. Niveles séricos de gonadotropinas en ratones hembra hCG $\beta$  (A y B) y ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> (D y E) analizados por RIA (ng/mL). n=6/grupo. Análisis estadístico: Test de Student **A**) p=0,0296; **B**) p=0,0046; **D**) p=0,0138; **E**) p=0,0447. **C**) Niveles séricos de hCG medidos por bioensayo in vitro en ratones hCG $\beta$  (Unidad Internacional, UI/L). Datos extraídos de Rulli et al. (Rulli et al., 2002). n=6/grupo; a, p<0,05 hembras wt vs. hCG $\beta$ <sup>+</sup>.**

Estos resultados en su conjunto nos muestran una expresión hipofisaria disminuida de los ARNm que codifican para las subunidades que conforman a las activinas A y B (*Inhba* e *Inhbb*) en las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> y ko (ambas con

desarrollo de prolactinoma) respecto de sus pares wt. Siendo las activinas un factor inhibitorio de la función lactotropa, esta disminución en la expresión de activinas hipofisarias encontrada en ambos modelos experimentales podría estar contribuyendo al desarrollo de un prolactinoma en las hembras.

Asimismo, es importante destacar que, en ambos modelos experimentales, la expresión de *Inhba* e *Inhbb* se encontró significativamente elevada en hipófisis de machos de ambos genotipos (sin desarrollo de prolactinoma), sugiriendo una mayor producción local de activinas en las hipófisis de estos animales, que, postulamos, podrían ejercer una protección frente al desarrollo tumoral.

Por otro lado, la mayor expresión de *Inha* observada en hembras ko respecto de sus pares wt, tanto a nivel hipofisario como ovárico, podría sugerir que, en este modelo, estaría relacionada, a los altos niveles circulantes de FSH en este modelo, en el cual habría inhibinas circulantes para contrarrestar el efecto hipofisario de las ya disminuidas activinas. Por otro lado, en hembras hCG $\beta$ +, las disminuidas o indetectables inhibinas podrían sugerir la participación de otros antagonistas en el control de la función de activinas a nivel hipofisario.

---

#### **EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE ANTAGONISTAS FUNCIONALES DE ACTIVINAS: FST Y BETAGLICANO**

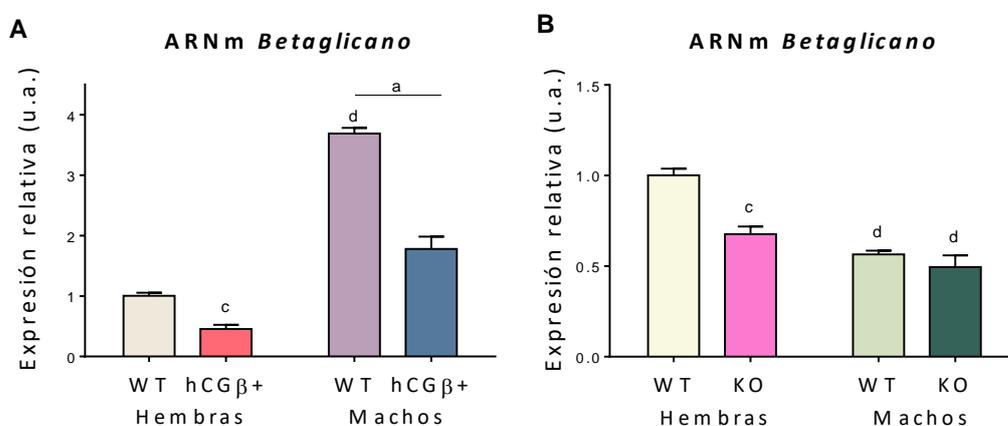
Como mencionamos anteriormente, las acciones de las activinas son moduladas de manera local mediante un grupo de proteínas de unión (folistatinas) y antagonistas (inhibinas) que limitan el acceso de las activinas a sus receptores ubicados en la membrana celular.

Ha sido demostrado que la acción antagónica de las inhibinas depende de la presencia de betaglicano. Esta proteína es un correceptor que se une con una elevada afinidad a la subunidad  $\alpha$  de las inhibinas. Dicha unión aumenta la capacidad de las inhibinas de competir con las activinas por la unión a los receptores tipo 2 (Wiater et al., 2009), previniendo de modo efectivo el reclutamiento del receptor ActRIB y, en consecuencia, la capacidad de las activinas de iniciar una cascada de señalización intracelular (Lewis et al., 2000).

Analizamos en ratones de ambos modelos experimentales, en ambos sexos y genotipos, la expresión relativa hipofisaria del ARNm que codifica para betaglicano, por PCR cuantitativa en tiempo real. En la Figura 2.12A podemos

observar que, en ambos sexos, la expresión se encuentra significativamente disminuida en los grupo transgénicos (hCG $\beta$ +) respecto de sus pares wt y que existe una marcada diferencia sexual donde las hipófisis de los machos de ambos genotipos presentan una mayor expresión respecto de las hembras.

Por otro lado, al analizar el modelo experimental *Drd2*<sup>-/-</sup>, encontramos nuevamente una expresión disminuida de betaglicano en las hembras ko (con desarrollo de prolactinoma) respecto de sus pares wt (Figura 2.12B). Sin embargo, en este modelo experimental, los machos presentaron niveles de expresión disminuida respecto de las hembras wt, sin diferencias entre genotipos.

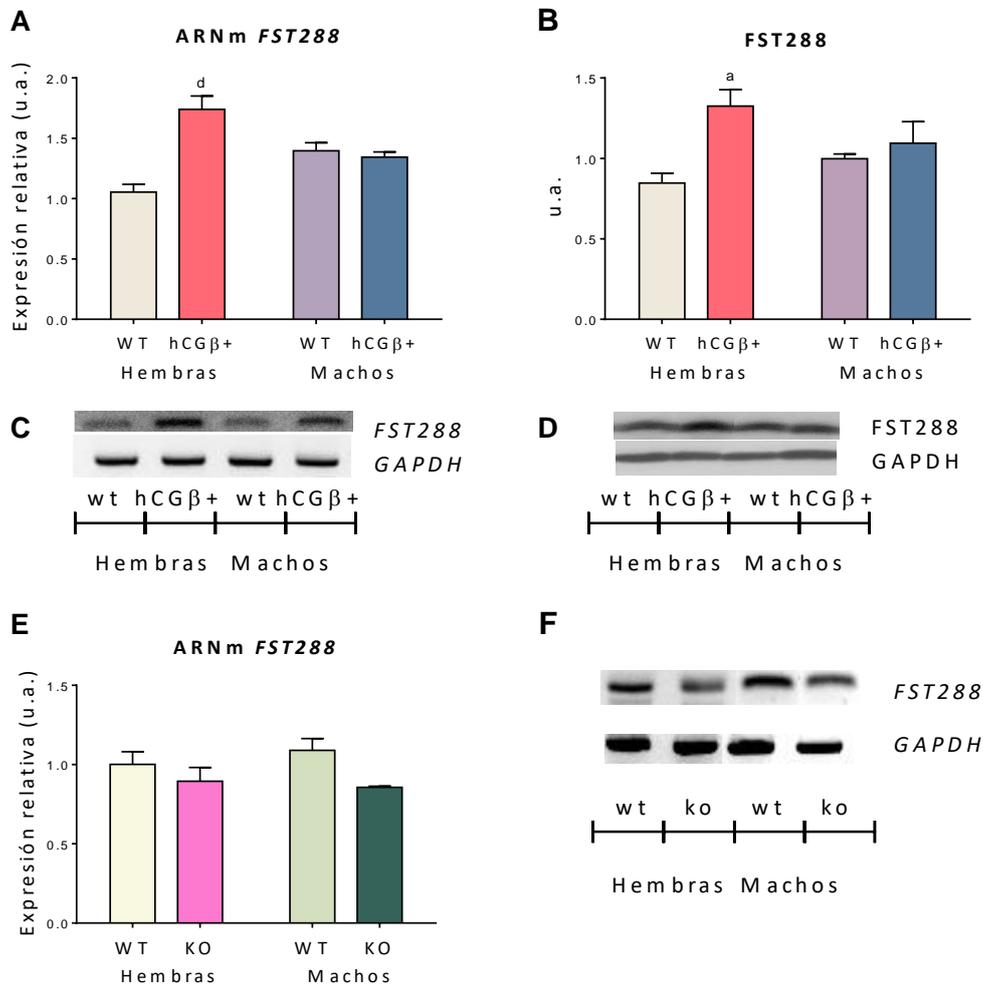


**Figura 2.12. Expresión hipofisaria de betaglicano en ratones de ambos sexos y genotipos, medidos por PCR cuantitativa en tiempo real y normalizados a CiclofilinaB.** Valores relativizados a hembras wt. n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** Ratones hCG $\beta$ . Interacción ns; c, p<0,001 hembras wt vs. hCG $\beta$ +; d, p<0,0001; a, p<0,05 machos wt vs. hCG $\beta$ +. **B)** Ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. Interacción p=0,0103; c, p<0,001 hembras wt vs. ko; d, p<0,0001.

Otro de los antagonistas funcionales descritos para las activinas, es la isoforma 288 de la proteína folistatina (FST288) que se encuentra en la matriz extracelular de la hipófisis y posee la capacidad de unirse al dímero de activina en una relación 2:1 (dos moléculas de FST por cada molécula de activina) de forma específica e irreversible, limitando la disponibilidad biológica local de la citoquina y, en consecuencia, interfiriendo en su mecanismo de acción (Phillips, 2001).

Cuando analizamos los niveles de expresión relativa de FST288 mediante PCR semicuantitativa en ambos modelos experimentales (Figura 2.13A y 2.13E), sólo encontramos diferencias entre grupos en los ratones hCG $\beta$ , donde

tanto por PCR semicuantitativa como por western blot (Figura 2.13B) encontramos niveles de FST288 elevados en hembras hCG $\beta$ + respecto a hembras wt y machos.



**Figura 2.13. Expresión hipofisaria de FST288 en ratones hCG $\beta$  (A, B, C, D) y *Drd2*<sup>-/-</sup> (E y F) de ambos sexos y genotipos.** FST288 medido por PCR semicuantitativa (A y E). Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de FST288 relativa a las de GAPDH. n=4/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** Ratones hCG $\beta$ . Interacción p= 0,0249; a, p<0,05 hembras wt vs. hCG $\beta$ +. **E)** Ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. Interacción ns. **C)** y **F)** Imágenes representativas de las bandas en gel de agarosa 2% de FST288 (62 pb) y para GAPDH (171 pb), utilizada como control de carga. **B)** FST medido por wb en ratones hCG $\beta$ . Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de FST288 relativa a las de GAPDH. n=3/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, interacción ns; a, p<0,05 hembras wt vs. hCG $\beta$ +. **D)** Ratones hCG $\beta$ . Imagen representativa de las bandas inmunoreactivas para FST288 (32 kDa) y para GAPDH (37 kDa), utilizada como control de carga.

Estos resultados en su conjunto demuestran una diferencia en la expresión de los antagonistas en ambos modelos experimentales de prolactinoma.

Previamente, habíamos encontrado que en el modelo *Drd2<sup>-/-</sup>* las inhibinas tanto hipofisarias como ováricas podrían estar controlando la actividad de activinas en hipófisis, mientras que en el en modelo *hCGβ*, los bajos o indetectables niveles de inhibinas sugerían la participación de otros antagonistas.

En los presentes resultados encontramos en el modelo de ratones *hCGβ* un perfil de expresión de *betaglicano* similar al observado previamente en la Figura 2.7C de este capítulo para *Inha* (disminuido en hembras *hCGβ+* respecto de sus pares wt) sugiriendo un antagonismo leve de inhibinas en las hembras de este modelo. Por otro lado, en machos wt se observa una alta expresión hipofisaria de *betaglicano* (con un perfil similar al observado para inhibina alfa), indicando una función antagónica fuerte de inhibinas en este sexo. Es interesante destacar que esta función se pierde en machos transgénicos *hCGβ+*, al igual que en hembras *hCGβ+*, muy probablemente por los altos niveles de hCG circulantes como discutiremos más adelante.

Asimismo, los niveles elevados de FST288 presente sólo en el modelo *hCGβ* podrían sugerir que sería éste el factor antagónico de activinas a nivel hipofisario en las hembras *hCGβ+* (con desarrollo de prolactinoma).

---

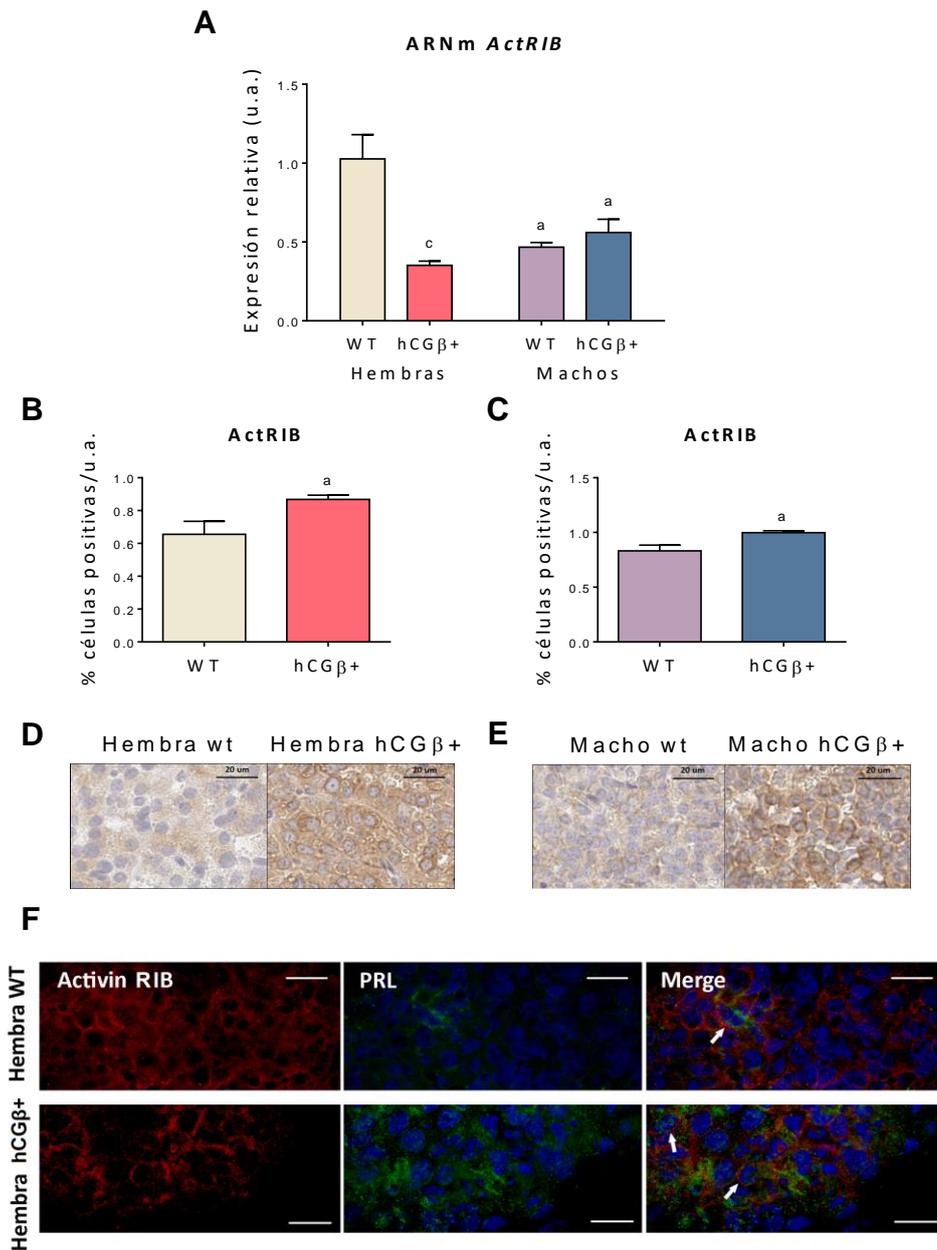
## EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE RECEPTORES DE ACTIVINAS DE TIPO 1 Y TIPO 2

Al igual que *TGFβ1*, las activinas forman un complejo hetero-oligomérico de receptores serin/treonin quinasas y proteínas SMAD intracelulares para iniciar su señalización. Los receptores de tipo 1 descritos para las activinas son los receptores ActRIB y ActRIC, mientras que el receptor de membrana de tipo 2 preferentemente utilizado por estas moléculas es el receptor ActRIIB (L Attisano et al., 1992). En esta sección, evaluamos la expresión hipofisaria de estos receptores en ambos modelos experimentales de prolactinoma.

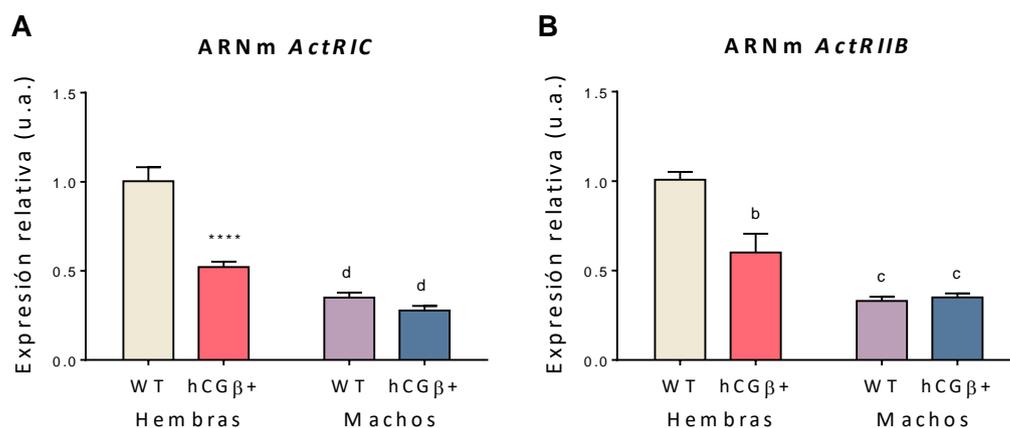
En los ratones *hCGβ*, al estudiar la expresión relativa hipofisaria del ARNm del receptor ActRIB observamos una menor expresión en hembras con desarrollo de tumor (*hCGβ+*) respecto de sus pares wt y encontramos que la expresión en machos es menor a la presentada por las hembras wt, sin diferencias entre genotipos (Figura 2.14A). Dado que el receptor ActRIB se

encuentra implicado en la señalización desencadenada por activinas en el lactotrofo, profundizamos nuestro estudio analizando su expresión proteica por inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de hipófisis de hembras (Figuras 2.14B y 2.14C) y machos (Figuras 2.14D y 2.14E). Por otro lado, determinamos en hembras de ambos genotipos su co-localización con PRL por microscopía confocal para identificar su expresión en este tipo celular (Figura 2.14F). De los resultados obtenidos por IHQ, con posterior cuantificación, observamos que la expresión proteica del receptor es mayor en ratones hCG $\beta$ <sup>+</sup> de ambos sexos. Por otro lado, identificamos con la microscopía confocal la expresión de ActRIB en lactotrofos en hembras de ambos genotipos, además de su expresión en otros tipos celulares.

A continuación, analizamos por la expresión relativa hipofisaria de los receptores ActRIC (Figura 2.15A) y ActRIIB (Figura 2.15B) por PCR cuantitativa en tiempo real y encontramos que, en ambos casos, las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> presentan una expresión disminuida respecto de sus pares wt. Por otro lado, la expresión de ambos receptores en los machos se encuentra disminuida respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos.



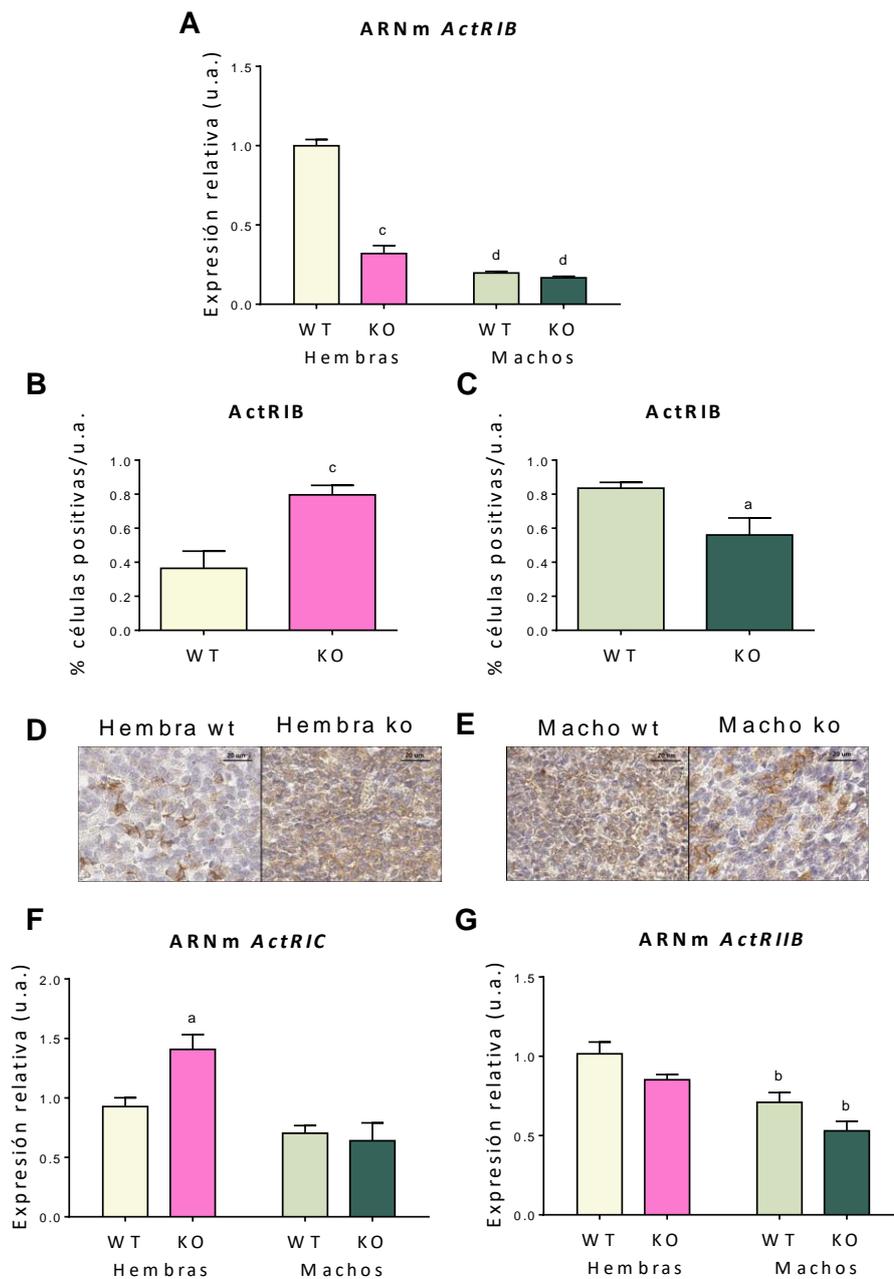
**Figura 2.14. Expresión hipofisaria de ActRIB en ratones hCGβ.** **A)** Expresión relativa del ARNm medido por PCR cuantitativa en tiempo real y normalizado a *CiclofilinaB*. Valores relativizados a hembras wt. n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. Interacción p=0,0008; c, p<0,001 hembras wt vs. hCGβ+; a, p<0,05. **B y C)** Análisis de la inmuno-marcación en cortes de hipófisis. Se utilizó el programa Aperio Image Scope para el análisis de imágenes. Expresión proteica de ActRIB en hembras (**B**) y machos (**C**) determinada como número de células positivas/unidad de área. n=5/grupo. Análisis estadístico: test de student; Hembras a; p=0,0129; Machos a; p=0,0302. **D y E)** Inmuno-marcación de ActRIB. Las secciones de hipófisis de los distintos grupos experimentales fueron incubadas con anticuerpo anti ActRIB y reveladas con DAB (color marrón). Los núcleos fueron contra-teñidos con hematoxilina (color azul) y las imágenes fueron tomadas con aumento 40X. La longitud de la barra representa 20μm. **F)** Identificación y co-localización de ActRIB con la hormona hipofisaria PRL en cortes de hipófisis de hembras de ambos genotipos analizada por doble inmunofluorescencia indirecta. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas blancas indican lactotropos (PRL) expresando ActRIB. Las imágenes fueron tomadas con aumento 40X. La longitud de la barra representa 20μm.



**Figura 2.15. Expresión hipofisaria de receptores de activina tipo 2 en ratones hCGβ.** Expresión relativa del ARNm medido por PCR cuantitativa en tiempo real y normalizado a *CiclofilinaB*. Valores relativizados a hembras wt. n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** ActRIC. Interacción p=0,0002; \*\*\*\*, p<0,0001 hembras wt vs. hCGβ+; d, p<0,0001. **B)** ActRIIB. Interacción p=0,0303; b, p<0,01 hembras wt vs. hCGβ+; c, p<0,001.

Continuamos nuestro estudio evaluando la expresión de estos receptores en los ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. En la Figura 2.16A podemos observar que la expresión del receptor ActRIB evaluada por PCR cuantitativa en tiempo real se encuentra significativamente disminuida en hembras ko respecto de sus pares wt. Esto se observa también en machos de ambos genotipos, donde los niveles de expresión son similares a los presentados por las hembras wt. Respecto de la expresión proteica del receptor, tal y como observábamos en el modelo hCGβ, las figuras 2.16B-E demuestran que la expresión del receptor ActRIB evaluada por IHQ presenta un aumento de expresión en hembras ko respecto de sus pares wt. por otro lado, observamos en este modelo experimental una mayor expresión hipofisaria de ActRIB en machos respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos.

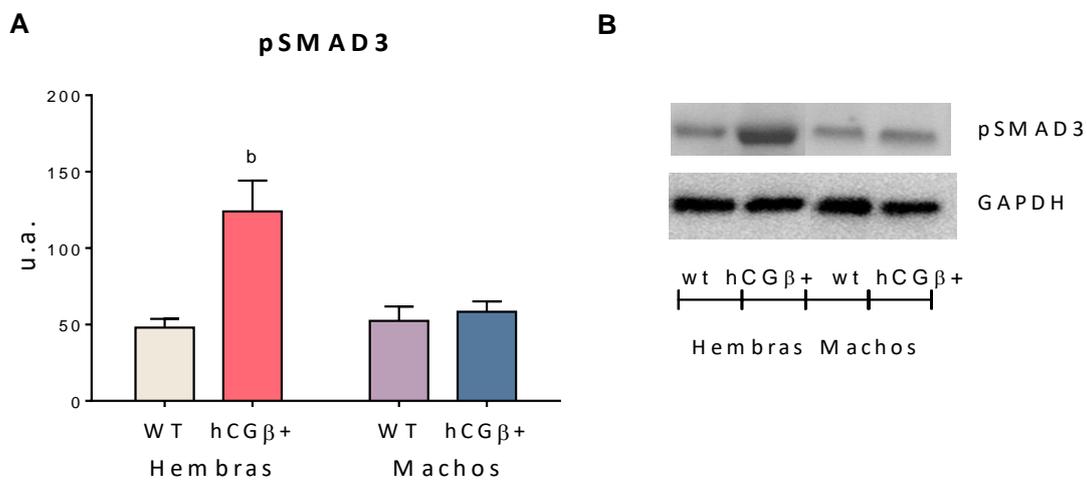
Para el receptor ActRIC (Figura 2.16F) observamos un aumento en la expresión en hembras ko respecto de sus pares wt no tumorales. Sin embargo, al estudiar el receptor ActRIIB (Figura 2.16G), si bien no observamos diferencias genotípicas en hembras, encontramos una expresión disminuida en machos de ambos genotipos respecto de las hembras.



**Figura 2.16. Expresión hipofisaria de receptores de activina tipo 1 y tipo 2 en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>.** Expresión relativa del ARNm medido por PCR cuantitativa en tiempo real y normalizado a *CiclofilinaB* de ActRIB (A), ActRIC (F) y ActRIIB (G). Valores relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** ActRIB. Interacción p=0,0004; c, p<0,001 hembras wt vs. ko; d, p<0,0001. **F)** ActRIC. Interacción ns. a, p<0,05 hembras wt vs. ko. **G)** ActRIIB. Interacción p=0,9049; b, p<0,01. **B y C)** Análisis de la inmuno-marcación de ActRIB en cortes de hipófisis en hembras (B) y machos (C). Se utilizó el programa Aperio Image Scope para el análisis de imágenes. Expresión proteica de ActRIB determinada como número de células positivas/unidad de área. n=5/grupo. Análisis estadístico: test de student; Hembras c; p=0,0010; Machos a; p=0,0082. **D y E)** Inmuno-marcación de ActRIB. Las secciones de hipófisis de los distintos grupos experimentales fueron incubadas con anticuerpo anti ActRIB y reveladas con DAB (color marrón). Los núcleos fueron contra-teñidos con hematoxilina (color azul) y las imágenes fueron tomadas con aumento 40X. La longitud de la barra representa 20µm.

Como mencionamos en la introducción, en hipófisis, la unión de activinas a sus receptores de membrana inicia una cascada de señales intracelular mediante fosforilación de las proteínas SMAD2/3 que finaliza en el núcleo con la activación de la transcripción de genes blanco. En los lactotropos, estas señales son de tipo inhibitorio, tanto para su proliferación como para la síntesis y secreción de PRL.

Por este motivo, a continuación, estudiamos la fosforilación de la proteína SMAD3 por técnica de western blot (wb), mediante la utilización de un anticuerpo que detecta la fosforilación en los residuos de cisteína 423 y 425 de la proteína SMAD3. Cuando evaluamos la expresión hipofisaria de pSMAD3 en ratones hCG $\beta$  de ambos sexos y genotipos a los 6 meses de edad, evidenciamos un aumento significativo en los niveles de pSMAD3 en hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> respecto de sus pares wt (Figura 2.17). Por otro lado, la expresión en machos fue similar a la observada en hembras wt, sin diferencias entre genotipos.

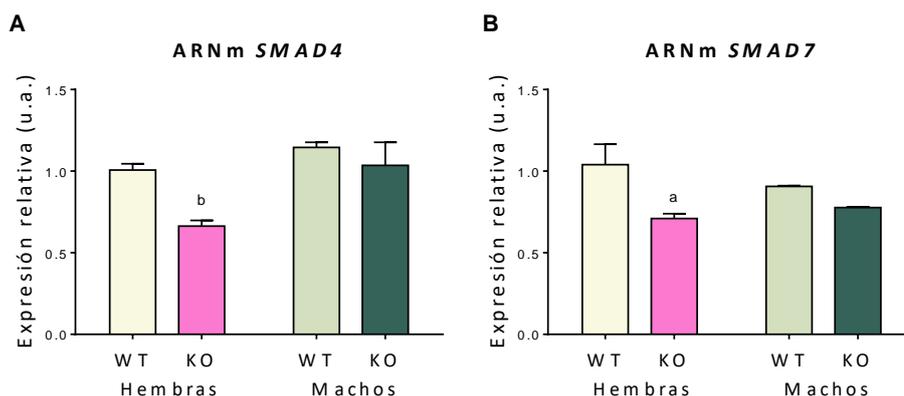


**Figura 2.17. Expresión hipofisaria de pSMAD3 en ratones hCG $\beta$  de ambos sexos y genotipos. A)** Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de pSMAD3 relativa a las de GAPDH. n=3/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, interacción p= 0,0227; b, p<0,01. **B)** Imagen representativa de las bandas inmunoreactivas para pSMAD3 (52 kDa) y para GAPDH (37 kDa), utilizada como control de carga.

## EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO DEL LACTOTROPO Y LA SECRECIÓN DE PRL: PIT-1 Y MENINA

Como mencionamos en la introducción, en el lactotrofo la regulación inhibitoria que ejercen las activinas involucra, luego de la fosforilación de las proteínas SMADs, el reclutamiento de SMAD4 y del supresor tumoral menina formando un complejo que transloca al núcleo donde promueve la inhibición del factor de transcripción pit-1, factor involucrado en el desarrollo y mantenimiento de las células lactotropas; así como también es capaz de regular otros factores de transcripción que inhiben la progresión del ciclo celular, contribuyendo a la disminución en el crecimiento de las células lactotropas y la secreción de PRL (Lacerte et al., 2004);(Hendy et al., 2005). Como mencionamos en la introducción, esta acción es a su vez regulada negativamente por SMAD7 (Hendy et al., 2005).

Con el objetivo de estudiar estos mecanismos en las hipófisis de nuestros modelos experimentales, evaluamos la expresión relativa hipofisaria de SMAD4 y SMAD7 en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> de ambos sexos y genotipos. En la figura 2.18 podemos apreciar tal y como observábamos en la figura 1.9 del capítulo 1 para el modelo hCG $\beta$ , que tanto la expresión de la proteína SMAD4 (Figura 2.18A) como de SMAD7 (Figura 2.18B) se encuentran significativamente disminuidas en las hembras ko (con desarrollo de prolactinoma) respecto de sus pares wt.



**Figura 2.18. Expresión relativa de SMAD4 y SMAD7 evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5-8/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores. **A)** SMAD4. Interacción ns; b, p<0,01 hembras wt vs. ko. **B)** SMAD7. Interacción ns; ap<0,05 hembras wt vs. ko.

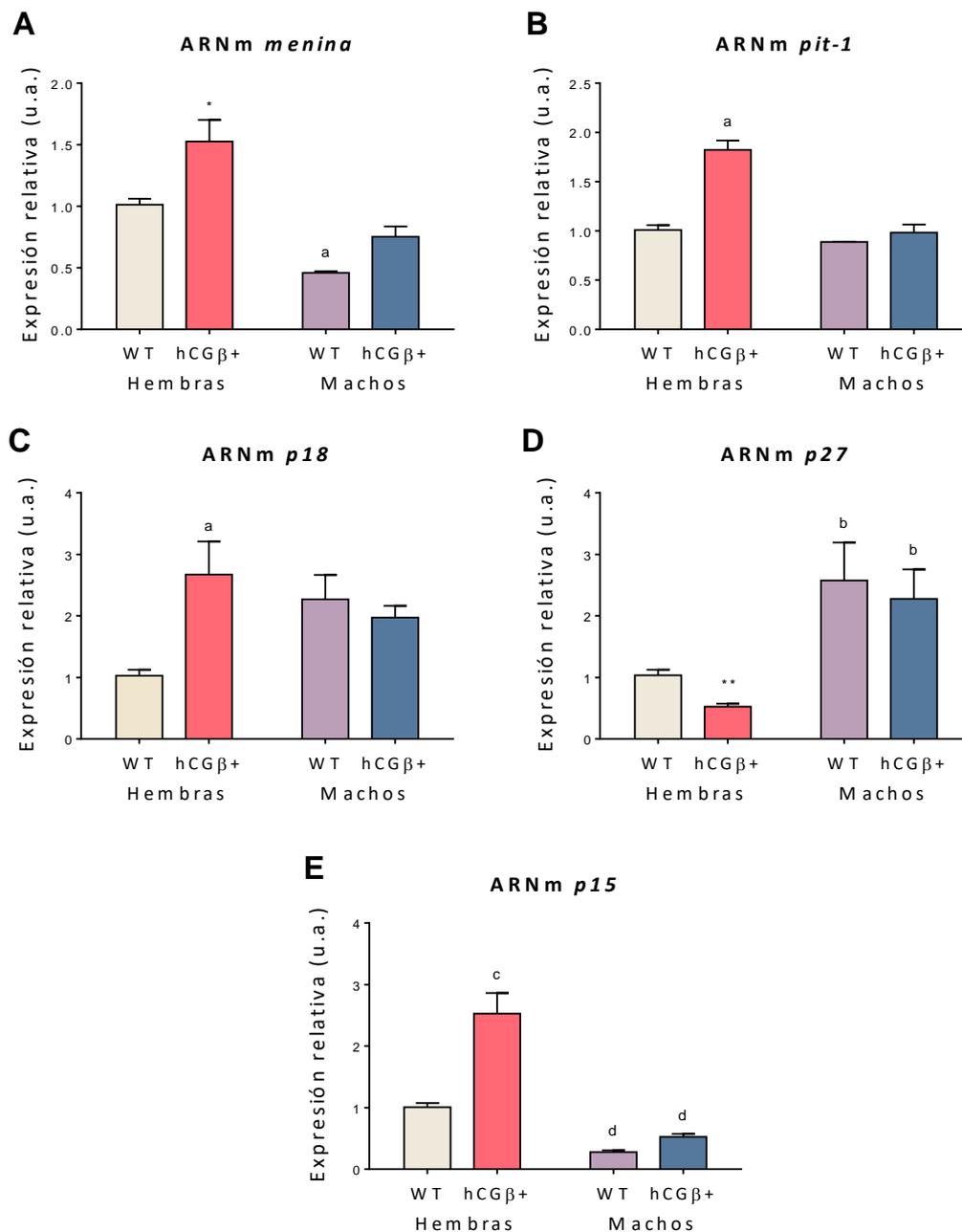
Sin embargo, a diferencia de lo observado en los ratones hCG $\beta$ , no encontramos diferencias en la expresión presentada por los machos de ambos genotipos respecto de las hembras wt.

Continuamos estudiando la expresión relativa del ARNm de los genes involucrados en regulación del crecimiento del lactotrofo: *menina* y *pit-1*, así como también de tres genes involucrados en la regulación del ciclo celular, regulados a su vez por *menina*: *p15*, *p18* y *p27* en ambos modelos experimentales de prolactinoma.

En la figura 2.19 podemos observar que las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> (con desarrollo de prolactinoma) presentan, acorde a lo esperado, una mayor expresión hipofisaria de *pit-1* (Figura 2.19B), no observándose estas diferencias genotípicas en machos. Por otro lado, las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> presentan una mayor expresión de *menina* respecto de sus pares wt (Figura 2.19A), resultado que nos llamó la atención, dado que *menina* es un supresor tumoral, del cual se ha descrito que actúa como factor inhibitorio de la expresión de *pit-1* (J.-J. Lebrun, 2009). Además, siguiendo el mismo perfil de expresión de *menina*, observamos en hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> una mayor expresión hipofisaria de *p18* y *p15* (Figuras 2.19C y 2.19E, respectivamente).

Llamativamente, al analizar *p27* observamos un patrón de expresión diferente al encontrado para *p18*, a pesar de que ambos estarían regulados de modo directo por *menina*. Como podemos ver en la Figura 2.19D, las hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> (con desarrollo de prolactinoma) presentan niveles hipofisarios disminuidos de *p27* respecto de sus pares wt.

Respecto de las diferencias sexuales, observamos una mayor expresión hipofisaria de *p27* en machos de ambos genotipos respecto de las hembras (Figura 2.19D) y, por el contrario, una menor expresión de *p15* en machos respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos (Figura 2.19E).



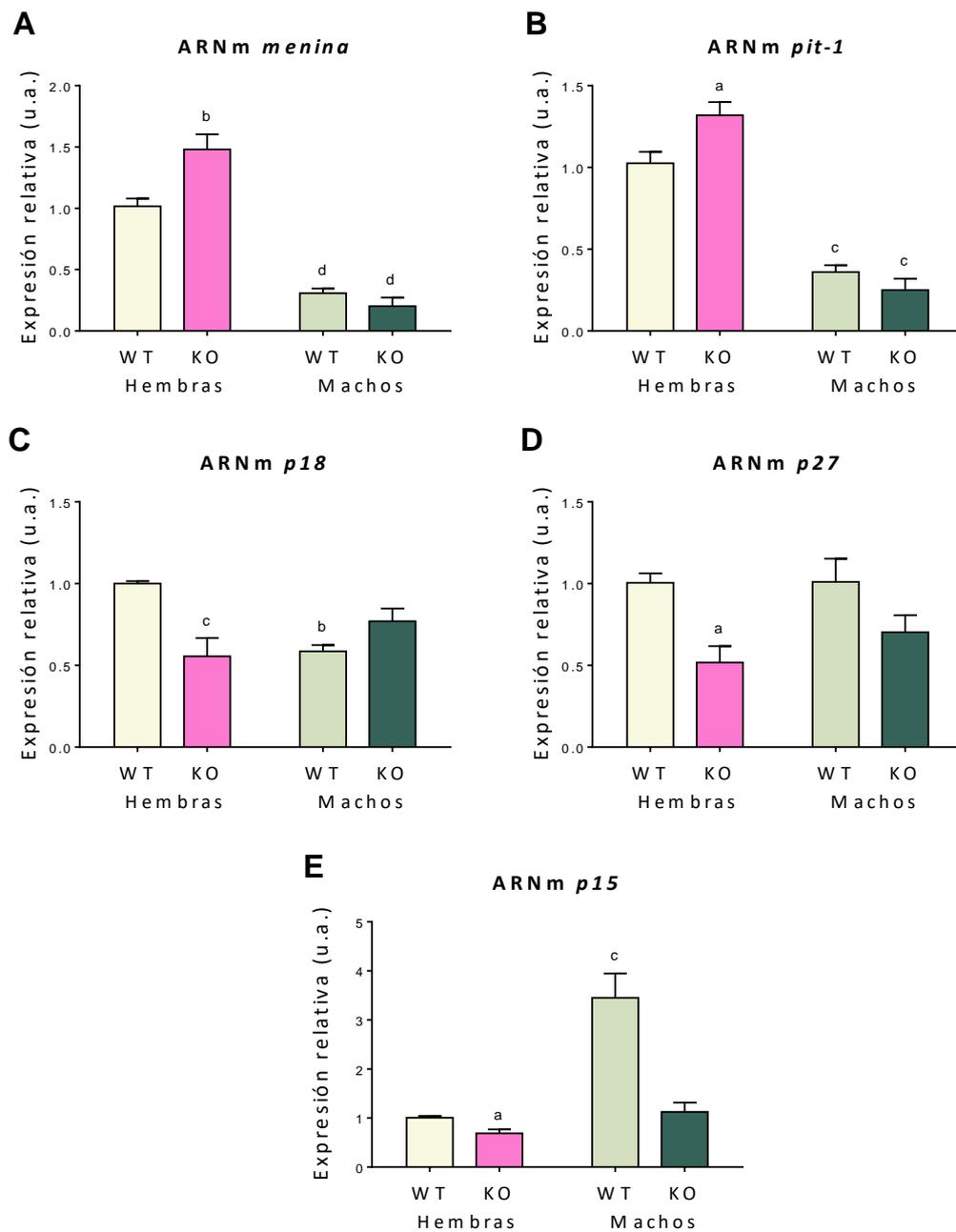
**Figura 2.19. Expresión hipofisaria de reguladores del lactotrofo en ratones hCGβ de ambos sexos y genotipos, medidos por PCR cuantitativa en tiempo real y normalizados a *CiclofilinaB*.** Valores relativizados a hembras wt. n=6-8/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores. **A)** *Menina*. Interacción ns; \*, p<0,05 hembras wt vs. hCGβ+; a, p<0,05. **B)** *Pit-1*. Interacción p=ns; a, p<0,05 hembras wt vs. hCGβ+. **C)** *p18*. Interacción p=0,0145; a, p<0,05 hembras wt vs. hCGβ+. **D)** *p27*. Interacción ns; \*\*, p<0,01 hembras wt vs. hCGβ+; b, p<0,01. **E)** *p15*. Interacción p= 0,0038; c, p<0,001 hembras wt vs. hCGβ+; d, p<0,0001.

Al analizar la expresión relativa hipofisaria de estos factores en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> de ambos sexos y genotipos, encontramos diferencias que nos llamaron la atención entre ambos modelos experimentales. Si bien en hembras con

desarrollo de prolactinoma (ko) encontramos nuevamente mayor expresión hipofisaria de *menina* y *pit-1* respecto de sus pares wt (Figura 2.20A y Figura 2.20B, respectivamente), a diferencia de las hembras *hCGβ+*, las hembras ko presentan menores niveles de expresión de *p18*, *p27* y *p15* respecto de sus pares wt (Figuras 2.20C, 2.20D y 2.20E, respectivamente).

En referencia a las diferencias sexuales, observamos diferencias significativas en la expresión hipofisaria de *menina*, *pit-1* y *p15*, con menores niveles de expresión en machos respecto de las hembras, sin diferencias entre genotipos (Figuras 2.20A, 2.20B y 2.20E, respectivamente).

Estos resultados indican que las hembras transgénicas (*hCGβ+* y ko) de ambos modelos experimentales de prolactinoma presentan diferencias significativas no sólo en sus perfiles hormonales, sino también en las respuestas intracelulares asociadas al control del ciclo celular, sugiriendo una desregulación diferencial de los procesos proliferativos en el desarrollo de un prolactinoma en hembras de ambos modelos experimentales.



**Figura 2.20.** Expresión hipofisaria de reguladores del lactotrofo en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> de ambos sexos y genotipos, medidos por PCR cuantitativa en tiempo real y normalizados a *CiclofilinaB*. Valores relativizados a hembras wt. n=6-8/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores. **A)** *Menina*. Interacción p=0,0310; b, p<0,01 hembras wt vs. ko; d, p<0,0001. **B)** *Pit-1*. Interacción p=0,0354; a, p<0,05 hembras wt vs. ko; c, p<0,001. **C)** *p18*. Interacción p=0,0001; c, p<0,001 hembras wt vs. ko; b, p<0,01 machos wt vs. hembra wt. **D)** *p27*. Interacción ns; a, p<0,05 hembras wt vs. ko. **E)** *p15*. Interacción p=0,03; c, p<0,001 macho wt vs. hembra wt.

Hasta aquí nuestros resultados demuestran que el efecto inhibitorio de activinas sobre las células lactotropas se encuentra disminuido en hembras con

desarrollo de prolactinomas, evento evidenciado por una menor expresión en las subunidades que conforman a las activinas A y B, así como también en la mayor expresión de sus antagonistas funcionales, FST288 en hembras hCG $\beta$ + e inhibinas en hembras ko. Asimismo, evidenciamos una importante diferencia sexual en ambos modelos experimentales, donde podemos observar que los machos presentan un sistema inhibitorio de activinas más fuerte, que podría estar protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinoma.

## DISCUSIÓN II

En base a los resultados obtenidos para TGF $\beta$ 1 hipofisario en el primer capítulo de esta tesis, nos preguntamos si otros miembros de la familia TGF $\beta$  sintetizados por la hipófisis podrían encontrarse implicados en el desarrollo de un prolactinoma.

Como mencionamos en la introducción de este capítulo, las activinas A y B son miembros de la familia TGF $\beta$  que, en hipófisis, modulan negativamente la expresión de prolactina (PRL) y la proliferación de las células del lactotrofo (Lacerte et al., 2004);(J.-J. Lebrun, 2009). Por otra parte, las inhibinas A y B son moléculas que se encuentran íntimamente relacionadas a las activinas, antagonizando su acción, y, a pesar de que su origen es principalmente gonadal, son también sintetizadas de manera local dentro de la hipófisis, al igual que la proteína de unión folistatina (FST).

Existen numerosos trabajos que indican que perturbaciones o disrupciones en la funcionalidad de activinas e inhibinas se encuentran relacionadas al origen y desarrollo de tumores endocrinos y neuroendocrinos (Risbridger et al., 2001);(Louise M Bilezikjian et al., 2004);(Namwanje & Brown, 2016).

Con estos antecedentes, nos enfocamos en este segundo capítulo al estudio del “sistema activinas-inhibinas” hipofisario en dos modelos experimentales de prolactinoma: ratones hCG $\beta$  y ratones Drd2 $^{-/-}$ . Ambos modelos presentan un dimorfismo sexual en el desarrollo de prolactinomas evidenciado por un aumento en el peso hipofisario y una marcada hiperprolactinemia presente sólo en las hembras transgénicas hCG $\beta$ + y Drd2 $^{-/-}$  *knock out* (ko), tal y como fuera

descrito por Rulli y col. (Rulli et al., 2002) y Cristina y col. (Carolina Cristina et al., 2006), respectivamente.

Demostramos que existe una disminución en la expresión hipofisaria de las subunidades que codifican para las activinas A y B (subunidades  $\beta A$  y  $\beta B$ ) en hembras hCG $\beta$ + y hembras ko, sugiriendo una potencial disminución en la biodisponibilidad de activinas en hipófisis tumorales. Asimismo, evidenciamos una notable diferencia sexual en la expresión de estas subunidades en ambos modelos de ratón, encontrándose una expresión elevada de ambas subunidades en hipófisis de machos de ambos genotipos respecto de las hembras, sugiriendo la presencia de un sistema inhibitorio de la función del lactotrofo, por parte de las activinas, más fuerte en este sexo.

Respecto de la expresión de la subunidad  $\alpha$ , presente sólo en los dímeros de inhibinas, los resultados fueron diferentes en los modelos experimentales utilizados. Mientras que en el modelo hCG $\beta$  las hipófisis de hembras no mostraron diferencia de expresión entre genotipos, en el modelo *Drd2*<sup>-/-</sup> las hipófisis de hembras ko presentaron un aumento significativo de la expresión de subunidad  $\alpha$  respecto a sus pares wt. Este aumento observado en las hembras ko podría deberse a los mayores niveles de FSH séricos encontrados en este modelo, respecto a las hembras wt, ya que es sabido que tanto LH como FSH inducen el aumento en la síntesis de la subunidad alfa (Makanji et al., 2014);(Walton, Makanji, Robertson, & Harrison, 2011). Por el contrario, en hembras hCG $\beta$ +, si bien presentan una actividad “símil” de LH muy incrementada, los valores de FSH séricos se encuentran disminuidos.

A partir de este resultado “modelo-dependiente”, y sabiendo que el mayor aporte de inhibinas que alcanzan la hipófisis proviene de las gónadas (Louise M Bilezikjian et al., 2004), evaluamos la expresión ovárica de las tres subunidades en ambos modelos experimentales. Los ovarios de las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> mostraron una expresión elevada de todas las subunidades en hembras ko respecto de sus pares wt sugiriendo una producción gonadal elevada de inhibinas en las hembras con prolactinoma, acorde nuevamente a los mayores niveles de FSH sérico presente en estas hembras. Estos elevados niveles de inhibinas gonadales en las hembras ko podrían estar contrarrestando la acción de las ya disminuidas activinas presentes en sus hipófisis.

Por el contrario, en hembras hCG $\beta$ +, al igual que lo observado en hipófisis, encontramos una marcada disminución en la expresión ovárica de todas las subunidades respecto de sus pares wt, sugiriendo una producción significativamente reducida de inhibinas tanto hipofisarias como gonadales en este grupo. Más aún, estudios de nuestro grupo colaborador, nos permitieron verificar una ausencia de inhibina A circulante en hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt, indicando una ausencia de antagonismo por parte de inhibinas en las hipófisis tumorales del modelo experimental hCG $\beta$ .

Es importante destacar que la exacerbada señal de hCG que presentan las hembras hCG $\beta$ + desde temprana edad desencadena una maduración anormal de los folículos, inhibe la ovulación y promueve una masiva luteinización en edad adulta, responsable de los niveles elevados de progesterona y testosterona característicos de las hembras hCG $\beta$ + (Rulli & Huhtaniemi, 2005);(Peltoketo, Zhang, & Rulli, 2011);(Abel et al., 2014) y, sin embargo, niveles muy disminuidos de inhibinas. Respecto de estos niveles disminuidos de inhibinas, ha sido descrito que a pesar de que LH y hCG son capaces de unir al mismo receptor, ha sido demostrado que ante la falta de señal de GnRH y anovulación (eventos que ocurren en hembras hCG $\beta$ +) la administración de hCG no es capaz, *per sé*, de inducir en el cuerpo lúteo la producción de inhibinas (McLACHLAN et al., 1989);(Smith et al., 1991);(Wen et al., 2008);(Shayya et al., 2014). Asimismo, ha sido demostrado *in vitro* que un estímulo con hCG disminuye los niveles de inhibinas por parte de células luteales humanas (Muttukrishna, Groome, & Ledger, 1997). Estos antecedentes, junto a los disminuidos niveles séricos de FSH, podrían explicar la muy escasa síntesis y secreción ovárica de inhibinas que encontramos en las hembras hCG $\beta$ +

Respecto de las diferencias sexuales, resulta muy interesante destacar que en el modelo hCG $\beta$  la expresión de la subunidad  $\alpha$  en machos transgénicos presentó un patrón diferente al observado para las otras subunidades. Si bien la expresión en machos wt presenta niveles elevados respecto de las hembras, acorde a lo observado previamente para las subunidades  $\beta$ A y  $\beta$ B, evidenciamos en machos hCG $\beta$ + una disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha$ . Estos resultados podrían relacionarse nuevamente al entorno

hormonal propio de los machos de este modelo: con sobreexpresión de hCG que provoca un aumento en la síntesis de testosterona por parte de las células de Leydig, interrumpiendo el eje gonadotrófico y provocando una disminución en la producción de FSH (Huhtaniemi, Korenbrot, & Jaffe, 1977);(Rulli et al., 2003);(Gonzalez et al., 2011). Por lo tanto, teniendo en cuenta que los receptores de FSH se encuentran en las células de Sertoli (Simoni, Gromoll, & Nieschlag, 1997) y estas células son las que sintetizan inhibinas, los resultados obtenidos en machos hCG $\beta$ + podrían indicar que la falta de estimulación por parte de FSH sumado al tamaño testicular reducido característico de este grupo (Pakarainen et al., 2007);(Jonas, Oduwole, Peltoketo, Rulli, & Huhtaniemi, 2014) serían los responsables de la disminución en la producción de inhibinas, tal y como fuera postulado previamente por otros autores (Dias, Rajpert-De Meyts, McLachlan, & Loveland, 2009);(Grinson et al., 2014).

Por otro lado, es sabido que el efecto antagónico de las inhibinas requiere de la presencia de betaglicano para bloquear el acceso de activinas a su receptor (J. J. Lebrun & Vale, 1997);(Lewis et al., 2000);(C. Welt et al., 2002);(Wiater et al., 2009). Nuestros estudios demuestran una menor expresión del correceptor en las hipófisis tumorales hCG $\beta$ + y ko respecto de sus pares wt, sugiriendo una débil acción de inhibinas a nivel hipofisario en ambos modelos experimentales de prolactinoma.

Además, la acción de activinas puede ser localmente contrarrestada por la acción de folistatina 288 (FST288). En el presente trabajo encontramos un aumento significativo en la expresión de esta proteína en hipófisis tumorales de hembras hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt, sugiriendo que FST288 podría estar ejerciendo el rol antagónico por unión a activinas en este modelo experimental. Estas diferencias no fueron observadas en el modelo *Drd2*<sup>-/-</sup> en ninguno de los grupos analizados.

Hasta aquí, observamos que las hembras con desarrollo de prolactinoma (hCG $\beta$ + y ko) presentan una menor biodisponibilidad de activinas respecto de sus pares wt. A su vez, la funcionalidad de activinas estaría contrarrestada por FST288 en hipófisis de hembras tumorales hCG $\beta$ + y por inhibinas en hembras ko. Es importante destacar que, las diferencias sexuales encontradas en la expresión de estos componentes sugieren un efecto inhibitorio de activinas

más fuerte en machos de ambos modelos experimentales respecto de las hembras, hecho que podría estar protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinoma.

Hemos mencionado que otro punto de regulación para las acciones de activinas son sus receptores. En bibliografía se ha demostrado que alteraciones en la expresión de los receptores de membrana y proteínas SMADs involucrados en la señalización intracelular de activinas se encuentran relacionadas al desarrollo tumoral y a perturbaciones en la regulación génica río debajo de estos receptores (Alexander et al., 1996);(Zhou et al., 2000);(Suszko & Woodruff, 2006);(Makanji et al., 2014);(Principe et al., 2018).

Al evaluar la expresión hipofisaria de los receptores en ratones hCG $\beta$ , nuestros resultados demuestran una expresión elevada de ActRIB en hipófisis de hembras tumorales hCG $\beta$ + respecto de sus pares wt. Además, comprobamos que el receptor ActRIB co-localiza con PRL en hipófisis tumorales, indicando que los lactotopos (tipo celular predominante en prolactinomas) podrían expresar significativamente este receptor.

Teniendo en cuenta que uno de los determinantes de la funcionalidad de las activinas es la disponibilidad de receptor y que, en hipófisis, ActRIIB se encuentra expresado casi con exclusividad en los gonadotropos y (Gregory & Kaiser, 2004);(Bernard & Tran, 2013), la disminución en la expresión de los receptores ActRIC y ActRIIB y GnRHR (datos no mostrados) observada en hipófisis de hembras hCG $\beta$ + sumado a la disminución en los niveles séricos de FSH presentados por este grupo respecto de sus pares no tumorales (wt), podría indicar que de haber activinas biodisponibles en hipófisis, éstas no promoverían respuesta en gonadotropos. Por lo tanto, en este contexto, la expresión elevada del receptor ActRIB en hembras hCG $\beta$ + podría deberse, al menos en parte, a un efecto compensatorio ante una muy baja disponibilidad de activinas hipofisarias.

Un resultado inesperado fue la alta expresión de pSMAD3 encontrada en los prolactinomas de hembras hCG $\beta$ +, en los cuales se encuentran disminuidos los niveles de TGF $\beta$ 1 y activinas.

Ha sido descripto, utilizando modelos *in vivo* que, en gonadotropos, la síntesis de FSH mediada por activinas sería, a diferencia de lo encontrado

previamente *in vitro*, principalmente regulada por 2 factores de transcripción: SMAD4 y FOXL2, actuando en conjunto y en forma independiente de GnRH (Roybal et al., 2014);(Herndon & Nilson, 2015). Además, ha sido demostrado que la delección condicional de SMAD4 o FOXL2 en gonadotropos induce una deficiencia de transcripción de FSH $\beta$  y FST (Fortin et al., 2015);(Y. Li et al., 2018). Más aún, se ha sugerido que, frente a reducidos niveles de SMAD4, existiría en este tipo celular una mayor actividad de pSMAD3 compensatoria para mantener, al menos, valores mínimos de FSH (Y. Li et al., 2017). Por otro lado, ha sido comprobado que ratones deficientes en SMAD4 presentan niveles séricos disminuidos de FSH y son subfértiles (Fortin, Boehm, Deng, Treier, & Bernard, 2014). En este contexto, los bajos niveles de SMAD4 encontrados en hipófisis de hembras hCG $\beta$ + podrían estar contribuyendo a los muy disminuidos niveles de FSH encontrados en este modelo, a pesar de presentar niveles elevados de pSMAD3.

Sin embargo, no podemos dejar de tener en cuenta que, en los prolactinomas, los lactotropos representan un altísimo porcentaje entre el total de tipos celulares hipofisarios, y que el aumento en pSMAD3 observado podría ser aportado también por este tipo celular.

Respecto de los niveles hipofisarios de menina, nuestros resultados correlacionan con estudios recientes realizados en humanos, en los cuales se ha identificado a menina en todos los tipos celulares hipofisarios tanto normales como tumorales, incluso en las células endoteliales (Iacovazzo, Hernandez-Ramirez, & Korbonits, 2017). En ese trabajo, Iacovazzo y col. encuentran que 15 biopsias de un total de 68 adenomas hipofisarios esporádicos expresan niveles elevados de menina, con ubicación nuclear, semejante a lo observado en las hipófisis normales provenientes de autopsias; y, por el contrario, demuestran una inmunotinción muy débil para menina en una biopsia de un adenocarcinoma positivo para PRL, al igual que en las metástasis extraídas. Estos resultados, junto a los encontrados en el desarrollo de la presente Tesis demostrarían que los niveles de menina son independientes de los niveles de activinas y TGF $\beta$ 1 hipofisarios, y que no necesariamente menina correlaciona con la presencia o ausencia del desarrollo de un prolactinoma.

En bibliografía, los trabajos que señalan la participación de menina en la inhibición que producen las activinas sobre la síntesis y secreción de PRL corresponden solo a un grupo de trabajo, del Dr. Lebrun (Lacerte et al., 2004);(Hendy et al., 2005). Estos mismos autores, en el año 2004, proponen que menina mediaría la inhibición de activinas sobre el factor de transcripción pit-1, fundamental para la funcionalidad del lactotrofo y que, en esa inhibición, se encuentra involucrada la participación de pSMAD3 (Lacerte et al., 2004). Sin embargo, el mismo grupo de trabajo describe 2 años más tarde que las activinas inhibirían a pit-1 por un mecanismo independiente de SMADs, mediado por p38 MAPK (de Guise et al., 2006).

En base a los primeros antecedentes, esperábamos encontrar una menor expresión de menina en hipófisis tumorales de hembras hCG $\beta$ + y ko, dada la menor expresión hipofisaria de activinas observada en ambos grupos (Theodoropoulou et al., 2004); contrariamente, encontramos una mayor expresión de menina en hipófisis de hembras tumorales de ambos modelos experimentales, concomitante con una alta expresión de pit-1.

Estos resultados demuestran que la elevada expresión de pit-1 correlaciona con la baja expresión de activinas hipofisarias, el alto índice proliferativo de lactotrofos y el mayor porcentaje de lactotrofos encontrado en los prolactinomas, independientemente de los niveles de menina. Asimismo, la menor expresión de pit-1 en hipófisis de machos correlaciona con la menor proporción de lactotrofos en este sexo, en ambos modelos experimentales analizados.

Otros genes blanco descritos para las acciones de menina en diversos tejidos son p18 y p27. Al respecto, en nuestros 2 modelos de prolactinomas observamos niveles elevados de expresión de menina, y concomitantemente, una mayor expresión de p18 (en hembras transgénicas con desarrollo de prolactinomas respecto a sus pares wt). Sin embargo, mientras que en las hembras ko también se observó aumentada la expresión de p27 (presentando el mismo perfil que menina y p18), en las hembras hCG $\beta$ + observamos, contrariamente, una muy disminuida expresión hipofisaria de p27, disociada completamente de la expresión local de menina. Estas diferencias entre ambos modelos de prolactinoma podrían quizás explicar la elevada tasa proliferativa

observada en hipófisis de hembras hCG $\beta$ +, quienes desarrollan tumores de mayor tamaño respecto a hembras tumorales del modelo Drd2 $^{-/-}$ . Por otro lado, a pesar de que muchos trabajos in vitro e in vivo han asociado la disminución de niveles de menina a una consecuente disminución de niveles de sus genes blanco p18 y p27, resultados recientes realizados sobre tumores neuroendócrinos pancreáticos en pacientes MEN1 demostraron una disociación en la expresión de p27, siendo ésta significativamente alta en estos tumores a pesar de la ausencia de menina. Respecto de estos resultados, los autores postulan que ante la falta de menina se desenmascara un mecanismo de control diferente sobre p27 que aumenta su expresión para contrarrestar el exacerbado crecimiento tumoral (Thakker, 2014). Estos autores si observan una correlación con los niveles de p18 en estos tumores pancreáticos, muy disminuidos frente a la ausencia de menina en estos pacientes. En el modelo hCG $\beta$ , nuestros resultados en hembras con desarrollo de tumor correlacionan con estos valores hallados en pacientes con tumores neuroendócrinos pancreáticos, donde los autores postulan que la disminución en la expresión de p27, y no así de menina o p18, es la que correlaciona con un peor diagnóstico, con índices proliferativos más altos (Kim, Lee, Nam, Choi, & Kim, 2014).

Futuros estudios hacen falta para dilucidar los complejos mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de prolactinoma en cada uno de los modelos experimentales utilizados en esta Tesis, sin embargo, en las diferencias encontradas, seguramente se encuentren también involucrados los entornos hormonales diferentes que presenta cada modelo. Mientras las hembras hCG $\beta$ + presentan con una expresión de progesterona y bioactividad de hCG (similar LH) exacerbadas, disminuidos niveles circulantes de FSH y niveles normales de estradiol, las hembras ko presentan niveles elevados de FSH y disminuidos niveles de LH y son, además, hipoestrogénicas. Este tema será discutido en mayor detalle en el capítulo 3.

Siendo las activinas moléculas inhibitorias de la función del lactotrofo, los resultados de este segundo capítulo nos permiten postular que una disminución en la expresión de activinas en hipófisis de hembras hCG $\beta$ + y ko estaría involucrada en el desarrollo de prolactinomas en hembras de ambos modelos experimentales. Además, proponemos que la disponibilidad de activinas se

encuentra regulada de modo diferencial en las hipófisis de hembras transgénicas de ambos modelos experimentales, encontrándose comprometida por unión a FST288 en hembras hCG $\beta$ + y por inhibinas en hembras ko, ambos efectos antagónicos que promueven una reducción en la biodisponibilidad de activinas en las hipófisis tumorales ambos grupos. Asimismo, nuestros resultados sugieren que alteraciones en las vías de transducción de señales mediadas por activina junto a una desregulación de factores moduladores del ciclo celular podrían estar involucrados en el desarrollo de un prolactinoma en hembras transgénicas hCG $\beta$ + y ko. Por último, proponemos que las diferencias sexuales encontradas en la expresión de los componentes del sistema activinas e inhibinas, sugieren un efecto inhibitorio de activinas más fuerte en hipófisis de machos de ambos genotipos que podría estar protegiendo a este sexo de una del desarrollo de un prolactinomas en ambos modelos experimentales.

## **CONCLUSIÓN II**

Como conclusión de este capítulo, los resultados demuestran que las hembras de dos modelos experimentales de prolactinoma (hCG $\beta$ + y ko) presentan una menor expresión hipofisaria de las subunidades que conforman a las activinas A y B concomitante a una mayor expresión de sus antagonistas funcionales, FST288 en hembras hCG $\beta$ + e inhibinas en hembras ko. Estos resultados indican que, en ambos modelos, el efecto inhibitorio de activinas sobre las células lactotropas se encuentra disminuido en las hipófisis tumorales. Postulamos que la menor expresión de activinas locales se encuentra involucrada en el desarrollo tumoral.

Asimismo, describimos alteraciones en las vías de transducción de señales mediadas por activina junto a una desregulación de factores moduladores del ciclo celular que podrían estar involucradas en el desarrollo de un prolactinoma en hembras transgénicas (hCG $\beta$ + y ko).

Por último, demostramos que las hipófisis de machos de ambos modelos experimentales presentan una mayor expresión de los componentes del sistema de activina-inhibinas respecto de las hembras y, por ello, postulamos que una mayor expresión hipofisaria de este sistema inhibitorio en machos

podría estar protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinoma independientemente del genotipo.

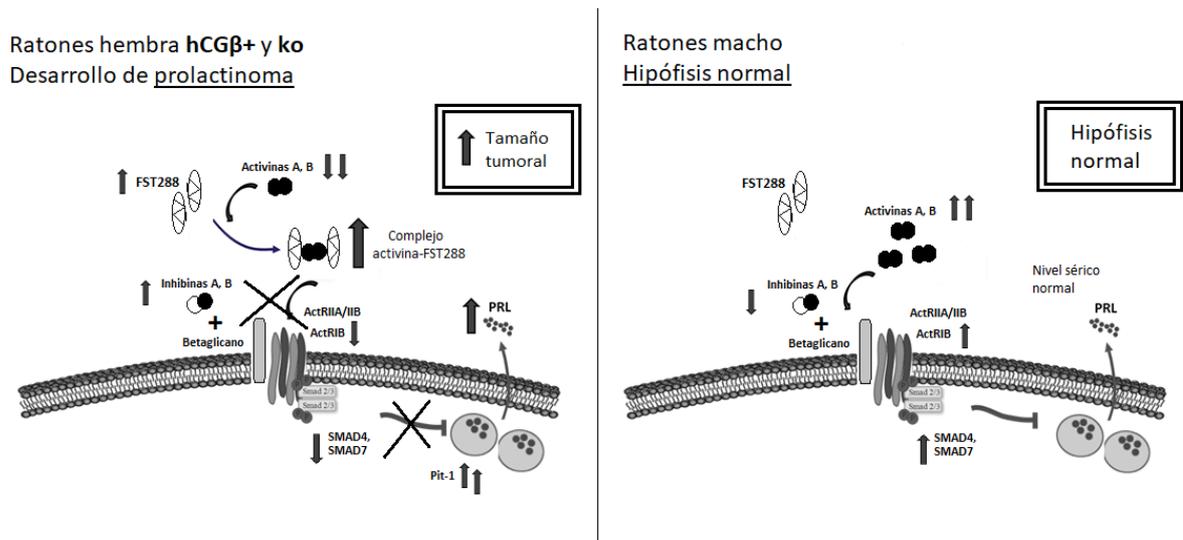
**Tabla 2.2. Resumen de los resultados obtenidos para la expresión hipofisaria de los componentes del sistema activinas-inhibinas en ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> adultos de ambos sexos y genotipos.**

Modelo	hCG $\beta$		Drd2 <sup>-/-</sup>	
Componente	Hembras (♀)	Hembras vs. Machos (♀ vs. ♂)	Hembras (♀)	Hembras vs. Machos (♀ vs. ♂)
Sub $\beta$ A	wt > hCG $\beta$ +	♀ < ♂	wt > ko	♀ < ♂
Sub $\beta$ B	wt > hCG $\beta$ +	♀ << ♂	wt > ko	♀ << ♂
Sub $\alpha$	wt $\approx$ hCG $\beta$ +	♀ $\approx$ ♂	wt < ko	♀ $\approx$ ♂
Betaglicano	wt > hCG $\beta$ +	♀ $\approx$ ♂	wt < ko	♀ > ♂
FST288	wt < hCG $\beta$ +	♀ $\approx$ ♂	wt $\approx$ ko	♀ $\approx$ ♂
ActRIB	wt < hCG $\beta$ +	♀ > ♂	wt < ko	♀ > ♂
ActRIC	wt > hCG $\beta$ +	♀ >> ♂	wt < ko	♀ $\approx$ ♂
ActRIIB	wt > hCG $\beta$ +	♀ >> ♂	wt $\approx$ ko	♀ > ♂
SMAD4	wt > hCG $\beta$ +	♀ << ♂	wt > ko	♀ $\approx$ ♂
SMAD7	wt > hCG $\beta$ +	♀ << ♂	wt > ko	♀ $\approx$ ♂
Menina	wt < hCG $\beta$ +	♀ $\approx$ ♂	wt < ko	♀ >> ♂
Pit-1	wt < hCG $\beta$ +	♀ $\approx$ ♂	wt < ko	♀ >> ♂
P18	wt < hCG $\beta$ +	♀ $\approx$ ♂	wt > ko	♀ $\approx$ ♂
P27	wt > hCG $\beta$ +	♀ >> ♂	wt > ko	♀ $\approx$ ♂
P15	wt < hCG $\beta$ +	♀ >> ♂	wt > ko	♀ $\approx$ ♂

**Tabla 2.3. Resumen de los resultados obtenidos para la expresión ovárica de las subunidades que componen a las inhibinas A y B en ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> adultos de ambos genotipos.**

Modelo	hCG $\beta$	Drd2 <sup>-/-</sup>
Componente	Hembras (♀)	Hembras (♀)
Sub $\beta$ A	wt > hCG $\beta$ +	wt < ko
Sub $\beta$ B	wt > hCG $\beta$ +	wt < ko
Sub $\alpha$	wt > hCG $\beta$ +	wt < ko

**Figura 2.21. Esquema de las diferencias sexuales observadas en el sistema activinas-inhibinas hipofisario en ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup>. Hembras con desarrollo de prolactinoma (izquierda) vs. machos (derecha) de ambos genotipos. Las hipófisis de hembras transgénicas (hCG $\beta$ + y ko) presentan una disminuida expresión de activinas y sus receptores, concomitante a una mayor expresión de factores que antagonizan su función. La menor expresión y función de este sistema inhibitorio en hipófisis de hembras transgénicas contribuye al desarrollo del prolactinoma en ambos modelos experimentales. Las hipófisis de machos presentan mayores niveles de expresión del sistema activinas, involucrado en la inhibición de la función del lactotro (proliferación celular y secreción de prolactina), por lo tanto, los machos no desarrollan prolactinomas, independientemente del genotipo.**



## CAPÍTULO III: EFECTOS DE UNA OVARIECTOMÍA EN EL SISTEMA ACTIVINAS-INHIBINAS HIPOFISARIO Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA.

### INTRODUCCIÓN

#### OVARIECTOMÍA: EFECTOS EN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PRL

Como mencionamos en la introducción general de esta tesis, la síntesis y secreción de prolactina por parte de las células lactotropas hipofisarias se encuentra regulada principalmente por dopamina (DA) y estradiol (E2). Mientras la dopamina hipotalámica regula negativamente a PRL, los estrógenos ováricos estimulan su producción (Freeman et al., 2000).

Ha sido descrito que una extirpación quirúrgica bilateral de ovarios (ovariectomía, OVX), produce un descenso en los niveles de PRL secretada en ratas, al mismo tiempo que reduce el número y tamaño de las células lactotropas hipofisarias (De Paul, Pons, Aoki, & Torres, 1997). Este efecto es atribuido, en parte, a la pérdida de los estrógenos circulantes que impacta de manera directa sobre el eje hipotálamo-hipofisario. Sin estrógenos ováricos, el lactotrofo pierde su principal factor estimulador, al mismo tiempo que el hipotálamo pierde estimulación en la actividad de las neuronas TIDA y, por lo tanto, disminuye la síntesis y secreción del principal factor inhibitorio, la dopamina (C. L. Chen & Meites, 1970);(N Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que una ovariectomía peripuberal en ratones de los dos modelos experimentales de prolactinoma: ratones *Drd2<sup>-/-</sup>* y *hCGβ*, previene el desarrollo de una hiperplasia hipofisaria, indicando la participación de factores ováricos en el desarrollo de este tipo de tumor (S. T. Hentges & Low, 2002);(Ahtiainen et al., 2010). Más aún, en ambos modelos experimentales se ha probado que un reemplazo hormonal en estas hembras, previamente ovariectomizadas, no es suficiente para restaurar la formación del tumor.

Estos resultados en su conjunto sugieren que en el desarrollo de una hiperplasia hipofisaria influyen no solo los efectos de DA, E2 y P4, sino que también esta hiperplasia podría depender de la participación de un factor

ovárico distinto, pero no por ello menos indispensable para la formación del tumor.

Como mencionamos previamente, las inhibinas son factores de crecimiento pertenecientes a la familia TFG $\beta$  cuya principal fuente de producción son los ovarios (Makanji et al., 2014). Se ha descrito que una disminución en la concentración de inhibinas circulatorias induce importantes alteraciones en la glándula hipófisis, las cuales se postula, podrían estar contribuyendo al menos en parte, al desarrollo de un prolactinoma (DePaolo, Mercado, Guo, & Ling, 1993).

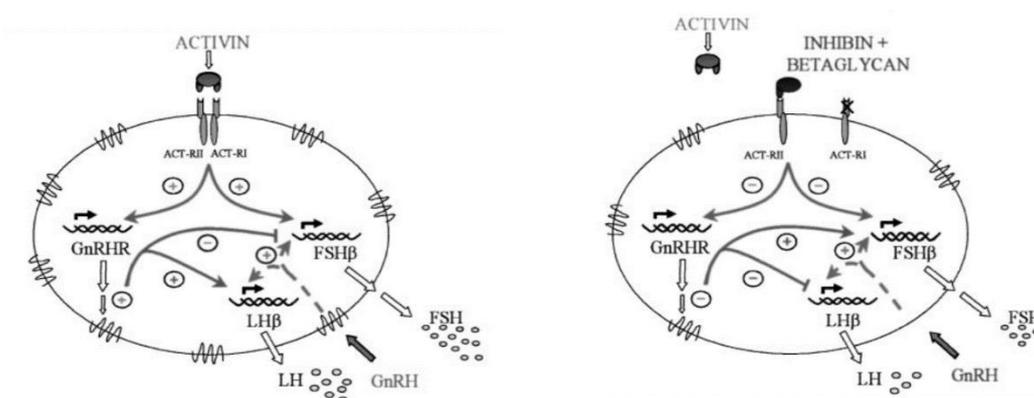
---

### **ALTERACIONES EN EL EJE GONADOTRÓFICO: ROL DE ACTIVINAS E INHIBINAS**

La secreción de las gonadotrofinas (FSH, LH) por parte de la hipófisis es, en parte, regulada por los estrógenos a lo largo del ciclo reproductivo (Levine, 1997). Existen numerosas evidencias de que los estrógenos juegan un rol importante en la inhibición de la secreción de gonadotrofinas actuando sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior. Por su parte, la progesterona es capaz de inhibir la expresión de la subunidad  $\beta$  de LH (LH $\beta$ ) y de estimular la expresión de la subunidad  $\beta$  de FSH (FSH $\beta$ ) en los gonadotropos (Thackray, McGillivray, & Mellon, 2006);(Thackray, Mellon, & Coss, 2010). Asimismo, ha sido descrito que una ovariectomía en ratones hembras resulta en un aumento en los niveles de LH y FSH en circulación (Wise & Ratner, 1980).

Por otro lado, GnRH promueve una síntesis y liberación diferencial de FSH y LH según su amplitud y frecuencia de pulsatilidad; variaciones que pueden correlacionarse con la estimulación sobre la síntesis de los ARNm correspondientes a las subunidades FSH $\beta$  y LH $\beta$  de ambas hormonas (Haisenleder, Dalkin, Ortolano, Marshall, & Shupnik, 1991);(Stamatiades & Kaiser, 2018). Mientras que una frecuencia baja de pulsos de GnRH favorece la expresión de FSH $\beta$  y disminuye la expresión de los receptores de GnRH (GnRHR), una frecuencia de pulsos elevados promueve un aumento en la expresión de LH $\beta$  y de GnRHR y la disminución en la síntesis de folistatina (FST) local hipofisaria (Wildt et al., 1981);(Dalkin, Haisenleder, Ortolano, Ellis, & Marshall, 1989);(Kirk, Dalkin, Yasin, Haisenleder, & Marshall, 1994).

Sin embargo, a pesar de que el rol de los E2, P4 y GnRH son de suma importancia en la síntesis hipofisaria diferencial de las subunidades  $\beta$  de las gonadotrofinas, existe un control adicional llevado a cabo por factores que son sintetizados no sólo en los ovarios, sino que también son producidos de manera local en la hipófisis: activinas, inhibinas y folistatinas. Figura 3.1.



**Figura 3.1. Representación esquemática de la regulación en la síntesis de FSH $\beta$  y LH $\beta$  en el gonadotropo.** Imagen tomada y modificada de (Gregory & Kaiser, 2004).

Ha sido descrito que en gonadotropos, las activinas estimulan la síntesis de FSH por un mecanismo que involucra la vía del receptor ActRIB y las proteínas SMAD (Massague, 1998);(Liliana Attisano & Wrana, 2002). La regulación de activina B sobre el gonadotropo, ocurre por un mecanismo autocrino que involucra a activina B, folistatina y FSH $\beta$  (Fortin et al., 2015). Esta regulación autocrina produce en el gonadotropo un impacto de hasta 50 veces la estimulación que promueve GnRH sobre la síntesis FSH $\beta$  en este tipo celular (C. Welt et al., 2002);(Abel et al., 2014). A su vez, este mecanismo es modulado negativamente por inhibinas de origen gonadal e hipofisario, así como también por la folistatina local sintetizada tanto por los gonadotropos como por las células foliculoestrelladas de la hipófisis (V. Roberts et al., 1989);(Kogawa et al., 1991);(Kaiser et al., 1992).

Por otro lado, las activinas, si bien intervienen en la regulación de la expresión de LH $\beta$  en gonadotropos, lo hacen con un menor impacto respecto de la regulación fuerte ejercida sobre FSH $\beta$  (Attardi & Miklos, 1990);(Coss, Thackray, Deng, & Mellon, 2005).

## ACTIVINAS E INHIBINAS EN OVX

Las regulaciones previamente mencionadas se ven alteradas frente a una ovariectomía. Luego de la extirpación bilateral de ovarios, la hipófisis recibe una mayor estimulación de GnRH por parte del hipotálamo debido a la falta de inhibición por estrógenos gonadales y, en consecuencia, la síntesis hipofisaria de folistatina y de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que conforman a las activinas e inhibinas se ven modificadas. Tanto en ratas como en ratones hembra, una OVX produce un aumento en el ARNm que codifica para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ B en gonadotropos (Gregory & Kaiser, 2004) al mismo tiempo que se observa en la glándula un aumento en la expresión de folistatina (DePaolo et al., 1993). Este aumento en la síntesis de ambas subunidades se ve reflejado en una mayor producción de activina B que induce un aumento en la expresión de los receptores para GnRH (GnRHR) en los gonadotropos hipofisarios (Gregory & Kaiser, 2004);(Xia & Schneyer, 2009) promoviendo en este tipo celular un aumento en la síntesis de los ARNm que codifican para FSH $\beta$  y LH $\beta$  (Gregory & Kaiser, 2004).

En conjunto o de forma independiente las inhibinas y folistatinas modulan la señalización de activinas ya sea mediante regulación de su biodisponibilidad (folistatina) en MEC o regulando el acceso a su receptor (inhibina). De este modo, la mera existencia de varios mecanismos de regulación en la vía de las activinas argumenta fuertemente la importancia de su función en el control de la fisiología normal y patológica de los distintos tipos celulares hipofisarios, entre ellos, el lactotrofo.

### OBJETIVO III

Sabiendo que: **1-** La síntesis de activinas e inhibinas tanto hipofisarias como ováricas se encuentra alterada en el desarrollo de un prolactinoma; **2-** Una ovariectomía altera el eje gonadotrófico y, en consecuencia, la expresión de activinas, inhibinas y folistatinas en hipófisis (DePaolo et al., 1993);(Dalkin, Haisenleder, Yasin, Gilrain, & Marshall, 1996);(Gregory & Kaiser, 2004); **3-** Una ovariectomía previene el desarrollo de un prolactinoma en ratones hembra de dos modelos experimentales de prolactinoma: ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> (Ahtiainen et al., 2010);(S. T. Hentges & Low, 2002):

Postulamos que la falta de inhibinas ováricas en modelos OVX potencia la acción hipofisaria de las activinas evitando el desarrollo de un prolactinoma.

Para demostrar nuestra hipótesis, nos propusimos estudiar las alteraciones que sufre el sistema activina-inhibina hipofisario en tres modelos experimentales de prolactinoma:

- Ratas hembra estrogenizadas (grupo DES) vs. ratas ovariectomizadas (grupo OVX)
- Ratones hembra hCG $\beta$  de 6 meses de edad, intactos o previamente OVX a los 2 meses de vida
- Ratones hembra Drd2<sup>-/-</sup> de 8 meses de edad, intactos o previamente OVX a los 2 meses de vida

---

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

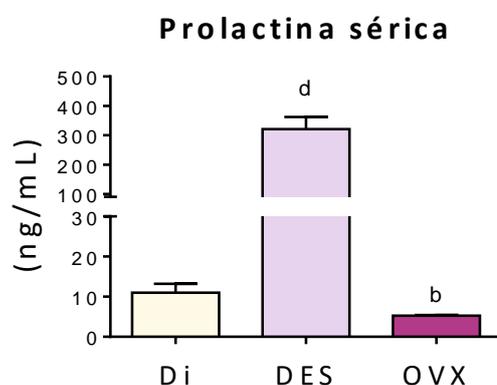
- ❖ Estudiar la expresión de los distintos componentes del sistema activinas-inhibinas hipofisario (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ A y  $\beta$ B, receptores, antagonistas y proteínas de unión, efectores intracelulares) en ratas en diestro vs. DES y OVX y en ratones hembra hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> (ovariectomizados vs. control).
- ❖ Evaluar la relación entre la expresión del sistema activinas e inhibinas y las variaciones hormonales en hembras de ambos modelos experimentales de ratones hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> luego de una ovariectomía.

## RESULTADOS III: PARTE I SISTEMA ACTIVINAS-INHIBINAS EN RATAS DES Y OVX

### DESARROLLO DE UN PROLACTINOMA

Ratas hembra Sprague Dawley adultas (60 días) fueron divididas en tres grupos experimentales: ratas en diestro (grupo control), ratas con administración subcutánea de un pellet de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (grupo DES) y ratas ovariectomizadas (grupo OVX), (ver descripción detallada en sección Materiales y Métodos).

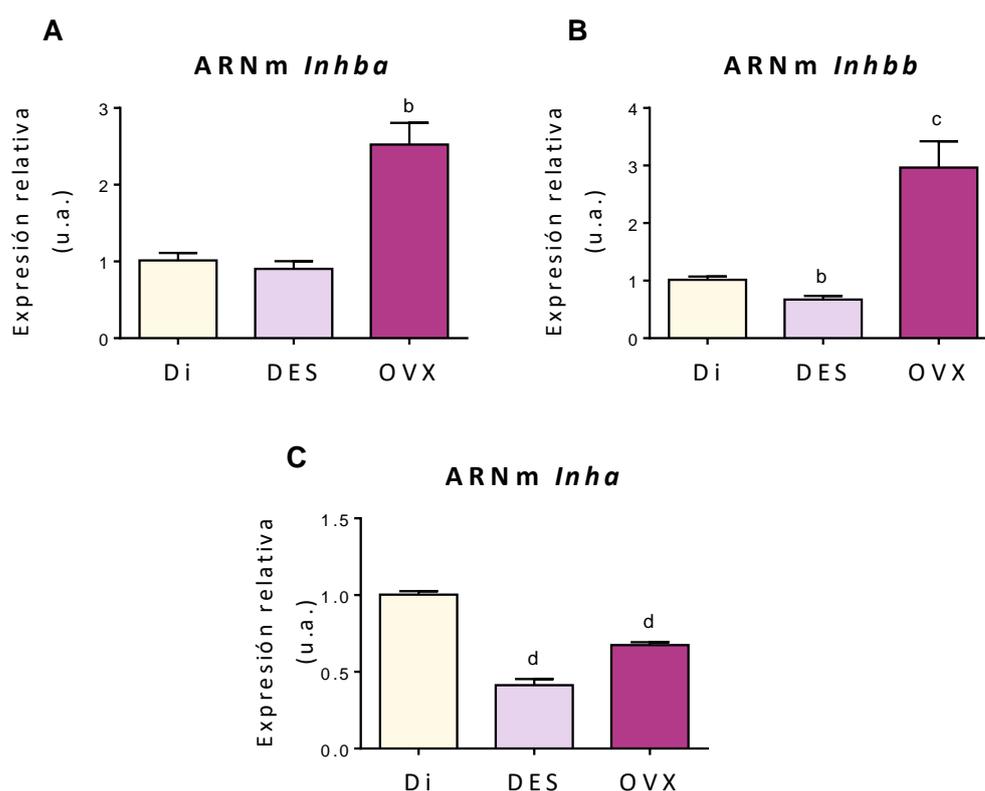
Comenzamos nuestro estudio analizando por RIA los niveles de PRL sérica. Encontramos en el grupo de ratas DES niveles de PRL sérica muy elevados respecto del grupo control en diestro, acorde al desarrollo de un prolactinoma inducido por tratamiento crónico con estrógenos (Phelps & Hymer, 1983);(Recouvreux et al., 2012), (Figura 3.2). Asimismo, notamos una disminución en los niveles séricos de PRL en el grupo de ratas OVX respecto del grupo control, producto de la disminución en el número de lactotopos frente a una OVX (De Paul et al., 1997).



**Figura 3.2. PRL sérica medida por RIA (ng/ml) en ratas: diestro, DES y OVX.** Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Dunnet, Interacción:  $p < 0,0001$ ; d,  $p < 0,0001$ ; b,  $p < 0,01$ .

## EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ , $\beta A$ y $\beta B$

En base a lo expuesto en la introducción de este capítulo y acorde a los resultados presentados en el capítulo 2 de esta tesis, postulamos que una alteración en los componentes del sistema activinas e inhibinas se encuentran relacionados al desarrollo de un prolactinoma. En esta parte del tercer capítulo, nos propusimos estudiar este sistema en hipófisis de ratas hembra adultas con desarrollo de prolactinoma (ratas DES), ratas OVX y ratas en diestro (grupo control, Di). El tratamiento crónico con estrógenos no alteró la expresión hipofisaria de *Inhba*, pero redujo significativamente la expresión de *Inhbb* e *Inha* (Figura 3.3). Por otro lado, la OVX incrementó significativamente la expresión hipofisaria de las subunidades pertenecientes a las activinas: *Inhba* e *Inhbb* (Figuras 3.3A y 3.3B, respectivamente).

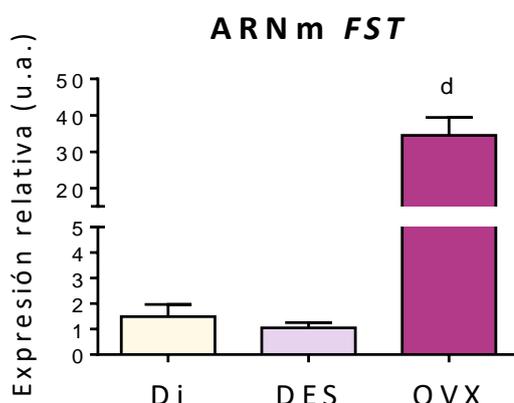


**Figura 3.3. Expresión relativa de subunidades *Inhba*, *Inhbb* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en hipófisis de ratas: diestro, DES y OVX.** Valores normalizados a *CiclotilinaB* y relativizados a hembras en diestro n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Dunnett. **A)** *Inhba*. ANOVA,  $P < 0,0001$ ; b,  $p < 0,01$ . **B)** *Inhbb*. ANOVA,  $P < 0,0001$ ; b,  $p < 0,01$ ; c,  $p < 0,001$ . **C)** *Inha*. ANOVA,  $p < 0,0001$ ; d,  $p < 0,0001$ .

Estos resultados podrían sugerir un potencial aumento en la síntesis de activinas hipofisarias en ratas Sprague Dawley luego de una ovariectomía, por un lado, debido al aumento en la expresión de *Inhba* y *Inhbb* y, por otro lado, por una potencial disminución en la formación de inhibinas locales debido a la disminución en la síntesis de *Inha*. Por otro lado, el tratamiento crónico con estrógenos disminuyó significativamente los niveles de *Inhbb* a *Inha*, evidenciando alteraciones en el sistema activinas-inhibinas hipofisario, inducidas durante el desarrollo de un prolactinoma en este modelo.

### EXPRESIÓN DE FST: ANTAGONISTA FUNCIONAL DE ACTIVINAS

Cuando evaluamos la expresión hipofisaria de FST, molécula que une de forma específica e irreversible a las activinas, limitando su disponibilidad biológica local e interfiriendo en su mecanismo de acción (Phillips, 2001), encontramos niveles de expresión significativamente elevados respecto de los presentados por el grupo control (ratas en diestro, Di), Figura 3.4.

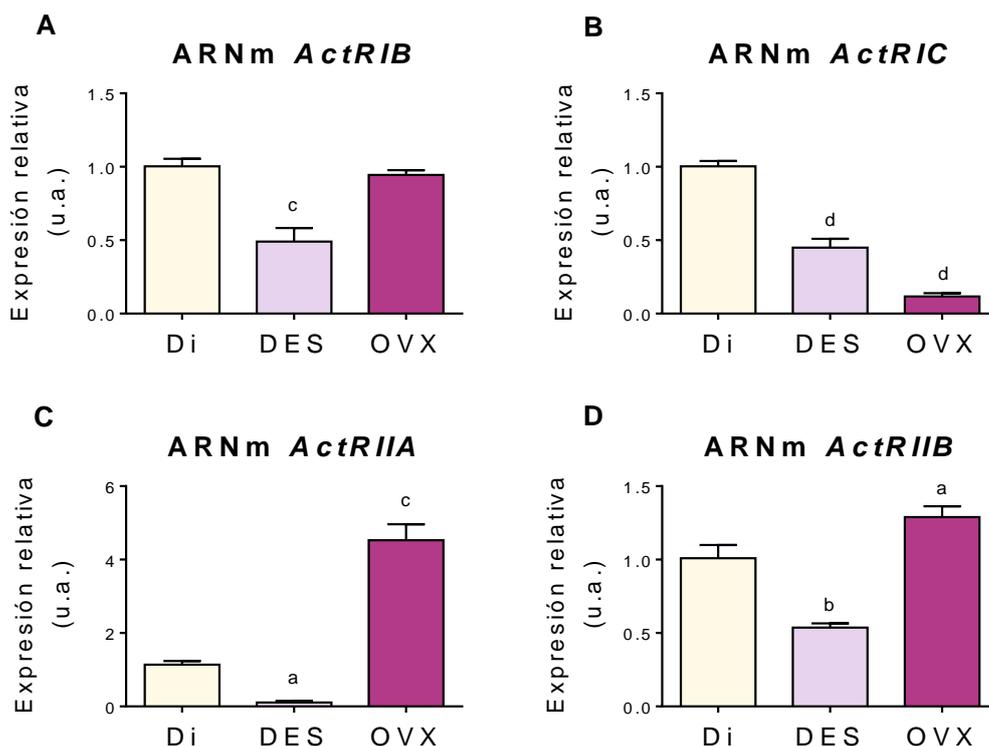


**Figura 3.4. Expresión relativa de FST hipofisaria evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratas: diestro, DES y OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB* y relativizados a hembras en diestro n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Dunnet., p<0,0001; d, p<0,0001.

### EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE RECEPTORES DE ACTIVINAS DE TIPO I Y TIPO II

A continuación, estudiamos la expresión hipofisaria de los receptores de activinas de tipo 1 y tipo 2: ActRIB, ActRIC, ActRIIA y ActRIIB por PCR cuantitativa en tiempo real. En todos los casos, encontramos una disminución

significativa de la expresión de estos receptores en el grupo de ratas DES (con desarrollo de prolactinoma) respecto de sus pares en diestro (Figura 3.5). Por otro lado, el grupo de ratas OVX presenta una disminución en la expresión relativa del receptor de tipo 1 ActRIC y un aumento significativo en la expresión de ambos receptores de tipo 2: ActRIIA y ActRIIB respecto de sus pares en diestro (Figuras 3.5C y 3.5D, respectivamente).



**Figura 3.5. Expresión relativa de receptores de activinas en hipófisis evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratas: diestro, DES y OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB* y relativizados a hembras en diestro n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Dunnet. **A)** ActRIB. ANOVA,  $P=0,0003$ ; c,  $p<0,001$ . **B)** ActRIC. ANOVA,  $P=<0,0001$ ; d,  $p<0,0001$ . **C)** ActRIIA. ANOVA,  $p<0,0001$ ; a,  $p<0,05$ ; c,  $p<0,001$ . **D)** ActRIIB. ANOVA,  $p=0,0002$ ; a,  $p<0,05$ ; b,  $p<0,01$ .

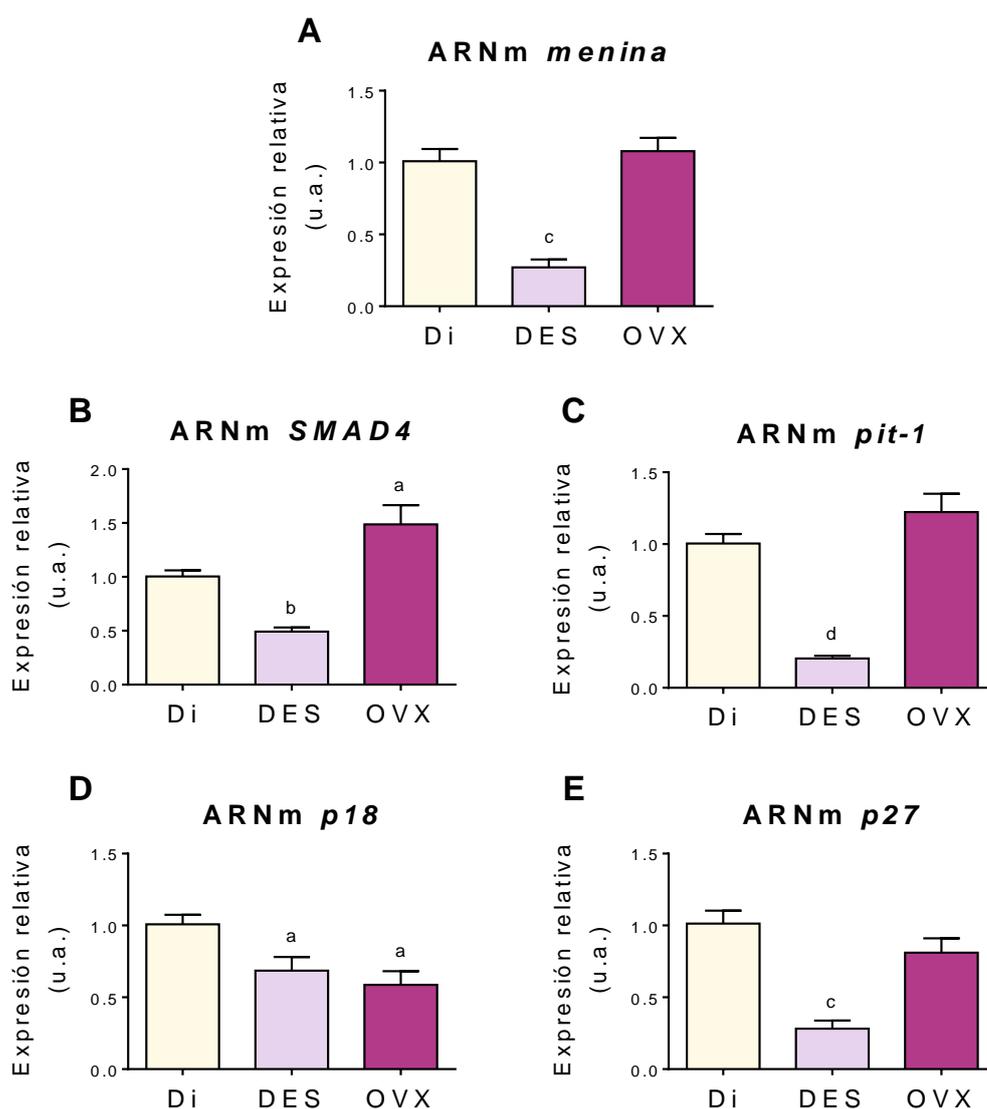
La disminución en la expresión de ActRIIA y ActRIIB inducida por el tratamiento estrogénico, junto a la recuperación en la expresión observada luego de una OVX podrían sugerir una modulación negativa por parte de los estrógenos sobre la expresión de los receptores de activinas de tipo 2 en hipófisis.

## **EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO DEL LACTOTROPO Y LA SECRECIÓN DE PRL: PIT-1 Y MENINA**

Como mencionamos previamente en el capítulo 2, había sido descrito que las activinas regulan el crecimiento de las células lactotropas y la secreción de PRL mediante unión al receptor de membrana ActRIB que fosforila SMAD3. Luego pSMAD3 une a SMAD4 y menina formando un complejo que trasloca al núcleo y regula negativamente al factor de transcripción pit-1 (Lacerte et al., 2004);(Hendy et al., 2005) y otros factores de transcripción como p18 y p27 (Hendy et al., 2005).

Al evaluar la expresión de los factores involucrados en esta vía de señalización, observamos una expresión disminuida de todos los factores mencionados en las hipófisis provenientes del grupo DES respecto del grupo de ratas en diestro (Figura 3.6). Por otro lado, la OVX sólo incremento la expresión hipofisaria de SMAD4 (Figura 3.6B) y disminuyó la expresión de p18 (Figura 3.6D) respecto del grupo control en diestro, sin inducir alteraciones en la expresión hipofisaria de menina, pit-1 y p27.

Las variaciones de expresión observadas en esta primera parte en los grupos DES y OVX, podrían sugerir una relación directa de los estrógenos sobre la expresión de las subunidades  $\beta A$  y  $\beta B$  de las activinas, así como también sobre los receptores de tipo 2 y SMAD4. Sin embargo, es importante destacar que este modelo (DES) es farmacológico, y el desarrollo de los prolactinomas en ratas es inducido por dosis muy elevadas y crónicas de tratamiento estrogénico, con lo cual es un modelo un poco alejado de lo que ocurre normalmente en humanos en comparación al modelo murino con ausencia de receptor dopaminérgico RD2 (ratones *Drd2<sup>-/-</sup>*), modelo ideal para el estudio de prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos.



**Figura 3.6. Expresión relativa hipofisaria de genes reguladores de las funciones del lactotrofo y secreción de PRL en hipófisis evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratas: diestro, DES y OVX.** Valores normalizados a CiclofilinaB y relativizados a hembras en diestro n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del test de Dunnett. **A)** *Menina*. ANOVA,  $p=0,0001$ ; c,  $p<0,001$ . **B)** *SMAD4*. ANOVA,  $p=0,0003$ ; b,  $p<0,01$ ; a,  $p<0,05$ . **C)** *pit-1*. ANOVA,  $p<0,0001$ ; d,  $p<0,0001$ . **D)** *p18*. ANOVA,  $p=0,0209$ ; a,  $p<0,05$ . **E)** *p27*. ANOVA,  $p=0,0005$ ; c,  $p<0,001$ .

Por esta razón, y ante la evidencia de que una ovariectomía previene, en ambos modelos experimentales murinos la formación de un prolactinoma, decidimos analizar el sistema activinas-inhibinas en ratones hembra  $hCG\beta$  y  $Drd2^{-/-}$  de ambos genotipos, ovariectomizados y no ovariectomizados a los 6 y 8 meses de edad, respectivamente.

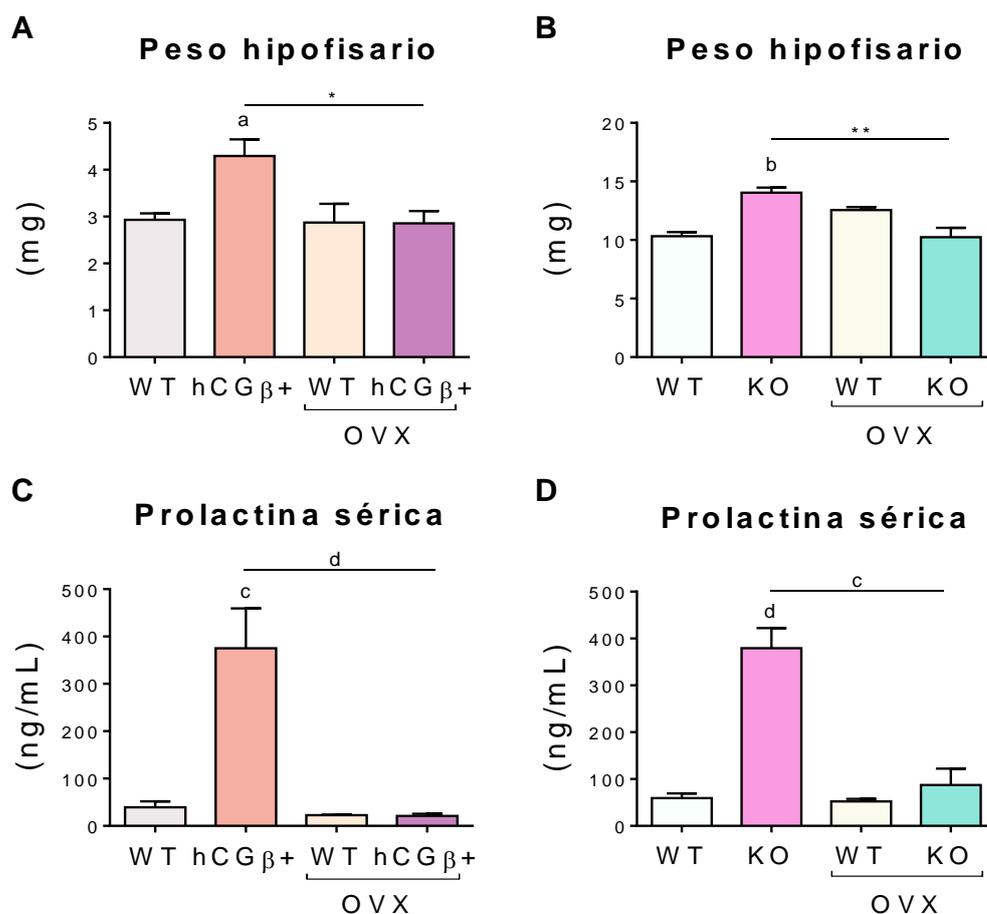
## **RESULTADOS III: PARTE II SISTEMA ACTIVINAS-INHIBINAS EN RATONES HCG $\beta$ Y DRD2<sup>-/-</sup>: EFECTOS DE UNA OVX**

En esta sección analizamos los efectos de una OVX en el peso hipofisario, los niveles séricos hormonales, así como también los niveles de expresión hipofisaria de los componentes del sistema activinas-inhibinas en ratones hembra adultos hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> de ambos genotipos ovariectomizados (OVX) y no OVX (grupos control).

---

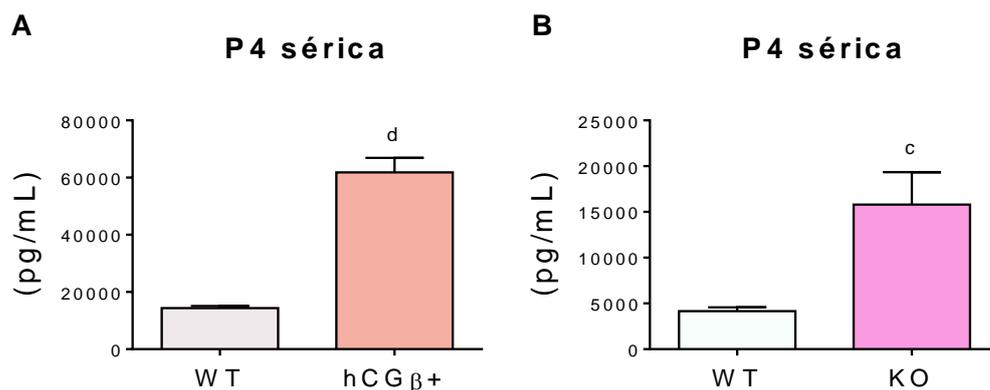
### **PESO HIPOFISARIO Y NIVELES SÉRICOS DE PRL**

Como puede observarse en la Figura 3.7 y, al igual que había sido previamente descrito por Ahtiainen y col. (Ahtiainen et al., 2010) y Hentges y col. (S. T. Hentges & Low, 2002), la OVX evitó el desarrollo de un prolactinoma y, por ende, el aumento de peso hipofisario (Figura 3.7A y 3.7B) y la hiperprolactinemia (Figura 3.7C y 3.7D) en hembras transgénicas de ambos modelos experimentales hCG $\beta$ <sup>+</sup> y ko, respectivamente.



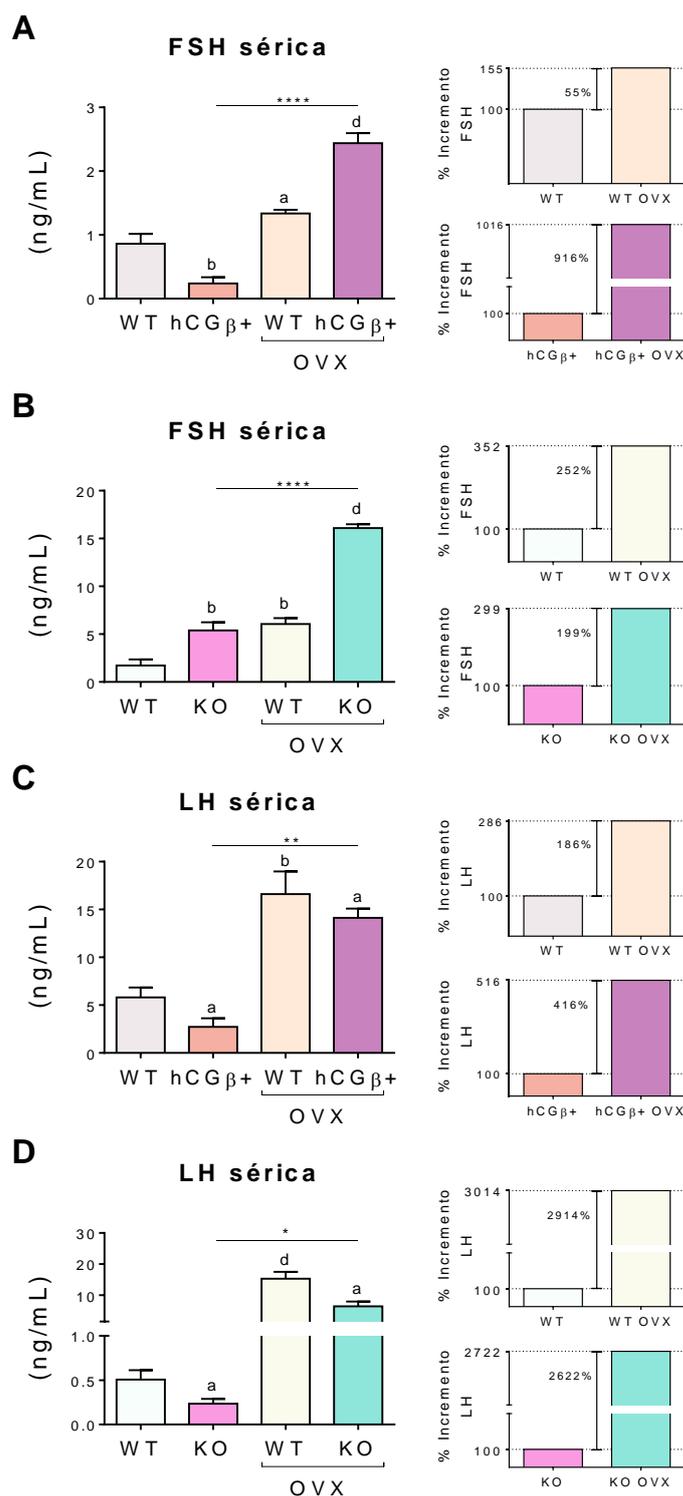
**Figura 3.8. Peso hipofisario (A, B) y PRL sérica medida por RIA (C, D) en hembras control y OVX.** n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. Ratones hembra hCG $\beta$  de 6 meses de edad (A y C); Ratones hembra Drd2<sup>-/-</sup> de 8 meses de edad (B y D). **A)** Interacción ns; a, p<0,05; \*, p<0,05 hembras hCG $\beta$ + vs. hCG $\beta$ + OVX. **B)** Interacción p=0,0002; b, p<0,01; \*\*, p<0,01 hembras ko vs. ko OVX. **C)** Interacción p=0,0007; c, p<0,001; d, p<0,0001 hembras hCG $\beta$ + vs. hCG $\beta$ + OVX. **D)** Interacción p=0,0008; d, p<0,0001; c, p<0,001 hembras ko vs. ko OVX.

Cuando evaluamos los niveles séricos de progesterona por RIA identificamos en ambos modelos experimentales niveles mayores de esta hormona en ratones transgénicos hCG $\beta$ + y ko respecto de sus pares wt (Figuras 3.9A y 3.9B, respectivamente). Es importante recordar que los altos niveles de progesterona encontrados en ratones hembra hCG $\beta$ + (ver diferencia de escala entre modelos en gráficos 3.9A y 3.9B) son producto de la luteinización masiva de sus ovarios debida a la sobreexpresión de hCG en este modelo, acorde al fenotipo descrito por Rulli y col. (Rulli et al., 2003).



**Figura 3.9. P4 sérica evaluada por RIA en hembras de grupos control.** n=8/grupo. Análisis estadístico: test de Student. **A)** Ratones hembra hCGβ de 6 meses de edad. p=0,0005. **B)** Ratones hembra Drd2<sup>-/-</sup> de 8 meses de edad. p<0,0005.

Por otro lado, el evaluar los niveles de gonadotrofinas, observamos un incremento en los niveles séricos de FSH y LH luego de una OVX en ambos modelos experimentales (Figura 3.10). Sin embargo, cabe destacar que el aumento que sufren los niveles de gonadotrofinas séricas inducido por una OVX es mucho más marcado en hembras transgénicas de ambos modelos experimentales (hCGβ+ y ko), que aquel observado en hembras wt (ver gráficos anexos donde se grafica la proporción de aumento).



**Figura 3.10. Niveles séricos de FSH y LH evaluados por RIA en hembras hCGβ de 6 meses de edad (A y C) y ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> (B y D) de 8 meses de edad, grupos control y OVX. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** FSH. Ratones hCGβ. Interacción p<0,0001; b, p<0,01; a, p<0,05; d, p<0,0001; \*\*\*\*, p<0,0001 hembras hCGβ+ vs. hCGβ+ OVX. **B)** FSH. Ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. Interacción p=0,0004; b, p<0,01; d, p<0,0001 hembras ko vs. ko OVX. **C)** LH. Ratones hCGβ. Interacción ns; a, p<0,05; b, p<0,01; \*\*, p<0,01 hembras hCGβ+ vs. hCGβ+ OVX. **D)** LH. Ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. Interacción p=0,0045; a, p<0,05; d, p<0,0001; \*, p<0,05 hembras ko vs. ko OVX.**

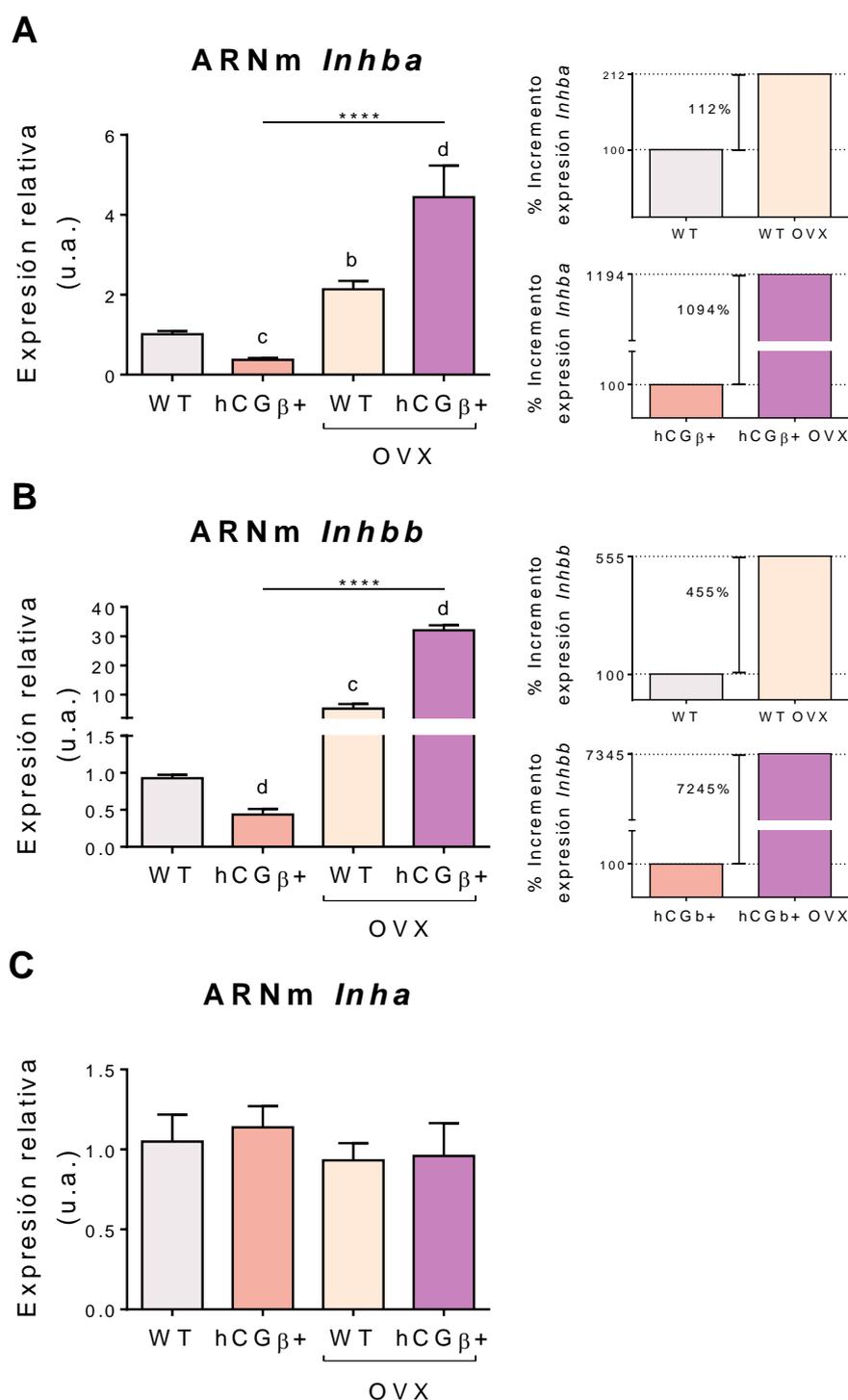
## EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ , $\beta A$ Y $\beta B$

Como demostramos en el capítulo 2 de esta tesis, en la Figura 3.11 podemos observar que en el grupo control las hembras con desarrollo de prolactinomas (hCG $\beta$ + y ko) presentan una menor expresión hipofisaria de las subunidades  $\beta A$  y  $\beta B$  respecto de sus pares wt no tumorales.

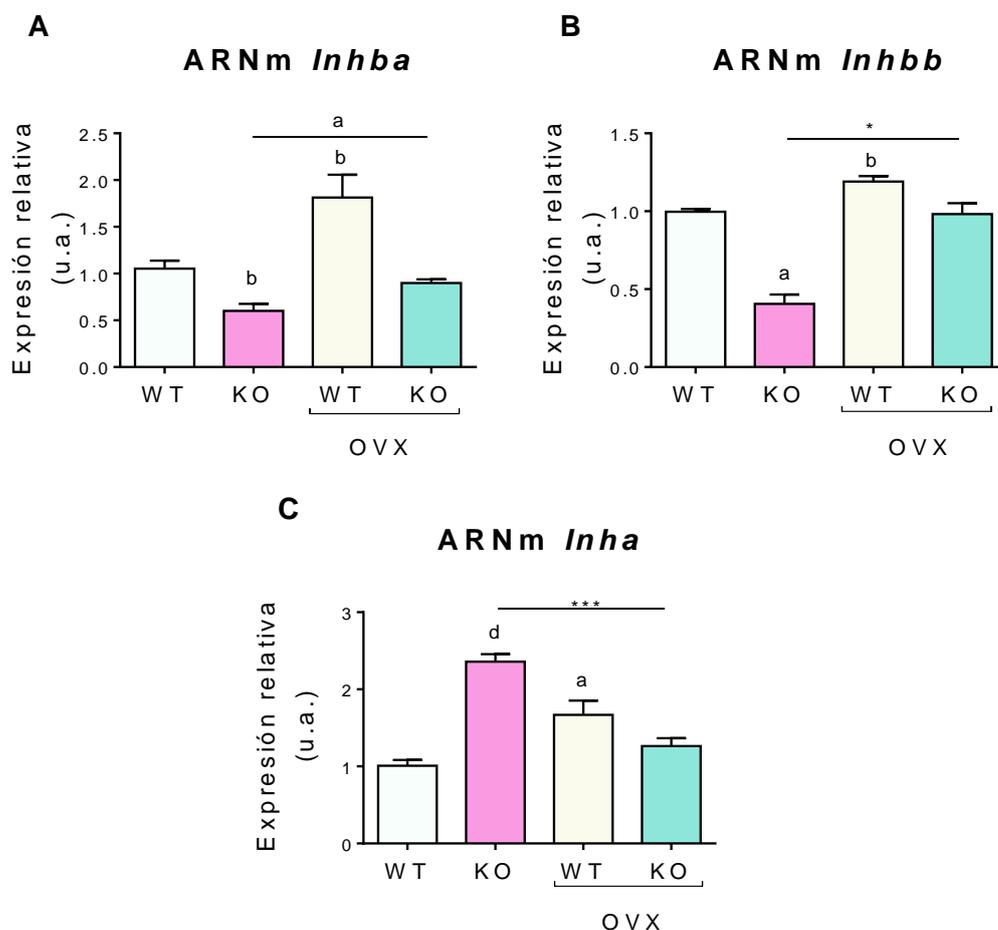
Al respecto, es interesante destacar que, como se observa en las Figuras 3.11 y 3.12, la OVX promueve un aumento muy significativo en la expresión hipofisaria de estas subunidades en ambos modelos experimentales. Asimismo, el incremento de expresión hipofisaria, tanto de  $\beta A$  como de  $\beta B$  inducido por la OVX, es mucho más pronunciado en las hembras transgénicas (hCG $\beta$ + y ko) que en sus respectivos controles wt.

Otro factor a destacar es el hecho de que, en el modelo hCG $\beta$ , el incremento que induce la OVX sobre la expresión hipofisaria de *Inhbb* (Figura 3.11B) es significativamente mayor respecto de aquel observado para *Inhba* (Figura 3.11A), lo cual puede evidenciarse fácilmente por las diferencias de escala presentes entre ambos gráficos (ver gráficos anexos a Figuras 3.11A y 3.11B).

Respecto de la expresión hipofisaria de *Inha*, no encontramos ningún efecto inducido por la OVX en el modelo de ratones hCG $\beta$  (Figura 3.11C). Sin embargo, en el modelo *Drd2*<sup>-/-</sup> encontramos que la OVX aumenta la expresión hipofisaria de *Inha* en hembras wt, pero, por el contrario, la disminuye en las hembras ko (ko OVX vs. ko intacta), Figura 3.12C.



**Figura 3.11. Expresión hipofisaria relativa de subunidades *Inhbα*, *Inhbβ* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra hCGβ OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=6/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** *Inhbα*. Interacción  $p < 0,0001$ ; c,  $p < 0,0001$ ; b,  $p < 0,001$ ; d,  $p < 0,00001$ ; \*\*\*\*,  $p = 0,0001$  hembras hCGβ+ vs. hCGβ+ OVX. **B)** *Inhbβ*. Interacción  $p < 0,0001$ ; d,  $p < 0,00001$ ; c,  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*,  $p = 0,0001$  hembras hCGβ+ vs. hCGβ+ OVX. **C)** *Inha*. Interacción ns.

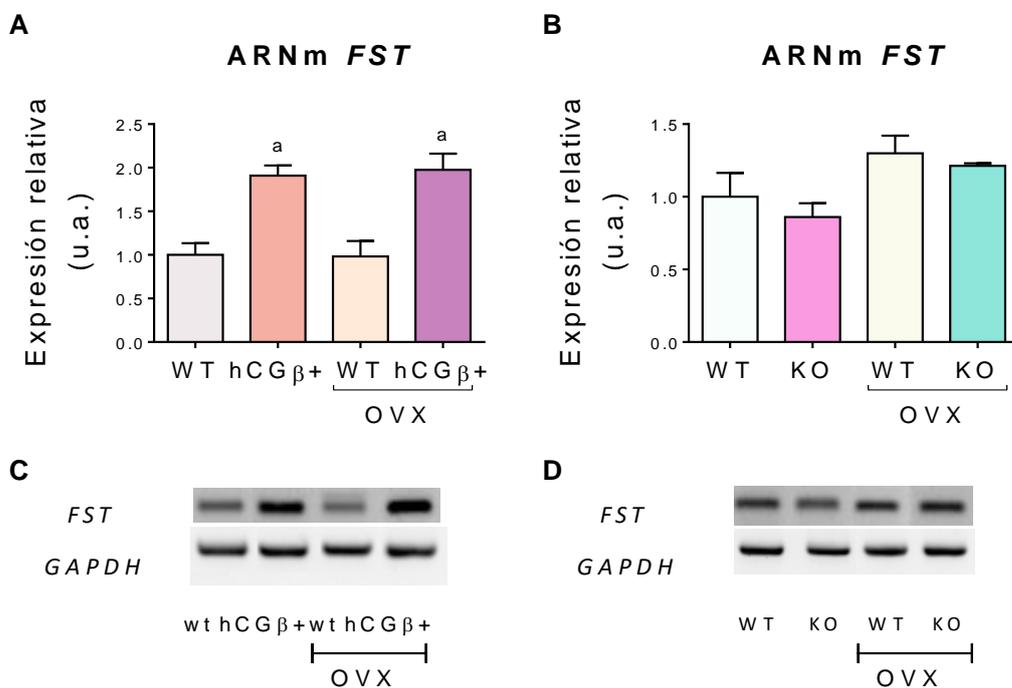


**Figura 3.12. Expresión hipofisaria relativa de subunidades *Inhba*, *Inhbb* e *Inha* evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra *Drd2*<sup>-/-</sup> OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** *Inhba*. Interacción ns; b, p<0,01; a, p<0,05 hembras wt OVX vs. ko OVX. **B)** *Inhbb*. Interacción ns; a, p<0,05; b, p<0,01; \*, p= 0,05 hembras ko vs. ko OVX. **C)** *Inha*. Interacción p< 0,0001; d, p<0,0001; a, p<0,05; \*\*\*, p= 0,001 hembras ko vs. ko OVX.

### EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE ANTAGONISTAS FUNCIONALES DE ACTIVINAS: FST Y BETAGLICANO

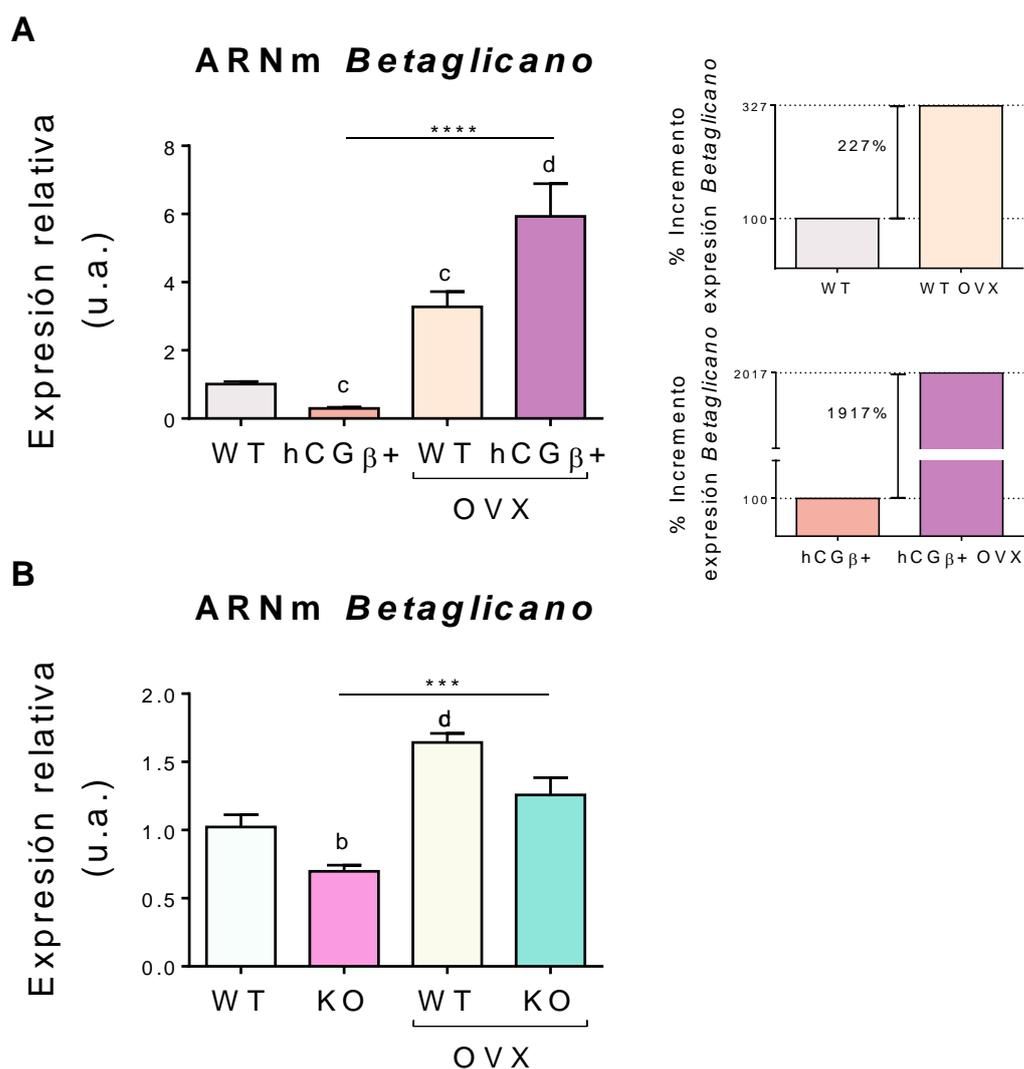
Como demostramos en el capítulo 2 de esta tesis, en el modelo hCG $\beta$  las hembras con desarrollo de prolactinomas presentan una mayor expresión hipofisaria de FST288 que sus pares wt. En las Figuras 3.13A y 3.13C podemos observar que la OVX no altera el patrón de expresión hipofisario de FST288 en este modelo, así como tampoco evidenciamos alteraciones

inducidas por la OVX en la expresión de *FST288* hipofisaria en las hembras *Drd2<sup>-/-</sup>* (Figura 3.13B y 3.13D).



**Figura 3.13. Expresión hipofisaria de *FST288* en ratones hembra hCGβ (A y C) y *Drd2<sup>-/-</sup>* (B y D) OVX y no OVX evaluados por PCR semicuantitativa. A) y B) Cuantificación por densitometría de la intensidad de las bandas de *FST288* relativa a las de *GAPDH*. Normalizados a hembra wt control. n=4/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. A) Ratones hCGβ. Interacción ns. a, p<0,05. B) Ratones *Drd2<sup>-/-</sup>*. Interacción ns. C) y D) Imágenes representativas de las bandas en gel de agarosa 2% de *FST288* (62 pb) y para *GAPDH* (171 pb), utilizada como control de carga.**

Respecto de la expresión de betaglicano, en ambos modelos de ratón, podemos observar que la OVX aumenta los niveles de expresión de este correceptor en hipófisis de hembras de ambos genotipos (Figuras 3.14A y 3.14B), siendo en proporción, mucho más pronunciado el aumento que induce la OVX en las hembras hCGβ+ respecto al efecto inducido en sus pares wt (Figura 3.14A).

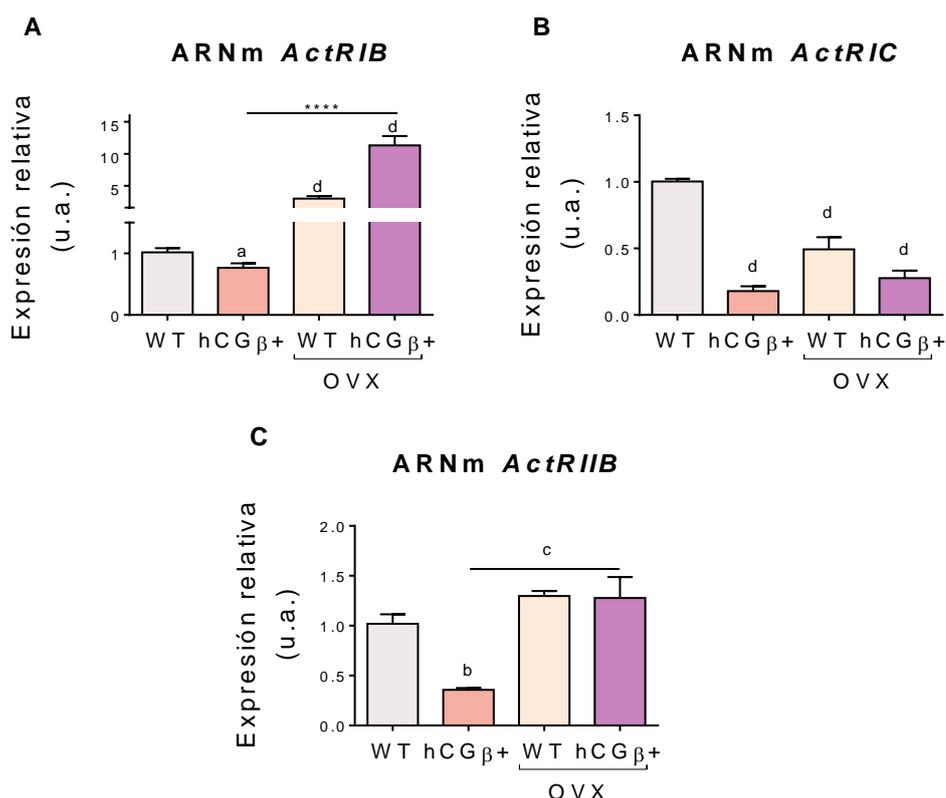


**Figura 3.14. Expresión relativa de betaglicano evaluada por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra hCGβ y *Drd2*<sup>-/-</sup> OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** Ratones hCGβ. Interacción p<0,0001; c, p<0,001; d, p<0,0001; \*\*\*\*, p<0,0001 hembras hCGβ vs. hCGβ+ OVX. **B)** Ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>. Interacción ns; b, p<0,01; d, p<0,0001; \*\*\*, p<0,001 hembras ko vs. ko OVX.

Hasta aquí, los resultados indican que la OVX altera la expresión hipofisaria de las activinas, las inhibinas y sus proteínas de unión en ambos modelos experimentales, de modo tal que las hipófisis de ratones hembra OVX hCGβ+ y OVX ko presentarían una mayor biodisponibilidad de activinas respecto de sus pares control (no OVX) que ejercerían un efecto inhibitorio de activinas más fuerte sobre la población lactotropa en estos grupos, impidiendo el desarrollo de un prolactinoma.

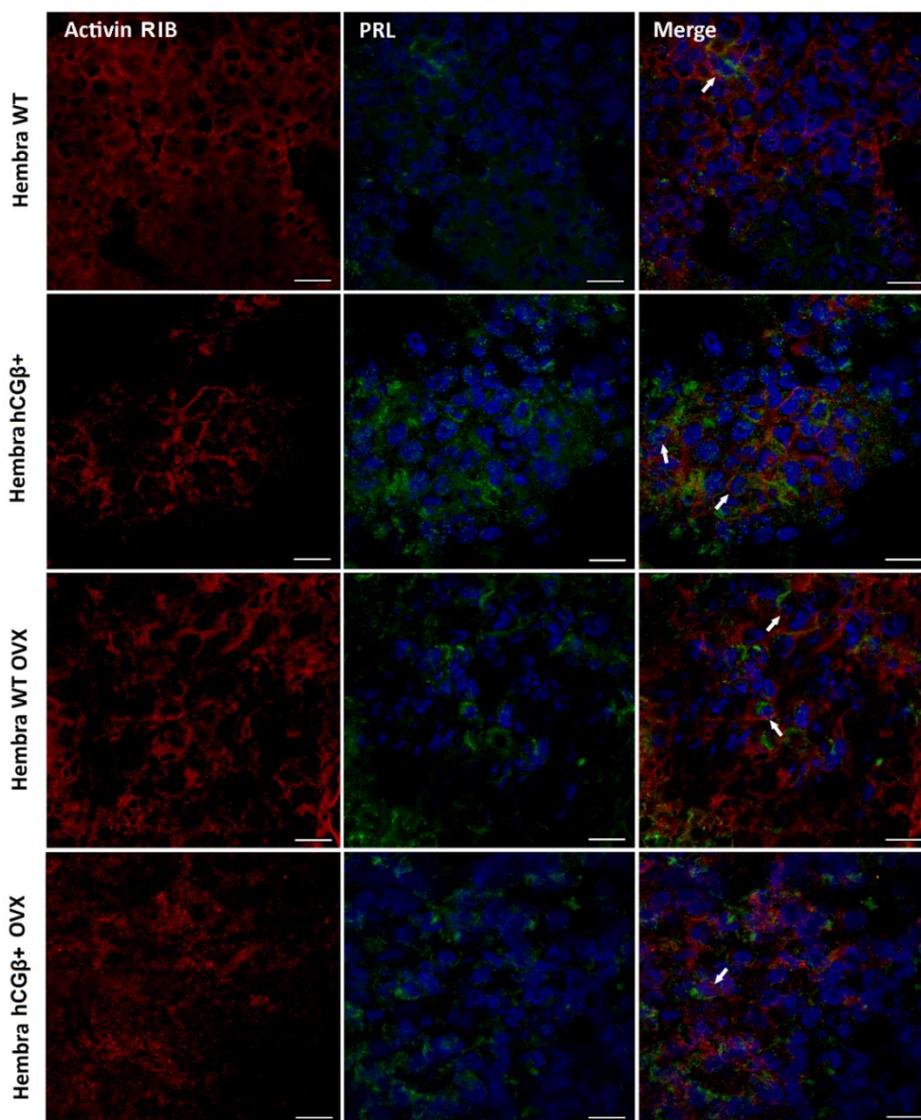
## EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE RECEPTORES DE ACTIVINAS DE TIPO 1 Y TIPO 2

Al estudiar la expresión de los receptores de activinas en hipófisis de ratones hCG $\beta$ , encontramos que la OVX afecta diferencialmente la expresión hipofisaria de los mismos. A saber, la OVX indujo un fuerte aumento en la expresión del receptor de tipo 1 ActRIB en hembras de ambos genotipos (Figura 3.15A); sin embargo, la expresión de ActRIC se encontró disminuida a causa de la OVX solo en hembras wt, sin verse afectada en las hembras hCG $\beta$ + (Figura 3.15B). Por último, la OVX no alteró la expresión del receptor de tipo 2 ActRIIB (Figura 3.15C) en hembras wt, pero si indujo un incremento muy marcado en su expresión en las hembras hCG $\beta$ +. Este hecho, junto a la incrementada expresión de activinas luego de una OVX, podría colaborar a una alta acción inhibitoria de las mismas sobre los lactotropos.



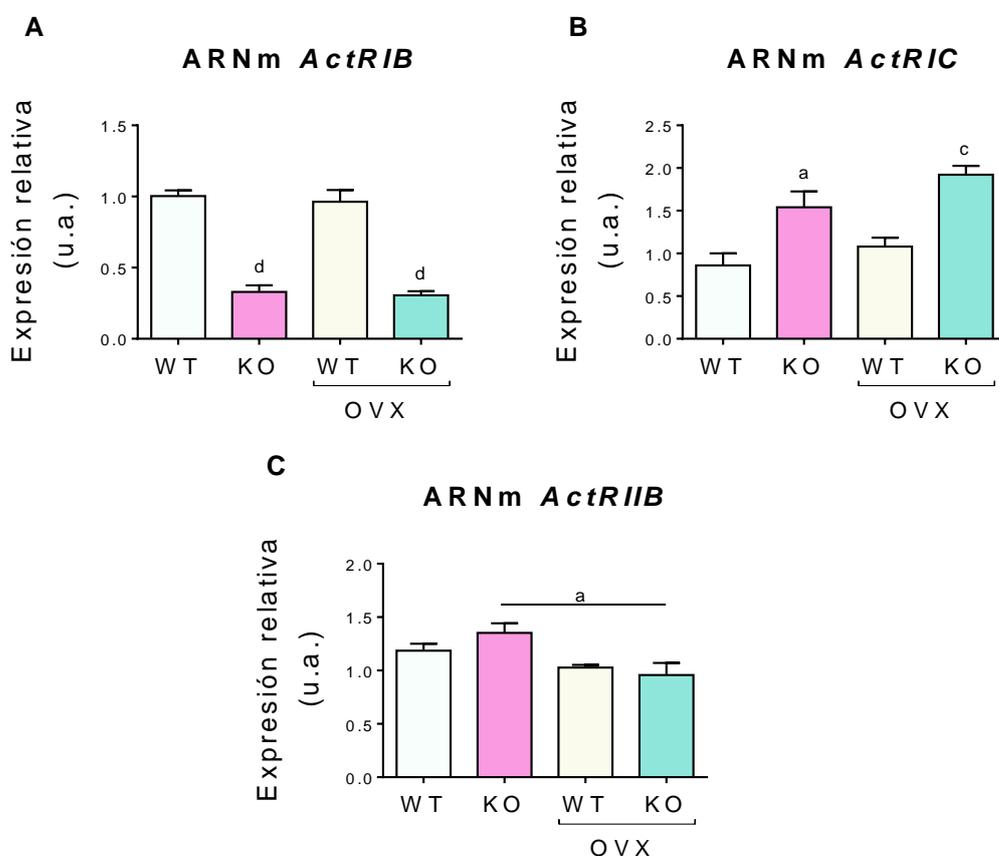
**Figura 3.15. Expresión hipofisaria relativa de los receptores de activinas de tipo 1 y 2 evaluadas por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra hCG $\beta$  OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** ActRIB. Interacción p<0,0001; a, p<0,05; d, p<0,0001; \*\*\*\*, p<0,0001 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX. **B)** ActRIC. Interacción p<0,0001; d, p<0,0001. **C)** ActRIIB. Interacción p=0,0074; b, p<0,01; c, p<0,001 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX.

Para asegurarnos una posible acción incrementada, post-OVX, de las activinas sobre la función lactotropa, analizamos por microscopía confocal y doble inmunomarcación la continuidad, aún después de la OVX, la co-localización del receptor ActRIB con PRL en los diferentes grupos. Como podemos ver en la Figura 3.16, ActRIB co-localiza con PRL en hipófisis de todos los grupos experimentales estudiados. Si bien no realizamos un análisis cuantitativo, podemos asegurar que este receptor se expresa en lactotrofos aún luego de realizada la OVX.



**Figura 3.16. Identificación y co-localización de ActRIB con la hormona hipofisaria PRL en cortes de hipófisis de ratones hCG $\beta$  control (no OVX) y OVX analizada por doble inmunofluorescencia indirecta. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas blancas indican lactotrofos (PRL) expresando ActRIB. Las imágenes fueron tomadas con aumento 40X. La longitud de la barra representa 20 $\mu$ m.**

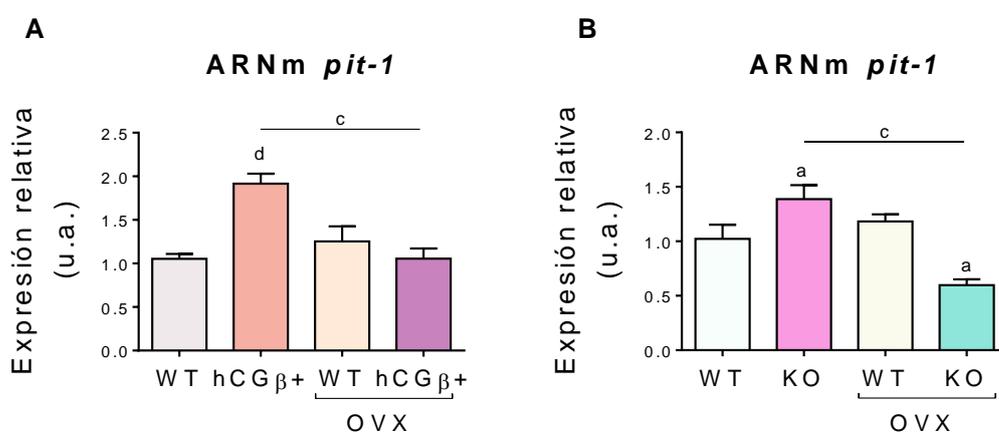
También analizamos los efectos de una OVX sobre la expresión de receptores de activinas en el otro modelo experimental (hembras *Drd2<sup>-/-</sup>*) y observamos que la OVX no modificó la expresión hipofisaria de los receptores de tipo 1: ActRIB y ActRIC (Figuras 3.17A y 3.17B, respectivamente), mientras que produjo una disminución en la expresión del receptor de tipo 2 ActRIIB en hipófisis de hembras ko OVX respecto de sus pares control (ko no OVX) como puede observarse en la Figura 3.17C.



**Figura 3.17. Expresión hipofisaria relativa de los receptores de activinas de tipo 1 y 2 evaluadas por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra *Drd2<sup>-/-</sup>* OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** ActRIB. Interacción ns; d,  $p < 0,0001$ . **B)** ActRIC. Interacción ns; a,  $p < 0,05$ ; c,  $p < 0,001$ . **C)** ActRIIB. Interacción ns; a,  $p < 0,05$  hembras ko vs. ko OVX.

## EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE REGULADORES DE LA FUNCIÓN DEL LACTOTROPO: PIT-1 Y MENINA

Al evaluar la expresión del factor de transcripción pit-1, encontramos que la OVX provocó en ambos modelos experimentales una disminución en la expresión hipofisaria de este factor sólo en hembras transgénicas (hCG $\beta$ + y ko) respecto de sus pares control no OVX (Figura 3.18B), concomitante a la inhibición del desarrollo tumoral, de la proliferación celular lactotropa y de la secreción de PRL inducida por la OVX en estos grupos.

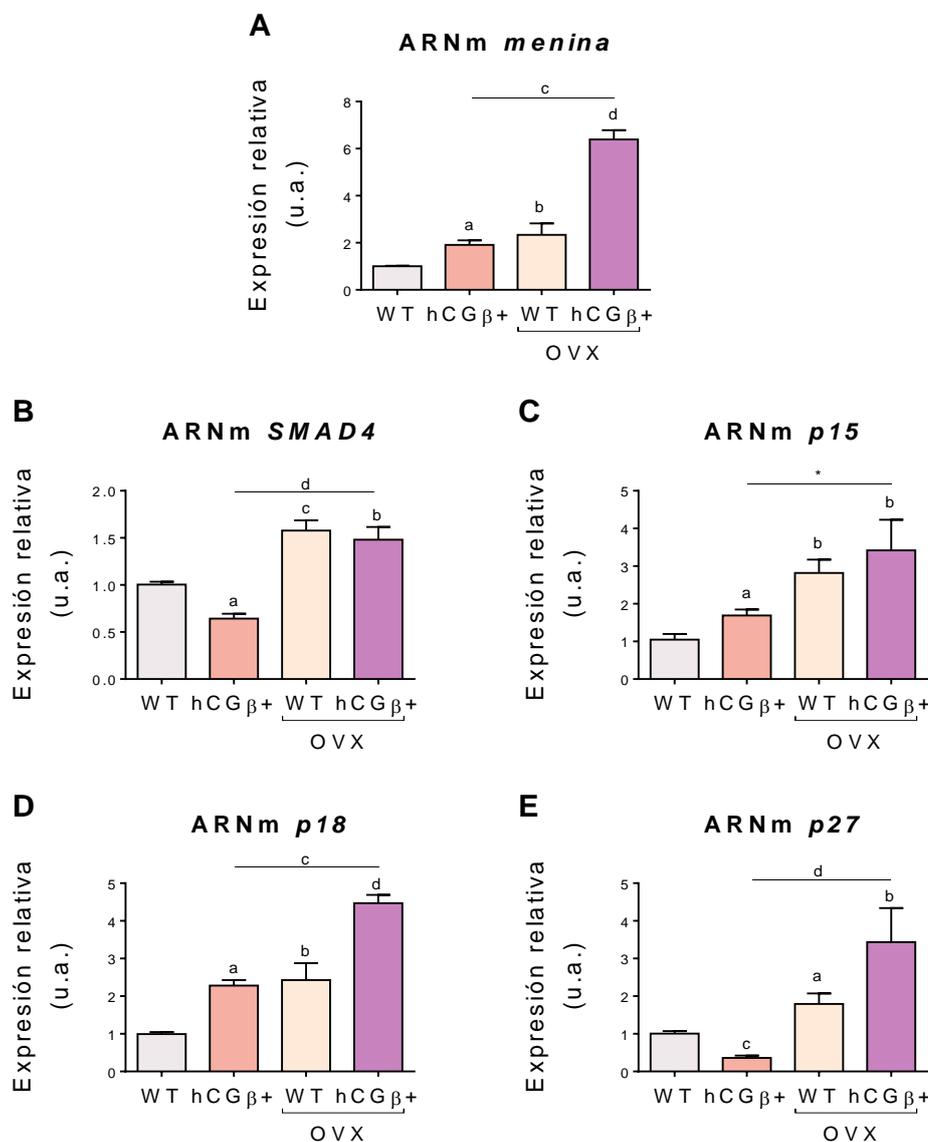


**Figura 3.18. Expresión hipofisaria relativa de pit-1 evaluada por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra hCG $\beta$  y Drd2<sup>-/-</sup> OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** Ratones hCG $\beta$ . Interacción p=0,0002; d, p<0,0001; c, p<0,001 hembras hCG $\beta$ + vs. hCG $\beta$ + OVX. **B)** Ratones Drd2<sup>-/-</sup>. Interacción p=0.0005; a, p<0,05; c, p<0,001 hembras ko vs. ko OVX.

Cuando analizamos el impacto de la OVX sobre los diferentes componentes de la vía de señalización descrita para las activinas en lactotrofos observamos nuevamente, y tal como mencionábamos en el capítulo 2, que las alteraciones fueron modelo-específicas.

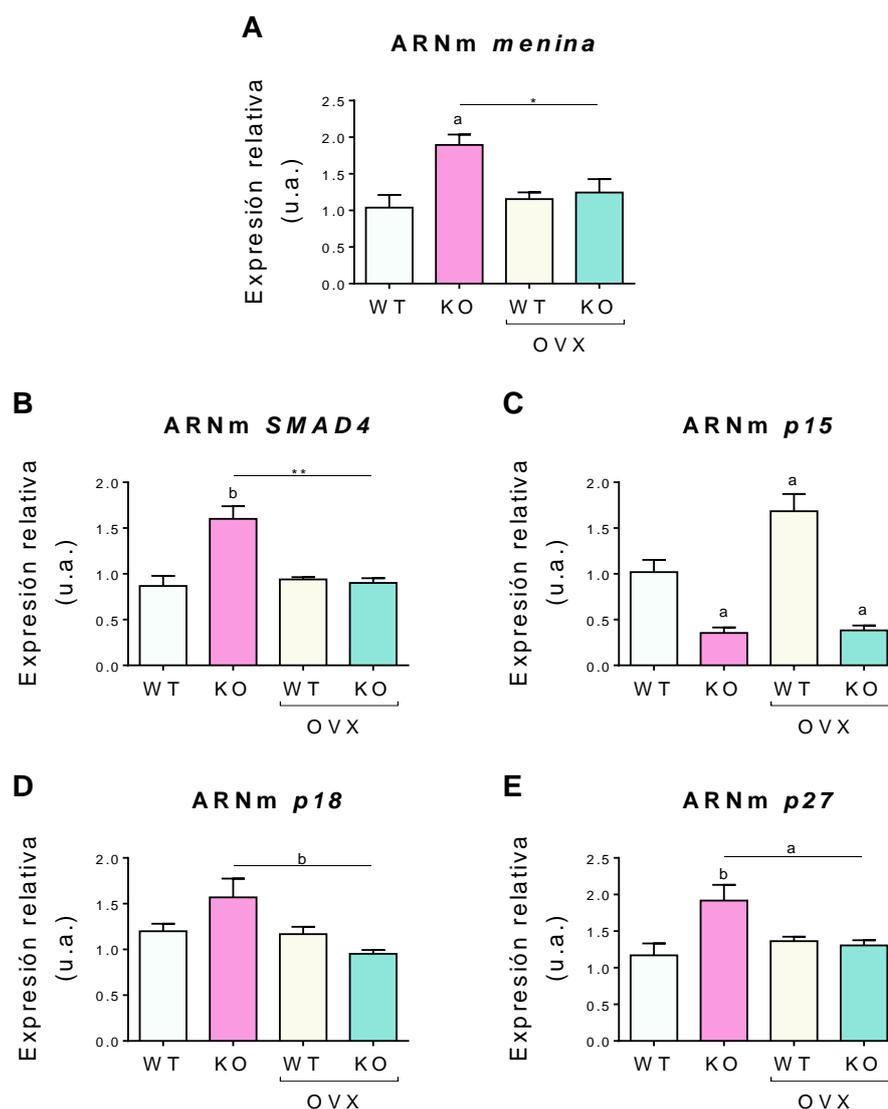
En las hembras del modelo hCG $\beta$  observamos que una OVX promueve un aumento en la expresión de todos los componentes de la vía (Figura 3.19), sugiriendo una acción aumentada de la vía inhibitoria de activinas luego de una OVX. Asimismo, entre todos los genes analizados, la expresión hipofisaria de p27 en hembras transgénicas hCG $\beta$ + fue la que, en proporción, tuvo un incremento más pronunciado luego de la OVX (Figura 3.19E). Es decir, en este modelo, la OVX recupera la expresión de genes íntimamente involucrados en la

inhibición del ciclo celular, impactando negativamente en la tasa proliferativa hipofisaria de hembras hCG $\beta$ +, hecho que muy probablemente se encuentra involucrado en la inhibición del desarrollo tumoral luego de una OVX, en este modelo, independientemente del genotipo.



**Figura 3.19. Expresión hipofisaria relativa de los componentes involucrados en la vía de señalización propuesta para las activinas en el lactotrofo evaluada por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra hCG $\beta$  OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** Menina. Interacción ns; a, p<0,05; c, p<0,001; b, p<0,01; d, p<0,0001 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX. **B)** SMAD4. Interacción ns; a, p<0,05; c, p<0,001; b, p<0,01; d, p<0,0001 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX. **C)** p15. Interacción ns; a, p<0,05; b, p<0,01; \*, p<0,05 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX. **D)** p18. Interacción ns; a, p<0,05; b, p<0,01; d, p<0,0001; c, p<0,001 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX. **E)** p27. Interacción p=0,0003; c, p<0,001; a, p<0,05; b, p<0,01; d, p<0,0001 hembras hCG $\beta$  vs. hCG $\beta$ + OVX.

Por el contrario, cuando evaluamos el efecto de una OVX sobre esta vía de señalización en ratones hembra *Drd2<sup>-/-</sup>* (Figura 3.20) observamos que, en general e inesperadamente, la OVX produjo una disminución en los niveles de expresión hipofisaria de todos los componentes evaluados en hipófisis de hembras ko respecto de la expresión observada en sus pares ko control (ko no OVX).



**Figura 3.20. Expresión hipofisaria relativa de los componentes involucrados en la vía de señalización propuesta para las activinas en el lactotrofo evaluada por PCR cuantitativa en tiempo real en ratones hembra *Drd2<sup>-/-</sup>* OVX y no OVX.** Valores normalizados a *CiclofilinaB*. Resultados relativizados a hembras wt. n=5/grupo. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores, seguido del test de Bonferroni. **A)** Menina. Interacción ns; a, p<0,05; \*, p<0,05 hembras ko vs. ko OVX. **B)** SMAD4. Interacción p=0,0015; b, p<0,01; \*\*, p<0,01 hembras ko vs. ko OVX. **C)** p15. Interacción p=0,0239; a, p<0,05. **D)** p18. Interacción p=0,0253; b, p<0,01 hembras ko vs. ko OVX. **E)** p27. Interacción p=0,0113; b, p<0,01; a, p<0,05 hembras ko vs. ko OVX.

Como mencionábamos en el capítulo II, en general se observa que las hipófisis tumorales de las hembras *Drd2*<sup>-/-</sup> presentan valores incrementados de expresión de supresores tumorales como menina, SMAD4, p27, p18, p15, a pesar del desarrollo de prolactinoma. En concordancia, estos nuevos resultados sugieren que esta vía de señalización no sería la responsable, en este modelo, del desarrollo tumoral presente en hembras ko y, por consiguiente, de la inhibición que induce la OVX sobre el desarrollo tumoral en este modelo. Sin embargo, no descartamos una posible acción inhibitoria de las activinas aumentadas post-OVX, por otra vía alternativa que no involucre menina.

### DISCUSIÓN III

En el capítulo 2 de la presente Tesis hemos postulado que, en dos modelos experimentales de prolactinoma: ratones hCG $\beta$  y ratones *Drd2*<sup>-/-</sup>, la menor expresión hipofisaria de activinas en hembras transgénicas hCG $\beta$ <sup>+</sup> y ko estaría involucrada en el desarrollo tumoral en edad adulta. Asimismo, postulamos que la disponibilidad de activinas se encuentra regulada de modo diferencial en estos modelos, encontrándose comprometida por unión a FST288 en hembras hCG $\beta$ <sup>+</sup> y por antagonismo de inhibinas en hembras ko.

Con estos antecedentes y dado que trabajos previos demostraron que una ovariectomía (OVX) a los 2 meses de edad previene el desarrollo de un prolactinoma en hembras transgénicas hCG $\beta$ <sup>+</sup> y ko en edad adulta (Ahtiainen et al., 2010);(S. T. Hentges & Low, 2002), nos propusimos en este tercer capítulo estudiar los efectos de una ovariectomía sobre el sistema activinas-inhibinas hipofisario en tres modelos animales: ratas Sprague Dawley, ratones hCG $\beta$  y *Drd2*<sup>-/-</sup>.

Como mencionamos previamente, existe una estrecha relación entre el perfil hormonal y la síntesis de activinas e inhibinas. Por ello, analizamos en ratones hCG $\beta$  y *Drd2*<sup>-/-</sup> los valores séricos de progesterona y gonadotrofinas en ratones hembra de grupos control (no OVX) y OVX de ambos genotipos. Evidenciamos similitudes en el perfil hormonal de ambos modelos animales, con niveles séricos de progesterona elevados y disminuidos niveles de LH en circulación

en hembras transgénicas con desarrollo de prolactinoma (hCG $\beta$ + y ko) respecto de sus pares wt. Sin embargo, observamos un comportamiento distinto en los niveles de FSH presentados por estos grupos, encontrando niveles disminuidos en hembras hCG $\beta$ + y elevados en hembras ko respecto de sus pares wt, acorde a lo reportado para ambos modelos animales por Rulli y col. y Kelly y col., respectivamente (Rulli et al., 2002);(Kelly et al., 1997).

Las diferencias encontradas entre los modelos respecto a los niveles séricos de FSH podrían deberse, entre otros factores, a las diferencias que presentan estos animales en los niveles circulantes de estrógenos, dado que ha sido reportado que mientras las hembras hCG $\beta$ + presentan niveles fisiológicos de estradiol (Rulli et al., 2002), las hembras ko son hipoestrogénicas respecto de sus pares wt (Kelly et al., 1997), presentando por ello, una menor inhibición hipotálamo-hipofisaria por parte del esteroide sobre la síntesis de FSH (Thackray et al., 2006);(Thackray et al., 2010). Asimismo, observamos tal y como ha sido bien descrito en bibliografía, que la OVX indujo un aumento en los niveles séricos de gonadotropinas en hembras de ambos genotipos en ambos modelos experimentales.

Con los perfiles hormonales estudiados, nos enfocamos a analizar el impacto de una OVX sobre la expresión hipofisaria de las subunidades que conforman a activinas e inhibinas.

Previamente habíamos observado que la expresión de las activinas (inhibidoras de la función lactotropa) se encuentra significativamente reducida en los tres modelos experimentales de prolactinoma, hecho que podría estar relacionado al desarrollo tumoral. En este capítulo demostramos que, en los 3 modelos estudiados, una OVX incrementa muy significativamente la expresión de activinas hipofisarias.

Observamos que una OVX peripuberal en ratones transgénicas de ambos modelos experimentales previene la disminución en los niveles de expresión hipofisarios de las subunidades  $\beta$ A y  $\beta$ B propios del genotipo tumoral (prolactinomas de hembras hCG $\beta$ + y ko). Más aun, postulamos que los niveles elevados de activinas hipofisarias continuados hasta la edad adulta, estarían relacionados a la falta de desarrollo tumoral que se observa en las hembras transgénicas hCG $\beta$ + y ko, previamente OVX.

Por otro lado, evidenciamos que la OVX previene el fuerte incremento de expresión hipofisaria del factor de transcripción pit-1, concomitante con el freno a los altos índices proliferativos de lactotropos (característicos de prolactinomas en hembras transgénicas de ambos modelos), resultados que demuestran la recuperación en el control proliferativo y funcional de este tipo celular.

En todos los casos, este aumento en la síntesis hipofisaria de activinas podría ser atribuido, en parte, a la pérdida de la regulación negativa ejercida por esteroides gonadales (estradiol y progesterona), tanto a nivel hipotalámico como hipofisario luego de una OVX, lo cual resulta en una mayor liberación hipotalámica de GnRH al sistema portal estimulando, en hipófisis, la producción de ambas subunidades  $\beta$ A y  $\beta$ B, tal como había sido reportado previamente por otros autores (Wise & Ratner, 1980);(Gregory & Kaiser, 2004). Sin embargo, es importante recordar que frente a una OVX también se pierden las inhibinas gonadales, fundamentales para contrarrestar la acción de activinas hipofisarias. De modo tal que, luego de una OVX, la acción inhibitoria de activinas se encuentra significativamente potenciada, evitando el desarrollo de un prolactinoma en estos animales, en forma independiente del genotipo.

Es importante mencionar que en ratones hCG $\beta$ + el marcado aumento en la síntesis de subunidad  $\beta$ B post-OVX, respecto de la observada para  $\beta$ A, podría estar, a su vez, relacionado al concomitante aumento exacerbado en la producción de FSH que se produce en estos animales, dado que ha sido reportado que la síntesis de subunidad  $\beta$ B en gonadotropos se encuentra íntimamente relacionada a esta gonadotropina, encontrándose ambas involucradas en un mecanismo de retroalimentación positiva específico de este tipo celular (C. Welt et al., 2002);(Fortin et al., 2015).

Respecto de la subunidad alfa (*Inha*), en los modelos de rata y ratones ko observamos que la OVX disminuye la expresión de *Inha* en hipófisis. Esta disminución, particularmente en ratones ko, implica un déficit de inhibinas locales, sumado a falta de inhibinas gonadales, hecho que proporciona una falta de antagonismo a las aumentadas activinas, facilitando su efecto inhibitorio sobre el lactotrofo. Por el contrario, la expresión de *Inha* no se vio alterada por la OVX en hipófisis de ratones hCG $\beta$ ; sin embargo, el exacerbado incremento en la síntesis de activinas hipofisarias observada post-OVX en este

modelo, sobre todo de la subunidad  $\beta B$ , resulta suficiente para contrarrestar el desarrollo tumoral en las hembras  $hCG\beta+$ .

Respecto a otros componentes del sistema, observamos que la OVX promueve un aumento en la expresión hipofisaria de betaglicano y, en el modelo de rata hembra, un marcado aumento en la síntesis hipofisaria de FST, ambos hechos que podrían estar relacionados con un intento de contrarrestar, al menos parcialmente, la exacerbada acción inhibitoria de las activinas.

Hasta aquí, encontramos que la OVX recupera el efecto inhibitorio de activinas sobre el lactotrofo en hipófisis de ratones hembra  $hCG\beta+$  y  $ko$ , efecto que podría estar protegiendo a estos animales del desarrollo de un prolactinoma en edad adulta. Además, particularmente en ratones  $hCG\beta+$ , el aumento exacerbado en la expresión hipofisaria de las subunidades  $\beta$  en hipófisis luego de la OVX parecería tener un rol crucial en la recuperación de la función inhibitoria de activinas en hipófisis, mientras que, los resultados obtenidos en ratones  $ko$ , indicarían que la recuperación del efecto inhibitorio de activinas, luego de una OVX, se debería a un mecanismo dual dado por un aumento en la expresión hipofisaria de activinas, potenciado por una disminución en la síntesis local de inhibinas.

Respecto al efecto de la OVX sobre los receptores de activinas, los resultados observados fueron nuevamente modelo-dependientes. En ratones  $hCG\beta+$  la OVX indujo un muy significativo aumento en la expresión de los receptores tipo 1 y tipo 2 de activinas (ActRIB y ActRIIB). Este hecho favorece la recuperación de la acción de activinas tanto sobre el eje gonadotrófico, como sobre la función de los lactotrofos (Suszko & Woodruff, 2006). Es así como demostramos con doble inmunomarcación y análisis por microscopía confocal, la presencia de ActRIB en lactotrofos en todos los grupos analizados (intactos y OVX). Este aumento observado de expresión de activinas y de sus receptores luego de una OVX en el modelo  $hCG\beta$ , se vio acompañado también por un fuerte incremento en la expresión de los supresores tumorales (menina, SMAD4, p18, p27) relacionados a la inhibición de la función lactotropa mediada por activinas, sugiriendo la participación de esta vía en la inhibición del desarrollo del prolactinoma en las hembras  $hCG\beta$  OVX.

Por el contrario, los resultados observados en el modelo de hembras *Drd2<sup>-/-</sup>* fueron diferentes. La OVX no tuvo impacto, en la expresión hipofisaria de los receptores de tipo 1, y produjo una inhibición en la expresión del receptor tipo 2 (ActRIIB) y de los supresores tumorales: menina, SMAD4, p18 y p27, sugiriendo que la inhibición del desarrollo tumoral inducido por la OVX no estaría mediada por esta vía de señalización en este modelo.

Las diferencias observadas entre ambos modelos de ratón nos resultaron de gran interés y futuros estudios harán falta para dilucidar los complejos mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de prolactinoma en cada uno de los modelos experimentales utilizados en esta Tesis.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo demuestran que, luego de una OVX, no solo se ven modificados los niveles de estrógenos y progesterona circulantes, sino que también se modifica fuertemente la expresión hipofisaria del sistema activinas-inhibinas, posicionando de este modo a las activinas como un importante sistema inhibitorio de la proliferación del lactotrofo, así como también de la síntesis y secreción de PRL.

### **CONCLUSIÓN III**

Como conclusión de este capítulo, los resultados demuestran que la OVX, además de modificar los niveles de estrógenos y progesterona circulantes, altera profundamente la expresión hipofisaria del sistema activinas-inhibinas en los tres modelos experimentales utilizados.

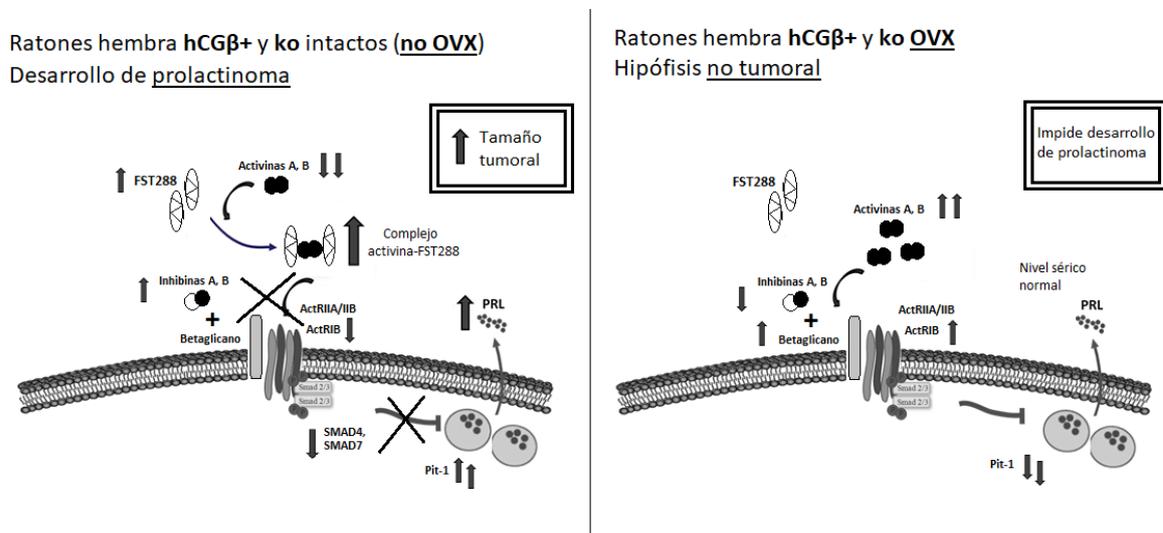
En los modelos experimentales de *hCG $\beta$*  y *Drd2<sup>-/-</sup>*, la ausencia de inhibinas gonadales post-OVX promueve una recuperación de los niveles de expresión hipofisarios de activinas en hembras transgénicas *hCG $\beta$ <sup>+</sup>* y ko, (sistema inhibitorio de la función del lactotrofo) evitando el desarrollo tumoral, independientemente del genotipo.

Por otro lado, en ratones *hCG $\beta$ <sup>+</sup>* OVX evidenciamos un fuerte incremento en la expresión de los supresores tumorales (menina, SMAD4, p18, p27) relacionados a la inhibición de la función lactotropa mediada por activinas, sugiriendo la participación de esta vía en la inhibición del desarrollo del prolactinoma en la hembras *hCG $\beta$*  OVX.

**Tabla 3.1. Resumen de los resultados obtenidos al evaluar la expresión hipofisaria de los componentes del sistema activinas-inhibinas en ratones hembra hCGβ+ y ko adultos intactos (no OVX) y OVX.**

Modelo	hCGβ	Drd2 <sup>-/-</sup>
Componente	hCGβ+ vs. hCGβ+ OVX	ko vs. ko OVX
SubβA	hCGβ+ << hCGβ+ OVX	ko < ko OVX
SubβB	hCGβ+ << hCGβ+ OVX	ko < ko OVX
Subα	hCGβ+ ≈ hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
Betaglicano	hCGβ+ << hCGβ+ OVX	ko < ko OVX
FST288	hCGβ+ ≈ hCGβ+ OVX	ko≈ko OVX
ActRIB	hCGβ+ << hCGβ+ OVX	ko≈ko OVX
ActRIC	hCGβ+ ≈ hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
ActRIIB	hCGβ+ < hCGβ+ OVX	ko≈ko OVX
SMAD4	hCGβ+ < hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
Menina	hCGβ+ < hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
Pit-1	hCGβ+ > hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
P18	hCGβ+ < hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
P27	hCGβ+ < hCGβ+ OVX	ko > ko OVX
P15	hCGβ+ < hCGβ+ OVX	ko≈ko OVX

**Figura 3.21. Esquema de la expresión en hipófisis del sistema activinas-inhibinas en ratones hembra transgénicos hCGβ+ y ko intactos (no OVX) y OVX.** Hembras hCGβ+ y ko intactas (no OVX) con desarrollo de prolactinoma (izquierda) vs. hCGβ+ OVX y ko OVX (derecha) con hipófisis no tumoral. Las hipófisis de hembras transgénicas intactas (hCGβ+ y ko) presentan una disminuida expresión de activinas y sus receptores, concomitante a una mayor expresión de factores que antagonizan su función. La menor expresión y función de este sistema inhibitorio en hipófisis de hembras transgénicas contribuye al desarrollo del prolactinoma en ambos modelos experimentales. Las hipófisis de hembras transgénicas OVX presentan mayores niveles de expresión del sistema activinas, involucrado en la inhibición de la función del lactotrofo (proliferación celular y secreción de prolactina), por lo tanto, la OVX impide el desarrollo de un prolactinoma.



## CONCLUSIÓN GENERAL

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes en humanos y su incidencia difiere entre ambos sexos, afectando en mayor medida a mujeres en edad reproductiva, siendo esta diferencia posteriormente equiparada entre ambos sexos recién a partir de la cuarta y quinta década de vida. Los objetivos principales de los tratamientos ante la aparición de un prolactinoma son normalizar la prolactina, restaurar la fertilidad y reducir el tamaño del tumor. Si bien, en general, estos tumores responden bien a la terapia farmacológica con agonistas dopaminérgicos del RD2, hay pacientes que exhiben resistencia a estos fármacos y deben someterse a cirugía transeptoefenoidal, un procedimiento de elevado riesgo y costo económico asociado. Por ello, es necesario encontrar terapias médicas alternativas para estos pacientes con prolactinomas resistentes, es decir, es necesario encontrar otros sistemas inhibitorios de la función del lactotrofo como nuevos blancos terapéuticos.

Dado que alteraciones en la expresión de diversos factores de crecimiento, o de sus receptores, afectan la diferenciación y proliferación del lactotrofo favoreciendo el desarrollo tumoral, estudiamos a lo largo de esta Tesis la participación de dos sistemas inhibitorios de la proliferación del lactotrofo, la síntesis y secreción de PRL: TGF $\beta$ 1 y activinas.

Nuestro estudio, combinando la utilización de tres modelos experimentales de prolactinomas, uno por ausencia de control dopaminérgico, otro por exceso de hormona hCG circulante y un último modelo con exceso de estimulación estrogénica, nos permitió profundizar el conocimiento sobre el rol que tienen estos sistemas inhibitorios en el desarrollo de un prolactinoma, así como también su participación en las diferencias sexuales encontradas en la aparición de este fenotipo, diferencias similares a las encontradas en la clínica.

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

- ❖ Demostramos que la expresión hipofisaria disminuida del sistema TGF $\beta$ 1 se encuentra involucrada en el desarrollo de un prolactinoma en hembras hCG $\beta$ +

- ❖ Comprobamos que la recuperación de los niveles hipofisarios de TGF $\beta$ 1 activo en hembras hCG $\beta$ + contrarresta el desarrollo tumoral y normaliza los niveles de PRL sérica.
- ❖ Describimos importantes diferencias sexuales en los sistemas inhibitorios de TGF $\beta$ 1 y activinas en hipófisis de ratones hCG $\beta$  y Drd2 $^{-/-}$ , encontrándose ambos mayormente expresados en hipófisis de machos respecto de las hembras y, por ello, postulamos que la presencia de sistemas inhibitorios más fuertes en hipófisis de machos podría estar protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinoma en ambos modelos experimentales.
- ❖ Demostramos que el efecto inhibitorio de activinas sobre las células lactotropas se encuentra disminuido en hembras con desarrollo de prolactinomas (hCG $\beta$ + y ko), evento evidenciado por una menor expresión de las subunidades que conforman a las activinas A y B, así como también en la mayor expresión de sus antagonistas funcionales, FST288 en hembras hCG $\beta$ + e inhibinas en hembras ko.
- ❖ En ratones hembra hCG $\beta$  y Drd2 $^{-/-}$  describimos alteraciones en las vías de transducción de señales mediadas por activina junto a una desregulación de factores moduladores del ciclo celular que podrían estar involucradas en el desarrollo de un prolactinoma en hembras transgénicas (hCG $\beta$ + y ko).
- ❖ Demostramos que la OVX, además de modificar los niveles de estrógenos y progesterona circulantes, altera profundamente la expresión hipofisaria del sistema activinas-inhibinas en los tres modelos experimentales utilizados. La ausencia de inhibinas gonadales post-OVX promueve, en ratones hCG $\beta$  y Drd2 $^{-/-}$ , una mayor expresión activinas (sistema inhibitorio de la función del lactotrofo) en hipófisis de hembras transgénicas evitando el desarrollo tumoral, independientemente del genotipo.

**Los resultados presentados en esta tesis nos permiten, en su conjunto, evidenciar el rol crucial que tienen TGF $\beta$ 1 y activinas en el desarrollo de un prolactinoma y postular, de este modo, a ambos sistemas como un potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento de prolactinomas resistentes a terapias convencionales.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abel, M. H., Widen, A., Wang, X., Huhtaniemi, I., Pakarinen, P., Kumar, T. R., & Christian, H. C. (2014). Pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell structure in normal and follicle-stimulating hormone beta knockout, follicle-stimulating hormone receptor knockout, luteinising hormone receptor knockout, hypogonadal a. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(11), 785–795. <https://doi.org/10.1111/jne.12178>
- Ahtiainen, P., Sharp, V., Rulli, S. B., Rivero-Muller, A., Mamaeva, V., Roytta, M., & Huhtaniemi, I. (2010). Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCGbeta-subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(3), 611–621. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0016>
- Alexander, J. M., Bikkal, H. A., Zervas, N. T., Laws, E. R. J., & Klibanski, A. (1996). Tumor-specific expression and alternate splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor-beta receptors in human pituitary adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *81*(2), 783–790. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.2.8636304>
- Anagnostis, P., Adamidou, F., Polyzos, S. A., Efstathiadou, Z., Karathanassi, E., & Kita, M. (2012). Long term follow-up of patients with prolactinomas and outcome of dopamine agonist withdrawal: a single center experience. *Pituitary*, *15*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/s11102-011-0303-6>
- Andreone, L., Velásquez, E. V., Abramovich, D., Ambao, V., Loreti, N., Croxatto, H. B., ... Campo, S. (2009). Regulation of inhibin/activin expression in rat early antral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *309*(1), 48–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.05.003>
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2004). Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of Cell Biology*, *165*(5), 723–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312172>
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 2), 217–224.
- Antenos, M., Lei, L., Xu, M., Malipatil, A., Kiesewetter, S., & Woodruff, T. K. (2011). Role of PCSK5 expression in mouse ovarian follicle development: identification of the inhibin alpha- and beta-subunits as candidate substrates. *PloS One*, *6*(3), e17348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017348>
- Antsiferova, M., & Werner, S. (2012). The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 17), 3929–3937. <https://doi.org/10.1242/jcs.094789>
- Arafah, B. M., Kailani, S. H., Nekl, K. E., Gold, R. S., & Selman, W. R. (1994). Immediate recovery of pituitary function after transsphenoidal resection of pituitary macroadenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *79*(2), 348–

354. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.2.8045946>

Arafah, B. M., & Nasrallah, M. P. (2001). Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocrine-Related Cancer*, 8(4), 287–305.

Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. (1993). Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, 58(5), 501–510. <https://doi.org/10.1159/000126583>

Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. (2002). Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*, 75(5), 273–281. <https://doi.org/10.1159/000057336>

Asa, S. L., Kelly, M. A., Grandy, D. K., & Low, M. J. (1999). Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 140(11), 5348–5355. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7118>

Attardi, B., & Miklos, J. (1990). Rapid stimulatory effect of activin-A on messenger RNA encoding the follicle-stimulating hormone beta-subunit in rat pituitary cell cultures. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 4(5), 721–726. <https://doi.org/10.1210/mend-4-5-721>

Attisano, L., & Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1646–1647. <https://doi.org/10.1126/science.1071809>

Attisano, L., Wrana, J. L., Cheifetz, S., & Massague, J. (1992). Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell*, 68(1), 97–108.

Bachelot, A., & Binart, N. (2007). Reproductive role of prolactin. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(2), 361–369. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0299>

Bahena-Trujillo R, Flores G, A.-M. J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*.

Balasubramanian, D., & Scacheri, P. C. (2009). Functional studies of menin through genetic manipulation of the Men1 homolog in mice. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 668, 105–115.

Banerjee, S. K., Sarkar, D. K., Weston, A. P., De, A., & Campbell, D. R. (1997). Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis*, 18(6), 1155–1161.

Barton, D. E., Yang-Feng, T. L., Mason, A. J., Seeburg, P. H., & Francke, U. (1989). Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta A, and beta B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics*, 5(1), 91–99.

Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor.

- Endocrine Reviews*, 22(6), 724–763. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0451>
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews*, 29(1), 1–41. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Bernard, D. J., Lee, K. B., & Santos, M. M. (2006). Activin B can signal through both ALK4 and ALK7 in gonadotrope cells. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 4, 52. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-52>
- Bernard, D. J., & Tran, S. (2013). Mechanisms of activin-stimulated FSH synthesis: the story of a pig and a FOX. *Biology of Reproduction*, 88(3), 78. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.107797>
- Bilezikjian, L. M., Blount, A. L., Corrigan, A. Z., Leal, A., Chen, Y., & Vale, W. W. (2001). Actions of activins, inhibins and follistatins: implications in anterior pituitary function. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 28(3), 244–248.
- Bilezikjian, L. M., Blount, A. L., Leal, A. M. O., Donaldson, C. J., Fischer, W. H., & Vale, W. W. (2004). Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 225(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.02.010>
- Bilezikjian, L. M., Justice, N. J., Blackler, A. N., Wiater, E., & Vale, W. W. (2012). Cell-type specific modulation of pituitary cells by activin, inhibin and follistatin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359(1–2), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.025>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Bonomi, L., Brown, M., Ungerleider, N., Muse, M., Matzuk, M. M., & Schneyer, A. (2012). Activin B regulates islet composition and islet mass but not whole body glucose homeostasis or insulin sensitivity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 303(5), E587-96. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00177.2012>
- Borrelli, E., Sawchenko, P. E., & Evans, R. M. (1992). Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2764–2768.
- Burns, G., & Sarkar, D. K. (1993). Transforming growth factor beta 1-like immunoreactivity in the pituitary gland of the rat: effect of estrogen. *Endocrinology*, 133(3), 1444–1449. <https://doi.org/10.1210/endo.133.3.8365375>
- Cahoreau, C., Klett, D., & Combarous, Y. (2015). Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 26. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00026>

- Cai, A., Hayes, J. D., Patel, N., & Hyde, J. F. (1999). Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia. *Endocrinology*, *140*(11), 4955–4964. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7120>
- Cameron, V. A., Nishimura, E., Mathews, L. S., Lewis, K. A., Sawchenko, P. E., & Vale, W. W. (1994). Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology*, *134*(2), 799–808. <https://doi.org/10.1210/endo.134.2.8299574>
- Campbell, N., Greenaway, J., Henkin, J., & Petrik, J. (2011). ABT-898 induces tumor regression and prolongs survival in a mouse model of epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*(10), 1876–1885. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0402>
- Castinetti, F., & Brue, T. (2010). Adenomas hipofisarios. *EMC - Tratado de Medicina*, *14*(2), 1–12. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(10\)70509-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1636-5410(10)70509-2)
- Chen, C. L., & Meites, J. (1970). Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology*, *86*(3), 503–505. <https://doi.org/10.1210/endo-86-3-503>
- Chen, Y., Dabovic, B., Colarossi, C., Santori, F. R., Lilic, M., Vukmanovic, S., & Rifkin, D. B. (2003). Growth retardation as well as spleen and thymus involution in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice. *Journal of Cellular Physiology*, *196*(2), 319–325. <https://doi.org/10.1002/jcp.10296>
- Colao, A., Sarno, A. Di, Cappabianca, P., Briganti, F., Pivonello, R., Somma, C. Di, ... Lombardi, G. (2003). Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology*, *148*(3), 325–331.
- Colao, A., & Savastano, S. (2011). Medical treatment of prolactinomas. *Nature Reviews. Endocrinology*, *7*(5), 267–278. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.37>
- Coss, D., Thackray, V. G., Deng, C.-X., & Mellon, P. L. (2005). Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *19*(10), 2610–2623. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0047>
- CRAMER, O. M., PARKER RICHARD.C, J. R., & PORTER, J. C. (1979). Estrogen Inhibition of Dopamine Release into Hypophysial Portal Blood\*. *Endocrinology*, *104*(2), 419–422. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/endo-104-2-419>
- Cristina, C., Diaz-Torga, G., Baldi, A., Gongora, A., Rubinstein, M., Low, M. J., & Becu-Villalobos, D. (2005). Increased pituitary vascular endothelial growth factor-a in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology*, *146*(7), 2952–2962. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1445>
- Cristina, C., Diaz-Torga, G., Gongora, A., Guida, M. C., Perez-Millan, M. I., Baldi, A., &

- Becu-Villalobos, D. (2007). Fibroblast growth factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1341-51. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00260.2007>
- Cristina, C., Garcia-Tornadu, I., Diaz-Torga, G., Rubinstein, M., Low, M. J., & Becu-Villalobos, D. (2006). Dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Frontiers of Hormone Research*, 35, 50–63. <https://doi.org/10.1159/000094308>
- Dalkin, A. C., Haisenleder, D. J., Ortolano, G. A., Ellis, T. R., & Marshall, J. C. (1989). The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, 125(2), 917–924. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-917>
- Dalkin, A. C., Haisenleder, D. J., Yasin, M., Gilrain, J. T., & Marshall, J. C. (1996). Pituitary activin receptor subtypes and follistatin gene expression in female rats: differential regulation by activin and follistatin. *Endocrinology*, 137(2), 548–554. <https://doi.org/10.1210/endo.137.2.8593801>
- de Guise, C., Lacerte, A., Rafiei, S., Reynaud, R., Roy, M., Brue, T., & Lebrun, J.-J. (2006). Activin inhibits the human Pit-1 gene promoter through the p38 kinase pathway in a Smad-independent manner. *Endocrinology*, 147(9), 4351–4362. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0444>
- De Nicola, A. F., von Lawzewitsch, I., Kaplan, S. E., & Libertun, C. (1978). Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 61(3), 753–763.
- De Paul, A. L., Pons, P., Aoki, A., & Torres, A. I. (1997). Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochemica*, 99(3), 277–289. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(97\)80022-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(97)80022-0)
- Denef, C. (2008). Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(1), 1–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01616.x>
- DePaolo, L. V, Mercado, M., Guo, Y., & Ling, N. (1993). Increased follistatin (activin-binding protein) gene expression in rat anterior pituitary tissue after ovariectomy may be mediated by pituitary activin. *Endocrinology*, 132(5), 2221–2228. <https://doi.org/10.1210/endo.132.5.8477666>
- Derynck, R., & Feng, X. H. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1333(2), F105-50.
- Di Sarno, A., Landi, M. L., Cappabianca, P., Di Salle, F., Rossi, F. W., Pivonello, R., ... Colao, A. (2001). Resistance to cabergoline as compared with bromocriptine in hyperprolactinemia: prevalence, clinical definition, and therapeutic strategy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(11), 5256–5261. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.11.8054>

- Dias, V. L., Rajpert-De Meyts, E., McLachlan, R., & Loveland, K. L. (2009). Analysis of activin/TGFB-signaling modulators within the normal and dysfunctional adult human testis reveals evidence of altered signaling capacity in a subset of seminomas. *Reproduction (Cambridge, England)*, *138*(5), 801–811. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0206>
- Donaldson, C. J., Vaughan, J. M., Corrigan, A. Z., Fischer, W. H., & Vale, W. W. (1999). Activin and inhibin binding to the soluble extracellular domain of activin receptor II. *Endocrinology*, *140*(4), 1760–1766. <https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6665>
- dos Santos Nunes, V., El Dib, R., Boguszewski, C. L., & Nogueira, C. R. (2011). Cabergoline versus bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemia: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *Pituitary*, *14*(3), 259–265. <https://doi.org/10.1007/s11102-010-0290-z>
- Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E., & Leduc, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(18), 10618–10624.
- Ebbinghaus, S., Hussain, M., Tannir, N., Gordon, M., Desai, A. A., Knight, R. A., ... Figlin, R. (2007). Phase 2 study of ABT-510 in patients with previously untreated advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(22 Pt 1), 6689–6695. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1477>
- Ehrlich, L., Hall, C., Meng, F., Lairmore, T., Alpini, G., & Glaser, S. (2017). A Review of the Scaffold Protein Menin and its Role in Hepatobiliary Pathology. *Gene Expression*, *17*(3), 251–263. <https://doi.org/10.3727/105221617X695744>
- Esch, F. S., Shimasaki, S., Mercado, M., Cooksey, K., Ling, N., Ying, S., ... Guillemin, R. (1987). Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *1*(11), 849–855. <https://doi.org/10.1210/mend-1-11-849>
- Fainstein Day, P., Glerean, M., Lovazzano, S., Pietrani, M., Christiansen, S., Balzaretto, M., ... Carrizo, A. (2010). Gender differences in macroprolactinomas: study of clinical features, outcome of patients and ki-67 expression in tumor tissue. *Frontiers of Hormone Research*, *38*, 50–58. <https://doi.org/10.1159/000318494>
- Farrell, W. E. (2006). Pituitary tumours: findings from whole genome analyses. *Endocrine-Related Cancer*, *13*(3), 707–716. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01131>
- Fortin, J., Boehm, U., Deng, C.-X., Treier, M., & Bernard, D. J. (2014). Follicle-stimulating hormone synthesis and fertility depend on SMAD4 and FOXL2. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *28*(8), 3396–3410. <https://doi.org/10.1096/fj.14-249532>
- Fortin, J., Ongaro, L., Li, Y., Tran, S., Lamba, P., Wang, Y., ... Bernard, D. J. (2015). Minireview: Activin Signaling in Gonadotropes: What Does the FOX say... to the SMAD? *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *29*(7), 963–977.

<https://doi.org/10.1210/me.2015-1004>

Fraser, H. M., & Lunn, S. F. (1993). Does inhibin have an endocrine function during the menstrual cycle? *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 4(6), 187–194.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>

Fujiwara, K., Ikeda, H., & Yoshimoto, T. (1998). Abnormalities in expression of genes, mRNA, and proteins of transforming growth factor-beta receptor type I and type II in human pituitary adenomas. *Clinical Neuropathology*, 17(1), 19–26.

Garside, S. A., Henkin, J., Morris, K. D., Norvell, S. M., Thomas, F. H., & Fraser, H. M. (2010). A thrombospondin-mimetic peptide, ABT-898, suppresses angiogenesis and promotes follicular atresia in pre- and early-antral follicles in vivo. *Endocrinology*, 151(12), 5905–5915. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0283>

Gharib, S. D., Wierman, M. E., Shupnik, M. A., & Chin, W. W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews*, 11(1), 177–199. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-1-177>

Gillam, M. P., Molitch, M. E., Lombardi, G., & Colao, A. (2006). Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine Reviews*, 27(5), 485–534. <https://doi.org/10.1210/er.2005-9998>

Glister, C., Kemp, C. F., & Knight, P. G. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(2), 239–254. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00090>

Gonzalez-Iglesias, A. E., Murano, T., Li, S., Tomic, M., & Stojilkovic, S. S. (2008). Dopamine inhibits basal prolactin release in pituitary lactotrophs through pertussis toxin-sensitive and -insensitive signaling pathways. *Endocrinology*, 149(4), 1470–1479. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0980>

Gonzalez, B., Ratner, L. D., Giorgio, N. P. Di, Poutanen, M., Huhtaniemi, I. T., Calandra, R. S., ... Rulli, S. B. (2011). Endogenously elevated androgens alter the developmental programming of the hypothalamic–pituitary axis in male mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1), 78–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.016>

Gordon, M. S., Mendelson, D., Carr, R., Knight, R. A., Humerickhouse, R. A., Iannone, M., & Stopeck, A. T. (2008). A phase 1 trial of 2 dose schedules of ABT-510, an antiangiogenic, thrombospondin-1-mimetic peptide, in patients with advanced cancer. *Cancer*, 113(12), 3420–3429. <https://doi.org/10.1002/cncr.23953>

Goudreau, J. L., Lindley, S. E., Lookingland, K. J., & Moore, K. E. (1992). Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of

the rat pituitary. *Neuroendocrinology*, 56(1), 100–105.  
<https://doi.org/10.1159/000126214>

Grattan, D. R. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *The Journal of Endocrinology*, 226(2), T101-22.  
<https://doi.org/10.1530/JOE-15-0213>

Grattan, D. R., Jasoni, C. L., Liu, X., Anderson, G. M., & Herbison, A. E. (2007). Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. *Endocrinology*, 148(9), 4344–4351.  
<https://doi.org/10.1210/en.2007-0403>

Gray, P. C., Greenwald, J., Blount, A. L., Kunitake, K. S., Donaldson, C. J., Choe, S., & Vale, W. (2000). Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3206–3212.

Green, V. L., Atkin, S. L., Speirs, V., Jeffreys, R. V., Landolt, A. M., Mathew, B., ... White, M. C. (1996). Cytokine expression in human anterior pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology*, 45(2), 179–185.

Gregory, S. J., & Kaiser, U. B. (2004). Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(3), 253–267. <https://doi.org/10.1055/s-2004-831901>

Grinson, R. P., Loreti, N., Braslavsky, D., Bedecarrats, P., Ambao, V., Gottlieb, S., ... Rey, R. A. (2014). Utilidad de la hormona anti-Mülleriana (AMH) y la inhibina B en el diagnóstico del hipogonadismo en el niño. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 12, 76–88. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-31102014000200002&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102014000200002&nrm=iso)

Gudelsky, G. A., & Porter, J. C. (1981). Sex-related difference in the release of dopamine into hypophysial portal blood. *Endocrinology*, 109(5), 1394–1398.  
<https://doi.org/10.1210/endo-109-5-1394>

Guo, N. H., Krutzsch, H. C., Inman, J. K., Shannon, C. S., & Roberts, D. D. (1997). Antiproliferative and antitumor activities of D-reverse peptides derived from the second type-1 repeat of thrombospondin-1. *The Journal of Peptide Research : Official Journal of the American Peptide Society*, 50(3), 210–221.

Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C., Ortolano, G. A., Marshall, J. C., & Shupnik, M. A. (1991). A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*, 128(1), 509–517.  
<https://doi.org/10.1210/endo-128-1-509>

Harrison, C. A., Al-Musawi, S. L., & Walton, K. L. (2011). Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 29(5), 174–186.  
<https://doi.org/10.3109/08977194.2011.608666>

- Haviv, F., Bradley, M. F., Kalvin, D. M., Schneider, A. J., Davidson, D. J., Majest, S. M., ... Henkin, J. (2005). Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(8), 2838–2846. <https://doi.org/10.1021/jm0401560>
- Heaney, A. P., Fernando, M., & Melmed, S. (2002). Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*(2), 277–283. <https://doi.org/10.1172/JCI14264>
- Heaney, A. P., Horwitz, G. A., Wang, Z., Singson, R., & Melmed, S. (1999). Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nature Medicine*, *5*, 1317. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/15275>
- Hendy, G. N., Kaji, H., Sowa, H., Lebrun, J.-J., & Canaff, L. (2005). Menin and TGF-beta superfamily member signaling via the Smad pathway in pituitary, parathyroid and osteoblast. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, *37*(6), 375–379. <https://doi.org/10.1055/s-2005-870152>
- Henkin, J., & Volpert, O. V. (2011). Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *15*(12), 1369–1386. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.640319>
- Hentges, S., Pastorcic, M., De, A., Boyadjieva, N., & Sarkar, D. K. (2000). Opposing actions of two transforming growth factor-beta isoforms on pituitary lactotropic cell proliferation. *Endocrinology*, *141*(4), 1528–1535. <https://doi.org/10.1210/endo.141.4.7419>
- Hentges, S. T., & Low, M. J. (2002). Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice. *Endocrinology*, *143*(12), 4536–4543. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220421>
- Herndon, M. K., & Nilson, J. H. (2015). Maximal expression of Foxl2 in pituitary gonadotropes requires ovarian hormones. *PloS One*, *10*(5), e0126527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126527>
- Holzbauer, M., & Racke, K. (1985). The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Medical Biology*, *63*(3), 97–116.
- Huhtaniemi, I. T., Korenbrot, C. C., & Jaffe, R. B. (1977). HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *44*(5), 963–967. <https://doi.org/10.1210/jcem-44-5-963>
- Iacovazzo, D., Hernandez-Ramirez, L. C., & Korbonits, M. (2017). Sporadic pituitary adenomas: the role of germline mutations and recommendations for genetic screening. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, *12*(2), 143–153. <https://doi.org/10.1080/17446651.2017.1306439>

- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J., & Ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 6954–6967.
- Ivo, D., Corset, L., Desbourdes, L., Gaudray, P., & Weber, G. (2011, January). Menin controls the concentration of retinoblastoma protein. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. United States. <https://doi.org/10.4161/cc.10.1.14447>
- Jin, L., Tsumanuma, I., Ruebel, K. H., Bayliss, J. M., & Lloyd, R. V. (2001). Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology*, 142(5), 1703–1709. <https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8117>
- Jonas, K. C., Oduwole, O. O., Peltoketo, H., Rulli, S. B., & Huhtaniemi, I. T. (2014). Mouse models of altered gonadotrophin action: insight into male reproductive disorders. *Reproduction (Cambridge, England)*, 148(4), R63-70. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0302>
- Kaiser, U. B., Lee, B. L., Carroll, R. S., Unabia, G., Chin, W. W., & Childs, G. V. (1992). Follistatin gene expression in the pituitary: localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology*, 130(5), 3048–3056. <https://doi.org/10.1210/endo.130.5.1572312>
- Kaiser, U. B., Sabbagh, E., Katzenellenbogen, R. A., Conn, P. M., & Chin, W. W. (1995). A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12280–12284.
- Kajdaniuk, D., Marek, B., Borgiel-Marek, H., & Kos-Kudla, B. (2013). Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in physiology and pathology. *Endokrynologia Polska*, 64(5), 384–396. <https://doi.org/10.5603/EP.2013.0022>
- Kelly, M. A., Rubinstein, M., Asa, S. L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J. R., ... Low, M. J. (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*, 19(1), 103–113.
- Keogh, E. J., Lee, V. W., Rennie, G. C., Burger, H. G., Hudson, B., & De Kretser, D. M. (1976). Selective suppression of FSH by testicular extracts. *Endocrinology*, 98(4), 997–1004. <https://doi.org/10.1210/endo-98-4-997>
- Kim, H. S., Lee, H. S., Nam, K. H., Choi, J., & Kim, W. H. (2014). p27 Loss Is Associated with Poor Prognosis in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 46(4), 383–392. <https://doi.org/10.4143/crt.2013.102>
- Kirk, S. E., Dalkin, A. C., Yasin, M., Haisenleder, D. J., & Marshall, J. C. (1994). Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology*, 135(3), 876–880. <https://doi.org/10.1210/endo.135.3.8070381>

- Kitaoka, M., Kojima, I., & Ogata, E. (1988). Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *157*(1), 48–54.
- Kogawa, K., Nakamura, T., Sugino, K., Takio, K., Titani, K., & Sugino, H. (1991). Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology*, *128*(3), 1434–1440. <https://doi.org/10.1210/endo-128-3-1434>
- Kovacs, K., Horvath, E., & Vidal, S. (2001). Classification of pituitary adenomas. *Journal of Neuro-Oncology*, *54*(2), 121–127.
- Krieglstein, K., Zheng, F., Unsicker, K., & Alzheimer, C. (2011). More than being protective: functional roles for TGF-beta/activin signaling pathways at central synapses. *Trends in Neurosciences*, *34*(8), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.002>
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (2012). TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*, *10*, 183. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>
- Kumar, T. R., Agno, J., Janovick, J. A., Conn, P. M., & Matzuk, M. M. (2003). Regulation of FSHbeta and GnRH receptor gene expression in activin receptor II knockout male mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *212*(1–2), 19–27.
- Kuorelahti, A., Rulli, S., Huhtaniemi, I., & Poutanen, M. (2007). Human chorionic gonadotropin (hCG) up-regulates wnt5b and wnt7b in the mammary gland, and hCGbeta transgenic female mice present with mammary Gland tumors exhibiting characteristics of the Wnt/beta-catenin pathway activation. *Endocrinology*, *148*(8), 3694–3703. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0249>
- Lacerte, A., Lee, E.-H., Reynaud, R., Canaff, L., De Guise, C., Devost, D., ... Lebrun, J.-J. (2004). Activin inhibits pituitary prolactin expression and cell growth through Smads, Pit-1 and menin. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *18*(6), 1558–1569. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0470>
- Lairmore, T. C., & Chen, H. (2009). Role of menin in neuroendocrine tumorigenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *668*, 87–95.
- Lanuza, G. M., Groome, N. P., Barañao, J. L., & Campo, S. (1999). Dimeric Inhibin A and B Production Are Differentially Regulated by Hormones and Local Factors in Rat Granulosa Cells\*. *Endocrinology*, *140*(6), 2549–2554. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/endo.140.6.6788>
- Lau, A. L., Kumar, T. R., Nishimori, K., Bonadio, J., & Matzuk, M. M. (2000). Activin betaC and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(16), 6127–6137.
- Lawler, J. (2002). Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *6*(1), 1–12.

Lebrun, J.-J. (2009). Activin, TGF-beta and menin in pituitary tumorigenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 668, 69–78.

Lebrun, J. J., Takabe, K., Chen, Y., & Vale, W. (1999). Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(1), 15–23. <https://doi.org/10.1210/mend.13.1.0218>

Lebrun, J. J., & Vale, W. W. (1997). Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1682–1691.

Lechan, R. M., & Toni, R. (2000). Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, ... A. Vinik (Eds.). South Dartmouth (MA).

Lerch, T. F., Shimasaki, S., Woodruff, T. K., & Jardetzky, T. S. (2007). Structural and biophysical coupling of heparin and activin binding to follistatin isoform functions. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), 15930–15939. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700737200>

Levine, J. E. (1997). New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biology of Reproduction*, 56(2), 293–302.

Lewis, K. A., Gray, P. C., Blount, A. L., MacConell, L. A., Wiater, E., Bilezikjian, L. M., & Vale, W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*, 404(6776), 411–414. <https://doi.org/10.1038/35006129>

Li, S., Shimono, C., Norioka, N., Nakano, I., Okubo, T., Yagi, Y., ... Sekiguchi, K. (2010). Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36645–36655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.177865>

Li, Y., Schang, G., Boehm, U., Deng, C.-X., Graff, J., & Bernard, D. J. (2017). SMAD3 Regulates Follicle-stimulating Hormone Synthesis by Pituitary Gonadotrope Cells in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(6), 2301–2314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.759167>

Li, Y., Schang, G., Wang, Y., Zhou, X., Levasseur, A., Boyer, A., ... Bernard, D. J. (2018). Conditional Deletion of FOXL2 and SMAD4 in Gonadotropes of Adult Mice Causes Isolated FSH Deficiency. *Endocrinology*, 159(7), 2641–2655. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/en.2018-00100>

Libertun, C. (1980). *Radioinmunoanálisis* (López Libr). Buenos Aires.

Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Esch, F., Denoroy, L., & Guillemin, R. (1985). Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(21), 7217–7221.

Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., & Guillemin, R. (1986). A

homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 138(3), 1129–1137.

Liu, J. K., & Couldwell, W. T. (2004). Contemporary management of prolactinomas. *Neurosurgical Focus*, 16(4), E2.

Liu, Y., Du, S.-Y., Ding, M., Dou, X., Zhang, F.-F., Wu, Z.-Y., ... Xu, C.-J. (2017). The BMP4-Smad signaling pathway regulates hyperandrogenism development in a female mouse model. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11740–11750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781369>

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F., & Moses, H. L. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *The Journal of Cell Biology*, 110(4), 1361–1367.

M'baye, M., Hua, G., Khan, H. A., & Yang, L. (2015). RNAi-mediated knockdown of INHBB increases apoptosis and inhibits steroidogenesis in mouse granulosa cells. *The Journal of Reproduction and Development*, 61(5), 391–397. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-158>

Makanji, Y., Zhu, J., Mishra, R., Holmquist, C., Wong, W. P. S., Schwartz, N. B., ... Woodruff, T. K. (2014). Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review. *Endocrine Reviews*, 35(5), 747–794. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1003>

Manzoor, S. M., Sattar, A., Hashim, R., Khan, F. A., Younas, M., Ali, A., ... Ijaz, A. (2012). Serum inhibin B as a diagnostic marker of male infertility. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*, 24(3–4), 113–116.

Marinoni, I., & Pellegata, N. S. (2011). p27kip1: a new multiple endocrine neoplasia gene? *Neuroendocrinology*, 93(1), 19–28. <https://doi.org/10.1159/000320366>

Mason, A. J., Berkemeier, L. M., Schmelzer, C. H., & Schwall, R. H. (1989). Activin B: precursor sequences, genomic structure and in vitro activities. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 3(9), 1352–1358. <https://doi.org/10.1210/mend-3-9-1352>

Mason, A. J., Farnworth, P. G., & Sullivan, J. (1996). Characterization and determination of the biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 10(9), 1055–1065. <https://doi.org/10.1210/mend.10.9.8885240>

Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annual Review of Cell Biology*, 6, 597–641. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.06.110190.003121>

Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 67,

753–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>

Mather, J. P., Woodruff, T. K., & Krummen, L. A. (1992). Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 201(1), 1–15.

Matkar, S., Thiel, A., & Hua, X. (2013). Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(8), 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.05.005>

McAndrew, J., Paterson, A. J., Asa, S. L., McCarthy, K. J., & Kudlow, J. E. (1995). Targeting of transforming growth factor-alpha expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology*, 136(10), 4479–4488. <https://doi.org/10.1210/endo.136.10.7664668>

McCullagh, D. R. (1932). DUAL ENDOCRINE ACTIVITY OF THE TESTES. *Science (New York, N.Y.)*, 76(1957), 19–20. <https://doi.org/10.1126/science.76.1957.19>

McLACHLAN, R. I., COHEN, N. L., VALE, W. W., RIVIER, J. E., BURGER, H. G., BREMNER, W. J., & SOULES, M. R. (1989). The Importance of Luteinizing Hormone in the Control of Inhibin and Progesterone Secretion by the Human Corpus Luteum\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 68(6), 1078–1085. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-6-1078>

Mendis, S. H. S., Meachem, S. J., Sarraj, M. A., & Loveland, K. L. (2011). Activin A balances Sertoli and germ cell proliferation in the fetal mouse testis. *Biology of Reproduction*, 84(2), 379–391. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086231>

Mete, O., Cintosun, A., Pressman, I., & Asa, S. L. (2018). Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0016-8>

Mindermann, T., & Wilson, C. B. (1994). Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology*, 41(3), 359–364.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>

Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Fukuda, M., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K., & Matsuo, H. (1985). Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 129(2), 396–403.

Miyamoto, S., Irahara, M., Ushigoe, K., Kuwahara, A., Sugino, H., & Aono, T. (1999). Effects of activin on hormone secretion by single female rat pituitary cells: analysis by cell immunoblot assay. *The Journal of Endocrinology*, 161(3), 375–382.

Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., & Heldin, C. H. (1991). A role of the latent TGF-

beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO Journal*, 10(5), 1091–1101.

Moore, K. E. (1987). Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biology of Reproduction*, 36(1), 47–58.

Morrell, J. I., Rosenthal, M. F., McCabet, J. T., Harrington, C. A., Chikaraishi, D. M., & Pfaff, D. W. (1989). Tyrosine Hydroxylase mRNA in the Neurons of the Tuberoinfundibular Region and Zona Incerta Examined after Gonadal Steroid Hormone Treatment. *Molecular Endocrinology*, 3(9), 1426–1433. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/mend-3-9-1426>

Mottram JC, C. W. (1923). On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumour growth in the rat and the special effects on testis and pituitary. *J Exp Physiol*, (13), 209–229.

Musolino, N. R. C., & Passos, V. Q. (2005). [Dopamine-agonist resistant prolactinomas: diagnosis and management]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 49(5), 641–650. <https://doi.org/S0004-27302005000500005>

Muttukrishna, S., Groome, N., & Ledger, W. (1997). Gonadotropic control of secretion of dimeric inhibins and activin A by human granulosa-luteal cells in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 14(10), 566–574.

Myers, M., Middlebrook, B. S., Matzuk, M. M., & Pangas, S. A. (2009). Loss of inhibin alpha uncouples oocyte-granulosa cell dynamics and disrupts postnatal folliculogenesis. *Developmental Biology*, 334(2), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.001>

Namwanje, M., & Brown, C. W. (2016). Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021881>

Oda, S., Nishimatsu, S., Murakami, K., & Ueno, N. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210(2), 581–588. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1699>

Oh, M. C., & Aghi, M. K. (2011). Dopamine agonist-resistant prolactinomas. *Journal of Neurosurgery*, 114(5), 1369–1379. <https://doi.org/10.3171/2010.11.JNS101369>

Oklu, R., & Hesketh, R. (2000). The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *The Biochemical Journal*, 352 Pt 3, 601–610.

Olsen, O. E., Wader, K. F., Hella, H., Mylin, A. K., Turesson, I., Nesthus, I., ... Holien, T. (2015). Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 13, 27. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0104-z>

Oreffo, R. O. C., Mundy, G. R., Seyedin, S. M., & Bonewald, L. F. (1989). Activation of

the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158(3), 817–823. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92795-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92795-2)

Ottley, E. C., Reader, K. L., Lee, K., Marino, F. E., Nicholson, H. D., Risbridger, G. P., & Gold, E. (2017). Over-Expression of Activin-betaC Is Associated with Murine and Human Prostate Disease. *Hormones & Cancer*, 8(2), 100–107. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0283-8>

Paez-Pereda, M., Giacomini, D., Refojo, D., Nagashima, A. C., Hopfner, U., Grubler, Y., ... Arzt, E. (2003). Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 1034–1039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237312100>

Pakarainen, T., Ahtiainen, P., Zhang, F.-P., Rulli, S., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2007). Extragonadal LH/hCG action—Not yet time to rewrite textbooks. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 269(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2006.10.019>

Pasqualini, C., Guibert, B., & Leviel, V. (1993). Short-term inhibitory effect of estradiol on tyrosine hydroxylase activity in tuberoinfundibular dopaminergic neurons in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 60(5), 1707–1713.

Pastorcic, M., De, A., Boyadjieva, N., Vale, W., & Sarkar, D. K. (1995). Reduction in the expression and action of transforming growth factor beta 1 on lactotropes during estrogen-induced tumorigenesis in the anterior pituitary. *Cancer Research*, 55(21), 4892–4898.

Peltoketo, H., Zhang, F.-P., & Rulli, S. B. (2011). Animal models for aberrations of gonadotropin action. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 12(4), 245–258. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9174-4>

Perez, P. A., Petiti, J. P., Wagner, I. A., Sabatino, M. E., Sasso, C. V., De Paul, A. L., ... Gutierrez, S. (2015). Inhibitory role of ERbeta on anterior pituitary cell proliferation by controlling the expression of proteins related to cell cycle progression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 415, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.009>

Peters, L. L., Hofer, M. T., & Ben-Jonathan, N. (1981). The posterior pituitary: regulation of anterior pituitary prolactin secretion. *Science (New York, N.Y.)*, 213(4508), 659–661.

Phelps, C., & Hymer, W. C. (1983). Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology*, 37(1), 23–31. <https://doi.org/10.1159/000123511>

Phillips, D. J. (2001, April). New developments in the biology of inhibins, activins and follistatins. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*. United States.

Piroli, G., Lima, A. E., Diaz-Torga, G., & De Nicola, A. F. (1994). Biochemical parameters in the anterior pituitary during the course of tumorigenesis induced by

diethylstilbestrol treatment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 51(3–4), 183–189.

Principe, M., Chanal, M., Karam, V., Wierinckx, A., Mikaélian, I., Gadet, R., ... Bertolino, P. (2018). ALK7 expression in prolactinoma is associated with reduced prolactin and increased proliferation. *Endocrine-Related Cancer*, 25(9).

Qi, W., Gao, S., & Wang, Z. (2008). Transcriptional regulation of the TGF-beta1 promoter by androgen receptor. *The Biochemical Journal*, 416(3), 453–462. <https://doi.org/10.1042/BJ20080651>

Recouvreux, M. V., Camilletti, M. A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Diaz-Torga, G. (2012). Thrombospondin-1 (TSP-1) analogs ABT-510 and ABT-898 inhibit prolactinoma growth and recover active pituitary transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1). *Endocrinology*, 153(8), 3861–3871. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1007>

Recouvreux, M. V., Guida, M. C., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Diaz-Torga, G. (2011). Active and total transforming growth factor-beta1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology*, 152(7), 2722–2730. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1464>

Recouvreux, M. V., Lapyckyj, L., Camilletti, M. A., Guida, M. C., Ornstein, A., Rifkin, D. B., ... Diaz-Torga, G. (2013). Sex differences in the pituitary transforming growth factor-beta1 system: studies in a model of resistant prolactinomas. *Endocrinology*, 154(11), 4192–4205. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1433>

Refaat, B. (2014). Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12, 116. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-116>

Ren, B., Yee, K. O., Lawler, J., & Khosravi-Far, R. (2006). Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1765(2), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.11.002>

Ribeiro, S. M., Poczatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M., & Murphy-Ullrich, J. E. (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13586–13593.

Riddle, O., Bates, R. W., & Dykshorn, S. W. (1933). THE PREPARATION, IDENTIFICATION AND ASSAY OF PROLACTIN—A HORMONE OF THE ANTERIOR PITUITARY. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 105(1), 191–216. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1933.105.1.191>

Rifkin, D. B. (2005). Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7409–7412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400029200>

Risbridger, G. P., Schmitt, J. F., & Robertson, D. M. (2001). Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocrine Reviews*, 22(6), 836–858.

<https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0450>

Rivier, J., Spiess, J., McClintock, R., Vaughan, J., & Vale, W. (1985). Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *133*(1), 120–127.

Roberts, V. J., Peto, C. A., Vale, W., & Sawchenko, P. E. (1992). Inhibin/activin subunits are costored with FSH and LH in secretory granules of the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*, *56*(2), 214–224.

Roberts, V., Meunier, H., Vaughan, J., Rivier, J., Rivier, C., Vale, W., & Sawchenko, P. (1989). Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology*, *124*(1), 552–554. <https://doi.org/10.1210/endo-124-1-552>

Roybal, L. L., Hambarchyan, A., Meadows, J. D., Barakat, N. H., Pepa, P. A., Breen, K. M., ... Coss, D. (2014). Roles of binding elements, FOXL2 domains, and interactions with cJUN and SMADs in regulation of FSHbeta. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *28*(10), 1640–1655. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1008>

Rulli, S. B., Ahtiainen, P., Makela, S., Toppari, J., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2003). Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs, and infertility in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, *144*(11), 4980–4990. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0403>

Rulli, S. B., & Huhtaniemi, I. (2005). What have gonadotrophin overexpressing transgenic mice taught us about gonadal function? *Reproduction (Cambridge, England)*, *130*(3), 283–291. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00661>

Rulli, S. B., Kuorelahti, A., Karaer, O., Pelliniemi, L. J., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2002). Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, *143*(10), 4084–4095. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220490>

Sarkar, D. K. (2006). Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Frontiers of Hormone Research*, *35*, 32–49. <https://doi.org/10.1159/000094307>

Sarkar, D. K., Chaturvedi, K., Oomizu, S., Boyadjieva, N. I., & Chen, C. P. (2005). Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)-beta1, and TGF-beta type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. *Endocrinology*, *146*(10), 4179–4188. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0430>

Schlechte, J. A. (2007). Long-term management of prolactinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *92*(8), 2861–2865. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0836>

Schneyer, A. L., Rzucidlo, D. A., Sluss, P. M., & Crowley, W. F. J. (1994). Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum. *Endocrinology*, *135*(2), 667–674. <https://doi.org/10.1210/endo.135.2.8033815>

- Schneyer, A. L., Wang, Q., Sidis, Y., & Sluss, P. M. (2004). Differential distribution of follistatin isoforms: application of a new FS315-specific immunoassay. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(10), 5067–5075. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0162>
- Schneyer, A., Schoen, A., Quigg, A., & Sidis, Y. (2003). Differential binding and neutralization of activins A and B by follistatin and follistatin like-3 (FSTL-3/FSRP/FLRG). *Endocrinology*, 144(5), 1671–1674. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0203>
- Schwartz, J. (2000). Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine Reviews*, 21(5), 488–513. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.5.0408>
- Scully, K. M., Gleiberman, A. S., Lindzey, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Rosenfeld, M. G. (1997). Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(6), 674–681. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0019>
- Seilicovich, A., Pisera, D., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Puntel, M., Xiong, W., ... Castro, M. G. (2005). Gene therapy for pituitary tumors. *Current Gene Therapy*, 5(6), 559–572.
- Sepporta, M. V., Tumminello, F. M., Flandina, C., Crescimanno, M., Giammanco, M., La Guardia, M., ... Leto, G. (2013). Follistatin as potential therapeutic target in prostate cancer. *Targeted Oncology*, 8(4), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s11523-013-0268-7>
- Shacham, S., Harris, D., Ben-Shlomo, H., Cohen, I., Bonfil, D., Przeddecki, F., ... Naor, Z. (2001). Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitamins and Hormones*, 63, 63–90.
- Shayya, R. F., Rosencrantz, M. A., Chuan, S. S., Cook-Andersen, H., Roudebush, W. E., Irene Su, H., ... Chang, R. J. (2014). Decreased inhibin B responses following recombinant human chorionic gonadotropin administration in normal women and women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 101(1), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.037>
- Shelling, A. N. (2012). Mutations in inhibin and activin genes associated with human disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359(1–2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.031>
- Shi, Y., & Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700.
- Shimasaki, S., Koga, M., Esch, F., Mercado, M., Cooksey, K., Koba, A., & Ling, N. (1988). Porcine follistatin gene structure supports two forms of mature follistatin produced by alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(2), 717–723.
- Shimizu, A., Kato, M., Nakao, A., Imamura, T., ten Dijke, P., Heldin, C. H., ... Miyazono, K. (1998). Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signalling in a human epidermal keratinocyte cell line. *Genes to Cells: Devoted to Molecular &*

*Cellular Mechanisms*, 3(2), 125–134.

Silveira, C. O., Rezende, C. P., Ferreira, M. C., Del Puerto, H. L., & Reis, F. M. (2017). Implantation Failure Is Associated With Increased alpha-Inhibin and beta-Glycan Gene Expression in Secretory Phase Endometrium: Nested Case-Control Study of Infertile Women Undergoing IVF/Fresh Embryo Transfer. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 24(5), 720–725. <https://doi.org/10.1177/1933719116667490>

Simoni, M., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 18(6), 739–773. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0320>

Smith, K. B., Millar, M. R., McNeilly, A. S., Illingworth, P. J., Fraser, H. M., & Baird, D. T. (1991). Immunocytochemical localization of inhibin alpha-subunit in the human corpus luteum. *The Journal of Endocrinology*, 129(1), 155–160.

Stamatiades, G. A., & Kaiser, U. B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 463, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.015>

Sterner-Kock, A., Thorey, I. S., Koli, K., Wempe, F., Otte, J., Bangsow, T., ... von Melchner, H. (2002). Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes & Development*, 16(17), 2264–2273. <https://doi.org/10.1101/gad.229102>

Sugino, H., Sugino, K., Hashimoto, O., Shoji, H., & Nakamura, T. (1997). Follistatin and its role as an activin-binding protein. *The Journal of Medical Investigation : JMI*, 44(1–2), 1–14.

Sugino, K., Kurosawa, N., Nakamura, T., Takio, K., Shimasaki, S., Ling, N., ... Sugino, H. (1993). Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(21), 15579–15587.

Sugiyama, M., Kikuchi, A., Misu, H., Igawa, H., Ashihara, M., Kushima, Y., ... Takamura, T. (2018). Inhibin betaE (INHBE) is a possible insulin resistance-associated hepatokine identified by comprehensive gene expression analysis in human liver biopsy samples. *PLoS One*, 13(3), e0194798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194798>

Sun, Z., Li, Z., & Zhang, Y. (2010, August). Adult testicular dysgenesis of Inhba conditional knockout mice may also be caused by disruption of cross-talk between Leydig cells and germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008771107>

Suszko, M. I., & Woodruff, T. K. (2006). Cell-specificity of transforming growth factor-beta response is dictated by receptor bioavailability. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 591–600. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01936>

Taguchi, R., Yamada, M., Horiguchi, K., Tomaru, T., Ozawa, A., Shibusawa, N., ... Mori,

- M. (2011). Haploinsufficient and predominant expression of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)-related genes, MLL, p27Kip1 and p18Ink4C in endocrine organs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(2), 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.077>
- Thackray, V. G., McGillivray, S. M., & Mellon, P. L. (2006). Androgens, progestins, and glucocorticoids induce follicle-stimulating hormone beta-subunit gene expression at the level of the gonadotrope. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(9), 2062–2079. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0316>
- Thackray, V. G., Mellon, P. L., & Coss, D. (2010). Hormones in synergy: regulation of the pituitary gonadotropin genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(2), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.003>
- Thakker, R. V. (2014). Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 386(1–2), 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.002>
- Theodoropoulou, M., Cavallari, I., Barzon, L., D'Agostino, D. M., Ferro, T., Arzberger, T., ... Pagotto, U. (2004). Differential expression of menin in sporadic pituitary adenomas. *Endocrine-Related Cancer*, 11(2), 333–344.
- Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K., & Jardetzky, T. S. (2005). The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Developmental Cell*, 9(4), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.008>
- Todorovic, V., & Rifkin, D. B. (2012). LTBP5, more than just an escort service. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2), 410–418. <https://doi.org/10.1002/jcb.23385>
- Truty, M. J., Lomber, G., Fernandez-Zapico, M. E., & Urrutia, R. (2009). Silencing of the transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptor II by Kruppel-like factor 14 underscores the importance of a negative feedback mechanism in TGFbeta signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6291–6300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807791200>
- Tsonis, C. G., Hillier, S. G., & Baird, D. T. (1987). Production of inhibin bioactivity by human granulosa-lutein cells: stimulation by LH and testosterone in vitro. *The Journal of Endocrinology*, 112(3), R11-4.
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Yamakawa, N., Hashimoto, O., Hasegawa, Y., & Sugino, H. (2004). Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 220(1–2), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.03.009>
- Uccella, S., La Rosa, S., Genasetti, A., & Capella, C. (2000). Localization of inhibin/activin subunits in normal pituitary and in pituitary adenomas. *Pituitary*, 3(3), 131–139.
- Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., ... Spiess, J. (1986). Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine

- ovarian follicular fluid. *Nature*, 321(6072), 776–779. <https://doi.org/10.1038/321776a0>
- Vale, W., Wiater, E., Gray, P., Harrison, C., Bilezikjian, L., & Choe, S. (2004). Activins and inhibins and their signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1038, 142–147. <https://doi.org/10.1196/annals.1315.023>
- Vasilev, V., Daly, A. F., Vroonen, L., Zacharieva, S., & Beckers, A. (2011). Resistant prolactinomas. *Journal of Endocrinological Investigation*, 34(4), 312–316. <https://doi.org/10.1007/BF03347092>
- Vehviläinen, P., Koli, K., Myllärniemi, M., Lindholm, P., Soini, Y., Salmenkivi, K., ... Keski-Oja, J. (2011). Latent TGF- $\beta$  binding proteins (LTBPs) 1 and 3 differentially regulate transforming growth factor- $\beta$  activity in malignant mesothelioma. *Human Pathology*, 42(2), 269–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.07.005>
- Vinik, A., Perry, R. R., Hughes, M. S., & Feliberti, E. (2000). Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, ... A. Vinik (Eds.). South Dartmouth (MA).
- Wada, W., Medina, J. J., Kuwano, H., & Kojima, I. (2005). Comparison of the function of the beta(C) and beta(E) subunits of activin in AML12 hepatocytes. *Endocrine Journal*, 52(2), 169–175.
- Walton, K. L., Makanji, Y., & Harrison, C. A. (2012). New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 359(1–2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.030>
- Walton, K. L., Makanji, Y., Robertson, D. M., & Harrison, C. A. (2011). The synthesis and secretion of inhibins. *Vitamins and Hormones*, 85, 149–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385961-7.00008-1>
- Watanabe, Y., Itoh, S., Goto, T., Ohnishi, E., Inamitsu, M., Itoh, F., ... Kato, M. (2010). TMEPAI, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. *Molecular Cell*, 37(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.028>
- Webster, J., Piscitelli, G., Polli, A., Ferrari, C. I., Ismail, I., & Scanlon, M. F. (1994). A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 331(14), 904–909. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311403>
- Welt, C. K., & Schneyer, A. L. (2001). Differential Regulation of Inhibin B and Inhibin A by Follicle-Stimulating Hormone and Local Growth Factors in Human Granulosa Cells from Small Antral Follicles1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(1), 330–336. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.1.7107>
- Welt, C., Sidis, Y., Keutmann, H., & Schneyer, A. (2002). Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 227(9), 724–752.

- Wen, X., Tozer, A. J., Li, D., Docherty, S. M., Al-Shawaf, T., & Iles, R. K. (2008). Human granulosa-lutein cell in vitro production of progesterone, inhibin A, inhibin B, and activin A are dependent on follicular size and not the presence of the oocyte. *Fertility and Sterility*, *89*(5 Suppl), 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.086>
- Wiater, E., Lewis, K. A., Donaldson, C., Vaughan, J., Bilezikjian, L., & Vale, W. (2009). Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *23*(7), 1033–1042. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0021>
- Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchison, J. S., Plant, T. M., Belchetz, P. E., & Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, *109*(2), 376–385. <https://doi.org/10.1210/endo-109-2-376>
- Wise, P. M., & Ratner, A. (1980). Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, estradiol, and progesterone and medial basal hypothalamic LHRH concentrations old and young rats. *Neuroendocrinology*, *30*(1), 15–19. <https://doi.org/10.1159/000122968>
- Wong, A., Eloy, J. A., Couldwell, W. T., & Liu, J. K. (2015a). Update on prolactinomas. Part 1: Clinical manifestations and diagnostic challenges. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, *22*(10), 1562–1567. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.03.058>
- Wong, A., Eloy, J. A., Couldwell, W. T., & Liu, J. K. (2015b). Update on prolactinomas. Part 2: Treatment and management strategies. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, *22*(10), 1568–1574. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.03.059>
- Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., ... Massague, J. (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, *71*(6), 1003–1014.
- Xia, Y., & Schneyer, A. L. (2009). The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *The Journal of Endocrinology*, *202*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0549>
- Yacqub-Usman, K., Duong, C. V., Clayton, R. N., & Farrell, W. E. (2012). Epigenomic silencing of the BMP-4 gene in pituitary adenomas: a potential target for epidrug-induced re-expression. *Endocrinology*, *153*(8), 3603–3612. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1231>
- Yoshinaga, K., Obata, H., Jurukovski, V., Mazziere, R., Chen, Y., Zilberberg, L., ... Rifkin, D. B. (2008). Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(48), 18758–18763. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805411105>
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.

---

*Genes & Development*, 14(2), 163–176.

Zhang, Z. W., Carson, R. S., Herington, A. C., Lee, V. W., & Burger, H. G. (1987). Follicle-stimulating hormone and somatomedin-C stimulate inhibin production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 120(4), 1633–1638. <https://doi.org/10.1210/endo-120-4-1633>

Zhou, Y., Sun, H., Danila, D. C., Johnson, S. R., Sigai, D. P., Zhang, X., & Klibanski, A. (2000). Truncated Activin Type I Receptor Alk4 Isoforms Are Dominant Negative Receptors Inhibiting Activin Signaling. *Molecular Endocrinology*, 14(12), 2066–2075. <https://doi.org/10.1210/mend.14.12.0570>