

Tesis Doctoral

# El sistema Notch en la generación, crecimiento y desarrollo de tumores hipofisarios

Zubeldía Brenner, Lautaro

2017-03-22

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zubeldía Brenner, Lautaro. (2017-03-22). El sistema Notch en la generación, crecimiento y desarrollo de tumores hipofisarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zubeldía Brenner, Lautaro. "El sistema Notch en la generación, crecimiento y desarrollo de tumores hipofisarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-22.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

# **El Sistema Notch en la generación, crecimiento y desarrollo de tumores hipofisarios.**

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

**Lic. Lautaro Zubeldia Brenner**

Director de Tesis: **Dra. Damasia Becu de Villalobos.**

Director Asistente: **Dra. Carolina Cristina.**

Consejero de Estudios: **Dr. Omar A. Coso.**

**Lugar de Trabajo: Laboratorio de regulación Hipofisaria  
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)**

Buenos Aires, Marzo 2017.

## EL SISTEMA NOTCH EN LA GENERACIÓN, CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE TUMORES HIPOFISARIOS.

### Resumen

En la actualidad se ha postulado que la existencia de células madre cancerígenas sería determinante para el crecimiento y resistencia a la terapia en numerosos tumores. Además, se propone que la transición epitelio mesenquimática sería un proceso crucial para el desarrollo e invasividad en numerosos modelos tumorales. Una de las vías de señalización más vinculadas a estos procesos es la de los receptores NOTCH. En mamíferos, esta familia está formada por cuatro receptores: NOTCH1, 2, 3 y 4, regulando el equilibrio entre diferenciación y replicación celular en múltiples tejidos. Además, forman parte de un grupo de moléculas que actúan conjuntamente entre ligandos y efectores río abajo que globalmente se denomina Sistema Notch. Durante la última década, la relevancia de este sistema en la generación, mantenimiento y progresión de diversos tumores ha ido en considerable aumento.

Particularmente, la existencia de células madre cancerígenas y el proceso de transición epitelio mesenquimática han adquirido notoria relevancia en lo que respecta a la biología tumoral hipofisaria donde, además, la actividad del Sistema Notch es crucial para el proceso de diferenciación. Si bien se ha demostrado que la actividad de dicho sistema es de gran importancia en la biología tumoral hipofisaria, el funcionamiento, expresión de dichos receptores, su acción, ligandos y efectores no ha sido aún descripta. Dado que el Sistema Notch está íntimamente ligado a las células madre cancerígenas y transición epitelio mesenquimática, y siendo un marcador típico de estos procesos, su caracterización en el contexto de la transformación adenomatosa de la glándula hipófisis nos permitirá proponer nuevos blancos terapéuticos para avanzar en el tratamiento no quirúrgico de estos tumores.

En el presente estudio nos focalizamos en los mecanismos moleculares que participan en la génesis de adenomas hipofisarios y que inducen resistencia de prolactinomas a agonistas dopaminérgicos. Para esto, se realizó una vasta caracterización del Sistema Notch en diferentes modelos tumorales de ratón y rata, con diferentes grados de oncotransformación y agresividad. Esto nos permitió hacer un estudio comparativo de la expresión relativa de los cuatro receptores NOTCH así como de diferentes marcadores relacionados con dicha vía con el objetivo de establecer una correlación entre su actividad y el grado de agresividad en cada modelo. Además, mediante la generación de tumores experimentales xenotrópicos, pudimos establecer la importancia de los receptores NOTCH en la progresión tumoral, su impacto en la actividad endócrina hipofisaria y el correlato anatómico fisiológico de su inhibición durante el crecimiento. Por último, mediante estudios funcionales, se evaluó el papel de los receptores NOTCH en procesos de migración y la proliferación celular. Todos estos resultados nos permitieron comprobar la importancia de estos receptores en el crecimiento de los tumores hipofisarios, en particular, los prolactinomas.

La dopamina inhibe la síntesis y secreción de prolactina, reduce la proliferación de lactotrofos hipofisarios actuando a través del Receptor de Dopamina 2. La disminución de su expresión da origen a prolactinomas, que son los tumores hipofisarios más frecuentes dentro de los adenomas secretantes. Estos se diferencian del resto de los tumores hipofisarios dado que, en su mayoría, son tratados exitosamente con agonistas dopaminérgicos logrando una rápida reducción del tamaño tumoral con liberación de los síntomas de compresión. Sin embargo en un 15% de los casos los prolactinomas pueden ser resistentes a drogas dopaminérgicas y es necesario recurrir a la cirugía para su extirpación. Los resultados aquí presentados muestran el papel crucial del Sistema Notch en la biología tumoral de los prolactinomas, siendo tanto sus receptores como ligandos y efectores potenciales blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos tratamientos oncológicos.

**Palabras claves:** Hipófisis, Prolactinomas, Sistema Notch, Tumores Hipofisarios, Prolactina, Hormona de crecimiento.

## THE NOTCH SYSTEM IN THE GENERATION, GROWTH AND DEVELOPMENT OF PITUITARY TUMORS.

### Abstract

It has been postulated that the existence of cancer stem cells can be decisive for growth and resistance to therapy in many tumors. In addition, the epithelial mesenchymal transition would be crucial for the development and invasiveness in many tumor models. Notch receptors belong to one of the most associated pathways to these processes. In mammals, this family is composed of four receptors: NOTCH1, 2, 3 and 4, regulating the balance between differentiation and cell replication in multiple tissues. Moreover, they belong to a group of molecules called the Notch System which develop functions coordinately and interact in the ligand-receptor activation and the downstream effectors action in the nucleus. Over the past decade, the importance of this system in the generation, maintenance and pituitary tumors progression has increased considerably.

The existence of cancer stem cells and the epithelial mesenchymal transition process has acquired remarkable importance with regard to pituitary tumor biology where Notch System activity is crucial during differentiation. While it has been shown that the activity of this System is of great importance in pituitary tumor biology, the function, expression of these receptors, ligands and effectors, as well as their specific action, have not been fully described. Since the Notch System is closely linked to the cancer stem cells and epithelial mesenchymal transition, being a typical marker of these processes, its characterization in the context of pituitary gland transformation allows us to propose new therapeutic targets to advance in the nonsurgical treatment of these tumors.

In the present study we focus on the molecular mechanisms that induce pituitary tumors, and particularly, dopamine agonists resistant prolactinomas. To elucidate this, we performed a vast Notch System characterization in different mouse and rat tissues, with different degrees of aggressiveness and oncotransformation. This allowed us to make a comparative study of the relative expression of the four NOTCH receptors and different markers of this pathway in order to establish a correlation between their activity and the degree of aggressiveness in each model. Furthermore, by generating xenotropic experimental tumors, we could establish the importance of NOTCH receptors in tumor progression, its impact on the pituitary endocrine activity and physiological anatomical correlation of inhibition during growth. Finally, by functional studies, the role of NOTCH receptors in pituitary cell migration and proliferation was assessed. All these results allowed us to sort the relevance of these receptors in pituitary tumor growth, in particular prolactinomas.

Dopamine inhibits synthesis and prolactin secretion, reducing proliferation through pituitary lactotrophs dopamine receptor 2. Its downregulation gives rise to prolactinomas, which are most prevalent in secreting pituitary tumors adenomas. These differ from the rest of pituitary tumors since, in most cases, they are successfully treated with dopamine agonists achieving a rapid tumor reduction in size with release of compression symptoms. However in 15% of cases prolactinomas

may be resistant to dopaminergic drugs and need surgery for removal. The results presented here unveil the crucial role of Notch System in prolactinoma tumor biology, including receptors, ligands and effectors, being potential pharmacological therapeutic targets for developing new treatments against pituitary tumors.

**Key words:** Pituitary Gland, Prolactinoma, Growth Hormone, Prolactin, Notch System, Pituitary Tumors.

## AGRADECIMIENTOS

En este pequeño apartado, mi intención es agradecer a todas las personas e instituciones que me ayudaron a realizar este trabajo de Tesis Doctoral. Fueron años de muchísimo trabajo y esfuerzo en los cuales el aprendizaje fue no solo en términos científicos, sino más bien en la parte humana.

Quería agradecer en primer lugar a mi jefa Damasia Becú por todos estos años de sabiduría y aguante. Pese a que es Directora del IBYME nunca aflojó en cuanto a las ayudas; puedo decir que tuve siempre su consejo como guía, y puedo constatar de cómo le apasiona su trabajo, siempre con nuevas iniciativas, proponiendo nuevos objetivos y nuevos horizontes. Además de la parte estrictamente profesional, en términos personales estoy muy agradecido, en la que siempre hace un esfuerzo por escucharnos y tenernos paciencia. Siempre estuvo muy segura del rumbo de nuestro trabajo, y en momentos de nervios o zozobra, su guía para mantener la serenidad fue una ayuda invaluable.

También quería agradecerle a Caro Cristina, mi vice Directora de Tesis. Está lejos, pero cerca a la vez, siempre dispuesta a contestar cualquier duda por teléfono. También quiero agradecerle su buena onda, su alegría para trabajar y la buena predisposición de todos los chicos y chicas de su grupo de la UNNOBA, que por mensajito, por mail o por teléfono en todo momento estuvieron presentes para ayudarme en este trabajo. Creo que nos complementamos muy bien todos estos años y nuestro laburo está dando frutos muy lindos.

A nuestro grupo de trabajo también quiero agradecerle. A todos los que pasaron por el labo Becú en estos cinco años. Fueron muchas personas, y nombrarlas a todas sería largo, porque es un laboratorio importante; pero recuerdo a cada una de ellas, siempre presentes para ayudarme en cualquier inconveniente, para tomar mate, charlar y reírnos, pasando un rato de distracción entre experimento y experimento.

Mi familia y mis amigos han sido un sostén muy importante estos años, para seguir adelante con ánimo y no perder el aliento. Por ende también para ellos va un “gracias” y un abrazo fuerte.

Quiero agradecerle al IBYME, como institución, y a la Universidad de Buenos Aires por ser dos lugares muy buenos de formación, en los que aprendí, me formé como científico y como persona. Al CONICET por otorgarme las becas que me permitieron trabajar y desarrollarme en el aspecto laboral y humano. Muchas gracias a todos los amigos del IBYME, los compañeros, la gente de CPA, de Biblioteca, los muchachos de la guardia en fin, toda la pequeña comunidad del Instituto, que conforman un ámbito de buena onda y mucho trabajo.

Sin extenderme más, porque los agradecimientos es mejor hacerlos en forma personal, espero que este trabajo pueda sumar, aunque sea un poquito, para ayudar a los demás.

**Muchas gracias.**

## LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS FORMAN PARTE DE LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

1. Developmental and Functional Effects of Steroid Hormones on the Neuroendocrine Axis and Spinal Cord. **Zubeldia-Brenner L**, Roselli CE, Recabarren SE, Gonzalez Deniselle MC, Lara HE. J Neuroendocrinol. 2016 Jul;28(7). doi: 10.1111/jne.12401.
2. Notch system is differentially expressed in tumoral and normal pituitaries. Perrone S., **Zubeldía-Brenner L.**, Gazza E., Demarchi G., Baccarini L.C., Baricalla A., Mertens F., Luque G.M., Vankelecom H., Berner S.I., Becu-Villalobos D. and Cristina S.C. (Oncotarget, Aceptado en revisión 2017).
3. Notch activation participates in pituitary adenoma development. **Zubeldía-Brenner L.**, Perrone S., Rodriguez Seguí S., Willems C., Vankelecom H., Cristina C., Becu-Villalobos, D. (Manuscrito en preparación).



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



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>5</b>
HIPÓFISIS .....	5
<i>La Neurohipófisis.....</i>	7
<i>La Adenohipófisis .....</i>	8
FUNCIONAMIENTO ENDÓCRINO DE LA ADENOHIPÓFISIS .....	10
<i>Adrenocorticotropina .....</i>	10
<i>Prolactina.....</i>	13
<i>Hormona de crecimiento.....</i>	15
ADENOMAS HIPOFISARIOS .....	16
<i>Tumores de Corticotropos (Corticotropinomas) .....</i>	17
<i>Prolactinomas.....</i>	18
<i>Somatotropinomas .....</i>	21
<i>Adenomas no funcionantes, adenomas secretores de Gonadotrofinas y Tirotropinomas.....</i>	21
CÉLULAS MADRE TUMORALES (CANCER STEM CELLS: CSC) Y TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL (EPITHELIAL MESECHYMAL TRANSITION: EMT) .....	22
<i>CSC en tumorigénesis hipofisaria.....</i>	23
EL SISTEMA NOTCH .....	25
<i>Activación de los receptores NOTCH.....</i>	25
<i>Sistema Notch en cáncer y en particular en patologías hipofisarias .....</i>	27
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>30</b>
OBJETIVOS.....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
ANIMALES .....	32
<i>Ratones lacDrd2KO .....</i>	32
<i>Ratas:.....</i>	32
GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES .....	32
<i>Extracción de ADN genómico .....</i>	32
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....</i>	33
DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> PARA EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES POR PCR EN TIEMPO REAL .....	35
PCR EN TIEMPO REAL.....	39
ELECTROFESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA .....	40
EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE DNAC .....	40
RADIOINMUNOENSAYOS (RIAs) .....	40
<i>Niveles séricos de hormonas .....</i>	40
<i>Prolactina.....</i>	40
<i>Hormona de crecimiento.....</i>	41
<i>Niveles intratumorales de hormonas.....</i>	41
TÉCNICAS DE CULTIVO Y LÍNEAS CELULARES.....	42

<i>Líneas celulares utilizadas</i> .....	42
<i>Mantenimiento, propagación y subcultivo</i> .....	42
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS .....	43
WESTERN BLOT .....	43
ENSAYOS DE ESTÍMULO CON DAPT <i>IN VITRO</i> 24 Y 48 HS. ....	45
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR .....	46
ENSAYOS DE HERIDA (SCRATCH ASSAYS) .....	46
ENSAYOS DE HERIDA CON MITOMICINA C. ....	47
GENERACIÓN DE TUMORES XENOTRÓPICOS EN RATONES NUDE/NUDE A PARTIR DE LA LÍNEA CELULAR GH3.....	48
TRATAMIENTO CON DAPT DE TUMORES XENOTRÓPICOS EN RATONES NUDE/NUDE.....	49
BIOINFORMÁTICA.....	50
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	51
<b>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA NOTCH EN HIPÓFISIS Y LÍNEAS CELULARES HIPOFISARIAS MURINAS, NORMALES Y TUMORALES.</b> .....	<b>53</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO I.....	53
<i>Modelos experimentales de Prolactinoma</i> .....	54
<i>Ratón KO condicional lacDrd2KO: modelo de prolactinoma resistente a agonistas dopaminérgicos</i> .....	55
<i>Modelo experimental de tumores xenotrópicos a partir de la línea GH3 en ratones NUDE/NUDE</i> .....	55
LÍNEAS CELULARES GH3, MMQ Y ATT20 COMO HERRAMIENTAS COMPLEMENTARIAS EN EL ESTUDIO DE ADENOMAS HIPOFISARIOS .....	56
<b>OBJETIVOS DEL CAPÍTULO I</b> .....	<b>58</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	58
<b>RESULTADOS DEL CAPÍTULO I</b> .....	<b>59</b>
EL SISTEMA NOTCH ES EXPRESADO EN DIFERENTES TIPOS DE PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES .....	59
LA VÍA DE NOTCH ESTÁ ACTIVA EN LA LÍNEA CELULAR DE CORTICOTROPINOMA ATT20 .....	62
EL SISTEMA NOTCH ESTÁ SOBREEXPRESADO EN LOS PROLACTINOMAS GENERADOS <i>IN VIVO</i> EN EL RATÓN LACDRD2KO.....	65
<b>DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO I</b> .....	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO II: PAPEL DEL SISTEMA NOTCH EN LA PROGRESIÓN DE TUMORES HIPOFISARIOS XENOTRÓPICOS EN RATONES NUDE/NUDE</b> .....	<b>72</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO II.....	72
<b>OBJETIVOS DEL CAPÍTULO II</b> .....	<b>75</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	75
<b>RESULTADOS DEL CAPÍTULO II</b> .....	<b>76</b>
LA INHIBICIÓN DE NOTCH DECRECE EL VOLUMEN DE TUMORES XENOTRÓPICOS, EL CONTENIDO INTRATUMORAL DE GH Y PROLACTINA, Y LA LIBERACIÓN DE PROLACTINA .....	76
EL TRATAMIENTO CON DAPT DISMINUYÓ LA ACTIVACIÓN DE NOTCH, REDUJO EL NOTCH 1-2 ICD, Y EL EFECTOR RÍO ABAJO HES1.....	78
EL TRATAMIENTO CON DAPT REDUJO LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Hey2</i> .....	80
<b>DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II</b> .....	<b>83</b>

<b>CAPÍTULO III: ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DEL PAPEL DEL SISTEMA NOTCH EN ADENOMAS HIPOFISARIOS.</b>	<b>88</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO III .....	88
<b>OBJETIVOS DEL CAPÍTULO III.....</b>	<b>94</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL CAPÍTULO III .....	94
<b>RESULTADOS DEL CAPÍTULO III .....</b>	<b>95</b>
RESULTADO DEL ANÁLISIS DE CHIP SEQ DE CÉLULAS HIPOFISARIAS GC, EN BÚSQUEDA DE GENES ACTIVOS TRANSCRIPCIONALMENTE, ESPECÍFICOS DE HIPÓFISIS Y CON SITIOS DE UNIÓN PARA NOTCH1 .....	95
RESULTADO DEL ANÁLISIS DE RNA-SEQ COMPARATIVO ENTRE HIPÓFISIS CONTROLES Y ADENOMAS HIPOFISARIOS EN BÚSQUEDA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y RELACIONADOS A LA VÍA DE NOTCH1 .....	97
RESULTADOS COMBINANDO LOS ANÁLISIS DE CHIP-SEQ Y RNA-SEQ PARA EL CASO DEL ESTUDIO DE LA VÍA DE NOTCH EN PROLACTO-SOMATOTROPINOMAS .....	99
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE <i>BTG2</i> , <i>Nr4A1</i> , <i>MEN1</i> , <i>ZFP36</i> , Y <i>CNOT1</i> EN CÉLULAS GH3 Y EN XENOTRANSPLANTES TUMORALES DE GH3.....	102
EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DAPT EN LA EXPRESIÓN DE <i>BTG2</i> , <i>Nr4A1</i> , <i>MEN1</i> , <i>ZFP36</i> , Y <i>CNOT1</i> EN LOS XENOTRANSPLANTES TUMORALES DE GH3 .....	102
<b>DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO III .....</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE NOTCH EN CÉLULAS GH3 EN CULTIVO CELULAR .....</b>	<b>108</b>
INTRODUCCIÓN DEL CAPÍTULO IV.....	108
<b>OBJETIVOS DEL CAPÍTULO IV .....</b>	<b>110</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	110
<b>RESULTADOS DEL CAPÍTULO IV.....</b>	<b>111</b>
EL DAPT DISMINUYÓ LA SECRECIÓN DE PROLACTINA Y GH POR PARTE DE CÉLULAS GH3 <i>IN VITRO</i> .....	111
EFFECTO DEL DAPT <i>IN VITRO</i> EN LOS COMPONENTES DEL SISTEMA NOTCH .....	111
EL DAPT PREVIENE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS DE CÉLULAS GH3 EN CULTIVO.....	113
EL DAPT DISMINUYE LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE CÉLULAS GH3 <i>IN VITRO</i> . .....	116
<b>DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO IV .....</b>	<b>118</b>
<b>DISCUSIÓN FINAL.....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>151</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>AC</b>	Adenilato Ciclasa
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropina
<b>ADH</b>	Hormona Antidiurética
<b>AMPc</b>	Adenosin Monofosfato cíclico
<b>AMR</b>	Anova de dos factores de Medidas Repetidas
<b><math>\alpha</math>MSH</b>	Hormona Melanocito estimulante
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de Adrenocorticotropina
<b>CSC</b>	Cancer Stem Cells (Células Madre Cancerosas)
<b>CSL</b>	CBF-1-Su(H)1
<b>Ct</b>	Cycle Threshold
<b>DARPS</b>	Dopamine Agonist- Resistant Prolactinomas
<b>dbGAP</b>	Database Genotypes and Phenotypes
<b>Drd2-/-</b>	Ratones Knock out Totales para el RD2
<b>EA</b>	Albúmina de Huevo
<b>ECD</b>	Dominio Extracelular
<b>EMT</b>	Transición Epitelio Mesenquimal
<b>FACS</b>	Citometría de Flujo Fluorescente " <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> "
<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico
<b>FPKM</b>	Fragments per kilobase of Exon per Million of Fragments Mapped
<b>FSH</b>	Hormona Folículo Estimulante
<b>GH</b>	Hormona de Crecimiento
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de Hormona de Crecimiento
<b>GSEA</b>	Gene Set Enrichment Analysis

<b>GSI</b>	$\gamma$ -secretase inhibitor
<b>HRP</b>	Horse Radish Peroxidase
<b>ICD</b>	Dominio Intracelular
<b>IGF1</b>	Factor de crecimiento de Insulina tipo I
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>kDa</b>	Kilo Daltons
<b>lacDrd2KO</b>	Ratones Knock out para RD2 en lactotrofos
<b>LAH</b>	Leucemia Mieloide Aguda Humana
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>LPH</b>	Hormona Lipotrópica
<b>MCR2</b>	Melanocortina tipo 2
<b>MEN-1</b>	Múltiple Endocrina Neoplasia
<b>MET</b>	Transición Mesénquimo Epitelial
<b>MSH</b>	Melanocortina
<b>Msigdb</b>	Molecular signature database
<b>NECD</b>	Dominio Extracelular de NOTCH
<b>NGFR</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Neural
<b>NICD</b>	Dominio Activo de Notch o porción Intracelular
<b>NLS</b>	Señal de Localización Nuclear
<b>NPV</b>	Núcleo Paraventricular
<b>NRR</b>	Región Regulatoria Negativa "Negative Regulatory Region"
<b>NSO</b>	Núcleo Supraóptico
<b>NTMICD</b>	Dominio de Membrana e Intracelular de NOTCH
<b>Ox</b>	Oxitocina

<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PBST</b>	Buffer Fosfato Salino-Tween
<b>PC3</b>	NGF inducible antiproliferative Protein (Rata)
<b>PL</b>	Lactógeno Placentario
<b>POMC</b>	Proiomelanocortina
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PRLR</b>	Receptor de Prolactina
<b>RD1</b>	Receptor de Dopamina Tipo I
<b>RD2</b>	Receptor de Dopamina Tipo II
<b>RIA</b>	Radio Inmuno ensayo "Radio Immuno Assay"
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>Rx</b>	Radiografía
<b>SC</b>	Suero de Caballo
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SP</b>	Población Lateral "Side Population"
<b>SRA</b>	Sequense Read Archive
<b>STT</b>	Somatostatina
<b>TAC</b>	Tomografía Axial Computada
<b>TAD</b>	Dominio de Transactivación
<b>TAD</b>	Topologically Associated Domain
<b>[Tg(Prl-cre)1Mrub]</b>	Ratones Transgénicos que poseen la expresión de la enzima recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de Prolactina
<b>T-ALL</b>	T-Cell acute Lymphoblastic Leukemia

<b>Tis21</b>	NGF inducible antiproliferative Protein (Ratón)
<b>TMD</b>	Dominio Transmembrana
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
<b>TRH</b>	Hormona Liberadora de Tirotropina
<b>TSC</b>	Tumor Stem Cells (Células Madre Tumorales)
<b>TSH</b>	Tirotropina
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento de Endotelio Vascular
<b>VIP</b>	Péptido intestinal Vasoactivo

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Una de las facetas más importantes de la Fisiología humana es la habilidad del organismo para detectar y procesar información recibida del entorno. En este proceso de integración, la comunicación y señalización entre las diferentes estructuras fisiológicas, tejidos y órganos adquiere una notoriedad determinante. La habilidad de diferentes grupos celulares para comunicarse unos con otros, desde partes distantes del organismo, fue evolucionando hasta conformar el Sistema Endócrino (1). Éste se constituye por un conjunto de glándulas cuya función es controlar la fisiología de distintos órganos asegurando el crecimiento, y la capacidad de reproducción; y a la vez dar una respuesta coordinada a las fluctuaciones fisiológicas internas (2).

La Hipófisis es la piedra angular del Sistema Endócrino. Es una glándula descrita en varias oportunidades a lo largo de la historia biomédica, y se le han asignado los más sorprendentes roles fisiológicos. Desde la fuente de la flema que desde el cerebro iba hacia la nariz, pasando también por la porción del cuerpo donde habita el alma o el espíritu. Pero su descripción más cabal fue hecha a principios del siglo pasado, y de ahí en adelante sus componentes y las hormonas que produce fueron caracterizadas de forma lenta pero sistemática (3).

La estructura neuroanatómica que controla la hipófisis es el Hipotálamo; fue reconocido por Harris a mediados del siglo XX, dando origen a una de las disciplinas más fascinantes que es la neuroendocrinología (4). Para la misma época el Dr. Bernardo Houssay, fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 1947 por su descripción de la función del lóbulo anterior de la pituitaria en la metabolización de los azúcares de la sangre (5; 6). Argentina tiene el mérito de estar en un lugar protagónico en la consolidación de la neuroendocrinología como disciplina, asimismo esta vasta influencia a nivel mundial se continúa hasta nuestros días, siendo un referente ineludible el IBYME, fundado en marzo de 1944 por el mismo Dr. Houssay (7).

El eje hipotalámico-hipofisario constituye la porción más compleja y determinante de todo el aparato endócrino (8). Sus estructuras están relacionadas anatómica y funcionalmente de manera tan sofisticada que el resultado de esta sinergia es el control de la tiroides, las glándulas adrenales, y las glándulas reproductivas, así como la regulación del crecimiento corporal, la lactación, la secreción de leche, y el metabolismo del agua. Este "Centro de control endócrino" está concentrado en una masa celular que no supera los 15 gramos (8).

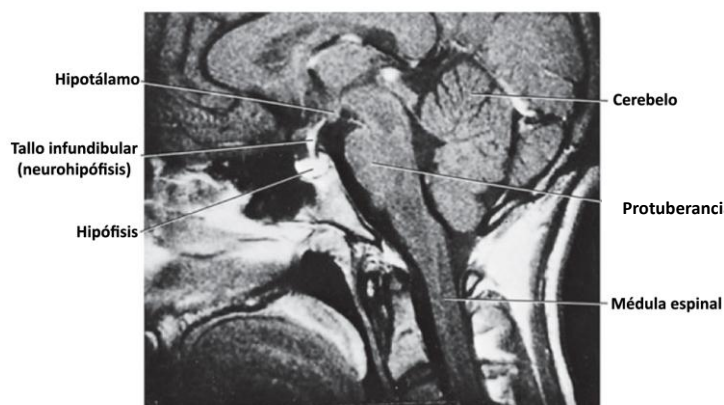
### HIPÓFISIS

---

La hipófisis regula diversas funciones fisiológicas básicas incluyendo crecimiento, reproducción, y homeostasis metabólica. Se encuentra ubicada ventral al cerebro y posterior al quiasma óptico, sobre el bolsillo o fosa del hueso esfenoides denominada silla turca; y permanece unida al hipotálamo por un tallo o pedículo (**Figura 1**). Se encuentra estrictamente regulada por el hipotálamo y por retroalimentaciones positivas y negativas. La glándula en su desarrollo completo es una amalgama de células secretoras glandulares y células nerviosas secretoras de neurohormonas. Estos dos grupos definen dos porciones que interactúan íntimamente entre sí,



la adenohipófisis de componente epitelial y la hipófisis posterior o neurohipófisis, de estructura neural. En ambos casos, el origen es ectodérmico (1).



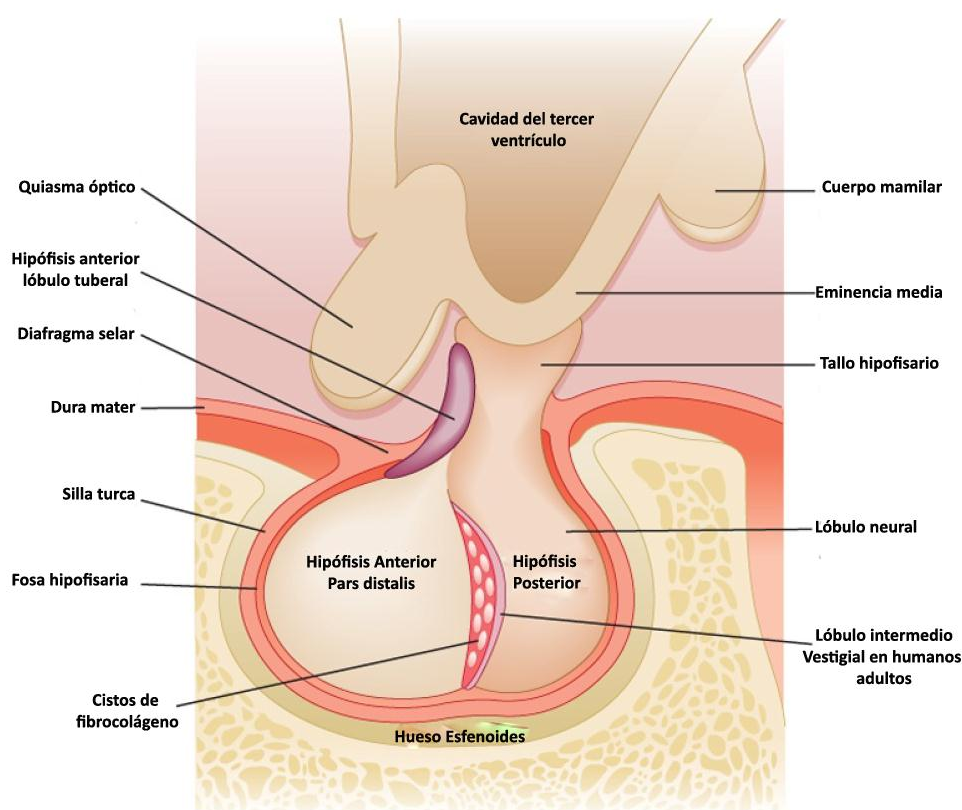
**Figura 1:** Situación anatómica de la glándula hipófisis en la cabeza. También puede apreciarse el tallo infundibular, que la comunica con el hipotálamo. Tomado de (Berne and Levy, 6th Edition 2008. Physiology) (1).

La adenohipófisis conforma lo que comúnmente se denomina Hipófisis anterior, o lóbulo anterior de la pituitaria. Puede ser subdividida en tres regiones anatómicas: La *pars distalis*, que conforma el 90% de la adenohipófisis; la *pars tuberalis*, que envuelve el tallo infundibular, y la *pars intermedia* que está ausente o vestigial en humanos (2) (**Figura 2**). Por otro lado, la neurohipófisis o lóbulo posterior de la hipófisis es una extensión del hipotálamo, llamada en su parte inferior *pars nervosa*. La sección de tejido conector entre la eminencia media hasta la *pars nervosa*, es el tallo infundibular. Esta estructura, sumada a la *pars tuberalis*, constituye el tallo hipofisario. La hipófisis de un humano adulto pesa alrededor de 0.6 gramos, mide aproximadamente 13 mm en su dimensión transversal y 6-9 mm en su lado anteroposterior.

La neurohipófisis tiene su origen embriológico como una evaginación del hipotálamo ventral y el tercer ventrículo. Está estructurada por los axones y terminales nerviosas de los cuerpos neuronales que residen en los núcleos paraventriculares y supraópticos del hipotálamo, más los tejidos conectivos. Este tracto que contiene 10000 fibras nerviosas, de variado espesor, que va desde 1µm a 50 µm (9).

En el feto humano, el primer vestigio de hipófisis anterior reconocible se puede apreciar a las 4 o 5 semanas de gestación, la diferenciación es bastante acelerada por lo que cerca de las 20 semanas se puede distinguir una unidad hipotalámica-hipofisaria. La adenohipófisis se origina de la bolsa de Rathke, una evaginación de origen ectodérmico de la orofaringe, que migra para fusionarse con la neurohipófisis. La porción de la bolsa de Rathke que entra en contacto con la neurohipófisis, da lugar a lo que se denomina lóbulo intermedio, que en humanos termina en una fusión con aquellas del lóbulo anterior dando lugar a la capacidad de secretar propiomelanocortina (POMC) y hormona adrenocorticotrópica (ACTH). El resto del de la bolsa de Rathke, puede dar lugar a pequeños quistes coloideos (*small colloid cyst*) (10).

La hipófisis está limitada por la dura madre en su parte superior, y descansa sobre la fosa hipofisaria o silla turca. Por debajo de la silla turca, se encuentra el seno esfenoides, quedando separado el uno del otro por el hueso esfenoides. La silla protege la parte baja, anterior y posterior de la hipófisis. El borde posterior de la silla turca está marcado por el dorso de la silla turca y las apófisis clinoides posteriores en dos lados. Por la parte superior, la hipófisis está protegida del fluido cerebro espinal por el diafragma selar, que es una extensión de la dura mater. Este tejido tiene un pequeño orificio, por el cual atraviesa el tallo hipofisario. Los márgenes laterales están limitados por senos cavernosos, enormes redes de vasos muy pequeños y finos rodeados por el hueso esfenoides y la dura madre lateral a la silla turca (2).



**Figura 2:**  
Estructura de la hipófisis.  
Tomado de:  
Berne and Levy,  
6th Edition 2008.  
Physiology. (1)

## La Neurohipófisis

La neurohipófisis tiene la capacidad principal de secretar dos neurohormonas primordiales para la homeostasis general y estas son: la hormona antidiurética ADH (*antidiuretic hormone*), o arginina vasopresina, y la oxitocina (OT). Estas secreciones se efectúan desde los cuerpos celulares de neuronas magnocelulares que se proyectan desde el núcleo supraóptico (NSO) y del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo hasta conformar la *pars nervosa* con sus axones. Estas prolongaciones están fundidas con un tejido soporte que son las Pituicitos, células de la glía que acompañan toda la prolongación axonal. La neurohipófisis está altamente vascularizada lo que

permite la liberación de neurohormonas; tienen disponible de forma adyacente un tejido muy rico en pequeños capilares fenestrados, que facilitan su difusión hacia el sistema circulatorio (11) **(Figura 3)**.

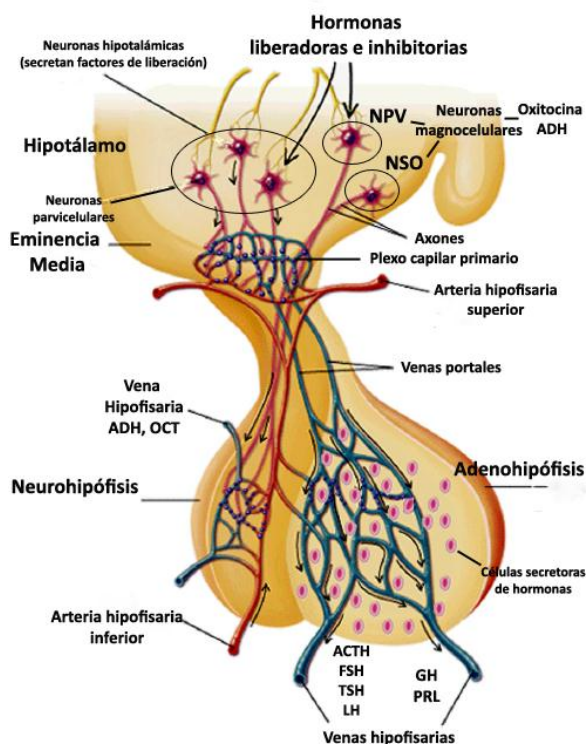
### La Adenohipófisis

---

La adenohipófisis embriológicamente se genera como una evaginación de la orofaringe. Tiene células agrupadas en cuerdas y folículos. Una disposición que obedece típicamente a las glándulas endócrinas. Para comprender correctamente la fisiología de la adenohipófisis es importante enmarcarla en el concepto de ejes endócrinos. Cada eje endócrino está compuesto de tres niveles celulares: **(1)** neuronas hipotalámicas, **(2)** células de la hipófisis anterior, y **(3)** glándulas endócrinas periféricas (9).

Las neuronas hipotalámicas producen hormonas liberadoras que específicamente actúan desencadenando la secreción por parte de la hipófisis de hormonas tróficas específicas. Estas últimas actúan periféricamente en glándulas endócrinas blanco, provocando la síntesis y liberación de hormonas periféricas. La hormona periférica secretada regula aspectos trascendentes en la fisiología del organismo, y generalmente establece un *feedback* o retroalimentación en la hipófisis para inhibir la producción y secreción de hormonas tróficas, pero también en el hipotálamo, de hormonas liberadoras o inhibitorias (12).

El control de la adenohipófisis es neurohormonal, y es ejercido por el hipotálamo, a través de grupos neuronales cuyos cuerpos celulares residen en diferentes partes del mismo. No son las mismas neuronas magnocelulares del NSO y del NPV que se proyectan con sus axones sobre la *pars nervosa*, sino que se las conoce más bien como hipofisiotróficas; es decir, estimuladoras de la hipófisis. Son neuronas Parvicelulares de cuerpo pequeño, que proyectan sus axones sobre la eminencia media, y es allí donde descargan las hormonas liberadoras. Éstas entran al sistema de capilares fenestrados primarios, para luego a través de las venas portales, entrar en el segundo plexo de capilares localizado en la hipófisis anterior. Allí cada hormona liberadora estimula su receptor específico en un subtipo celular determinado (9) **(Figura 3)**.



**Figura 3:** Relación endócrina y neuroendócrina del eje hipotalámico-hipofisario. Se ve la gran vascularización que tiene la glándula pituitaria. Las estructuras neuronales van desde los núcleos hipotalámicos hacia la hipófisis tienen un papel destacado en la secreción. Modificado de: Slomo Melmed The pituitary, Third Edition 2011; Elsevier. (9)

Las células de la adenohipófisis, se clasifican en seis tipos diferentes de acuerdo al tipo de hormona que sintetizan. Además, cada tipo celular, constituye un nivel intermedio de un eje endócrino. Las hormonas proteicas secretadas por esta parte de la glándula conocidas como hormonas tróficas son adrenocorticotropina (ACTH), folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), hormona de crecimiento (GH), tirotrófina (TSH) y prolactina (PRL). Cuando entran en el torrente sanguíneo, se dirigen hacia receptores específicos que encuentran en glándulas periféricas blanco. La unión con los receptores desencadenará posteriormente respuestas tendientes a compensar algún desequilibrio fisiológico (13).

Los somatotropos productores de GH suman aproximadamente el 20% de la masa celular hipofisaria, están situados generalmente en las alas laterales del lóbulo anterior de la hipófisis. Los lactotropos están situados principalmente en la parte posterior medial y posterolateral, y son productores de Prolactina. Representan una fracción entre el 40 % de la hipófisis anterior. Pueden estar diseminados por toda la glándula, pero es una disposición menos frecuente. Los corticotropos producen propiomelanocortina (POMC), que es el precursor de las hormonas ACTH, melanocortina (MSH), hormona lipotrófica (LPH) y  $\beta$ -endorfinas. Los corticotropos representan aproximadamente el 3% de la población celular, están localizados principalmente en el área central, pero en menor medida también desperdigados en las alas laterales. Son predominantes en el lóbulo intermedio (9).

Los gonadotropos producen la hormona LH y FSH, representando el 5-10% de la hipófisis anterior humana. Están dispersos en la *pars distalis*, y son mayoritarios en la *pars tuberalis*. Por último los

tirotropos son los menos abundantes, comprendiendo el 3% de la población celular, secretan hormona tiroideo estimulante (TSH) y se encuentra fundamentalmente en la parte anteromedial de la adenohipófisis, pero también en la *pars tuberalis* (1).

La *pars intermedia* se encuentra altamente inervada por terminales de neuronas hipotalámicas adrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas, que contactan con células denominadas melanotropos. Éstas últimas secretan mayoritariamente hormona melanocito estimulante ( $\alpha$ -MSH), como también otras melanocortinas ( $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH, CLIP,  $\beta$ -endorfina) (1). La secreción de  $\alpha$ -MSH es inhibida por las fibras dopaminérgicas provenientes del hipotálamo, específicamente del núcleo Arcuato que forman parte del tallo neural. La función principal de este lóbulo se relaciona con la pigmentación. Otro tipo celular presente en la glándula son las células folículo estrelladas, no secretoras de hormonas, pero que sintetizan numerosos factores con funciones autocrinas, y paracrinas, entre ellos el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (14).

## **Funcionamiento endócrino de la Adenohipófisis**

---

A continuación describiré la fisiología de tres hormonas hipofisarias que serán el eje de esta tesis: ACTH, prolactina y GH.

### **Adrenocorticotropina**

---

La ACTH es una hormona polipeptídica de 39 aminoácidos en humanos, con un peso molecular de 4,5 kDa. Como se mencionó en el anterior apartado, es sintetizada como parte de una prohormona de 266 aminoácidos llamada POMC (PM 28,5 KDa), junto a MSH, LPH, y  $\beta$ -endorfinas (**Figura 4**)(1). La ACTH tiene una vida media de 10 minutos, la actividad biológica de la hormona se encuentra en extremo N-terminal, entre los residuos 1 y 24 (9). Los corticotropos, el tipo celular que produce ACTH, son los primeros que alcanzan la diferenciación plena en la hipófisis, y en el caso de los ratones se los puede detectar en el estadio e12.5, en la naciente adenohipófisis (10). Los corticotropos producen POMC, y dentro de los mismos un único gen y una única molécula de *ARNm* codifican la síntesis y el procesamiento de la prohormona en componentes menores con actividad biológica. Únicamente los corticotropos expresan la enzima convertasa, responsable de generar ACTH activa (9).

La ACTH ejerce su acción en las glándulas adrenales. Su función principal es regular el crecimiento y la secreción de la corteza adrenal. Es una de las hormonas más importantes para la fisiología de los mamíferos, estimula la secreción de glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos, todos esteroides de la corteza adrenal (2). Es allí donde se une a su receptor “melanocortina tipo 2” (MC2R) e induce el proceso de esteroidogénesis por mecanismos moleculares dependientes de Adenosín monofosfato cíclico (AMPC). La ACTH tiene como principal blanco dentro de la glándula la síntesis del cortisol (o corticosterona en roedores), además de incrementar la expresión de una gran cantidad de enzimas esteroidogénicas (15) (16).

La adrenocorticotropina es detectable por primera vez en humanos, en la semana 5 de gestación. Se la puede detectar mediante inmunohistoquímica (IHQ) en células del divertículo de Rathke. La evaginación ectodérmica denominada divertículo de Rathke está formada, pero todavía no está embriológicamente constituida la neurohipófisis. Tres semanas después ACTH es medible por Radio Inmuno ensayo (RIA) en células de la pituitaria, pero también en la sangre del feto. El hecho de que los corticotropos sean los primeros en alcanzar la diferenciación definitiva, sumado a que el sistema portal de irrigación hipofisario se consolida entre la semana 8-14 de gestación, indican cuan temprano pueden accionar los factores de liberación hipotalámicos sobre la glándula. Las células productoras de ACTH son detectadas en su ubicación definitiva en la hipófisis anterior a partir del tercer trimestre de gestación, aunque la migración comience mucho antes durante el primero (9). Son grandes, ovaladas y angulares. Luego, en la glándula adulta, los corticotropos mayoritariamente están en la zona central, o media-sagital; en forma de pequeños grupos, o aisladamente. En la zona que queda definida entre la hendidura de Rathke y la neurohipófisis, en la *pars intermedia*, existen células ACTH positivas de origen epitelial, detectables luego de la semana 21 de gestación. Este fenómeno de incursión de la parte posterior se lo conoce como invasión basofílica, en alusión a la forma que se le atribuyó en las primeras caracterizaciones a los corticotropos (9).

(A) POMC gene

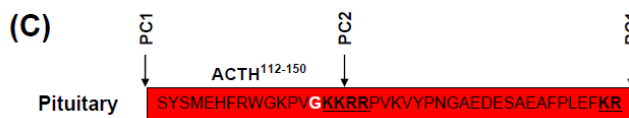
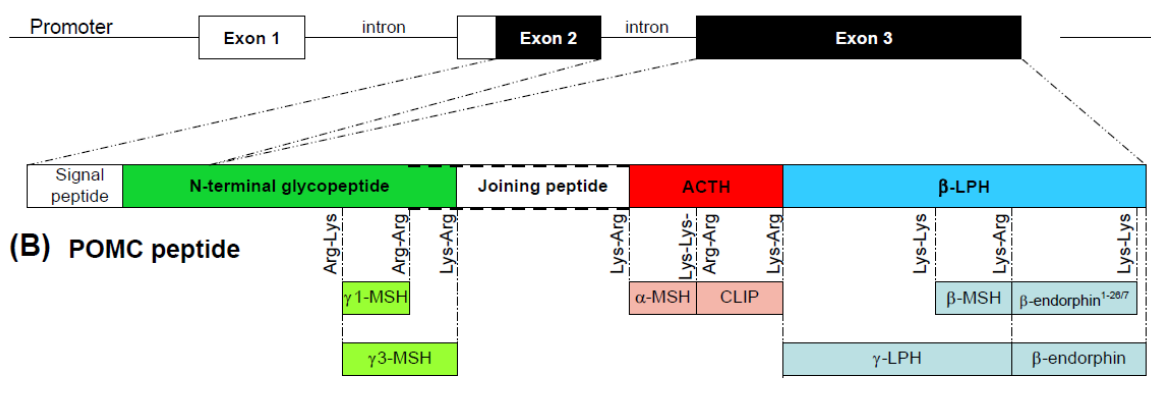


Figura 4: Organización del gen de propiomelanocortina y el péptido ACTH. A) Diagrama esquemático del gen de POMC, que consiste en 3 exones (rectángulos) separados por dos intrones (líneas). Las regiones traducidas se muestran en negro, con las correspondientes regiones peptídicas indicadas con líneas de puntos. B) El precursor POMC de 240 aminoácidos se forma luego del clivaje del péptido señal de 26 aminoácidos. El precursor POMC se lo puede dividir en tres dominios: (1) Glicopéptido N-terminal, péptido unión, (2) Adrenocorticotrofina (ACTH) y (3) β-Lipotrofina (β-LPH). Estas luego son clivadas por las enzimas prohormona convertasas PC1 y PC2 en los sitios arginina-arginina, arginina-lisina o lisina-lisina para producir la expresión tejido específica. C) El péptido correspondiente a ACTH es clivada en la hipófisis dando lugar a la expresión tejido específica. Se muestra la secuencia aminoacídica de ACTH. Modificado de Slomo Melmed The Pituitary, Third Edition 2011; Elsevier. (9).

La síntesis y secreción de la ACTH está afectada por numerosos estímulos, tanto externos como internos, los cuales son traducidos por el hipotálamo. Su regulación es la más compleja de todas las hormonas hipofisarias. Esta mediada por la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (*Corticotrope releasing hormone*, CRH), secretada por las neuronas parvicelulares (1). La ADH, sintetizada también por estas células, media en menor medida la liberación. Se genera primero el péptido *procorticotropin releasing hormone* (pro-CRH), que luego es procesado dando lugar a CRH con sus 41 aminoácidos. CRH provoca una aguda estimulación de los corticotropos, para la fabricación de POMC y posterior liberación de ACTH. Existe una alta homología entre los genes de pro-CRH, pro-ADH (también generada como un precursor), y el mismo POMC, lo que sugiere un punto evolutivo en común, a partir del cual divergieron y se complementaron (11).

CRH estimula la liberación de ACTH de una forma pulsátil durante el día, con picos pronunciados. El primer pico se produce una hora o dos antes del despertar, y posteriormente hay una pulsación rítmica que declina a medida que el día transcurre. Se observan entre 24 y 40 pulsos diarios de ACTH aproximadamente, dependiendo de cada cuantos minutos se tomen muestras sanguíneas. La concentración de la hormona en sangre crece hasta valores de 24 pg/ml en promedio (9). Este patrón diurno es un reflejo del control hipotalámico y concomitantemente se produce un patrón de liberación de cortisol desde la corteza adrenal. El reloj diurno puede descompensarse fácilmente alterando durante algunos días los momentos de actividad-sueño. Adicionalmente numerosos factores estresores pueden modificar el patrón de secreción de ACTH. Estrés físico, emocional, o químico, como por ejemplo sufrimiento, episodios de hipoxia, hipoglucemia aguda, altas o bajas temperaturas, o una cirugía, han demostrado desequilibrar el ritmo diurno. El aumento de ACTH por estrés esta mediado por CRH, pero también por la hormona vasopresina. Influyen en el patrón de secreción, el estadio en el desarrollo, yendo desde el feto hasta la pubertad. El embarazo y el parto también contribuyen a modificar la liberación de ACTH. El sistema inmune incluso interactúa con el eje hipotalámico-adrenal, dando cuenta de su complejidad regulatoria (16).

Existe un *feedback* negativo, que ejerce el cortisol en la secreción de ACTH. Se ejerce en dos niveles endócrinos distintos. Existe un mecanismo de *feedback* "largo" en el cual los glucocorticoides secretados por la corteza adrenal, impactan en el hipotálamo y en la hipófisis. Por otro lado, existe un mecanismo de *feedback* "corto" en el cual ACTH ejerce un efecto inhibitorio en el hipotálamo sobre la liberación de CRH. Se estipula que la ACTH podría tener un efecto inhibitorio a incluso a nivel de la eminencia media, frenando la síntesis de CRH (16).

Por otra parte, la inhibición por glucocorticoides se puede dividir en rápida y retrasada. La primera ocurre en el lapso de segundos o minutos e implica la inhibición de la liberación de ACTH y CRH ya estimulada; particularmente ejerce su acción cuando la tasa de incremento de los glucocorticoides es positiva. En cambio la retrasada, es a su vez de dos tipos: la intermedia que influye sobre la liberación de ACTH y CRH, pero no su síntesis, y se ejerce luego de cortos períodos a exposición de

glucocorticoides, o por lo menos no continuos. Se desarrolla luego de 45 minutos a posteriori de un estímulo con glucocorticoides. En segundo término, existe la respuesta lenta, que cobra relevancia luego de altas exposiciones y prolongadas en el tiempo. Se desencadena luego de 24 horas de la presencia del estímulo, tiene una persistencia alta de hasta incluso días, y el impacto es fundamentalmente sobre la síntesis de ACTH, directamente frenando la producción de POMC, con lo cual hay una merma en los niveles intracelulares de la hormona (9).

El eje hipotalámico-hipofisario-adrenal interacciona íntimamente con células del sistema inmune. Algunas células inmunes producen moléculas que tienen influencia en los ejes neuroendócrinos, por ejemplo los leucocitos mononucleares periféricos producen ACTH, asimismo existen linfocitos que liberan  $\beta$ -endorfinas. Los monocitos y los linfocitos T, durante reacciones inflamatorias pueden producir CRH. En humanos, únicamente los linfocitos B tiene la capacidad de responder a CRH y ADH, para liberar  $\beta$ -endorfinas. Los que median este efecto son los monocitos, a través de la interleuquina-1; se establece un *loop* regulatorio, las células del sistema inmune estimulan la secreción de ACTH y glucocorticoides que tienen un papel activo contra una infección, a su vez, estas hormonas inhiben la posterior síntesis de citoquinas (9).

### **Prolactina**

---

La prolactina es una hormona polipeptídica de 197 aminoácidos en rata y ratón, y 199 en humanos, con un peso molecular de 23 kilodaltons (kDa). Presenta múltiples y diversas funciones biológicas, siendo una de las hormonas más versátiles. Es sintetizada y secretada principalmente por las células lactotropas, las cuales se encuentran presentes en la hipófisis anterior. En humanos esta hormona es también producida por otros tejidos, por ejemplo: tejido adiposo, diferentes regiones del cerebro, miometrio, placenta, decidua, entre otros; donde es regulada de manera específica y actúa como una citoquina (17; 18). Sin embargo, generalmente los niveles producidos por tejidos no hipofisarios no modifican las concentraciones séricas de la hormona (18).

En el desarrollo, se detecta presencia de prolactina en la hipófisis fetal en el día 16 en el embrión de ratón, día 17 en la rata y semanas 12 a 15 del desarrollo embrionario humano. En el humano, el contenido hipofisario de prolactina en el feto aumenta a partir de la mitad de la gestación hasta el fin de la misma, sin existir una diferencia aparente entre sexos. Consecuentemente, los niveles séricos fetales también aumentan progresivamente hasta alcanzar un pico antes del nacimiento. Luego de la pubertad, las concentraciones séricas de esta hormona resultan el doble en mujeres respecto a los hombres de la misma edad. En el embarazo, la prolactina circulante aumenta progresivamente hasta alcanzar niveles 7-10 veces mayores que los presentes en mujeres no embarazadas. Este aumento es fundamental para el correcto desarrollo mamario necesario para la posterior lactancia (18; 19).

Existen evidencias que indican que los lactotropos derivan de una célula precursora que expresa GH. No obstante, otros estudios indican que tienen un precursor anterior, sobre todo en ratones. El estrógeno determina la proliferación de lactotropos, por lo que es clave la expresión de su



receptor para su división y aumento en número. Además, es muy importante en la activación del gen de prolactina.

La síntesis y secreción de la prolactina adenohipofisaria está estimulada por eventos tanto externos como internos, los cuales son integrados por el hipotálamo. Las concentraciones plasmáticas de esta hormona en humanos son mayores durante las horas de sueño y menores durante el día, presentando mayor amplitud en las mujeres respecto de los hombres. Esto sugiere que la prolactina responde, entre otras cosas, al ritmo circadiano. Por otra parte, la succión durante el amamantamiento es el estímulo externo de mayor importancia, mientras que el estrés y los niveles de esteroides gonadales también aumentan la liberación de esta hormona (9). La prolactina es secretada de forma pulsátil, con alrededor de 4 a 14 picos en el día en adultos normales. En adultos jóvenes se han medido entre 13 y 14 picos por día, con un promedio de 3-4 ng/ml. Desórdenes en la regulación de la expresión de prolactina pueden conducir a casos de hiperprolactinemia, generalmente como consecuencia de un tumor. Cantidades anormales de prolactina en suero producen oligomenorrea y amenorrea en mujeres. En el caso de los hombres se manifiesta como un decrecimiento en la libido o impotencia. Son cuadros en los que generalmente está asociada la infertilidad con disfunción gonadal.

Los lactotrofos, presentan una alta actividad espontánea intrínseca de síntesis y secreción de prolactina, y siendo su regulación hipotalámica predominantemente inhibitoria, ejercida principalmente por la dopamina (18). Este neurotransmisor catecolaminérgico llega a la hipófisis a través del sistema porta-hipofisario y se une a receptores dopaminérgicos tipo D2 (RD2s) localizados en el lactotrofo, produciendo la inhibición de la síntesis y secreción de la prolactina como así también de la proliferación de los lactotrofos (20; 21). Los RD2s son receptores de siete pasos transmembrana que se encuentran acoplados a proteína Gi suprimiendo la acumulación de 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPC) mediante la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), y a proteína G<sub>0</sub> regulando los niveles de calcio intracelular. Corresponden a los receptores específicos de dopamina predominantes en la hipófisis, abundantes tanto en lactotrofos como en melanotrofos (22; 23). En respuesta a la dopamina, lo primero que ocurre en el lactotrofo es una inactivación de los canales de voltaje dependientes de calcio y por lo tanto una inhibición de la liberación de gránulos con prolactina. Luego se inhibe la enzima AC que produce la inactivación de PKA y una consecuente supresión de la expresión de genes, incluyendo PIT1 (factor necesario para la expresión tanto del gen de prolactina como de GH). Aunque la cantidad de dopamina que llega a la hipófisis es suficiente para inhibir tónicamente al lactotrofo, se postulan otros factores inhibitorios cuyos papeles fisiológicos no están aún bien determinados, como endotelinas, somatostatina, acetilcolina, GABA, entre otros.

También la prolactina es capaz de regular su propia liberación al ejercer una retroalimentación positiva sobre el sistema dopaminérgico del hipotálamo. El incremento de prolactina produce un aumento en la actividad de las neuronas dopaminérgicas TIDA (haz dopaminérgico tuberoinfundibular), por lo que disminuye su liberación por parte de los lactotrofos (18). Existen

también péptidos estimuladores de la secreción de prolactina, siendo algunos de ellos TRH, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y los estrógenos.

Durante muchos años la prolactina ha sido considerada una hormona encargada de ejercer efectos biológicos limitados a la iniciación y mantenimiento de la reproducción y la lactancia. Sin embargo, los datos recolectados en los últimos años permitieron demostrar una gran variedad de funciones de esta hormona, junto con la amplia distribución de su receptor (PRLR) en diferentes tejidos y tipos celulares. Hoy en día, la prolactina es reconocida como una hormona altamente versátil que actúa regulando no solo la reproducción sino también la osmorregulación, metabolismo energético, funciones cerebrales, respuestas inmunológicas, crecimiento y angiogénesis (12; 24-26).

### **Hormona de crecimiento**

---

La hormona de crecimiento (GH), es una hormona polipeptídica que presenta homología de secuencia y estructural entre especies y con otras hormonas relacionadas como la prolactina y el lactógeno placentario (PL). Tiene un peso molecular de aproximadamente 22 KDa y está compuesta por una única cadena polipeptídica de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro, que generan un lazo mayor y un lazo menor (27). La mayor parte de la GH circula como monómero no glicosilado, aunque se conocen otras variantes como la desaminada (5%), acetilada (1-2%), fosforilada, glicosilada, dimerizada y oligodimerizada, las cuales tienen un mayor peso molecular, son generadas por procesamiento postraduccional, y su función, en general, se desconoce (28). Durante el desarrollo embrionario, el comienzo de la génesis de la pituitaria como glándula, está definida por la expresión de la subunidad  $\alpha$  de GH. Específicamente, antes de la formación de la bolsa de Rathke, en la placoda hipofisaria en el ectodermo de la faringe.

GH es sintetizada, almacenada y secretada por las células somatotropas de la hipófisis anterior, siendo esta hormona la proteína más abundante de la glándula. En total toda la glándula tiene entre 5 y 15 mg de GH (29).

En humanos, la GH es detectable en el suero fetal a partir del final del primer trimestre y aumenta rápidamente hasta alcanzar un pico en la 20<sup>a</sup> semana de gestación. Durante la niñez, los niveles son similares a los de la adultez. El mayor porcentaje de secreción se observa en la adolescencia y va decreciendo con la edad. En los roedores también hay una disminución en los niveles de GH relacionados con la edad. El aumento de GH en plasma se observa inmediatamente después del nacimiento, siendo máximo en las primeras dos semanas de vida (30). Los valores se mantienen altos hasta los dos meses y luego declinan con la edad hasta valores basales muy bajos.

Si bien la influencia del RD2 sobre la prolactina está cabalmente demostrada poco se sabe sobre el control que ejerce este receptor sobre GH. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que en edades tempranas el RD2 es crítico para la estimulación de este eje, y su ausencia en ratones *Drd2*<sup>-/-</sup> causa retardo de crecimiento (30).

El eje hipotalámico-hipofisario-somático en mamíferos recibe una multiplicidad de señales a lo largo del desarrollo madurativo de cada individuo lo que aporta un enorme valor adaptativo en relación a su éxito reproductivo posterior. Dos neuropéptidos hipotalámicos controlan la síntesis y liberación de GH en los somatotropos del lóbulo anterior de la hipófisis: GHRH (Hormona liberadora de hormona de crecimiento, “*Growth hormone releasing hormone*”) y STT (Somatostatina). Los desbalances en los niveles de GHRH, GH, sus receptores, o mecanismos de traducción de señales, producen alteraciones en fenotipos relacionados al crecimiento somático (31-33) mientras que la falta de STT altera el programa secundario de dimorfismo sexual (34; 35). GHRH estimula la proliferación de los somatotropos en la hipófisis así como la síntesis y liberación de GH. Por su parte, STT inhibe tanto la liberación de GHRH como de GH. Una tercera vía de regulación de la síntesis de GH se ha propuesto más recientemente e involucra a ghrelina, una hormona sintetizada por el tracto gastrointestinal, que también está presente en pequeñas cantidades en el hipotálamo e hipófisis e induce la liberación de GH de manera potente (36). Este péptido presenta además un rol fundamental en el control del apetito (37).

La GH plasmática tiene muchos blancos de acción, controlando el crecimiento corporal a través de su acción sobre células del hígado, músculo esquelético, tejido óseo y adipocitos. La acción de GH sobre los hepatocitos induce la producción y liberación del factor de crecimiento insulina tipo 1 (IGF-I) al torrente sanguíneo. IGF-I tiene receptores específicos en varios tejidos del organismo donde participa estimulando el crecimiento somático (38) y la maduración sexual (39). GH también es regulada negativamente mediante circuitos de *feedback*. IGF-1 participa de uno de ellos, inhibiendo la producción de GH en la hipófisis y en el hipotálamo. Además, GH inhibe la liberación de GHRH en el hipotálamo, sumado a que estimula la secreción de STT.

La liberación de GH sigue un patrón pulsátil. El mayor pulso de GH se produce justo en el comienzo del sueño. Buena parte de la secreción total de esta hormona ocurre durante el sueño, entre un 60 y un 70%. El ejercicio es un potente estimulador de la liberación de GH, que por otra parte, es catalogada como una hormona fuertemente asociada al estrés. El estrés físico, como el de índole neurológico son fuertes estimuladores de la secreción de GH (40).

Existe un dimorfismo sexual muy marcado en los niveles y forma de secreción de GH. En el caso de ratones, mientras que en hembras los niveles plasmáticos de GH son más constantes, de períodos más largos y menor amplitud, en machos la liberación hipofisaria de GH presenta períodos más cortos y de amplitud mucho mayor, por lo que los niveles plasmáticos son más variables a lo largo del día. Estos patrones diferenciales de aumento y descenso en la liberación de GH cumplen un papel clave en la determinación del desarrollo corporal normal en machos y hembras (35).

### **Adenomas hipofisarios**

---

Los tumores hipofisarios son adenomas monoclonales localizados en la silla turca que representan aproximadamente entre un 10 y 15% de todas las neoplasias intracraneales (41). Se los puede encontrar más tempranamente en mujeres (20-45 años) que en hombres (35-60 años); en niños es muy poco frecuente la aparición de este tipo de tumores. La mayoría de los tumores hipofisarios

crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos ya que no son metastásicos y permanecen dentro de la silla turca. Se definen como verdaderos carcinomas sólo en presencia de metástasis cráneo espinal y/o sistémica, y éstas son raras con una incidencia menor al 0,5% de los tumores hipofisarios (42).

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

Los pacientes con macroadenomas recurren a la consulta médica debido a efectos de compresión, como dolores de cabeza y/o falla visual progresiva mientras que los casos de microadenomas son identificados generalmente por la manifestación de síndromes clínicos endócrinos o en forma incidental durante diagnósticos por imagen. Sumado a esto, en un 25% de las autopsias se descubren pequeños adenomas subclínicos.

Los tumores hipofisarios se clasifican además según la hormona que producen y se describen como funcionantes si sobreproducen alguna hormona de la hipófisis anterior, o no funcionantes, si no existe síndrome clínico (endócrino) aparente. Los adenomas funcionantes más frecuentes resultan los de prolactina (denominados prolactinomas) contabilizando alrededor del 50%, los secretores de GH (los cuales provocan acromegalia o gigantismo), representan el 15-20% de los casos, y los secretores de ACTH, conforman del 10% de las neoplasias hipofisarias. La hipersecreción de TSH, de gonadotrofinas o subunidades alfa es altamente inusual (43). Los no funcionantes, constituyen el 25-30% de todos los adenomas hipofisarios y algunos de ellos (70 u 80%), pueden ser en realidad tumores secretores de gonadotrofinas o de subunidades alfa, pero de muy baja actividad (44).

### **Tumores de Corticotropos (Corticotropinomas)**

---

Este tipo de tumores fue inicialmente descrito por Harvey Cushing en 1932. Años después la alta secreción de ACTH fue considerada como una de las principales características de los tumores que causan hiperplasia bilateral de las glándulas adrenales. La hipersecreción de ACTH por parte de la hipófisis (Enfermedad de Cushing) es hoy en día reconocida como causa del hipercortisolismo dependiente de ACTH. Pero no es la única fuente.

La caracterización más precisa indica que el síndrome de Cushing se refiere al estado de hipercortisolismo independientemente de su etiología. La enfermedad de Cushing es el estado de hipercortisolismo causado por el exceso de secreción de ACTH hipofisaria. Los tumores de corticotropos representan aproximadamente el 5-15% de los adenomas hipofisarios y se observan principalmente en mujeres.

Aproximadamente un 90% de los tumores secretores de ACTH son microadenomas. La exposición crónica al cortisol endógeno resulta en obesidad, diabetes mellitus, hipertensión, osteoporosis y cambios en estados de ánimo como depresión, manías, ansiedad, y disfunciones cognitivas.

### **Prolactinomas**

---

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más frecuentes dentro de los adenomas secretantes (45), y tienen un origen monoclonal (46). La hipersecreción de Prolactina es la anormalidad endócrina más común en los desórdenes Hipotalámico-hipofisarios, la Prolactina es la hormona más comúnmente secretada en exceso en los tumores hipofisarios. Un 35% de los tumores hipofisarios en mujeres producen Prolactina y un 6% producen Prolactina junto a otra hormona hipofisaria. Las características clínicas de la hipersecreción tumoral de Prolactina son galactorrea, oligomenorrea o amenorrea. La dopamina inhibe la síntesis, secreción de prolactina y la proliferación de lactotrofos hipofisarios actuando a través del RD2, y por lo tanto la regulación negativa de este receptor es una de las causas de la aparición de prolactinomas. La amenorrea, oligomenorrea y anovulación o infertilidad está presente en aproximadamente el 90% de las mujeres con prolactinomas (47; 48). La disfunción gonadal es el resultado de la interferencia en el correcto funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisaria-gonadal por el exceso de Prolactina, y exceptuando pacientes con adenomas muy grandes e invasivos, no se trata de una destrucción de la masa de células gonadotropas.

En el caso de los hombres la manifestación de la hiperprolactinemia es el hipogonadismo. Los síntomas iniciales son una disminución de la libido, que inicialmente puede ser desestimada tanto por el paciente como por el médico como un factor psicológico, así como episodios muy frecuentes de impotencia. También se observa una marcada disminución en el conteo de espermatozoides. Como corolario, la diagnosis en hombres queda frecuentemente postergada y una marcada hiperprolactinemia finalmente es observada (49-51). En resumen, las manifestaciones clínicas dependientes de la hiperprolactinemia favorecen la detección temprana en mujeres jóvenes en período fértil (52).

Se diferencian del resto de los tumores hipofisarios, pues en su mayoría son tratados exitosamente con agonistas dopaminérgicos logrando, en general, una rápida reducción del tamaño tumoral con liberación de los síntomas de compresión. Sin embargo un 15% de los casos los prolactinomas pueden ser resistentes a drogas dopaminérgicas y es necesario recurrir a la cirugía para su extirpación (42). La hiperprolactinemia producida por los prolactinomas afecta la reproducción, por lo que el abordaje terapéutico de este tumor tiene como objetivo revertir dichas manifestaciones, como así también las de tipo neurológico y/u oftalmológico provocadas por la expansión tumoral. En particular la invasión hacia los senos cavernosos y la dura madre, como se encuentra en >30% de los pacientes (44; 53), es un determinante crítico de la remisión por cirugía. En general, los mecanismos de patogénesis de tumores hipofisarios no están aun descriptos en su totalidad (21; 42; 53). En pacientes con prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas sigue abierta la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas.

## **Diagnóstico**

---

El diagnóstico en laboratorio se efectúa en base a los niveles hormonales medidos en sangre. Los microprolactinomas suelen presentar niveles de entre 50 y 200 ng/ml. Está reportado que los niveles séricos de Prolactina correlacionan con el tamaño tumoral. En los casos de prolactinomas invasivos, la Prolactina preoperatoria es muy alta (54). Los macroprolactinomas presentan niveles en sangre de 200 ng/ml o mayores, con expansión extraselar.

Los test de supresión o estimulación no distinguen entre la Prolactina secretada por un adenoma de otras causas de hiperprolactinemia, por lo cual, el diagnóstico debe basarse en los niveles basales de Prolactina y estudios neuroradiológicos. Los casos más difíciles de diagnóstico son los pacientes con niveles moderados de Prolactina (por debajo de 100 ng/ml), porque puede deberse tanto a la presencia de un microprolactinoma. En este último caso, se aconseja la Resonancia Magnética Nuclear (RMN o RMI). Exámenes que muestren solo alteraciones menores suelen ser muy frecuentes entre la población sana, por ende la cautela debe estar acompañando el diagnóstico.

Hasta hace unos años atrás, se aconsejaba para el diagnóstico la combinación de RMN con radiografía (Rx) de silla turca. El RMN permite delinear los contornos de un macroadenoma, su expansión paraselar, diferenciar el contenido quístico o hemorrágico del tumor, y permite una buena visualización con el quiasma óptico. Por otra parte, la Rx permite visualizar las erosiones selares y estructuras óseas. La tomografía axial computada (TAC) se reserva para pacientes obesos, claustrofóbicos, o portadores de marcapasos cardíacos (29).

## **Tratamiento**

---

La dopamina es el neurotransmisor con efectos inhibitorios más potentes en contra de la síntesis y secreción de prolactina. También inhibe la proliferación de los lactotopos (55). Los RD2 son los principales receptores dopaminérgicos de la hipófisis, y a través de estos ejerce la dopamina su efecto inhibitorio sobre los lactotopos. Los prolactinomas son particulares en el sentido de que conservan la capacidad de respuesta a la dopamina, de modo que los agonistas dopaminérgicos provocan una rápida reducción del tamaño de los tumores, con remisión de los síntomas de compresión (15).

Los agonistas dopaminérgicos se han convertido en la droga estándar y representan el tratamiento de primera línea para todos los prolactinomas, incluso para macroprolactinomas que presentan efectos de masa.

La bromocriptina actúa como agonista del RD2 y antagonista del RD1, fue la primera droga utilizada clínicamente en prolactinomas. Provoca una normalización de la Prolactina sérica en 64% de los casos, y una mejoría de la galactorrea en un 100% de los casos. También hay una alta recuperación de los ciclos menstruales (57-100%) (50).

Desde los años 90s se ha reemplazado por la cabergolina, un agonista específico del RD2, de mayor potencia y duración. Comparando ambos agonistas dopaminérgicos, la cabergolina resulta más eficiente en cuanto a la recuperación de los niveles de Prolactina normales y de ciclos ovulatorios, y posee efectos secundarios menos frecuentes y menos severos que la bromocriptina (56). Otros agonistas dopaminérgicos utilizados en la clínica son el pergolide y el quinagolide, este último no derivado de la ergolina. Estas drogas parecen tener la misma eficacia que la bromocriptina, pero aún se tiene poca experiencia en su uso (3).

### **Tratamiento quirúrgico**

---

La cirugía hipofisaria transepto esfenoidal es el procedimiento quirúrgico recomendado para pacientes con prolactinomas, en los que falla o no puede aplicarse la terapia farmacológica. El microscopio quirúrgico permitió la extirpación selectiva de los adenomas hipofisarios, conservando la hipófisis normal, además de que disminuyó notablemente la cantidad e complicaciones. Permite la normalización endócrina con frecuente preservación y marcada mejoría en los ejes hipofisarios luego de la descompresión tumoral, y reduciendo la sintomatología neurológica u oftalmológica. Es de suma importancia en los casos de adenomas resistentes a agonistas dopaminérgicos en los que se da pérdida de la visión. La vía transcraneana es solamente utilizada para tumores de localización extraselar y con expansión fuera de la línea media.

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

---

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

La resistencia puede estar definida en términos de la incapacidad de normalizar los niveles de Prolactina sérica, o de reducirlos a niveles que permitan la ovulación, o bien a la incapacidad de reducir el tamaño tumoral en un porcentaje mayor al 50%. Hasta hace unos años no había un consenso sobre cuál era la dosis máxima de agonista para considerar a los tumores como resistentes (57).

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

Existen evidencias de una reducción en la expresión del RD2, a través de la determinación del número de sitios de unión de dopamina (58), y de una reducción de 4 veces de la expresión del RD2 en prolactinomas resistentes a bromocriptina (59). Otros mecanismos reportados asociados a

las vías de señalización de dopamina incluyen la reducción en la expresión de *ARNm* de la subunidad de la proteína G inhibitoria  $G\alpha i2$  (60); y la reducción en la expresión del receptor del factor de crecimiento neural (NGFR) que afecta indirectamente la señalización del RD2 (61).

**La ausencia de terapias alternativas para estos tumores resistentes hace necesario indagar más profundamente en los mecanismos de generación de prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, profundizando en la pérdida de control dopaminérgico, y en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.**

### **Somatotropinomas**

---

Los adenomas hipofisarios secretores de GH son los segundos en frecuencia de los secretantes luego de los prolactinomas. La característica clínica sobresaliente son los síndromes de acromegalia y gigantismo, producto de la hipersecreción de GH y de IGF-1. Se produce un crecimiento exacerbado de muchos tejidos, y el cambio en la velocidad de dicho crecimiento se produce muy lentamente, lo que retrasa el diagnóstico varios años. A pesar de que el crecimiento excesivo del tejido óseo es una de las principales características, el exceso de GH produce un desorden sistémico generalizado con efectos deletéreos, lo que incrementa la tasa de mortalidad. No obstante, esto pocas veces se debe a los efectos de compresión e invasión de espacio o los efectos destructivos de la masa tumoral (62).

Con todas estas aristas, lo más frecuente es que al momento del diagnóstico los tumores son grandes y han producido efectos por compresión como la disminución de la visión.

Alrededor del 30% de los pacientes con adenomas hipofisarios secretores de GH tienen hiperprolactinemia por cosecreción de GH y Prolactina. La hiperprolactinemia puede ser secundaria a la compresión de los vasos portales por efecto de la masa del tumor, que impide la llegada de dopamina a los lactotropos en la adenohipófisis y la consiguiente mayor liberación de Prolactina.

### **Adenomas no funcionantes, adenomas secretores de Gonadotrofinas y Tirotropinomas**

---

Los adenomas no funcionantes llamados erróneamente cromóforos suelen representar el 25-30% de todos los tumores hipofisarios. Sin embargo con el avance de las técnicas de detección hormonal de la hipófisis anterior, se especificó que en realidad el tipo no funcionante solo representa el 10% de todos los adenomas. El restante 70% se trata en realidad de adenomas que secretan hormonas deficientes o en muy baja cantidad (en particular gonadotrofinas).

Los no funcionantes, luego de los prolactinomas, son el tipo más común de macroadenomas. Son usualmente grandes al momento del diagnóstico, y los síntomas clínicos usuales son fuertes dolores de cabeza y problemas visuales y neurológicos. Los pacientes suelen presentarse con síntomas de hipopituitarismo, compresión del tallo hipofisario y como consecuencia hiperprolactinemia leve debido al impedimento de la llegada de dopamina a los lactotropos. Los



síntomas clínicos están presentes durante mucho tiempo, antes del diagnóstico. Uno de ellos es la carencia de gonadotrofinas. El hipotiroidismo e hipoadrenalismo son comunes, pero se presentan de forma casi imperceptible para el paciente y pueden ser minusvalorados. Los adenomas estrictamente no funcionantes se los llama adenomas de células nulas.

Muchos de estos adenomas inicialmente clasificados como no funcionantes expresan la subunidad alfa de las gonadotrofinas, pero no muestran otro síntoma clínico (63). También están los adenomas que secretan LH y FSH activas, cuyo síntoma más evidente son los desórdenes menstruales en las mujeres.

Por último, los Tirotropinomas, constituyen los adenomas más raros e infrecuentes con una incidencia de 0,5-2%. Su manifestación clínica es el hipertiroidismo como consecuencia de la alta TSH sérica (42). Su incidencia es mucho mayor en mujeres que en hombres. La terapia inicial más común es la microcirugía transfenoidal, pero frecuentemente por los grandes tamaños luego se requieren cirugías adicionales. Se utilizan como tratamiento farmacológico análogos de STT.

### **Células madre tumorales (*Cancer Stem Cells: CSC*) y Transición epitelio mesenquimal (*Epithelial Mesenchymal transition: EMT*)**

---

El concepto de que una subpoblación de tipo de Células Madre Tumorales "*Cancer Stem Cells*" (CSC) es responsable de la iniciación del tumor y el mantenimiento se propuso hace más de 50 años (64; 65). En 1994, John Dick completó su obra fundamental para demostrar la existencia de tales células en neoplasias hematológicas. Su laboratorio identificó una población de células raras en la *leucemia mieloide aguda humana* (LAH) que tiene la capacidad de iniciar LAH después del trasplante en ratones NOD/SCID (66). Casi una década más tarde, las CSC fueron identificadas en el cáncer de mama humano con capacidad de auto-renovación y la reiniciación del tumor primario en ratones NOD/SCID receptores (67). Desde entonces, las CSC se han documentado en otros tumores sólidos, incluyendo el cerebro, próstata, colon, de páncreas y cáncer de pulmón (68) (69-72). Muchos trabajos sugieren que las CSC son relativamente quiescentes y resistentes a la quimioterapia y la radiación (73-75). De hecho, la exposición de las líneas celulares a varios agentes citotóxicos ejerce una presión selectiva para sobrevivir a las células con características de CSC (76).

Son numerosos los estudios que han identificado subpoblaciones de CSC dentro de los tumores que impulsan el crecimiento del tumor y la recurrencia (66-68). Las CSC son resistentes a muchos tratamientos actuales contra el cáncer, incluyendo la quimioterapia y la radioterapia (73; 75; 77; 78). Muchas terapias contra el cáncer, matan a la mayor parte de las células tumorales, pero terminan siendo poco eficaces porque no eliminan las células madre cancerosas, que sobreviven para regenerar nuevos tumores.

Las CSC tienen ciertas características típicas *in vitro* que las definen: **(1)** en base a determinados perfiles de expresión de marcadores de superficie celular se pueden aislar subpoblaciones enriquecidas en CSC (67; 69; 79); por ejemplo, células madre cancerosas de mama están en alta

proporción en la subfracción de células CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> (67). **(2)** Las poblaciones celulares enriquecidas en CSC forman colonias esféricas en cultivos en suspensión, denominada mamoesferas tumorales en el caso de cáncer de mama (79) o tumoresferas en otros tipos de cáncer. Como se dijo anteriormente existen numerosos reportes donde se demuestra que las CSC presentan una mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos (77; 78; 78) y la radiación ionizante (78).

El fenómeno de transición epitelio mesenquimal “*epithelial-mesenchymal transition*” (EMT) participa en numerosos procesos, sobre todo en la embriogénesis y el desarrollo del plan corporal, y en la diferenciación formación de muchos tejidos y órganos. Este proceso se da a través de la transición o conversión de varios pasos de células epiteliales a células mesenquimales. También se da el camino inverso en el cual la conversión es de mesenquimal a epitelial “*mesenchymal to epithelial transition*” (MET) (80). Ambos procesos no son irreversibles, son complementarios en la formación y diferenciación de células especializadas tomando parte en la arquitectura tridimensional de los distintos órganos. Se intercambian varias series de EMT y MET sucesivas hasta que un tejido u órgano está totalmente formado. El proceso de gastrulación durante la implantación de los mamíferos es un buen ejemplo de EMT, así como también la formación de la cresta neural. EMT contribuye a la reparación de los tejidos, pero también puede provocar fibrosis en órganos determinados y dar lugar a mecanismos carcinogénicos a través de variados mecanismos. EMT confiere a las células características migratorias con capacidad invasiva, previene la apoptosis y la senescencia, y contribuye a la inmunosupresión (80-83).

Numerosos estudios de células madre y EMT señalan la posible existencia de plasticidad entre las células madre y sus derivados más diferenciados. Dicha plasticidad tendría importantes implicaciones para el modelo CSC y nuevas herramientas terapéuticas están siendo encaradas en base a este enfoque. En algunos modelos de cáncer se ha observado que células con marcadores de superficie típicos de CSC, también incluyen proteínas mesenquimales, como vimentina o fibronectina, además de una alta expresión de factores de transcripción típicos de EMT (83; 84).

Varias vías de señalización tales como NOTCH (objeto de estudio de esta Tesis Doctoral) y HEDGEHOG parecen desempeñar un papel esencial en el mantenimiento de CSC (85; 86). El sistema NOTCH (definido como todo el conjunto de receptores, ligandos, efectores río arriba de la vía e incluso efectores río abajo) evolutivamente afecta el desarrollo en organismos que van desde erizos de mar para los seres humanos (87) y desempeña un papel crucial en el control de células madre y la determinación del destino celular (88). En los mamíferos, cuatro receptores NOTCH distintos interactúan con diversos ligandos que inician una serie de pasos proteolíticos que conducen a la liberación del dominio intracelular NOTCH (NICD) (87). Se indagará en detalle estos mecanismos en los posteriores apartados.

### **CSC en tumorigénesis hipofisaria**

---

El principal lóbulo endocrino de la hipófisis, la hipófisis anterior, contiene diferentes tipos de células productoras de hormonas. Sin embargo, la composición celular de la glándula se somete a

ajustes dinámicos continuos con el fin de satisfacer las demandas hormonales cambiantes; durante la maduración temprana postnatal, así como más tarde en la vida en condiciones de crecimiento, la pubertad, el estrés y el ciclo menstrual (89). De manera contundente, los lactotrofos por poner un ejemplo, aumentan varias veces en número durante el embarazo y la lactancia para abastecer a los altos niveles de Prolactina necesarios. Los mecanismos subyacentes a esta neogénesis dinámica de células están lejos de entenderse, así como cuáles son los factores determinantes y marcadores moleculares típicos que los gobiernan.

Por ejemplo, el aumento de los corticotrofos después de la adrenalectomía no es, o sólo una parte muy pequeña (<5%), debido a la libre mitosis de las células de ACTH existentes. Más bien se debe a la diferenciación de un conjunto de células hormonalmente nulas preexistentes (90; 90; 91). Durante este aumento de los corticotrofos través de la diferenciación, también hay una ola autolimitada de actividad mitótica en las células hormonalmente nulas, de forma que queda una reserva lista para las próximas demandas de diferenciación. Otro ejemplo es el aumento temprano en número lactotrofos en respuesta a los estrógenos como supuestamente también ocurre durante el embarazo, que aparece sólo en un grado menor debido a una acción mitogénica sobre las células de Prolactina. Una vez más, la respuesta mitótica se produce principalmente en un conjunto de células no hormonales. Teniendo en cuenta todos estos antecedentes es razonable postular que los flujos celulares en la hipófisis, tanto en el ciclo menstrual como en contextos fisiológicos de adaptación dinámica están gobernados por el reclutamiento y la diferenciación de células madre.

La presencia de células madre o “*stem cells*” en la hipófisis ha sido documentada en numerosos trabajos (92-95). Se ha comprobado la existencia de una población de células llamada la Población Lateral “*Side Population*” (SP). Estas células SP, tienen varias características que recuerdan a las células madre/progenitoras y células estadio temprano-embionarias de la hipófisis (95; 96). Una de las principales características para identificarlas es la alta capacidad de expulsión de Hoechst 33342, un marcador de tinción del DNA (esta capacidad es la que les confiere una alta resistencia a las quimioterapias). Estas células “*Hoechst low*” son representadas como una pequeña rama lateral en la clasificación por FACS (“*Fluorescence-activated cell sorting*”), por lo que se las denomina población lateral (*Side Population*). Se han encontrado dentro de la SP poblaciones celulares con la capacidad de autorrenovación y de formar de tumoresferas, características típicas de las CSC. Este subconjunto celular tiene como característica saliente la elevada expresión del Sistema Notch (ligandos, receptores, y moléculas target) como lo demostraron numerosos trabajos previos, algunos en colaboración con nuestro laboratorio (93; 95; 97; 98).

Recientemente, también la señalización de NOTCH se ha implicado en el desarrollo de la hipófisis, basada principalmente en un patrón de expresión definido y preciso de miembros del Sistema Notch en la glándula a nivel embionario. Ejemplos claros de esto son las vías de señalización NOTCH, WNT y SHH, consideradas clásicamente como sistemas reguladores fundamentales de la morfogénesis de tejidos durante el desarrollo embionario (99; 100).

De esta forma vemos que poblaciones celulares con características *stem*, como la SP y la elevada expresión de receptores y ligandos del Sistema Notch están muy relacionadas. A estos elementos debemos sumarle la gran cantidad de antecedentes que relacionan la alteración de la vía de NOTCH con transformaciones neoplásicas, comportamientos tumorales y metastásicos en múltiples tipos de patologías (100; 101).

En trabajos recientes se ha comprobado que en tumores hipofisarios humanos se han encontrado SP con características malignas llamadas Células madre tumorales “*Tumor Stem Cells*” (TSC). Estas células contienen marcadores tumorales *stemness* además de factores ligados al proceso EMT. La SP está enriquecida en marcadores asociados a proliferación, desarrollo vascular, migración y movilidad. Entre los marcadores que están regulados positivamente se encontraron CD44, CXCR4, KIT, KLF4, y NESTIN, todos ligados con CSC y EMT. Sorprendentemente WNT y NOTCH son dos de las vías que también aparecen como predominantemente expresadas en las SP (95).

## El Sistema Notch

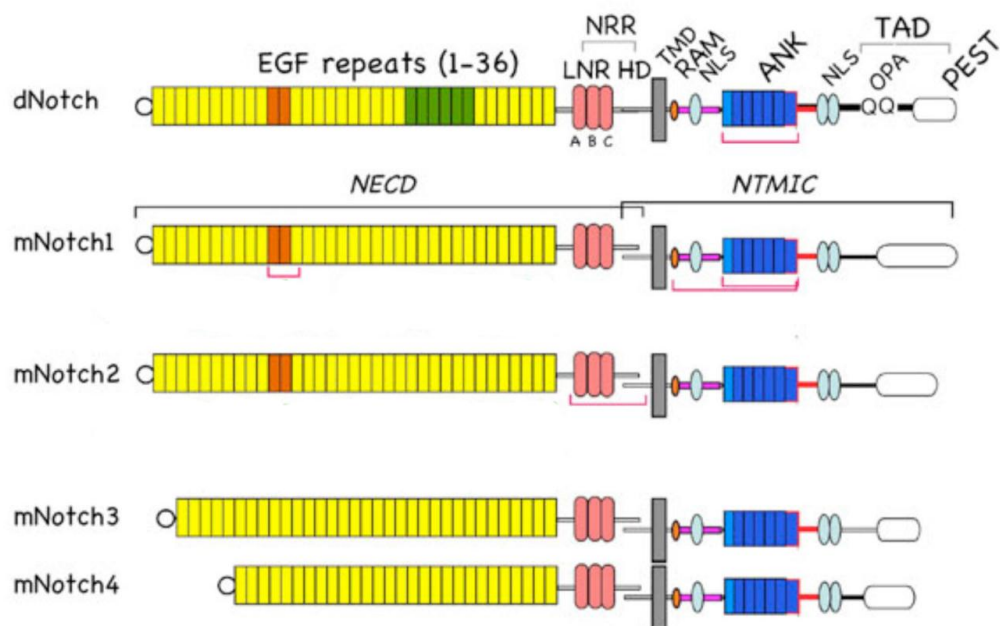
---

El Sistema Notch está altamente conservado en el reino animal. Su principal función es la de establecer una comunicación inmediata célula-célula. El Sistema Notch, dependiendo del contexto celular y fisiológico, señala para la adquisición de un determinado destino celular, activación de procesos de diferenciación, o mantenimiento y autorrenovación de tejidos adultos. También regula procesos tan complejos como la migración, y la apoptosis (102). Inicialmente NOTCH fue identificado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que contiene solo uno de estos receptores. Los gusanos tienen 2, que actúan de forma redundante (103), y los mamíferos que poseen cuatro receptores NOTCH parálogos que actúan, de forma redundante (104) o teniendo funciones exclusivas según el contexto fisiológico y tisular (105).

## Activación de los receptores NOTCH

---

Los receptores NOTCH en mamíferos son cuatro receptores transmembrana tipo I (denominados Notch 1-4) (**Figura 5**) todos ellos implicados en diferentes tipos de cáncer humano. El receptor maduro está conformado por dos subunidades, que se generan luego de un clivaje realizado por la furín-convertasa (**clivado S1 en el aparato de Golgi**) (**Figura 6**). La mayor de estas subunidades es la porción extracelular “*extracellular domain*” (ECD) y la otra es la porción intracelular “*intracellular domain*” (ICD) (106). Estas dos partes están unidas por uniones no covalentes. Los ECD de los receptores NOTCH, están conformados por repeticiones “*EGF-like*” que tienen un papel en la interacción receptor-ligando. El extremo carboxi terminal de las repeticiones “*EGF-like*” culmina con 3 repeticiones ricas en cisteína LIN12 y repeticiones NOTCH (LNRs), son importantes para prevenir la activación del receptor sin la presencia de ligando; por último existe una porción hidrofóbica que se inserta en la membrana mediando la unión entre el ECD y el dominio transmembrana. El NICD también está compuesto por dominios conservados como las repeticiones anquirina y el dominio PEST. Esta porción del receptor es la forma activa y es la que media la señalización (106).



**Figura 5:** Las proteínas NOTCH, son receptores de tipo I con múltiples repeticiones “EGF-like”. El único receptor que poseen las moscas de la fruta (dNOTCH) y los 4 receptores descritos en mamíferos (mNOTCH1–4) difieren en la cantidad de las repeticiones (29–36). En naranja aparecen los dominios 11-12 y en verde los 24-29, encargados de mediar interacciones con los ligandos. Las repeticiones son seguidas por la región reguladora negativa *Negative Regulatory Region* (NRR), que previene la activación de la vía en ausencia de ligando, compuesta por tres dominios NOTCH (LNR-A, B and C) y el dominio de heterodimerización (HD). Se observa el dominio extracelular de NOTCH (NECD), y la fusión del dominio transmembrana y el intracelular (NTMICD). En el esquema se detallan el dominio PEST (un dominio conservado rico en prolina, ácido glutámico, serina y treonina), los dominios anquirina (ANK), las señales de localización nuclear *Nuclear Localization signals* (NLS), el dominio transmembrana (TMD), el dominio RAM, con afinidad por el complejo CSL, y un dominio de transactivación (TAD), y por ultimo un dominio repetido OPA rico en glutamina. Obtenido de (106).

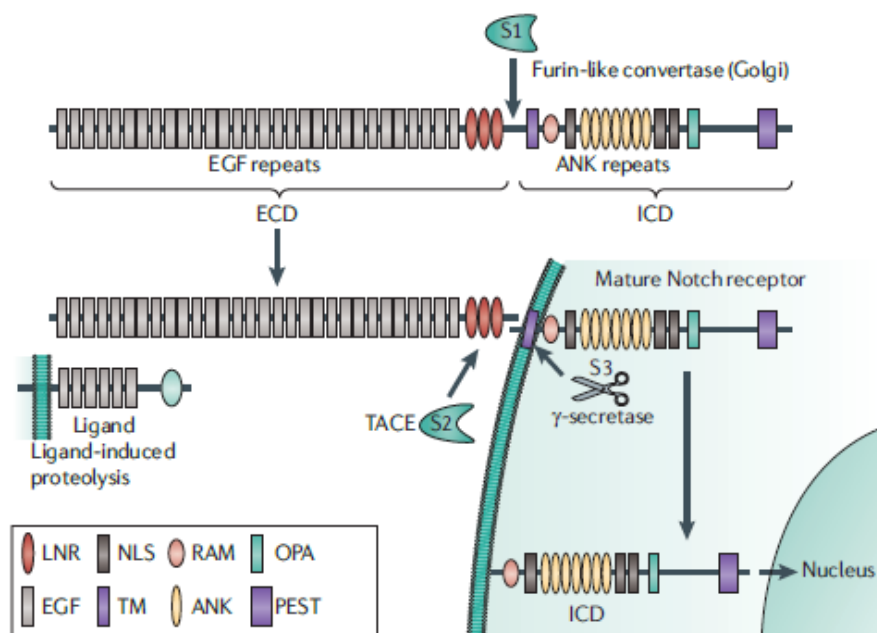
La señalización de la NOTCH se inicia por el contacto célula a célula del receptor con los ligandos de Notch: JAGGED 1 y 2 y DELTA-LIKE 1,3 y 4 (Dll1,3,4). La unión a ligandos induce un cambio conformacional que expone un **segundo sitio de escisión en el ECD, llamado S2**. La enzima que efectúa este clivaje es una metaloproteasa, la  $\alpha$ -convertasa del factor de necrosis tumoral (en inglés “TACE”). Posteriormente Notch experimenta **una tercera escisión mediada por el complejo  $\gamma$ -secretasa (conocido como S3)** que libera el NICD activo de la membrana plasmática de manera que puede traslocar al núcleo.

En el núcleo se activa un complejo de activación transcripcional, se recluta el co-activador “*Mastermind-protein like 1*” (MAML1) con la proteína de unión al ADN CSL, y se inicia una cascada transcripcional que implica tanto la activación y la represión de los genes diana, como mecanismos regulatorios o epigenéticos (87; 106). Los genes diana regulados por NOTCH dependen fuertemente del tipo celular, el tejido y el contexto fisiológico, estos genes pueden estar involucrados en la regulación del ciclo celular (107), diferenciación celular y metabolismo (108). Los genes *target* más comunes incluyen las familias de *Hes* y *Hey* (109), factores de transcripción represores (109), y también al factor de transcripción MYC (106). La unión del NICD al ADN implica un proceso rápido y dinámico dependiente de fosforilaciones y ubiquitinaciones cuyo corolario es una subsecuente degradación por el proteasoma (87) que “apaga” la vía de señalización. En ausencia del NICD, el complejo CSL está integrado por una serie de correpresores que reprimen la transcripción de los genes blanco de NOTCH (87).

### **Sistema Notch en cáncer y en particular en patologías hipofisarias**

---

La señalización de NOTCH es crítica para la homeostasis celular participando en una variedad de procesos que incluyen el mantenimiento de células madre, la especificación del destino celular, la diferenciación, la proliferación, la adhesión celular, la migración, la transición epitelio-mesenquimal y la apoptosis (110). Dada la importante y abarcativa participación del Sistema Notch en variados tejidos, no es sorprendente que esté involucrado en numerosas patologías humanas. Se ha reportado que NOTCH puede promover o reprimir el crecimiento tumoral dependiendo del tipo celular y el contexto (110). La desregulación de la señalización de NOTCH ha sido vinculada al cáncer de pulmón, de próstata, de cuello uterino (110; 111) y al neuroblastoma (112). La versatilidad y los efectos pleiotrópicos que resultan de la actividad aberrante de NOTCH pueden interpretarse en señales contextuales y de desarrollo, tales como la interacción con el microambiente del tumor y la diafonía con otras vías de señalización. La vía de NOTCH está sobreexpresada o constitutivamente activada en cáncer colorrectal en parte por mutaciones que se presentan en reguladores clave de la señalización (106). JAGGED1, por ejemplo, expresado por células tumorales o por células endoteliales es un ligando clave en la activación de NOTCH para que luego se generen las células neotransformadas en el cáncer colorrectal (106).



**Figura 6:** Procesamiento proteolítico de los receptores NOTCH. Los receptores NOTCH son sintetizados como un precursor, que es clivado por una convertasa tipo furina (clivaje S1), para dar lugar al receptor maduro, compuesto por el ECD y el ICD. La unión del ligando induce un cambio conformacional que expone el sitio de clivaje S2 en el ECD a la enzima TACE conocida como ADAM17. Luego del corte en S2, sigue el corte en S3 por la  $\gamma$ -secretasa, que resulta en la liberación del NICD desde la membrana para luego traslocar al núcleo. Obtenido de (106).

En la generación de tumores hipofisarios, la información relacionada con el Sistema Notch, su expresión y funciones, es realmente escasa. Existen algunos trabajos de Microarrays de genes y análisis proteómicos que demuestran una mayor expresión de *Notch3* en adenomas no funcionantes y prolactinomas en humanos, mientras que en somatotropinomas existe una marcada reducción de la expresión de *Notch3* (113). Pese a esto, no hay una descripción completa y exhaustiva de los cuatro receptores, ligandos y efectores río abajo, tanto en la hipófisis normal, como en estados patológicos. Por otra parte, existe un alto potencial terapéutico al utilizar como blanco al sistema NOTCH en patologías tumorigénicas hipofisarias.

Por lo tanto, en el presente estudio se decidió evaluar la expresión de los diferentes receptores NOTCH y otros componentes del sistema de manera comparativa en hipófisis tumorales y normales en muestras de roedores. De este modo, se pretendió elucidar la significación del sistema NOTCH en el desarrollo de tumores pituitarios en búsqueda de nuevos objetivos para el tratamiento de adenomas con resistencia o intolerancia a la terapia farmacológica, o aquellos en los que no existen más alternativas que la cirugía hipofisaria.

## **HIPÓTESIS**

### **Génesis y regulación de tumores hipofisarios:**

Postulamos la hipótesis que las CSC y la EMT son importantes en el crecimiento, angiogénesis, invasión y resistencia a terapia de tumores hipofisarios. El Sistema Notch está íntimamente ligado con las CSC y EMT, siendo un marcador típico de estos procesos. Su caracterización en el contexto de la transformación neoplásica de la glándula hipofisis nos permitirá proponer nuevos blancos terapéuticos para avanzar en el tratamiento de tumores hipofisarios con resistencia o intolerancia al tratamiento farmacológico, o para aquellos tumores en los cuales no existe aún una farmacología neta.



## OBJETIVOS GENERALES

Estudiar el papel de los receptores NOTCH en los mecanismos de generación de tumores hipofisarios.

### OBJETIVOS

El objetivo principal es el estudio de los mecanismos patogénicos que generan prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, somatotropinomas o adrenocorticotropinomas. Avanzaremos en la hipótesis que los receptores NOTCH asociados a CSC son importantes en el crecimiento, angiogénesis, invasión y resistencia a terapia de estos tumores y otros tumores hipofisarios.

**Capítulo 1:** En esta primera parte el objetivo es caracterizar el Sistema Notch (los receptores, sus ligandos y efectores río abajo) en hipófisis tumorales y normales, provenientes de diferentes cepas de ratones y de ratas Sprague Dawley, en células tumorales hipofisarias, y en distintos modelos experimentales de tumores hipofisarios. Establecer comparaciones entre tejidos hipofisarios transformados y normales en cuanto a la cantidad y calidad de receptores NOTCH expresados, y determinar comparativamente cuán activa está la vía cuantificando la presencia NICD, de ligandos y efectores. Además de tejidos hipofisarios se incluyeron en el análisis líneas celulares de diferentes tipos, obtenidas a partir de diferentes adenomas secretores, y con distintas características de agresividad.

**Capítulo 2:** El objetivo es analizar el papel funcional del Sistema Notch en un modelo *in vivo* de tumores xenotrópicos de origen hipofisario en ratones NUDE/NUDE. Utilizando la línea celular somatolactotrópica GH3 se generaron tumores en uno de los flancos de forma subcutánea en ratones atímicos. Usando DAPT, un fármaco que inhibe la activación de los receptores NOTCH, se determinó el crecimiento de dichos tumores, se midieron las variables fisiológicas del animal, los patrones de secreción hormonal del tumor, parámetros y marcadores de crecimiento así como ligandos y efectores río abajo.

**Capítulo 3:** Mediante herramientas de análisis bioinformático, el objetivo es analizar y detectar diferencias de expresión en genes clave en cuanto al desarrollo tumoral del modelo descrito en el capítulo previo, que a su vez tengan una relación fisiológica con el Sistema Notch. Utilizando análisis de GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) de RNA-seq de tumores hipofisarios humanos y de hipófisis humanas, se buscaron diferencias de expresión en grupos de genes determinados. Los resultados fueron cruzados con un análisis de secuencias obtenidas por ChIP-seq disponibles en bases de datos en la web, para detectar novedosos marcadores asociados a la vía de NOTCH, vinculados con cáncer y con hipófisis.

Algunos de los marcadores obtenidos por GSEA y mediante las comparaciones de secuencias ChIP-seq, se analizaron en los diferentes modelos desplegados en este trabajo.

**Capítulo 4:** El objetivo es caracterizar funcionalmente el Sistema Notch en células GH3 en cultivo, es decir un efecto directo en un modelo independiente de la matriz extracelular. En respuesta a la incubación con DAPT se midió la proliferación celular, la capacidad de migración de las células GH3, y la capacidad secretora de las células *in vitro*. También se analizó la expresión y respuesta de diferentes marcadores pertenecientes a la vía de NOTCH en función del tratamiento *in vitro* con DAPT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Todos los animales (ratones y ratas) se alojaron en grupos de 4 o 5 en una habitación con temperatura controlada con luz a las 0700 h y apagado a las 1900 h, y tenían acceso libre al agua del grifo y alimento balanceado en forma de pellets (Gepsa Feeds, Grupo Pilar). Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a las pautas del comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires y el Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET.

### Ratones lacDrd2KO

Los ratones que carecen de los RD2s funcionales solamente en lactotropos se obtuvieron por medio de la cruce de ratones  $Drd2^{loxP/loxP}$  (los cuales poseen el exón 2 del RD2 flanqueado por secuencias específicas loxP) (114) con ratones transgénicos que poseen la expresión de la enzima recombinasa *Cre* bajo el control transcripcional del promotor de prolactina [Tg(Prl-cre)<sub>1Mrub</sub>] (115). La actividad de la enzima *Cre* recombinasa fue analizada en hipófisis y demostramos que se encuentra activa en el 96% de las células productoras de prolactina y que esta actividad es altamente específica de lactotropos (115).

Los apareos fueron conformados por un ratón hembra  $Drd2^{loxP/loxP}$  junto con un macho  $Drd2^{loxP/loxP}$ .Tg(Prl-cre)<sub>1Mrub</sub> (lacDrd2KO), para obtener en una misma camada crías controles ( $Drd2^{loxP/loxP}$ ) y transgénicas (lacDrd2KO), que fueron luego utilizadas para los experimentos subsiguientes.

Los ratones lacDrd2KO y sus controles ( $Drd2^{loxP/loxP}$ ) son congénitos con la cepa C57BL/6J.

Se usaron hipófisis normales de ratones hembra adulta BalbC como controles en la determinación de la expresión de *ARNm* mediante qRT-PCR y expresión proteica mediante Western Blot en comparación con modelos tumorales.

### Ratas:

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembra. Los animales fueron sacrificados a los dos meses de edad. Las hipófisis se usaron como controles en la determinación de la expresión de *ARNm* por qRT-PCR y expresión de proteína por Western Blot en comparación con modelos de tumor de rata.

### Genotipificación de los ratones

#### Extracción de ADN genómico

Las crías de ratones se destetaron a los 30 días de su nacimiento y se separaron por sexo hasta que su genotipo fue determinado. Para determinar los genotipos se realizaron biopsias de la porción terminal de la cola o de las orejas, con un bisturí. Los segmentos de cola u orejas obtenidos se incubaron a 55°C en 20 µl de buffer de digestión (TrisHCl 50 mM pH 8; EDTA 100

mM; SDS 0,5%; 0,5 mg/ml de proteinasa K) durante 12 hs. Se precipitó el ADN en frío, durante 40 minutos a -70°C y se centrifugó a 12000 g por 40 minutos a 4°C, para su extracción. Finalmente, se descartó el pellet y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización. La presencia del transgén se detectó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos de las secuencias transgénicas como se detalla a continuación.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la genotipificación de los ratones lacDrd2KO y sus pares  $Drd2^{loxP/loxP}$  deben realizarse dos PCRs diferentes:

En primer lugar se realiza una para determinar la presencia de sitios loxP. Para la misma, se utilizó un par de *primers* sentido y antisentido complementarios al intrón 2 del gen RD2 (Invitrogen Life Technologies), cuyas secuencias se muestran en la **Tabla 1**. Si existe un alelo mutado el par de *primers* del intrón 2 amplifica un producto de 452 pares de bases (pb) y en caso de haber un alelo normal amplifican fragmento de 354 pb. Las condiciones de esta PCR se detallan en la **Tabla 2**.

En segundo lugar, se lleva a cabo una PCR para la detección del transgén Prl-Cre, en la cual se utilizó un par de *primers* conformado por una secuencia complementaria a una porción del promotor de prolactina (*primer* sentido), y una secuencia complementaria a la recombinasa Cre (*primer* antisentido). Las secuencias se muestran en la **Tabla 1** (Invitrogen Life Technologies) y las condiciones de esta PCR se detallan en la **Tabla 3**. En este caso se evidencia simplemente presencia o ausencia del transgén, es decir, presencia o ausencia de producto amplificado.

**Tabla 1:** Primers utilizados para las reacciones de PCR realizadas para la genotipificación de los animales.

Gen		Secuencia (5'- 3')
<i>Prl-Cre</i>	Sentido	CCTTCATTTCTGGCCAATG
	Antisentido	AGGCAATTTTGGTGTACGG
<i>Intrón 2</i>	Sentido	GCTTCACAGTGTGCTGCCTA
	Antisentido	CCATTGCTGCCTCTACCAAG

**Tabla 2:** Reacción de PCR para la genotipificación de los animales transgénicos control.

MIX PCR		Programa		
	Concentración		Temperatura (°C)	Tiempo
Primers sentido y antisentido	2 µM			
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	<b>1 ciclo de</b> desnaturalización inicial	95	5'
ADN	200 ng	<b>34 ciclos:</b> de desnaturalización- apareamiento y extensión	95	30''
dNTPs	0,2 mM		62	20''
Buffer	TrisHCl 20mM; KCl 50mM		72	20''
Taq polimerasa	1 UE	<b>1 ciclo de</b> extensión final	72	5'
H <sub>2</sub> O	Vf= 30ul			

**Tabla 3:** Reacción de PCR para la genotipificación de los animales transgénicos PrI-Cre.

MIX PCR		Programa		
	Concentración		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Primers sentido y antisentido	1 µM			
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	<b>1 ciclo de</b> desnaturalización inicial	95	3
ADN	200 ng	<b>35 ciclos:</b> de desnaturalización- apareamiento y extensión	94	1
dNTPs	0,2 mM		56	1
Buffer	TrisHCl 20mM; KCl 50mM		72	1
Taq polimerasa	1 UE	<b>1 ciclo de</b> extensión final	72	5
H <sub>2</sub> O	Vf= 30ul			

## Diseño de *primers* para evaluación de expresión de genes por PCR en tiempo real

Los *primers* específicos para cada protocolo de amplificación empleado en este trabajo de Tesis Doctoral fueron diseñados con el software “Primer-BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), utilizando registros de secuencias de referencia como templatado del análisis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). En el diseño se tuvo en cuenta que éstos amplificaran fragmentos que contuviesen al menos un intrón entre dos exones. De esta manera, se puede determinar la amplificación específica del transcripto y distinguir, en caso que la hubiese, contaminación con ADN genómico, ya que en dicho caso, el fragmento amplificado es de mayor tamaño dado que incluye la secuencia intrónica.

Para el análisis de las características de los *primers* diseñados se empleó el programa “OligoAnalyzer3.1”, (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Se tuvo en cuenta que los *primers* no formen ni homo ni heterodímeros, ni estructuras secundarias tipo horquillas de alta estabilidad, y que no presenten repeticiones invertidas ni repeticiones de un mismo nucleótido. Se tomó como parámetro que la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de ninguna de estas configuraciones supere en módulo las 10Kcal/mol.

Los *primers* seleccionados también se testearon a través del programa “Oligo Calc” (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Se comprobó la ausencia de autocomplementariedad de los oligos. Además, se utilizó el programa “OLIGO” (versión 6.45 “Primer analysis software”), para hacer PCR *in silico* que permitieron predecir el pico de *melting* que tendría cada producto de amplificación generados por PCR en Tiempo Real. Se eligieron *primers* cuya temperatura de “annealing” estuviera entre 58 y 60°C. El tamaño de los fragmentos amplificados por el par de *primers* diseñados para la PCR en Tiempo Real no superó los 130 pb. En la **Tabla 4** se detallan los *primers* utilizados.

**Tabla 4:** *Primers* de ratón utilizados en este trabajo para los ensayos de PCR en Tiempo Real.

Gen		Secuencia (5' - 3')	Temperatura de annealing
<i>Notch1</i> <i>rata</i>	Sentido	AATGGAGGGAGGTGCGAAG	60°C
	Antisentido	ATGGTGTGCTGAGGCAAGG	
<i>Notch3</i> <i>rata</i>	Sentido	AGGCTACCTGGCTCTGCTGAA	60°C
	Antisentido	CAGCCTGTCCAAGTGATCTGTGA	

<i>Notch3</i> <i>rata LZB</i>	Sentido	AATGTGGAGGCTACCTTGGC	58°C
	Antisentido	TCTCCCGGTTGGCAAAATGA	
<i>Notch2</i> <i>rata</i>	Sentido	TTTGCAGTGTGAGGTGGTC	58°C
	Antisentido	AGCGGTTCTTCTACAAGGG	
<i>Notch4</i> <i>rata</i>	Sentido	GCTCTGTCCGCTTCTTTCT	58°C
	Antisentido	TTGGCTGAGCAGAAGTCTCG	
<i>Hes1</i> <i>rata</i>	Sentido	CCAAAGACAGCCTCTGAGCA	56°C
	Antisentido	CTTGGAATGCCGGGAGCTAT	
<i>Hes5</i> <i>rata</i>	Sentido	GTGGAGATGCTCAGTCCCAA	58°C
	Antisentido	TGTCGGCCTTCTCCAGTTTG	
<i>Hey1</i> <i>rata</i>	Sentido	AGCGCAGACGAGAATGGAAA	58°C
	Antisentido	CGCTTCTCGATGATGCCTCT	
<i>Hey2</i> <i>rata</i>	Sentido	GAGAAGACTAGTGCCAACAGC	58°C
	Antisentido	GGCGTCAAAGTAGCCTTTCC	
<i>Gapdh</i> <i>rata</i>	Sentido	GAAGGTCGGTGTGAACG	58°C
	Antisentido	TGGGTAGAGTCATACTGGAA	
<i>CiclinaD1</i> <i>rata</i>	Sentido	CTCCACAGGAAACCCAGAGG	58°C
	Antisentido	GGACAGCATTTCTGACCAGC	
<i>CiclinaD3</i> <i>rata</i>	Sentido	AAAGGAGATCAAGCCGCACA	58°C
	Antisentido	AGCCAGAGGGAAGACATCCT	
<i>Jagged1</i>	Sentido	TATGCCTGCGACCAGAATGG	58°C

<i>rata</i>	Antisentido	AGTCACCTGGGAGTTTGACG	
<i>Jagged2 rata</i>	Sentido	CTGCGTGGATCAGGTGGAC	58°C
	Antisentido	TCCCTTCACACTCATTGGCG	
<i>Dlk1 rata</i>	Sentido	GAGAAGTGCCTAACCTCCCC	56°C
	Antisentido	GTAGAGGTGCAAGCCCGAA	
<i>Hes5 LZB rata</i>	Sentido	GTGGAGATGCTCAGTCCCAA	56°C
	Antisentido	GCTCCAGCAGCAGTTTCAG	
<i>Hey2 N°2 rata</i>	Sentido	GGGAAAGGCTACTTTGACGC	58°C
	Antisentido	TCGCCACTTCTGTCAAGCAT	
<i>Notch1 LZB rata</i>	Sentido	GAACAATGTGGACGCTGCTG	58°C
	Antisentido	CCAGCAACACTTTGGCAGTC	
<i>Delta like1 rata</i>	Sentido	GGGCTTCTCTGGCTTCAACT	58°C
	Antisentido	GACATCGGCACAGGTAGGAG	
<i>Hes1 N°2 rata</i>	Sentido	ATGACAGTGAAGCACCTCCG	58°C
	Antisentido	GTCACCTCGTTCATGCACTC	
<i>TGFβ rata</i>	Sentido	CAACAATTCCTGGCGTTACC	56°C
	Antisentido	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT	
<i>Btg2 rata</i>	Sentido	GCGAGCAGAGACTCAAGGTT	58°C
	Antisentido	GGATACAGCGATAGCCGGAG	
<i>Cnot1 rata</i>	Sentido	TCGCTGGCCTTGCTCTCAAT	58°C



	Antisentido	TCAGGACCGTGCCGATTAC	
<i>Men1 rata</i>	Sentido	TCACAAGGGGATTGCCTCAG	58°C
	Antisentido	GCGGTTGCGACAATGGTATC	
<i>Zfp36 rata</i>	Sentido	TCTGCCATCTACGAGAGCCT	58°C
	Antisentido	TGGGATGGAGTCCGATGAGT	
<i>Nr4a-1 rata</i>	Sentido	TGTGCGAGAAGGATTGCAGA	58°C
	Antisentido	TTGAGCTTGGATACAGGGCA	
<i>Notch1 ratón</i>	Sentido	CAAGAGGCTTGAGATGCTCC	56,4°C
	Antisentido	GATTGGAGTCCTGGCATCGT	
<i>Notch2 ratón</i>	Sentido	AGTACATTTGCACCTGCCCA	57°C
	Antisentido	ACTGTTGGCCATAGCACACT	
<i>Notch3 ratón</i>	Sentido	GCATACTCGGGACTGCCTAC	59°C
	Antisentido	CAGAATGGCGGGACACAGT	
<i>Notch4 ratón</i>	Sentido	GGAAGTCCTGGCTGTGTCC	57,7°C
	Antisentido	CTACAGGTCAACCCCATGTAGC	
<i>Hes1 ratón</i>	Sentido	GTCAACACGACACCGGACA	57,25°C
	Antisentido	GGAATGCCGGGAGCTATCT	
<i>Hes5 ratón</i>	Sentido	AGGAGAAAAACCGACTGCGGA	58,6°C
	Antisentido	GGAGTAGCCCTCGCTGTAGT	
<i>Hey2 ratón</i>	Sentido	TGAGGTCCAATTCACCGACA	55°C
	Antisentido	GCATCAAAGTAGCCTTTACCC	
<i>Delta like1 ratón</i>	Sentido	GAGAAGATCGCCCCAACACT	56,8°C
	Antisentido	CCATCTTACACCTCAGTCGCT	

<i>Jagged1</i> ratón	Sentido	AGACAAGTGGTATCGGTGCG	56,9°C
	Antisentido	CCTGAAACTTCATGGCACTTGG	
<i>Gapdh</i> ratón	Sentido	GGGGCTGCCAGAACATCAT	65,5°C
	Antisentido	GCCTGCTTACCACCTTCTTG	

### PCR en tiempo real

La evaluación cuantitativa de los niveles de *ARNm* se realizó por PCR en tiempo real con una unidad institucional de la firma Biorad, modelo CFX96 Touch™ (Biorad). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando una mezcla preformada llamada 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biotec) que contiene: 5X EvaGreen® qPCR buffer, ADN polimerasa HOT FIREPol®, dNTPs incluyendo dTTP para mejorar la eficiencia y sensibilidad de reacción respecto de los dUTP, colorantes EvaGreen® y ROX, y 12,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. A esta mezcla se agregaron los *primers* (0,48 μM), moldes (50 ng de ADNc) y el agua en un volumen final de 10 μl. Después de la desnaturalización a 95°C durante 15 minutos, los productos de ADNc se amplificaron con 40 ciclos de 15 s a 95°C, 20 s a 55-65,5°C y 30 s a 72°C. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyeron: el control negativo de la PCR en Tiempo Real (en el que se omitió el ADNc molde), y los controles negativos de la RT-PCR.

Se pusieron a punto programas de amplificación específicos para cada tejido.

La detección del producto amplificado se monitoreó en el equipo de PCR en Tiempo Real, el cual mide el aumento de los niveles de fluorescencia en cada ciclo de PCR causados por la unión del SYBR Green al ADN doble cadena. El equipo determina un nivel de fluorescencia umbral dentro de la fase exponencial de la reacción. El número de ciclos que requiere cada muestra para alcanzar dicho umbral se conoce como *Ct* (*Cycle threshold*), el cual está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la PCR. Dado que se obtiene una señal siempre que haya moléculas de ADN doble cadena, *a posteriori* del ensayo de PCR los resultados fueron validados sobre la base de la calidad de las curvas de disociación, tal como se describe en (116), y la expresión del gen diana se calculó en relación con el *ARNm* del gen *Gapdh*. Siempre que se utilizó por primera vez un par de primers, se corrió el producto de amplificación en una electroforesis en un gel de agarosa 3%, comprobando que el tamaño del amplicón sea del tamaño esperado.

La expresión relativa de los transcriptos evaluados se calculó usando *Gapdh* como control endógeno. La expresión matemática utilizada para calcular estas relaciones fue:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia}$ .

$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen endógeno}$ .

$\Delta Ct \text{ referencia} = \text{promedio } \Delta Ct \text{ de las muestras control}$ .

Para todos los genes evaluados se realizaron previamente ensayos de estandarización de los protocolos empleados, que involucraron la evaluación de curvas de rango dinámico de amplificación del transcrito de interés y posteriores curvas de disociación.

### **Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

---

Para chequear los tamaños de los productos de amplificación de los primers utilizados en PCR en Tiempo Real se emplean geles de 3% de agarosa. Para comprobar el peso molecular de los productos de PCRs llevadas a cabo para genotipar lacDrd2KO y sus pares *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* se emplearon geles 1% de agarosa. La solución se preparó en buffer 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8. Se le agregó a cada muestra 1  $\mu$ l de SYBR green (10mM) para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador ultravioleta.

### **Extracción de ARN y síntesis de DNAc**

---

La extracción total de ARN de tumores pituitarios de ratón o rata o de líneas celulares derivadas de tumores se recuperó utilizando reactivo TRI (Molecular Research Center, Inc) como se describió anteriormente (117). La concentración de ARN se determinó sobre la base de la absorbancia a 260 nm, se evaluó su pureza por la relación de absorbancia a 260/280 nm ( $\sim 2,0$  se consideró apropiado) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se analizó. 1  $\mu$ g de ARN fue retrotranscrito en 20  $\mu$ l de volumen en presencia de 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris • HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, desoxi-NTPs 1 mM, DTT 0,01 mM, 1 pM oligo(dT)15 (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), y 10 U de transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, CA, USA). La transcriptasa inversa se omitió en reacciones control negativas.

### **Radioinmunoensayos (RIAs)**

---

#### **Niveles séricos de hormonas**

---

Con los sueros obtenidos de cada una de los ratones NUDE/NUDE con tumores xenotrópicos, y los medios de cultivo de las células GH3 estimulas con DAPT o control se procedió a medir los niveles de prolactina y GH de rata mediante RIA, siguiendo los protocolos que se detallan a continuación:

#### **Prolactina**

---

La curva de concentraciones del estándar de referencia y de las muestras fueron realizadas en buffer de ensayo: PBS (buffer fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0,01% azida sódica, pH final de 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA). Tanto los puntos de la curva (llevados a cabo a partir del estándar de ratón RP3) como las muestras se analizaron por duplicado. Se tomaron 10  $\mu$ l de suero original

para sembrar cada una de las muestras en el ensayo. En el caso de las los medios provenientes de células estimuladas en cultivo, se sembraron 10 µl de una dilución 1/20-1/40.

El primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti-prolactina de ratón (cruza con prolactina de rata también, se puede utilizar con nuestro modelo), NHPP-NIDDK, dilución de trabajo 1:100000) y la hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 24 hs.

Al día siguiente, el segundo anticuerpo (suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo, dilución de trabajo 1:90) fue agregado al ensayo e incubado a temperatura ambiente durante 2 hs y 30 min a 4°C. Luego de esta incubación se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo específico por centrifugación refrigerada (4°C, Beckman Instruments) a 2000 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue aspirado y se midió la radioactividad asociada al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador Gamma [Hewlett Packard (eficiencia: 82%)]. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 6,3% y 12.5%, respectivamente.

### **Hormona de crecimiento**

---

La curva de concentraciones del estándar de referencia fueron realizadas en buffer de ensayo: PBS (buffer fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0,01% azida sódica, pH final de 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA). Tanto los puntos de la curva (llevados a cabo a partir del estándar de ratón RP3) como las muestras se analizaron por duplicado. Se tomaron 10 µl de suero original para sembrar cada una de las muestras en el ensayo. En el caso de las los medios provenientes de células estimuladas en cultivo, se sembraron 10 µl de una dilución 1/20-1/40.

El primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti-GH de ratón NHPP-NIDDK, dilución de trabajo 1:100000) y la hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm/tubo) fueron agregados a los tubos patrones y de muestra, los cuales fueron posteriormente incubados a temperatura ambiente durante 24 hs.

Al día siguiente se procedió de igual forma que para medir Prolactina.

### **Niveles intratumorales de hormonas**

---

Preparación de las muestras: Los tumores xenotrópicos generados en ratones NUDE/NUDE a partir de la línea GH3 fueron lisados en 80-300 µl de buffer de lisis: TRIS 100mM [pH 7,4], CaCl<sub>2</sub> 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, 10-µg/mL 1% Triton X-100. Se añadió PMSF 1mM y cóctel de inhibidores de proteasas justo antes de utilizar. El homogeneizado se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante para cuantificar las proteínas mediante el kit de ensayo de proteínas Qubit Quant-it (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

Se pipetearon 120 µl de una dilución 1µg/µL en buffer EA 1% del homogenato original de modo que hubiera 0,12 µg de proteína total cargada por muestra correspondiente a cada tumor, tanto

para medir GH como Prolactina. De acuerdo a calibraciones previas, esta cantidad de proteínas era la adecuada.

**Prolactina**

Se llevó a cabo del mismo modo que lo explicado anteriormente para las mediciones en suero.

**GH**

Se llevó a cabo del mismo modo que lo explicado anteriormente para las mediciones en suero.

**Técnicas de cultivo y líneas celulares**

**Líneas celulares utilizadas**

Línea	Origen	Características	Medio de cultivo
<b>GH3</b>	Tumor Hipofisario de rata (Rattus norvegicus). Somatolactotropos.	Epitelial, levemente adherente, con cúmulos flotantes. Carentes de receptores D2 de dopamina. Secretoras de GH y Prolactina.	F12K suplementado con 2,5% Suero Fetal Bovino, 15% Suero de caballo, Estreptomicina/Penicilina, Fungizona.
<b>AtT20</b>	Tumor hipofisario, ratón. Corticotropos.	Epitelial. Pequeñas células redondeadas. Secretoras de ACTH.	F12K suplementado con 2,5% Suero Fetal Bovino, 15% Suero de caballo, Estreptomicina/Penicilina, Fungizona.
<b>MMQ</b>	Tumor Hipofisario de rata (Rattus norvegicus). Lactotropos.	Epitelial. Crecen en suspensión. Secretan Prolactina, poseen receptores para Dopamina.	F12K suplementado con 2,5% Suero Fetal Bovino, 15% Suero de caballo, Estreptomicina/Penicilina, Fungizona.

Tabla 5: Descripción breve de las líneas celulares utilizadas.

**Mantenimiento, propagación y subcultivo.**

Las líneas celulares utilizadas se mantuvieron rutinariamente en Flasks de cultivo celular T75 o T175. Las GH3 somatolactotrópicas mantuvieron con medio de F12K (Ham's F-12K (Kaighn's) Medium, Cat. No: 21127022) suplementado con 2.5% de Suero Fetal Bovino (Natocor), 15% Suero de caballo (Natocor), 26 mM NaHCO3, 100 UI/ml Penicilina, 100 µg/ml Estreptomicina y Fungizona (0.5ug/ml PAA)

llamado en este trabajo Medio Completo). Las líneas celulares de corticotropo de ratón AtT20 y las células MMQ de prolactinoma de rata se cultivaron en suspensión en medio DMEM / F12 con suero de caballo al 10%, suero bovino fetal al 5%, glutamina al 1% y penicilina / estreptomina al 1% y se mantuvo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La incubación se realizó en una estufa gaseada a 37°C y en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Los subcultivos de las células se realizan diluyendo a 1/5 el cultivo empleando una solución de Tripsina y 0.25% EDTA (Gibco/Invitrogen) en buffer fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7,4). Las células se aislaron por la acción de 1ml de la solución sobre la monocapa durante 5 minutos a 37°C. La tripsina se neutraliza luego por el agregado de 10 ml de medio fresco suplementado con SFB y se pipetea varias veces con ayuda de una pipeta automática para disgregar mecánicamente la monocapa. Se centrifuga 5 min a 1000g para eliminar la tripsina y se diluye el pellet celular en medio fresco según las condiciones de experimentación. De acuerdo al tipo de ensayo a realizar las células se sembraron en placas de cultivo de 6, 12, 24 o 96 pocillos.

### **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS**

---

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Las muestras son incubadas, en el buffer de muestra (2% SDS, 10% glicerol, 5% 2- mercaptoetanol, 0.002% azul de bromofenol, 75 mM Tris HCl pH=6,8), durante 10 minutos a 100°C antes de la siembra. Las dos fases de los geles de acrilamida se prepararon de la siguiente forma: gel concentrador (o stacking), de 3% Acrilamida: Bisacrilamida (29:1), 0,125 M de Tris-HCl pH=6,8, 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amonio, 0,1% de TEMED. El gel separador, de concentración de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1) entre 8 y 12 %, 0,375 M Tris-HCl pH=8,8, 0,1 % de SDS, 0,03 % de persulfato de amonio 0.03 %, 0,07 % de TEMED. Los geles se armaron en un equipo para celdas MiniProtean III (Bio-Rad) y se corrieron en buffer de corrida (25 mM de Tris-HCl pH= 8,8, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS) entre 90 y 120 minutos a 100 V, hasta que el frente de corrida llega a pocos milímetros del borde inferior del gel.

### **Western Blot**

---

Se prepararon muestras hipofisarias y lisados de células en un homogeneizador de tejidos motorizado en 80 a 300 µl de buffer de lisis 1 (50 mM HEPES [pH 7,4], NaCl 140 mM, glicerol al 10%, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato sódico, pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 100 mM (NaF) y 10-µg/mL 1% Triton X-100) y phymethylsulfonylfouride 1 mM (PMSF). Además se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) al buffer justo antes de su utilización. El homogeneizado se centrifugó a 13.000g durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante para cuantificar las proteínas mediante el kit de ensayo de proteínas Qubit Quant-it (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

Los tumores xenotrópicos generados en ratones NUDE/NUDE a partir de la línea GH3 fueron lisados en 80-300 µl de buffer de lisis 2: TRIS 100mM [pH 7,4], CaCl<sub>2</sub> 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, 10-µg/mL 1% Triton X-100. Se añadió PMSF 1mM y cóctel de inhibidores de proteasas justo antes de utilizar. Las muestras fueron sonicadas tres veces durante 20 segundos a un 20% de potencia (datos del

sonicador); el homogeneizado se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante para cuantificar las proteínas mediante el kit de ensayo de proteínas Qubit Quant-it (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina).

En los ensayos de estímulo *in vitro* de células GH3 con DAPT durante 24 o 48 horas las proteínas se extrajeron con el buffer de extracción GPBL (20mM Tris pH=7.2-7.6; 150mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% NP40; 5mM β-glicerofosfato). Brevemente el procedimiento consistió en una vez retirado el medio de cultivo, lavar las células pegadas en el pocillo con PBS frío a 4°C, retirar el PBS, y agregar 100μl de buffer GPBL. Las células se rasparon de la superficie mediante una escobilla de plástico para luego pipetearlas en un tubo eppendorf e incubarlas 10 min en hielo. Luego se las centrifugó 10 minutos a 4°C a 13000 g, para por último descartar el pellet y separar el sobrenadante en un tubo nuevo. Se cuantificaron proteínas con el kit descrito en el párrafo anterior.

Las muestras de tejidos que se analizaron en un mismo grupo experimental se extrajeron con el mismo buffer de lisis, de modo que la eficiencia de extracción sea la misma a la hora de establecer una comparación.

Se sumaron cuarenta microgramos de proteínas en 20 μl de buffer de homogeneización con 5 μl de buffer de muestra 5x (Tris-HCl 312 mM, SDS al 10%, glicerol al 25%, azul de bromofenol al 0,002% y beta-mercaptoetanol al 1% a pH 6,8). Las muestras se calentaron 5 minutos a 95°C y se separaron por electroforesis SDS-PAGE al 8%, 10% o 12% según el caso y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (G & E, Little Chalfont, RU). Después de bloquear con una solución de leche desnatada en polvo al 3% en buffer de fosfato salino - Tween (PBST) (fosfato sódico 10 mM, fosfato potásico 2 mM [pH 7,4], NaCl 140 mM, KCl 3 mM y Tween-20 0,05%) se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 6**.

Las membranas se lavaron con PBST y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a “horse raddish peroxidase” (HRP) correspondiente, y las bandas de proteína se visualizaron en ImageQuant LAS 4000 mini (G & E). Los anticuerpos anti-β-actina monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc) y anti-G3PDH (Neobiolab, MA, USA) se utilizaron para validar la misma cantidad de proteína cargada y transferida.

Para reblotrear, las membranas se incubaron en “buffer stripping” (Tris 62,5 mM, SDS al 2% y mercaptoetanol 100 mM, pH 6,7) a lo largo de 40 minutos a 55°C y se recuperaron. Las intensidades de banda se cuantificaron utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

**Tabla 6:** Se muestran los anticuerpos utilizados en la técnica de Western Blot.

Epítotope	Fuente	Código	Isotipo	Western blot
Notch-2	Millipore	Cat. # 07-1234	Conejo	1/1000

Notch-1	Millipore	Cat. # 07-1232	Conejo	1/1000
Hes-1	Millipore	Cat. # AB5702	Conejo	1/1000
Actina	Santa Cruz	sc-8432	Ratón	1/1000
PCNA	Santa Cruz	sc-7907	Conejo	1/1000
Notch-3	Santa Cruz	sc-5593	Conejo	1/700
Erk-1	Santa Cruz	sc-94	Conejo	1/1000
p-Erk	Santa Cruz	sc-7383	Ratón	1/700
Beta-Tubulina	Sigma-Aldrich	T0198	Ratón	1/700000
Beta-Tubulina	Neobiolab	AC008	Conejo	1/1000
Notch-2	Spyros Artavanis-Tsakonas	C651.6DbHN	Rata	1/500
PECAM	Santa Cruz	sc-1506	Cabra	1/1000
Rat	Santa Cruz	sc-2006	Cabra	1/3000
VEGF	Santa Cruz	sc-7269	Mouse	1/1000
Rabbit	Santa Cruz	sc-2004	Cabra	1/3000
Mouse	Santa Cruz	sc-2005	Cabra	1/3000
Cabra	Santa Cruz	sc-2042	Burro	1/700
GAPDH	Neobiolab	Sc-3355	Cabra	1/1500

### **Ensayos de estímulo con DAPT *in vitro* 24 y 48 hs.**

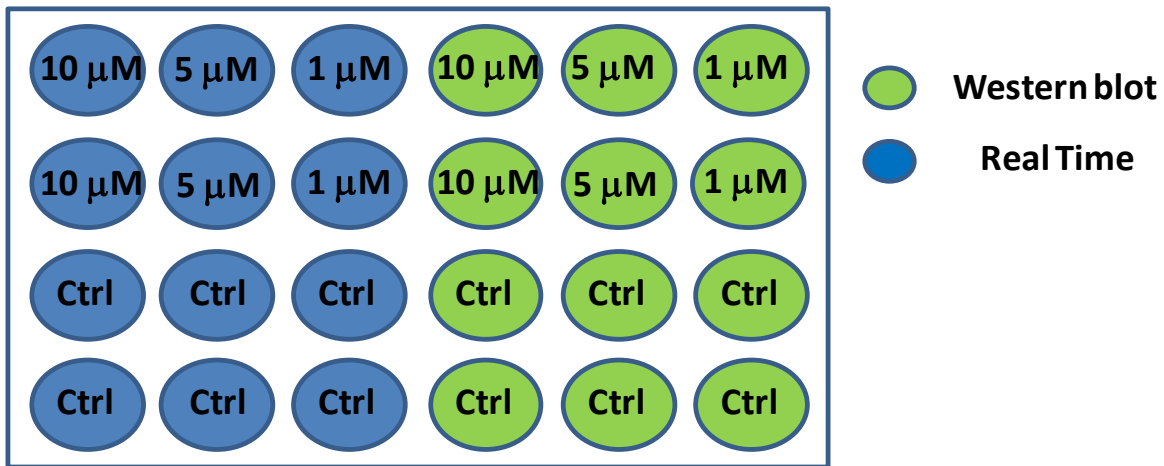
Para realizar los ensayos de estimulación con DAPT de células GH3 *in vitro*, se depositaron en una placa de 24 pocillos 250000 células/pocillo. Se lo hizo con medio F12K suplementado (ver apartado **Técnicas de cultivo y líneas celulares**). Se esperó durante 24 horas al pegado de las mismas, posteriormente y previo un lavado con PBS, a cada pocillo se le administró 1ml de medio completo para en ese volumen efectuar los estímulos. Los mismos fueron 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de DAPT o bien Control con solución vehículo.

Dependiendo del tiempo de estímulo, se esperó durante 24 o 48 horas sin cambiar el medio de cultivo en todo el experimento. Al finalizar, se guardó material para PCR en Tiempo Real, o bien



Western Blot así como medios de cultivo para medir la cantidad de hormonas liberadas mediante RIA. El *ARNm* se extrajo como ya se mencionó en el apartado **Extracción de ARN y síntesis de cDNA**.

Las proteínas obtenidas de los pocillos que fueron destinados a análisis por Western Blot fueron extraídas en frío a 4°C con el buffer de extracción GPBL, cuya fórmula se detalla en el apartado **Western Blot**.



**Figura 7:** Esquema de las placas de 24 pocillos empleadas para estimular las células GH3 in vitro con DAPT por 24 o 48 horas. En azul se muestran los pocillos que se utilizaron para extraer *ARNm* y sintetizar ADNc, y posteriormente analizarlo por PCR en Tiempo Real; en verde los pocillos a partir de los cuales se realizó extracción proteica para posterior análisis por Western Blot. 10µM, 5µM, 1µM de DAPT, y Ctrl (Control con vehículo), los estímulos aplicados.

### Ensayos de Proliferación celular

La proliferación de las células GH3 se determinó colorimétricamente a 490 nm utilizando un kit de ensayo de proliferación comercial (CellTiter96 AQueous nonradioactive cell proliferation assay, Promega). Después de la incubación con vehículo, 5uM, y 10uM de DAPT por 24 o 48 horas en una placa de 96 pocillos se incubaron con 333 mg / litro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4 - sulfofenil) - 2H - tetrazolio (MTS) y 25 uM de metenosulfato de fenazina a 37°C en una atmósfera humidificada de 50 ml / litro de CO<sub>2</sub>. La absorbancia del formazán soluble producido por la reducción celular de MTS se midió a 490 nm utilizando un lector de ELISA (Sensident scan, Merck). Se estimularon cuatro repiques celulares diferentes, durante 24 y durante 48 horas con las concentraciones de DAPT indicadas, en el caso de las 48 hs reponiendo el estímulo de DAPT a las 24 hs.

### Ensayos de herida (Scratch assays)

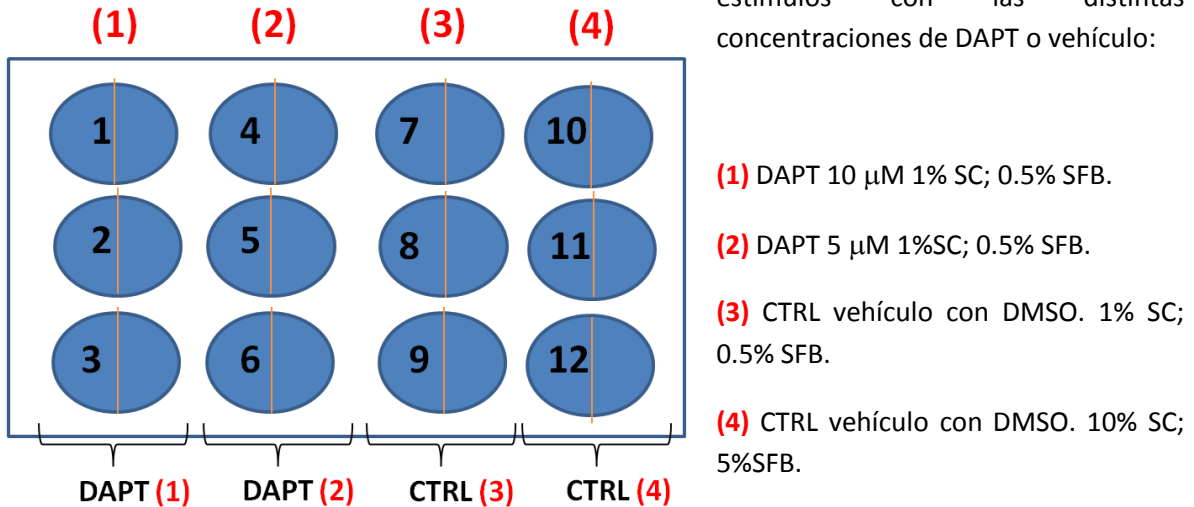
Se sembraron 1.000.000 células GH3 por well en una placa de cultivo de doce pocillos. Las células se sembraron en medio F12K con 15% de Suero de Caballo (SC), y 2.5% de Suero Fetal Bovino (SFB), más antibióticos y fungizona. Posteriormente:

1-Se dejó crecer a las células hasta 90-100% confluencia en forma de monocapa (1 o 2 días aproximadamente), también en medio F12 K completo 15% SC; 2,5% SFB.

2-Se realizó un hambreado por el período de 24 horas con medio F12K sin SFB ni SC ni antibióticos.

3-Se procedió a hacer herida con un tip, efectuando una línea recta sobre el pocillo, sin medio de cultivo presente.

4-Se agregó el medio F12K con las cantidades de suero correspondiente, y se efectuaron los estímulos con las distintas concentraciones de DAPT o vehículo:



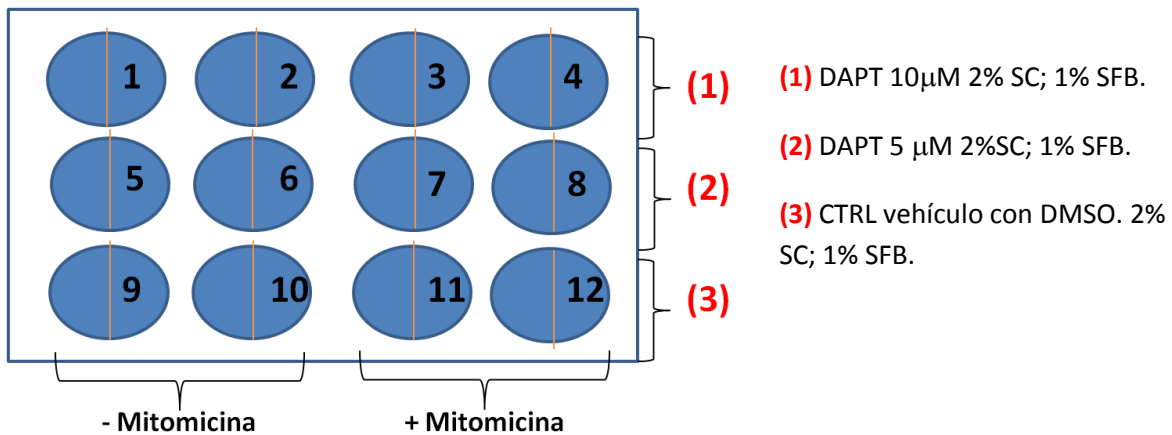
5- Inmediatamente después de aplicar el estímulo, se efectuó la toma de imágenes. La misma se llevó a cabo a las 0hs, 12hs, 24hs, 48hs y 72hs.

6-El estímulo con DAPT y vehículo se repuso día por día.

### Ensayos de herida con Mitomicina C.

Por otra parte, se realizaron ensayos de herida en los cuales se aplicó el fármaco Mitomicina C (Calbiochem 475820), con el objeto de frenar la duplicación celular. La Mitomicina C se aplicó entre los pasos 3 y 4 del protocolo anterior, es decir, luego del hambreado y con anterioridad a hacer a herida con el tip.

Se efectuó la incubación con Mitomicina C (10µg/ml) por una hora el mismo medio que se hizo el hambreado.



Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia “OLYMPUS CKX 41” utilizando un aumento 4x. Posteriormente la cerrazón de las heridas se cuantificó mediante el programa ImageJ 1.47 (National Institutes of Health, USA).

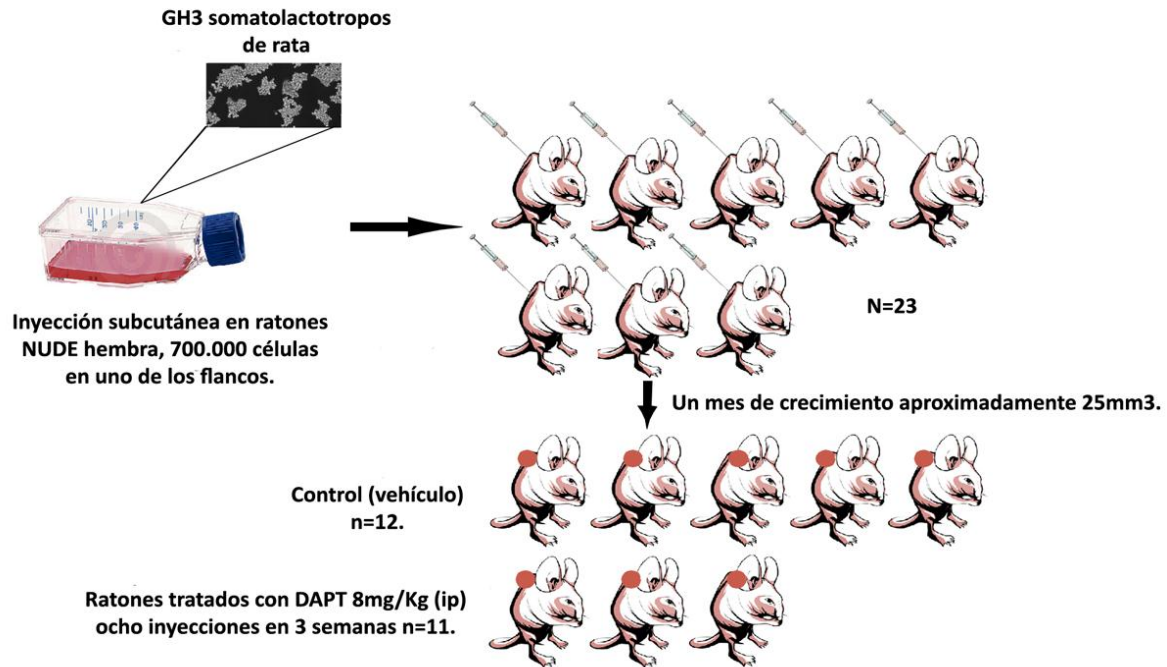
### **Generación de tumores xenotrópicos en ratones NUDE/NUDE a partir de la línea celular GH3.**

Teniendo células GH3 mantenidas en crecimiento según lo mencionado en **Técnicas de cultivo y líneas celulares:**

- 1) Se recogieron células GH3 usando 2 ml de tripsina-EDTA (0,05% de Invitrogen), se inactivó la tripsina mediante un exceso (20 ml) de medio F12K (con 15% SC, 2.5% SFB), se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm y 23°C.
- 2) El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS y luego se procedió a contar las células con una cámara de Neubauer.
- 3) Las células se resuspendieron de tal forma que quedaron 7 millones/ml en PBS.
- 4) Ratones hembra de la cepa NUDE/NUDE se anestesiaron con Xilacina 7mg/kg. Se inyectaron 700.000 células en uno de los flancos de los ratones NUDE hembra en aproximadamente un volumen de 100 µl; realizando únicamente un solo orificio y al retirar la aguja sosteniendo el punto de entrada con ambos dedos durante un minuto aproximadamente.
- 5) Posteriormente los tumores se midieron 3 veces por semana con un calibre milimetrado. Los tamaños de tumor se calcularon de la siguiente manera: lado más largo\*(lado más pequeño)<sup>2</sup>\*0,52. Simultáneamente se controló el peso de todos los animales, con el propósito de monitorear su correcto funcionamiento intestinal durante el tratamiento con la droga DAPT.

### Tratamiento con DAPT de tumores xenotrópicos en ratones NUDE/NUDE.

Los ratones NUDE/NUDE hembra inyectados subcutáneamente con la línea GH3 desarrollaron tumores xenotrópicos que se dejaron crecer durante aproximadamente 4 semanas. Cuando la masa tumoral llegó a un volumen de  $25\text{mm}^3$ , se trataron con la droga DAPT (inhibidor de  $\gamma$ -secretasa; Calbiochem Cat Nro: 565770) o con vehículo.



**Figura 8:** Esquema de los grupos experimentales generados en el ensayo de tumores xenotrópicos tratados con el inhibidor de  $\gamma$ -secretasa DAPT.

El tratamiento consistió en 8 inyecciones de dosis 8mg/Kg por cada animal durante tres semanas. Antes de comenzar con el tratamiento y durante todo el mismo se tomaron muestras de sangre de cola de cada uno de los animales, una vez por semana, con el objetivo de monitorear los parámetros hormonales. Al final del tratamiento se sacrificaron los animales por decapitación, de modo que la última muestra de sangre fue troncal. Se extirparon los tumores y se separaron masas de tejido para Western Blot y PCR en Tiempo Real.



Figura 9: Imágenes representativas de ratones NUDE/NUDE con tumores xenotrópicos: a la izquierda, tamaño de los tumores cuando comenzó el tratamiento; a la derecha, cuando terminó, el día de su extirpación.

## Bioinformática

ChIP-seq: Los conjuntos de datos crudos disponibles públicamente se obtuvieron de la base de datos “*Sequence Read Archive*” (SRA), como se muestra en la **Tabla 15 del ANEXO**, fueron alineados y procesados como se describe a continuación. Las secuencias fueron alineadas al genoma de rata (versión nr4) utilizando Bowtie 1.1.1 (118). Únicamente secuencias con  $\leq 1$  *mismatch* fueron retenidas. Luego de la alineación, el procesamiento de las lecturas de secuencia incluyeron extensión *in silico* y normalización de la señal, basada en el número de millones de lecturas mapeadas. Las lecturas fueron extendidas hasta un largo final equivalente a los fragmentos de estimación MACS (119) y solamente las lecturas únicas fueron retenidas. Para la normalización de la señal, el número de lecturas que mapean cada base en el genoma, fue contada utilizando el comando CoverageBed del BedTools (120). Los archivos procesados se visualizaron en el *browser* (121) para el genoma de UCSC <https://genome.ucsc.edu/>. Los sitios enriquecidos en ChIP-seq fueron detectados con MACS v1.4.0beta2 utilizando los parámetros *default*, y un valor de “p” de  $1e-5$ . Un conjunto de datos control obtenido de la secuenciación de DNA *input* fue utilizado para definir el *background*.

Posteriormente, las regiones regulatorias activas en las células GC fueron definidas como los sitios genómicos enriquecidos en H3K27ac+ que se superponían con la señal para H3K4me1+, también en células GC de rata. Para inferir los putativos sitios de unión de NOTCH1, el *liftover* de picos para NOTCH1 se obtuvo como reportó el grupo del Dr. Pear (122) del genoma de rata (rn4), y se buscó la superposición entre los sitios NOTCH1 y las regiones regulatorias activas obtenidas de las células GC. Para el análisis de *Gene Ontology*, los sitios putativos para la unión de NOTCH1 en las zonas regulatorias activas de las células GC fueron levantadas de genoma de ratón (mm9), las regiones fueron asociadas a genes y el análisis de *Gene Ontology* se hizo utilizando GREAT con la configuración default. Para ser más precisos en cuanto a la pertenencia tejido específica de las zonas regulatorias de interés para este trabajo, se bajó, realineó y analizo un conjunto de datos de ChIP-seq para PIT1 efectuado en células GC.

RNA-seq: Para las muestras de tumores hipofisarios, el conjunto de datos crudos fueron obtenidos desde la base de datos SRA. El conjunto de datos de hipófisis normales humanas utilizados en el análisis descrito en esta Tesis, fueron obtenidos desde dbGAP en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap> a través del número de acceso phs000424.v6.p1. La lectura cruda de las secuencias, su alineación y cuantificación de la expresión génica fue realizada con el suite Tuxedo (118; 123) (124).

Brevemente, las lecturas crudas fueron primero alineadas al genoma hg19 utilizando TopHat v2.0.12 (123), con los parámetros *default*, luego Cufflinks (124) fue utilizado, con parámetros *default*, para cuantificar los niveles de expresión como fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados “*fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*” (FPKM). Los análisis posteriores, incluyen la normalización de los niveles de transcripto y el análisis de su expresión diferencial utilizando las herramientas Cuffnorm y Cuffdiff (124). El conjunto de datos normalizados (6 muestras Control y 3 muestras tumorales, fue luego analizada utilizando *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) y los grupos de genes fueron seleccionados desde la base de datos *Molecular Signature Database* (Msigdb) (125). Particularmente se seleccionaron conjuntos de genes, “*Gene sets*”, relacionados con NOTCH, buscando componentes de la señalización de la vía que estén alterados en tumores hipofisarios humanos.

Estos análisis epigenéticos y de transcriptoma *in silico* nos sirvieron para seleccionar varios supresores tumorales o *enhancers* de NOTCH para ser evaluados en nuestros modelos: *Btg2*, *Nr4a1*, *Men1*, *Zfp36*, y *Cnot1*.

### **Análisis estadístico**

---

La distribución normal de los datos y la homogeneidad de la varianza se probaron en todos los casos. Análisis de varianza (ANOVA) seguido de test de Fisher se utilizó para analizar los receptores NOTCH, sus ligandos y la expresión de genes diana en modelos tumorales de rata versus hipófisis control.

Las pruebas estadísticas realizadas en los diferentes ensayos se llevaron a cabo utilizando el programa STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., EEUU), mientras que los supuestos fueron corroborados utilizando el programa Statistix 8.0. En la leyenda de cada figura, de la sección resultados, se indican las pruebas estadísticas utilizadas. En todos los casos los resultados fueron expresados como las medias  $\pm$  el error estándar de la media (E.S.M).

Sintéticamente, se utilizó Prueba de T en aquellas comparaciones entre sólo dos grupos, por ejemplo: la expresión génica de receptores NOTCH, ligandos y dianas en AtT20 vs hipófisis control; ratones *lacDrd2KO* vs *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* y en GH3, MMQ, Tumores GH3 vs hipófisis de rata. Se analizaron mediante ANOVA de dos factores para medidas repetidas (AMR) los datos obtenidos en los ensayos de proliferación en cultivo, los ensayos de herida, y los estímulos con DAPT en células en cultivo, los niveles de prolactina liberada el medio así como GH a lo largo del tratamiento con

DAPT. Además se utilizó este método para los datos obtenidos de volumen tumoral, cuando se trabajó con tumores xenotrópicos.

En los casos en los que fueron necesarias pruebas *post hoc* se realizaron comparaciones de Fisher o Dunnet, según corresponda.  $P < 0,05$  se consideró significativo. Comparaciones paramétricas o no paramétricas fueron llevadas a cabo según el cumplimiento o no de supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, y de ser necesario, se realizaron transformaciones de los datos.

## CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA NOTCH EN HIPÓFISIS Y LÍNEAS CELULARES HIPOFISARIAS MURINAS, NORMALES Y TUMORALES.

### Introducción del Capítulo I

Las células en organismos multicelulares necesitan descifrar las señales extracelulares en respuestas apropiadas incluyendo opciones de diferenciación correctas. Una parte considerable de esta información se transmite a través de un número sorprendentemente pequeño de vías de señalización, que son altamente conservadas a lo largo de la evolución y utilizadas en muchos tipos de células diferentes. Este grupo, que conforma un verdadero “núcleo duro” de los mecanismos de señalización, comprende las vías WNT/WINGLESS, BMP/ TGF $\beta$ , SONIC HEDGEHOG, receptores tirosina quinasas, receptores nucleares, JAK/STAT y, el Sistema Notch. Éste se define como todo el conjunto de receptores, ligandos, efectores río arriba de la vía e incluso efectores río abajo. Participan además agentes moleculares que condicionan la señalización del sistema, incluso de forma indirecta (108). La señalización de Notch no sólo se utiliza en muchos órganos diferentes, sino también reiteradamente y en forma específica durante la maduración de un órgano individual. En el desarrollo linfocitario hematopoyético, por ejemplo, cada diferenciación binaria importante, está gobernada en buena medida por elementos del Sistema Notch. Algunos trabajos incluso han demostrado que NOTCH no solo influencia procesos de diferenciación, sino que activamente determina un fenotipo celular. Esto se aprecia en especial en el sistema nervioso (108).

Varios componentes del Sistema Notch están expresados en el desarrollo de la hipófisis. Los receptores NOTCH2 y NOTCH3, por ejemplo, el ligando *Jagged1* y el efector HES1 (99; 100). Como se mencionó en la Introducción General, los receptores NOTCH y varios componentes de la vía se expresan en la SP de la pituitaria adulta (92; 96; 98; 126). También en la hipófisis de rata adulta, en la que Tando y sus colegas descubrieron que el Sistema Notch está involucrado en la proliferación de células foliculares positivas para la proteína S-100. Incluso, *Notch1*, *Notch2* y *Jagged1* colocalizan con el péptido S-100, mientras que la expresión de *Jagged2* predomina en su expresión en los melanotrofos (127). Recientemente, el mismo grupo de trabajo, identificó a E-CADERINA como un gen clave en la activación de NOTCH2. La adhesión celular que confiere la cadherina epitelial, sería indispensable para la activación del receptor (128).

Los efectos río abajo de la interacción NOTCH ICD-CSL no se conocen completamente, y menos aun en la hipófisis, pero se han identificado dos familias de factores básicos de transcripción hélice-lazo-hélice, HES y HERP (este último también conocido como HEY, HESR, HRT, CHF y GRIDLOCK) como objetivos transcripcionales inmediatos. La señalización de los receptores NOTCH eleva la expresión de *HES* y *HERP*, en virtud de los sitios de unión de CSL dentro de sus promotores, que a su vez reduce la expresión o bloquea la función de río abajo de efectores como NEUROGENIN, MASH y MYOD. Probablemente, la señalización por NOTCH a través de las familias HES y HERP, no sea exclusiva. Existe una evidencia cada vez mayor, de que la señalización por



NOTCH puede ocurrir por CSL pero sin involucrar a HES-HERP; o bien a través de mecanismos independientes de CSL. Los sitios de unión para CSL están presentes en numerosos genes, y *Ciclina D1* (129), *Ciclina D3*, *p21* (130), Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (131) y NODAL (132), entre otros pueden estar influenciados en su nivel de expresión por la señalización de NOTCH (108).

Se ha vinculado una sobreactivación de la vía NOTCH con adenomas hipofisarios agresivos, sin embargo esto no ha sido comprobado fehacientemente. No existe en la literatura una completa descripción de todos los efectores de NOTCH (receptores, ligandos, efectores río abajo, etc.) en situaciones fisiológicas de normalidad de la glándula, ni en modelos patológicos. Hay pocos estudios reportados que evalúan al sistema NOTCH en adenomas secretantes de ACTH, en tumores no funcionantes y algunos modelos de prolactinoma (133).

Sin embargo, debido a que la función NOTCH y los componentes del sistema pueden diferir sustancialmente dependiendo del tipo de celular, el tejido, y cada tipo de cáncer, es vital caracterizar la expresión génica y la activación en cada tipo de adenoma de hipófisis. Un análisis exhaustivo de estas características, no ha sido realizado hasta el momento en los adenomas pituitarios. En este capítulo se presenta un análisis comparativo del patrón de expresión en la hipófisis y líneas celulares hipofisarias murinas de componentes del Sistema Notch: receptores, ligandos y genes blancos.

Se recurrió a diferentes modelos de rata y ratón con tumores hipofisarios. Se tomaron hipófisis normales de ratones hembra Balb/c y C57 y de ratas hembra Sprague Dawley, líneas celulares provenientes de tumores secretantes de ACTH en ratón (AtT20), líneas celulares de rata provenientes de tumores secretantes de prolactina y GH (GH3) o de prolactina únicamente (MMQ), y tumores xenotrópicos generados a partir de estas mismas líneas celulares. Incluso se trabajó con ratones knockout que desarrollan prolactinomas, modelo que fue generado en nuestro grupo de trabajo en colaboración con el Dr. Marcelo Rubinstein (el ratón con delección selectiva del RD2 en células lactotropas de la hipófisis o lacDrd2KO).

### **Modelos experimentales de Prolactinoma**

---

Existen varios modelos ampliamente utilizados para el estudio de los prolactinomas, algunos de ellos son los prolactinomas de ratas generados por administración farmacológica de estrógenos en forma crónica (134; 135), los prolactinomas desarrollados espontáneamente en ratas seniles (136), y animales transgénicos como ratones que sobreexpresan GALANINA en lactotropos (137), TGF $\alpha$  (138), NGF (139), un receptor truncado tipo 4 del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (140) o ratones knockout para el receptor de prolactina (141). Otro modelo muy usado es el knockout total del RD2 (*Drd2*<sup>-/-</sup>) (116; 142) (143) (30) (144) (143; 145). En esta Tesis Doctoral, utilizamos el ratón KO condicional lacDrd2KO que describiremos a continuación.

---

### **Ratón KO condicional lacDrd2KO: modelo de prolactinoma resistente a agonistas dopaminérgicos**

---

En nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Rubinstein, desarrollamos un ratón knockout tejido específico, que carece de RD2s funcionales solamente en lactotropos (146; 147). Utilizamos la técnica CreLoxP en la cual se generan por técnicas convencionales ratones transgénicos homocigotas con el gen a deletar floxeado, y se cruzan con un segundo ratón transgénico que contiene el transgén Cre bajo el control transcripcional de un promotor tejido o célula específico. En la progenie homocigota para el gen floxeado y que porte el transgén Cre simultáneamente, se producirá recombinación Cre/loxP, y por lo tanto se delecionará el gen floxeado. Esto sucede porque la enzima Cre, reconoce como sitios de corte las secuencias loxP, y ocurre solamente en aquellos tipos celulares en los cuales el promotor asociado a Cre sea activo.

En nuestro caso particular los ratones que carecen de RD2s funcionales solamente en lactotropos se obtuvieron por medio de la cruce de dos ratones transgénicos previamente desarrollados: los ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup> (los cuales poseen el exón 2 del RD2 flanqueado por secuencias específicas LoxP) (114) y los ratones transgénicos que poseen la expresión de la enzima recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de prolactina [Tg(Prl-cre)1Mrub] (148).

Para validar el modelo, determinamos la especificidad de la expresión de esta enzima mediante el análisis de niveles de *ARNm* de Cre en diferentes tejidos. Observamos altos niveles de Cre hipofisarios, y niveles mínimos o ausentes en hipotálamo, hígado, riñón, ovario y pulmón. A su vez, estudiamos la actividad de la enzima Cre recombinasa en hipófisis. Para ello, se cruzó al ratón [Tg(Prl-cre)1Mrub] con un ratón reportero que expresa la proteína fluorescente TD-TOMATO como resultado de la recombinación mediada por Cre. Mediante el análisis de células doble positivas (para prolactina y la proteína TD-TOMATO) demostramos que la enzima Cre se encuentra activa en el 96% de las células productoras de prolactina y que esta actividad es altamente específica (148). Los ratones lacDrd2KO generan hipófisis adenomatosas significativamente mas grandes que los ratones WT, con niveles de prolactina séricos considerablemente mayores desde el primer mes de vida hasta los 11 meses de edad (149). No hay diferencias en el crecimiento corporal, es decir el eje de GH está conservado. El ratón lacDrd2KO es un excelente modelo para el estudio del Sistema Notch en prolactinomas resistentes, y por ello estudiamos la variación de los componentes de la vía de NOTCH en comparación con hipófisis normales (ratones *Drd2*<sup>loxP/loxP</sup>).

---

### **Modelo experimental de tumores xenotrópicos a partir de la línea GH3 en ratones NUDE/NUDE.**

---

El modelo de tumores xenotrópicos es ampliamente utilizado en la investigación oncológica preclínica (150-152). En nuestro caso, utilizando como punto de partida la línea celular GH3, se generaron tumores mediante la inyección subcutánea de dichas células en el flanco de ratones hembra de la cepa NUDE/NUDE (ver detalles en **Materiales y Métodos**). Al cabo de tres semanas, se comienza a percibir la aparición de una pequeña masa tumoral de aproximadamente 3mm de diámetro (**Figura 9 Materiales y Métodos**).

Estos pequeños tumores pueden ser monitoreados en su crecimiento fácilmente mediante toma de imágenes, y con la utilización de un calibre, midiendo el ancho y largo para calcular su volumen. De esta forma, se pueden tratar a los animales con fármacos que interfieran diferentes vías, y en función de ello hacer un seguimiento no solo del tumor, sino de diferentes variables fisiológicas del animal. Es por esto que este modelo nos resultó de suma utilidad, no solo en la caracterización del Sistema Notch, también, posteriormente para averiguar el papel de los receptores NOTCH en la progresión tumoral.

### **Líneas celulares GH3, MMQ y AtT20 como herramientas complementarias en el estudio de adenomas hipofisarios**

---

A lo largo de esta Tesis Doctoral utilizamos como herramienta para el estudio de prolactinomas a las líneas celulares GH3 y MMQ. Además, como herramienta para el estudio de corticotropinomas, recurrimos a la conocida línea AtT20.

La línea celular GH3, es uno de los mejores instrumentos utilizados en el estudio *in vitro* e *in vivo* de prolactinomas. Se la generó tratando ratas con grandes cantidades de estrógenos, administración que habitualmente genera tumores en las hipófisis de estos animales (153; 154). Al extraer uno de estos tumores, y utilizando técnicas de cultivo celular se dio origen a la línea en la década del 60' (155). Como peculiaridad interesante, esta línea celular carece de los RD2, lo cual constituye una de las principales características de los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. Este rasgo, manifiesta la excelente calidad como herramienta experimental para el estudio de somato-prolactinomas, lo cual permite la descripción *in vitro* e *in vivo* de elementos moleculares y rasgos fisiológicos importantísimos de la patología tumoral hipofisaria. Es conocida la propiedad de esta línea de secretar grandes cantidades de GH y prolactina, en cultivo celular o en experimentos *in vivo* (155-160).

Contrariamente a lo que ocurre con las células GH3, la línea celular MMQ sí expresa los RD2. También es una línea clonal aislada desde un tumor de rata. Tiene la capacidad de secretar solamente prolactina. Se ha reportado que esta capacidad secretoria puede ser modificada con el estímulo con dopamina o análogos. Con lo cual en este caso, esta línea constituye una herramienta de estudio tumoral *in vitro* e *in vivo*, pero de aquellos tumores que poseen los RD2. También se ha observado que las células MMQ responden a somatostatina, estrógenos, progesterona, y acetilcolina (161). Esta línea se ha utilizado como prolactinoma experimental en el testeo de agonistas de estrógenos en el tratamiento antitumoral. Es interesante destacar, que en el efecto antitumoral de los análogos estrogénicos, participa la vía de WNT/ $\beta$ -CATENINA, muy emparentada con NOTCH y mecanismos de "stemness" (162; 163).

La línea de corticotropos AtT20, fue generada de forma similar a las dos anteriores. Tumores de ratón productores de hormonas, en este caso secretores de ACTH provenientes de la hipófisis anterior fueron disgregados y cultivados *in vitro*, y mediante diferentes estrategias luego de varios pasajes, se los reinyectó en ratones nuevamente, para obtener nuevos tumores. Todo el proceso, se repitió varias veces, chequeando la actividad secretoria hormonal de los tumores en cada paso.

Con este procedimiento, se aumenta la capacidad secretoria de las células y se seleccionan las células con mayor resistencia a la manipulación en cultivo celular (164). Esta línea celular es ampliamente utilizada en el campo endocrinológico (165-167) y del estudio de la patología tumoral hipofisaria (95; 100), constituye una herramienta indispensable en nuestro caso por ser uno de los instrumentos más conocidos *in vivo* e *in vitro* en el estudio de corticotropinomas.

## OBJETIVOS DEL CAPÍTULO I

En base a los antecedentes mencionados, en este primer capítulo nos propusimos caracterizar los distintos componentes del sistema NOTCH hipofisario y determinar si existen alteraciones de los mismos en modelos de prolactinomas y corticotropinomas experimentales en relación a hipófisis normales.

### **Objetivos específicos:**

---

- 1) Cuantificar la proteína y el *ARNm* de cada uno de los cuatro receptores NOTCH en los diferentes modelos de hipófisis tumorales, así como en las hipófisis normales de rata y ratón. Se incluyen en el análisis las líneas celulares AtT20, GH3, y MMQ.
- 2) Cuantificar distintos ligandos y componentes río abajo del Sistema Notch en cada uno de los modelos y líneas celulares hipofisarias; relacionar los niveles de expresión de los efectores con el contexto fisiológico de la glándula, y el tipo y los niveles de expresión de receptor NOTCH en cada caso.

## RESULTADOS DEL CAPÍTULO I

### El Sistema Notch es expresado en diferentes tipos de prolactinomas experimentales

Con el objetivo de determinar la expresión relativa de cada receptor NOTCH en distintos modelos experimentales y líneas celulares de prolactinoma y somato-prolactinoma, primero se efectuaron PCRs en Tiempo Real (qRT-PCRs) para los cuatro receptores *Notch* en las líneas celulares de rata derivadas de prolactinomas MMQ (células secretoras de Prolactina) y GH3 (secretoras de GH y Prolactina), y en el modelo *in vivo* de tumores xenotrópicos generados por la inyección de células GH3 de forma subcutánea en ratonas NUDE/NUDE, comparando la expresión de los cuatro *Notch*, con los niveles encontrados en hipófisis de rata normales control.

Las líneas celulares GH3 y MMQ, e incluso los tumores *in vivo* de GH3 expresan los *ARNm* de los cuatro *Notch*, y se observó para todos los modelos y líneas celulares de prolactinomas que el *Notch2* era el que más se expresaba (menor delta CT), y en segundo lugar el *Notch1* (Tabla 7).

NOTCH receptor	ΔCT-ES			
	GH3	MMQ	GH3tumor	Hipófisis
Notch1	14,99	17,02	13,20	10,79
ES Notch1	1,0	1,0	1,2	0,9
Notch2	9,27	8,87	8,84	7,60
ES Notch2	0,4	0,4	0,4	0,2
Notch3	18,14	18,97	15,77	9,60
ES Notch3	1,0	0,8	1,1	0,9
Notch4	18,45	17,98	14,57	12,62
ES Notch4	1,1	0,8	1,2	0,5

Tabla 7: ΔCTs de los genes examinados en la Figura 12, para la línea celular GH3, Hipófisis normales de ratas Sprague Dawley, la línea MMQ, y el tumor xenotrópico.

Por otro lado, los receptores parálogos (*Notch1, 3,4*) mostraron menores niveles de *ARNm* en las líneas celulares, comparando su expresión con las hipófisis control. En el caso de los tumores xenotrópicos solamente el *Notch3* tuvo menor expresión que la hipófisis normal. El *Notch2*, en cambio, no mostró diferencias con los niveles observados entre las líneas, tumor e hipófisis normales (Figura 10 A).

Sin embargo, cuando se cuantificó la proteína mediante Western Blot, se observó que el NICD de NOTCH2 (es decir los receptores en su estado molecular luego del clivaje S2, pero antes del clivaje S3 por la  $\gamma$ -secretasa) estaba significativamente incrementado en las células de prolactinoma MMQ. Por otra parte, N1ICD o el dominio activo de NOTCH1, está más alto en tumores GH3 *in vivo* en comparación con las líneas celulares de prolactinomas. N3ICD por el contrario, no mostró diferencias significativas entre los modelos tumorales y las glándulas normales (Figura 11 A, C).

Por otro lado, los dominios de membrana de los receptores NOTCH, no mostraron diferencias en los distintos modelos tumorales y líneas celulares, con excepción del dominio de membrana de NOTCH3, que mostró una menor expresión en los modelos de prolactinomas en comparación con las pituitarias normales (**Figura 11 B, C**). La expresión de los ligandos de NOTCH, *Jagged1* y *Dll1* fue más alta en células GH3 que en células de hipófisis control (**Figura 10 B**).

El análisis llevado a cabo para los genes diana río abajo de NOTCH *Hes1*, *Hey1* y *Hey2* demostró una activación variable; se observaron diferencias en la expresión entre líneas celulares clonales, tumores xenotrópicos e hipófisis normales. Esta variabilidad en la activación de la vía, observada como distintos niveles de expresión de efectores río abajo, refleja la diferencia de patrones de activación de genes que se da en células normales, en comparación con las tumorales e incluso, entre los fenotipos tumorales. En particular, la expresión de *Hes1* predominó en hipófisis normales de rata cuando se comparó con los modelos de prolactinoma *in vivo* e *in vitro*; *Hey1* mostró niveles más altos en los tumores provenientes de GH3 en relación a las células MMQ y la hipófisis normal, mientras que el gen diana *Hey2* fue detectado en el modelos de tumores xenotrópicos GH3 y en la hipófisis normal pero estaba prácticamente ausente en las línea celulares de prolactinoma MMQ y GH3 (**Figura 10 C**).

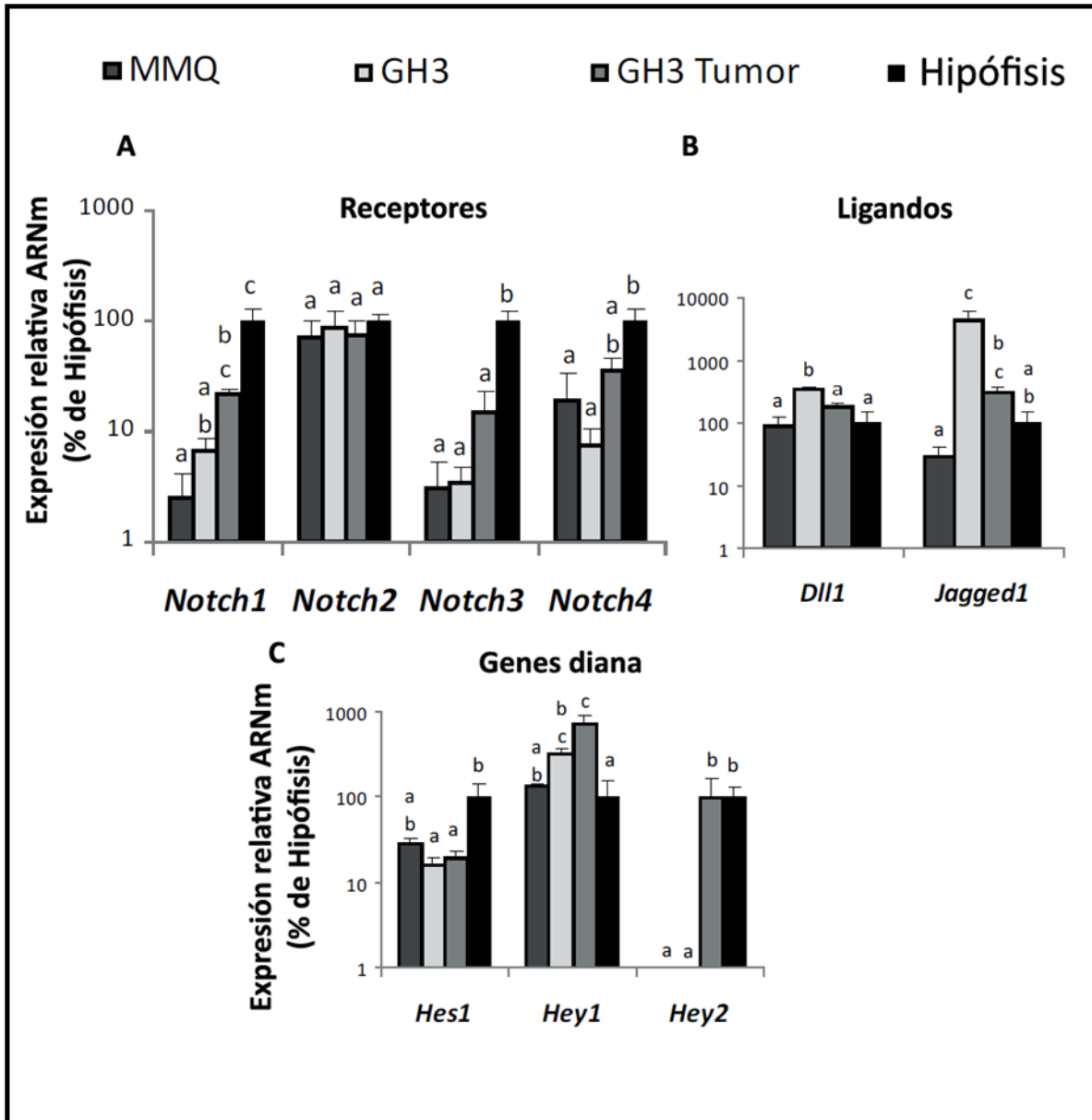


Figura 10: Patrón de expresión de *ARNm* de diferentes componentes de la vía de señalización *Notch* en modelos de rata: prolactinoma e hipófisis normales. A-C) Expresión diferencial normalizada al gen GAPDH y expresada como porcentaje de cambio de las hipófisis normales, cuyo nivel de expresión fue considerado 100%, en MMQ, GH3, GH3 tumores xenotrópicos *in vivo* y pituitarias de rata determinados por qRT-PCR. Para las figuras de este panel, las diferentes letras colocadas por encima de las columnas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los distintos grupos. (A) Receptores NOTCH1-4  $n = 4-5, 5, 4, 4-6$  para MMQ, GH3, modelo de tumores *in vivo* GH3, e hipófisis de rata. (B) Ligandos de NOTCH *Dll1* y *Jagged1*  $n = 3, 3, 3, 2$  y en (C) genes Diana de NOTCH: *Hes1*, *Hey1* y *Hey2*  $n = 3, 3, 3, 2$  para MMQ, GH3, tumores xenotrópicos GH3 y pituitarias de rata, respectivamente.



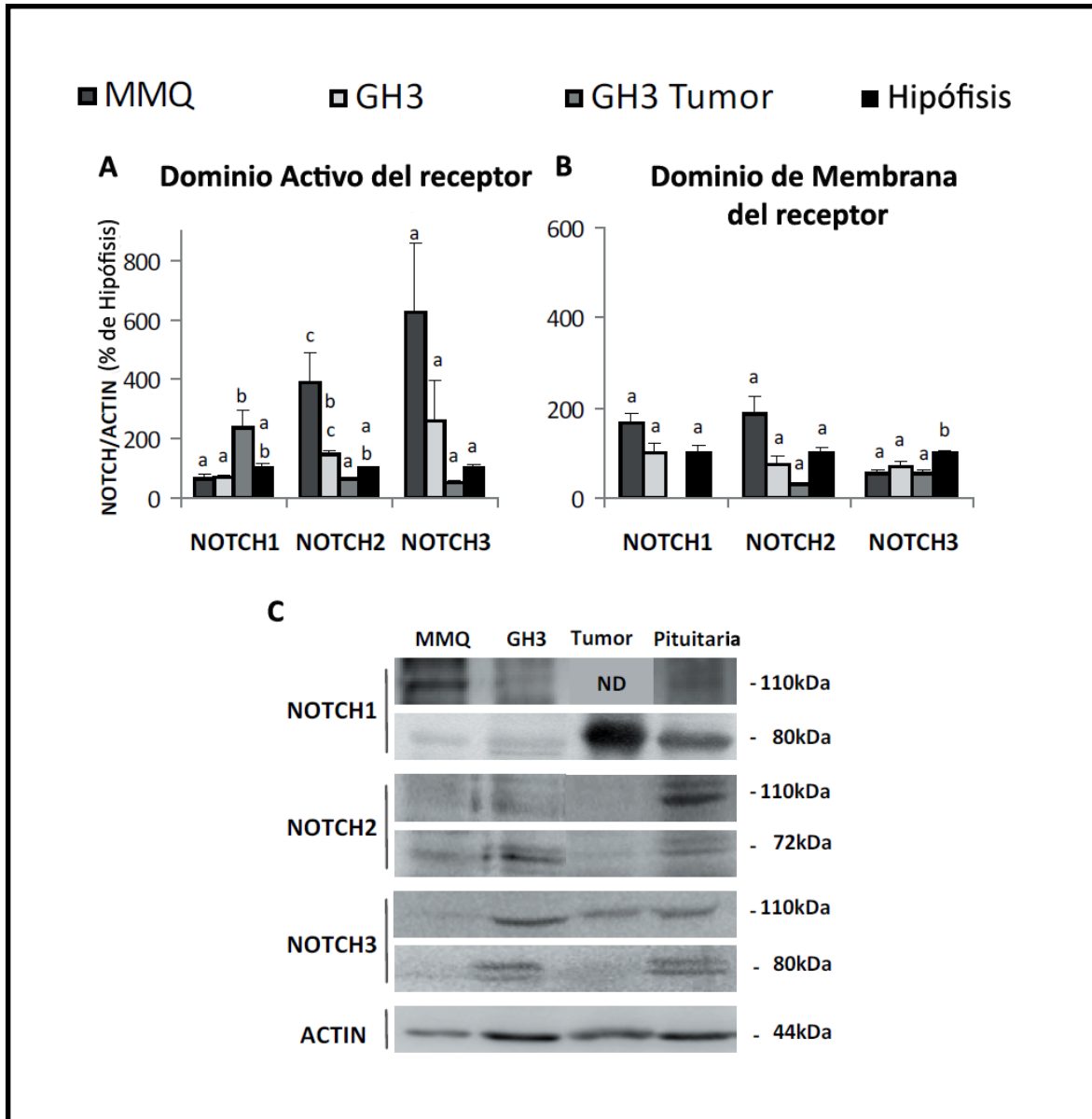


Figura 11: Patrón de expresión de la proteína de diferentes componentes de la vía de señalización NOTCH en modelos de rata: prolactinoma e hipófisis.

A-B) Los dominios activos y de membrana de los receptores NOTCH1-3 fueron medidos por Western Blot. Las columnas muestran el promedio del nivel de expresión del receptor, relativizado a la el control de carga Actina; expresado como porcentaje de la señal para cada receptor de hipófisis de rata normal. (A) Dominios activos (80KDa): n = 5-6; 5, 3, 6. (B) Dominios de membrana (110KDa): n = 3-6, 2-5, 0-3, 3-6 para MMQ, GH3, tumores xenotrópicos GH3 y pituitarias normales de rata.

(C) Western Blots representativos mostrando los dominios activos y de membrana de los cuatro receptores NOTCH para MMQ, GH3, tumores xenotrópicos GH3 *in vivo* y pituitarias normales.

### La vía de NOTCH está activa en la línea celular de corticotropinoma AtT20

Se estudió la expresión del Sistema Notch en el modelo murino de corticotropinoma, la línea celular AtT20 derivada de corticotropinoma de ratón (164). Utilizando la técnica de qTR-PCR se

determinó la expresión del *ARNm* de cada receptor *Notch*, comparando con la expresión de *Notch* en hipófisis control. Se observó que el *ARNm* de *Notch1*, *Notch2* y *Notch4* tenían niveles similares en la línea AtT20 y pituitarias adultas normales, mientras que el *ARNm* de *Notch3* estaba marcadamente reducido en las células tumorales corticotropas, comparando con la hipófisis normal de ratón adulto (**Figura 12 A**). Se estudió la presencia relativa de cada receptor evaluando su  $\Delta$ CT con respecto al housekeeping *GAPDH*, y se pudo establecer que el *Notch1* y *2* son los de mayor expresión en células AtT20, mientras que en hipófisis normales prevalece el *Notch3*, y luego tanto *Notch2* como *Notch1* (**Tabla 8**).

Receptor	AtT20 ( $\Delta$ CT)	Balb/c ( $\Delta$ CT)
<i>Notch1</i>	6,32	6,32
ES <i>Notch1</i>	0,16	0,73
<i>Notch2</i>	6,54	6,35
ES <i>Notch2</i>	0,32	0,53
<i>Notch3</i>	11,68	6,03
ES <i>Notch3</i>	1,02	0,50
<i>Notch4</i>	9,67	9,00
ES <i>Notch4</i>	0,93	0,11

Tabla 8:  $\Delta$ CTs de los genes examinados en la Figura 14, para la línea celular AtT20 y las Hipófisis normales provenientes de ratones hembra Balb/c.

También se analizaron los *ARNm* de los ligandos *Dll1* y *Jagged1*, y se encontraron niveles significativamente más altos de *Jagged1* en células AtT20 en comparación con células de hipófisis normal, y niveles disminuidos de *Dll1* para la misma comparación (**Figura 12 B**). Al analizar los genes diana de la vía de NOTCH, *Hes1*, *Hes5* y *Hey2*, se detectó un patrón particular para cada marcador: *Hes1* presentó mayores niveles de expresión en corticotropos derivados de tumor adrenocorticotrópico, mientras que *Hes5* y *Hey2* estaban disminuidos en la línea celular, en comparación con las hipófisis normales. *Hey2* prácticamente estaba en los límites de detección de la técnica en células AtT20. Estos resultados, probablemente estén relacionados con la función específica que desempeñen en hipófisis normales y neoplásicas (**Figura 12 C**).

El mismo tipo de análisis se efectuó a nivel de proteína. Se focalizó en los dominios intracelulares de NOTCH1-3. Se observó mediante Western Blot que los NICD (de aproximadamente 80 kDa) de los tres receptores estaban significativamente aumentados en las células tumorales en comparación con la hipófisis normal. Esto sugiere que los receptores están activados en la línea de corticotropinomas (**Figura 13 A, C**). Este resultado es acorde con los vastos reportes de agresividad ligados al aumento de los receptores NOTCH en su forma activa en otro tipo de tumores, pero que no había sido descrito hasta el momento en corticotropinomas (168-170). Cuando fueron analizados los dominios de membrana de los tres receptores NOTCH no se encontraron diferencias entre AtT20 y la hipófisis normal (**Figura 13 B, C**).

Por lo tanto, a la luz de los resultados presentados aquí que muestran altos niveles de receptores NOTCH activos y los ligandos de NOTCH *Jagged1* tanto en células AtT20 como en la línea GH3, puede inferirse una activación del sistema NOTCH en líneas tumorales hipofisarias.

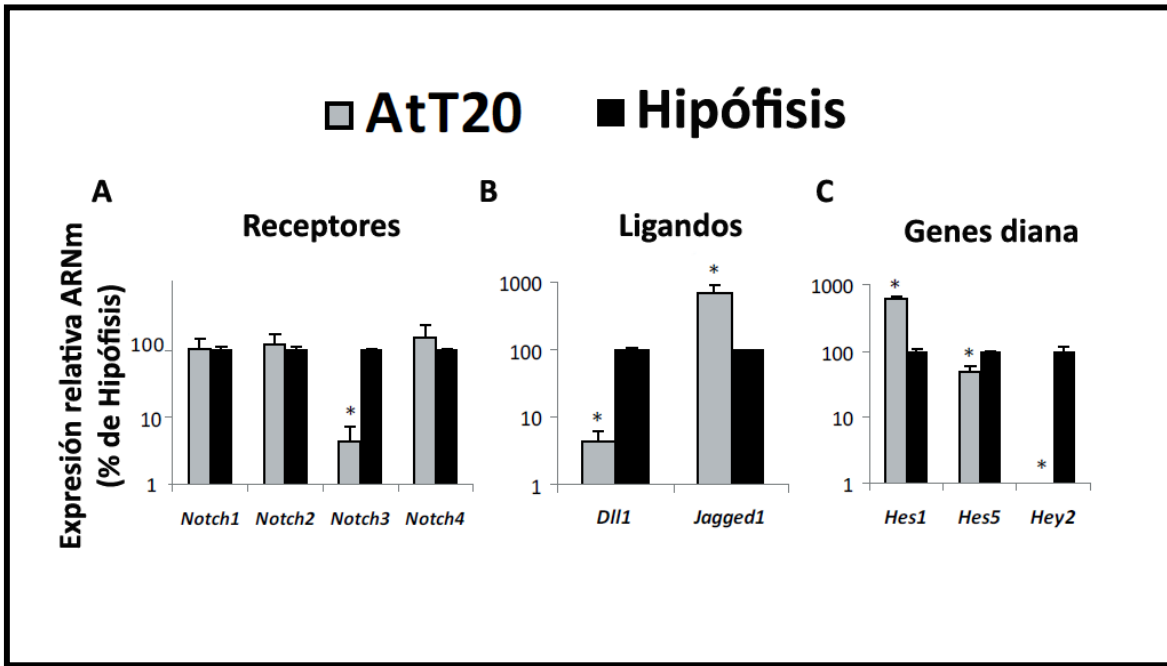


Figura 12: Expresión del *ARNm* de componentes del Sistema Notch en células corticotropas tumorales e hipófisis normales. A-C) Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* en AtT20 e hipófisis de ratón cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de las hipófisis normales, las cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideró 100%. \*  $p = 0.0003$  para *Notch3*, *Notch1,2,4* no significativo NS,  $n = 3-5$ ;  $3-8$  para AtT20 y pituitaria respectivamente (A),  $p = 0.0111$  y  $p = 0.0105$  para los ligandos de NOTCH *Dll1* y *Jagged1*, respectivamente vs hipófisis y (B)  $p = 0.0016$ ,  $0.0184$  y  $0.0032$  para los genes diana de NOTCH *Hes1*, *Hes5* and *Hey2*, respectivamente, vs hipófisis  $n = 2-3$ ;  $3$  AtT20 e hipófisis respectivamente (C).

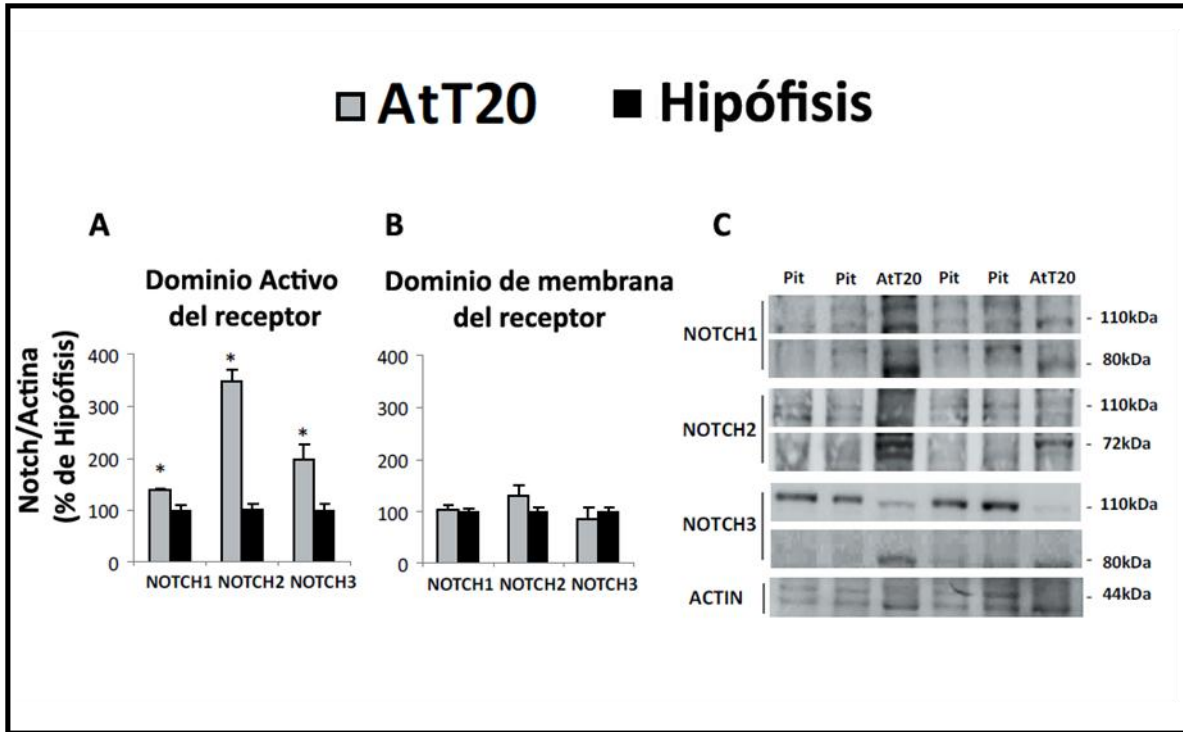


Figura 13: Expresión de la proteína de componentes del Sistema Notch a nivel proteico en células corticotropas tumorales e hipófisis normales. A, B) Niveles de NICD y dominio de membrana de los receptores NOTCH1-3 determinados por Western Blot: las barras muestran el promedio de las determinaciones de los receptores normalizado a los niveles de ACTINA, expresados como porcentaje de la hipófisis normal de ratón. \*  $p = 0.026$  para NOTCH1,  $p < 0.0001$  para NOTCH2 y  $p = 0.0146$  para NOTCH3 vs hipófisis para el dominio activo o NICD (80KDa)  $n = 3-6$ ; 5-7 para AtT20 e hipófisis respectivamente (A). No se encontraron diferencias significativas en el dominio de membrana (110 KDa)  $n = 3-6$ ; 3-7 para AtT20 e hipófisis respectivamente (B). Se muestran Western Blots representativos con las bandas del NICD y el dominio de membrana de cada uno de los receptores NOTCH en pituitarias normales (Pit) y células AtT20 (C).

### El Sistema Notch está sobreexpresado en los prolactinomas generados *in vivo* en el ratón *lacDrd2KO*.

El Sistema Notch se encontró altamente sobreexpresado en prolactinomas provenientes de ratonas hembra que carecen de los RD2 exclusivamente en las células lactotropas de la pituitaria. Los niveles de los receptores NOTCH fueron menores en las hipófisis de las ratonas hembra *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, que corresponden a los animales control sin delección alguna de RD2. El *ARNm* de *Notch1* y *Notch3* estaba en niveles significativamente más altos en las hipófisis de *lacDrd2KO* (Figura 14 A). Es más, cuando se midieron las proteínas por Western Blot se encontró que el N1ICD estaba significativamente incrementado al igual que los dominios de membrana de NOTCH2 y NOTCH3 en las hipófisis tumorales (Figura 15 A-C).

De forma inesperada, evidencias opuestas se encontraron cuando el análisis se efectuó con ligandos de la vía de NOTCH. No se observaron diferencias en la expresión del *ARNm* de *Dll1* o *Jagged1* entre *lacDrd2KO* o ratones controles (Figura 14 B). Por el contrario, *Hes1*, gen blanco de NOTCH, se encontraba significativamente reducido en las hipófisis de *lacDrd2KO* en comparación

con ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, mientras que se encontraron niveles de expresión similares en los genes diana *Hes5* y *Hey2*, al medirlos por qRT-PCR (Figura 14 C).

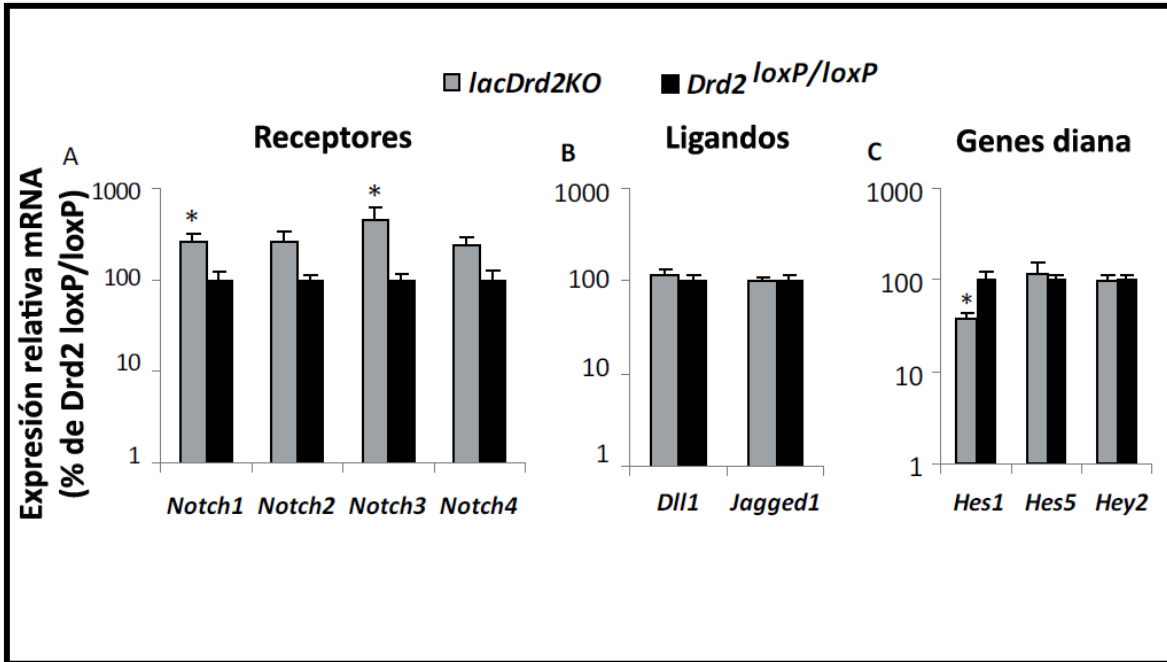


Figura 14: Los prolactinomas provenientes de las ratonas hembra lacDrd2KO tienen sobreexpresados los *ARNm* de tres receptores Notch. A-C) Expresión de genes medidos por qRT-PCR en hipófisis de lacDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* controles, normalizadas al gen *GAPDH* y expresadas como porcentaje de la expresión en hipófisis normales, considerada como 100%. Las columnas muestran el valor promedio. *Notch1* \*  $p = 0.0431$ , *Notch3* \*  $p = 0.0089$  vs. *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*; *Notch2*, 4 NS,  $n = 7, 5$  para ratones lacDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, respectivamente (A). Los ligandos de NOTCH *Dll1* y *Jagged1* NS (B), y los genes diana de NOTCH *Hes1* (\* $p = 0.0106$  lacDrd2KO vs. *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*), *Hes5* y *Hey2*, NS (C);  $n = 7, 5$  para ratones lacDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*, respectivamente.

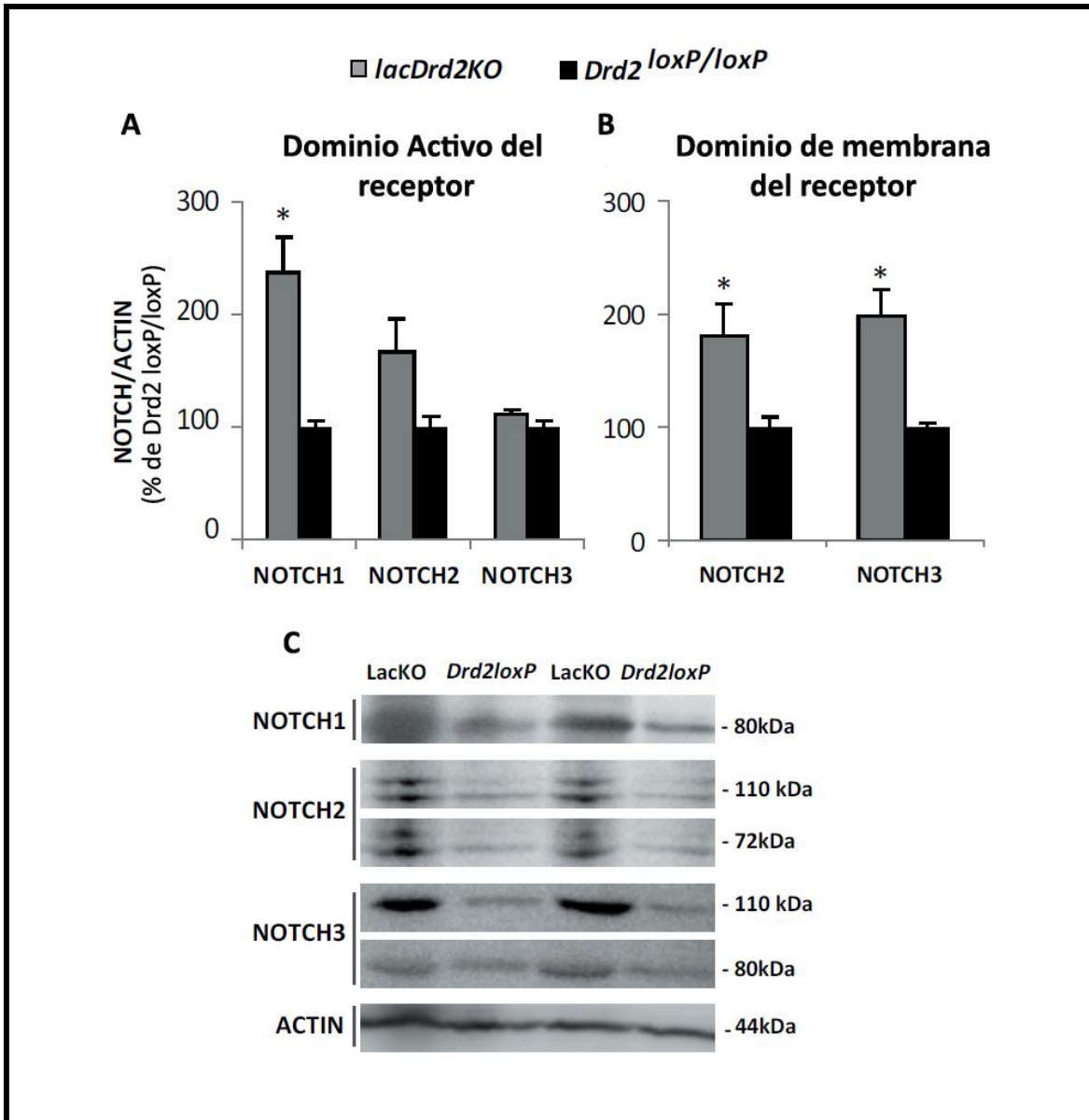


Figura 15: El N1ICD está significativamente aumentado en hipófisis tumorales de ratones Knockout.

A-B) La expresión de los dominios activos y de membrana de los receptores NOTCH1-3 fueron medidos por Western Blot, relativizados a su correspondiente nivel de ACTINA, y expresado como porcentaje del promedio de las hipófisis *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. \*  $p = 0.01$  para NOTCH1, NOTCH2, 3 NS dominio activo (NICD),  $p = 0.0604$  y  $p = 0.0042$  para NOTCH2 y NOTCH3 dominios de membrana, respectivamente para ratones lacDrd2KO vs *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. n=4, 3-4 para lacDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. Western Blots representativos mostrando el dominio activo y de membrana de los receptores NOTCH en lacDrd2KO y *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>* (C).

## DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO I

El Sistema Notch es una vía ampliamente conservada en los mamíferos superiores (87; 100; 170). Los receptores NOTCH cumplen importantes funciones en el equilibrio entre diferenciación y proliferación celular (171). Modulan la expresión de inhibidores del ciclo celular promoviendo la salida del mismo; tienen un papel destacado durante el desarrollo y también en patologías que implican transformaciones neoplásicas en una gran variedad de organismos multicelulares (112; 170; 172-175). En particular, en la hipófisis, el sistema Notch regula la cantidad de células precursoras que se encuentran en la glándula, el tamaño de la misma, y también la diferenciación y el destino celular (176).

Los genes que son importantes durante el desarrollo o la diferenciación a menudo contribuyen a la promoción y supervivencia tumoral cuando se desregulan. En este contexto, la señalización NOTCH ha sido asociada con varios cánceres humanos, incluyendo leucemia linfoblástica aguda de células T, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular y cáncer de próstata (176; 177). Es importante destacar que la señalización por el Sistema Notch, puede tener efectos inhibitorios o estimuladores del crecimiento tumoral, dependiendo del contexto fisiológico y tisular en que se encuentre. Por ejemplo, en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, la función NOTCH parece ser oncogénica, y los inhibidores de  $\gamma$ -secretasa, que inhiben la activación del receptor NOTCH, muestran actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (178). Por el contrario, en cáncer de próstata NOTCH podría ser considerado como un supresor tumoral, sobre todo en el inicio del proceso tumorigénico, cuando el gen blanco de NOTCH, *Hey1*, está activo. Este último marcador actúa como cofactor del receptor de andrógenos inhibiendo genes blanco involucrados en la progresión del cáncer de próstata (179). La complejidad del sistema, y los numerosos y variados efectores río abajo de la señalización, hacen que en algunas patologías se haya visto que los diferentes receptores NOTCH parálogos tengan papeles opuestos. Por ejemplo, se ha descrito que NOTCH1 y NOTCH3 tienen papeles dispares de NOTCH2 en cáncer de vejiga (180).

Esta complejidad no está ausente en la glándula pituitaria donde los receptores NOTCH2 y NOTCH3 se expresan durante la embriogénesis de la hipófisis del ratón y se ha encontrado que desempeñan un papel clave en la especificación celular durante el desarrollo de la glándula (171; 181; 182). Además, en ratones adultos, el grupo de Vankelecom describió altos niveles de transcripción de *Notch1* y *Hes1* en el SP de las células de la hipófisis que muestran las características de células madre o progenitores (92) en comparación con la expresión en la población principal (MP). También determinaron que *Notch2-4* y *Hes5* se acumularon predominantemente en el SP de pituitarios de ratones adultos, y que la activación de la vía NOTCH en este compartimento indujo un aumento de la tasa de proliferación celular (98).

Teniendo en cuenta esta multiplicidad en los roles, en cuanto a variedad de efectores, que muestra la vía de señalización entendimos que para el estudio experimental de tumores

hipofisarios era de suma importancia contar con una caracterización precisa de su expresión en la hipófisis en los modelos experimentales de rata y ratón con los cuales trabajamos.

Los resultados que obtuvimos para modelos tumorales hipofisarios y líneas celulares comparado con glándulas normales revelaron diferencias significativas en la calidad, cantidad y activación de los componentes de la señalización de NOTCH.

En la línea celular derivada de corticotropinoma AtT20, la sobreactivación de NOTCH puede ser afirmada por los niveles sustancialmente elevados del ligando *Jagged1*, y de la fracción clivada activa (NICD) de los NOTCH1-3 en comparación con la hipófisis normal de ratón. Sabiendo que el dominio intracelular activo liberado al citoplasma es necesario para que la señalización por NOTCH esté encendida, la elevada relación NICD/dominio de membrana encontrada en la línea celular AtT20 (sobre todo de NOTCH1), indica una acrecentada cantidad de receptor clivado en S3, un proceso molecular que es fundamental para el efecto de NOTCH en el crecimiento tumoral o por lo menos en su mantenimiento. Además, una mayor expresión del gen diana *Hes1*, pero menor de *Hey2* y *Hes5* en células AtT20 en comparación con pituitarias de ratón, sugiere que *Hes1* puede ser un mejor candidato en la señalización NOTCH en los corticotropinomas pituitarios y que ni *Hey2* ni *Hes5* participarían en las acciones del Sistema Notch en las células derivadas de corticotropinoma. En concordancia con la activación de NOTCH en este tipo de tumor hipofisario, en el único estudio publicado del Sistema Notch en corticotropinomas humanos, se encontró una sobre expresión del ligando *Dll4* en comparación con craneofaringiomas (133).

Por otro lado, los reportes que describen al Sistema Notch en modelos animales de prolactinomas, son escasos; si bien numerosos componentes de la vía de NOTCH como NOTCH3, *ASCL1* y *Hes1* están alterados en prolactinomas humanos (99).

Cuando se efectuó el estudio comparativo de distintas líneas celulares de prolactinomas experimentales y glándulas normales en rata no observamos una sustancial diferencia en la activación del Sistema Notch en células GH3 y MMQ, cuando comparamos con hipófisis normales, de la misma magnitud a la observada en corticotropos AtT20. Incluso habiendo establecido una caracterización y cuantificación amplia de ligandos, receptores y efectores río abajo. Se puede especular que una de las causas moleculares de las características agresivas e invasivas de los corticotropinomas en comparación con los prolactinomas, esté relacionada a los diferentes patrones de activación del Sistema Notch.

Sin embargo varias evidencias apuntaban a una participación del Sistema Notch en los modelos y líneas de prolactinomas: los niveles de *Jagged1* fueron mayores en las células somatolactotrópicas GH3 que en las MMQ y las hipófisis de rata normales; y los niveles de *Dll1* también fueron mayores en la línea GH3 comparando con MMQ, tumores xenotrópicos GH3 y pituitarias de rata normales. Se puede postular la hipótesis que *Jagged1* y *Dll1* son los principales ligandos a través de los cuales NOTCH es activado en GH3, pero no en las células MMQ. Queda por determinar, no obstante, cual es la función concreta en términos oncológicos de ambos ligandos en las células de prolactinoma.



En las células GH3, por ejemplo, se describió que el ligando de NOTCH no canónico *Dlk1* se expresa en algunos clones, en los que reprime la expresión y la secreción de GH sin afectar la producción de prolactina (183). Teniendo en cuenta que la línea celular MMQ produce prolactina de forma exclusiva y que la línea GH3, por el contrario produce GH y prolactina, se podría inferir que *Jagged1* y/o *Dll1* pueden estar implicados en la secreción hormono-específica o definiendo el comportamiento del tipo celular en estos dos modelos de prolactinoma *in vitro*.

Además, demostramos que los genes diana *Hes1* y *Hey2* están disminuidos en los modelos celulares de prolactinomas, en concordancia con lo encontrado en prolactinomas humanos (184), mientras que por el contrario, *Hey1* está sobre-expresado en células GH3. Algo notorio es que el gen *Hey2* está prácticamente ausente en las líneas MMQ y GH3, pero si está expresado en los tumores xenotrópicos generados a partir de GH3, además de encontrarse en hipófisis controles. Relacionando el modo de funcionamiento de la vía de señalización de NOTCH, en la cual, el contacto célula-célula es trascendental, y los resultados obtenidos, la expresión de *Hey2* puede ser asociada a la presencia de componentes de la matriz extracelular y por ello no se expresa en las líneas celulares en cultivo. Más aún, de la asociación de la matriz con la vasculatura y procesos angiogénicos, contexto fisiológico e histológico que se observa en las hipófisis completas y los tumores xenotrópicos incluidos en el análisis, pero no en el resto de los modelos. Este dato está en correspondencia con los también bajos niveles de *Hey2* observados en la línea celular AtT20.

En otro modelo de prolactinoma en ratón, los tumores provenientes de las ratones hembra *lacDrd2KO*, no solamente los niveles de *ARNm* de *Notch1* y *Notch2* estaban aumentados, sino también los dominios de membrana de NOTCH2-3 y el NICD de NOTCH1, resultaron fuertemente elevados en los ratones knockout en comparación con los ratones control *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. No hubo diferencias entre los genotipos en cuanto a la expresión de *Jagged1* o *Dll1*. De forma similar a lo que Lu et al observaron para JAGGED1 comparando prolactinomas humanos e hipófisis controles (97). En cambio se ha descrito que otros ligandos, como *Dll1* y *Dll4*, están regulados negativamente en tumores no funcionantes y adenomas secretores de prolactina (184; 185), y regulados positivamente en corticotropinomas (133) respectivamente, dando a entender que el perfil de expresión del Sistema Notch está fuertemente influenciado por el histotipo de los adenomas hipofisarios.

El *ARNm* de *Hes1* estaba, en cambio, significativamente reducido en las adenohipófisis de los ratones *lacDrd2KO* en comparación con las provenientes de los ratones *Drd2<sup>loxP/loxP</sup>*. Esto es similar a lo observado tanto en prolactinomas como en adenomas no funcionantes en humanos, en los que el mensajero de *Hes1* está menos expresado, en comparación con pituitarias humanas normales (184).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la generación de prolactinomas producidos por la disrupción del RD2 en lactotropos se asocia con la alta expresión de algunos componentes del Sistema Notch, en particular sus receptores NOTCH. Estos resultados son relevantes a la hora de

buscar nuevos blancos terapéuticos para los prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos. Además, se demuestra que en diferentes modelos y líneas de prolactinoma, diferentes componentes son sobre-expresados. Por lo que es fundamental tener en cuenta la complejidad de la vía, la cual, es imposible de analizar sin el contexto molecular de cada uno de los componentes. Es decir, al trabajar con el Sistema Notch, no se puede evaluar uno o dos genes, sino que lo mas acertado es hacer un paneo holístico del funcionamiento de los cuatro receptores y sus efectores, en un determinado contexto histológico.

Los reportes en los cuales NOTCH aparece como un protagonista destacado en la generación y progresión de adenomas hipofisarios es escasa. Si nos guiamos por los resultados vertidos en este capítulo, las diferencias de expresión entre hipófisis tumorales e hipófisis normales dependen del tipo de tumor. Aunque se afirmó que la activación del Sistema Notch se asociaría con tumores más indiferenciados y agresivos (100), estudios adicionales son necesarios para desentrañar con precisión los componentes más importantes que participan y los procesos afectados por las vías de NOTCH durante el desarrollo y mantenimiento de tumores pituitarios.

## CAPÍTULO II: PAPEL DEL SISTEMA NOTCH EN LA PROGRESIÓN DE TUMORES HIPOFISARIOS XENOTRÓPICOS EN RATONES NUDE/NUDE

### Introducción del Capítulo II

Los adenomas hipofisarios son en su mayoría tumores intracraneales benignos, que no hacen metástasis pero que pueden tener reincidencias luego de la remoción por cirugía y producir estados de morbilidad considerable debido a la compresión estructuras del cerebro, y disfunciones hormonales. Existe una escasez de marcadores moleculares complementarios que podrían mejorar el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico. En los tumores hipofisarios con células con características “stem” o muy desdiferenciadas, diferentes componentes de la vía de señalización de NOTCH fueron identificados (92; 93; 98; 99); por ende existe un potencial terapéutico para encontrar nuevos blancos contra NOTCH en el tratamiento de los tumores hipofisarios.

La versatilidad y los efectos pleiotrópicos que resultan de la actividad normal y aberrante de NOTCH pueden interpretarse en clave contextual y enmarcándolas en fenómenos moleculares, tales como la interacción con el microambiente del tumor y el *crosstalk* con otras vías de señalización. Además, cada tejido, e incluso, cada grupo celular expresa diferentes proporciones de parálogos de NOTCH y genes diana como lo demostramos en el Capítulo 1, que pueden determinar en última instancia su destino. Hemos demostrado que líneas celulares derivadas de diferentes tipos de tumores hipofisarios, y tumores generados *in vivo* por ratones knockout expresan diferentes niveles de receptores parálogos, de ligandos, y de efectores río abajo.

Por eso, para la búsqueda de tratamientos combinados en el tiempo, quitar el velo sobre la relevancia de la señalización de NOTCH en cada tipo de adenoma hipofisario es primordial. En la literatura, la información existente respecto de la participación de NOTCH en la generación, establecimiento y progresión de tumores hipofisarios es exigua. En general, la relación entre los adenomas pituitarios y la vía de señalización de NOTCH está establecida por la descripción en los niveles de expresión de algunos de los componentes del Sistema Notch, pero hasta el momento no se han hecho estudios funcionales *in vivo* que respalden las acciones de NOTCH en el desarrollo de estos tumores.

NOTCH3 por ejemplo, en algunos reportes se informa que está aumentado en prolactinomas y adenomas no funcionantes (184-186), pero regulado negativamente en somatotropinomas (185). Más aún, se ha reportado que *Hes1* está disminuido en prolactinomas y adenomas no funcionantes, y *Jagged1* aumentado (95). La SP aislada de adenomas hipofisarios, reconocida por contener células con características de células madre, ha mostrado una aumentada expresión de *Hes1*, *Jagged1* así como *Notch1-3* (95); sumando a esto, *Notch4*, *Jagged2* y *Dll1* están aumentados en células con características “stem” derivadas de adenomas pituitarios, las cuales son considerablemente más resistentes a agentes terapéuticos (187).

Por otro lado, Notch2 tiene una importancia clave en el desarrollo de la hipófisis. Durante el mismo, NOTCH2 es expresado en las células periluminales de alta tasa de proliferación de la bolsa de Rathke, pero no en aquellas con alta diferenciación que expresan  $\alpha$ GSU ( $\alpha$ -subunit of glycoprotein) con habilidad de producir hormonas glicosiladas, como TSH, FSH y LH. NOTCH2 va disminuyendo en su expresión a medida que el desarrollo de la glándula transcurre, indicando que en casos de marcada diferenciación celular no sería un gen necesario en altos niveles (100).

La expresión espacio-temporal de NOTCH2 es coincidente con la expresión de PROP1 (*prophet of pituitary transcription factor*; "Profeta del factor de transcripción hipofisario"), el cual precede y es requerido para la expresión del PIT1 (Pou domain transcription factor-1). PIT1 es el factor maestro del desarrollo de la pituitaria y la expresión de genes de hormonas. Mutaciones en el mismo, están asociadas con deficiencias en LH, GH, Prolactina y TSH. Cabe resaltar que NOTCH2 no es detectable en hipófisis con el *Prop1* mutado. Por otro lado, en ratones Knock out condicionales embrionarios para *Notch2*, PROP-1 está afectado, pero quedando inalterada la proliferación hipofisaria temprana (181) (100). Un dato interesante es que el ratón Knockout para *Notch2* es un letal embrionario.

En el **Capítulo I**, hemos demostrado que los cuatro receptores están expresados en la hipófisis. Además, la expresión de los ligandos *Jagged1* y *Dll1*, del N2ICD, el gen marcador *Hey1* está aumentado en las células GH3 en comparación con las hipófisis normales de rata utilizadas como control. Asimismo, de los cuatro parálogos, *Notch2* es el que más altos niveles de *ARNm* en GH3. Esto indica que el *pathway* de NOTCH esta activado en esta línea celular somatolactotrópica.

A la luz de estos resultados, y de datos previos, decidimos utilizar la línea tumoral GH3 como modelo de adenoma secretante para la generación *in vivo* de somato-prolactinomas. El modelo de tumores xenotrópicos generados por la inyección subcutánea de líneas celulares es ampliamente utilizado en la investigación oncológica (112; 188-190). La línea celular GH3, es empleada en numerosos reportes para investigar aspectos fisiológicos de los adenomas pituitarios (191-195).

La mayoría de los trabajos que existen en la literatura basan su estrategia de inhibición de la vía de señalización de NOTCH, a través de la inhibición de su clivaje en S3 (87; 106). Esto significa que puede lograrse una eficaz inhibición de la activación de los receptores NOTCH inhibiendo el accionar de la enzima  $\gamma$ -secretasa (196-200). Una droga muy conocida es el fármaco N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester o DAPT. Esta droga ha sido ampliamente utilizada como inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (GSI por las siglas en inglés " *$\gamma$ -secretase inhibitor*") tanto en modelos *in vitro* (201; 202), en células en cultivo, como en modelos con animales *in vivo* (197; 200; 203).

Por ejemplo, el DAPT ha sido utilizado como GSI en células de cáncer de pulmón, con una sobreactivación de NOTCH, característica que les confería una malignidad superior. Los tumores tratados con DAPT mostraron una menor expresión de los efectores río abajo, y sus células no pudieron regenerar un tumor luego de la reimplantación en ratones NOD/SCID (204). El DAPT

también ha sido utilizado como GSI para reducir la invasividad en matrigel de una línea celular de rhabdomiosarcoma, siendo efectivo en ensayos de herida, el ciclo celular, y ensayos de apoptosis (170). El DAPT resultó activo también en un modelo de cáncer de mama cuyas células epiteliales MCF10A tienen activada la señalización por NOTCH de forma autócrina, hecho que previene fuertemente la apoptosis celular. La administración de DAPT, disminuyó la actividad de AKT, vinculada a la proliferación, y aumentó la sensibilidad a apoptosis (205). En el páncreas de ratón, la activación ectópica de NOTCH resultó en la acumulación de células precursoras positivas para la proteína NESTINA; esto expandió el epitelio metaplásico de los ductos, lo que representa una lesión previa al cáncer de páncreas. Miyamoto y colaboradores, utilizaron inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa, entre los cuales se encuentra el DAPT y determinaron un efecto dosis-dependiente categórico de disminución de las lesiones precancerosas (206).

Los antecedentes en investigación oncológica, utilizando estrategias *in vivo* para inhibir NOTCH, son numerosos. Nuestro grupo tiene una larga trayectoria en el trabajo con prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (14; 35; 95; 149; 153; 154; 207; 208) decidimos por este motivo desarrollar un modelo vivo en el cual podemos monitorear en tiempo real el crecimiento tumoral, así como muchas de las variables fisiológicas relacionadas a la patología tumoral hipofisaria. Nuestro objetivo se desprende de la descripción del Sistema Notch hecho en el **primer Capítulo** de este trabajo.

## OBJETIVOS DEL CAPÍTULO II

En base a los antecedentes presentados nos propusimos estudiar la participación de la señalización de NOTCH sobre el desarrollo y la progresión de somato-prolactinomas experimentales en un modelo *in vivo* xenotrópico generado por inyección subcutánea de la línea celular somatolactotrópica GH3 en ratones NUDE/NUDE.

### Objetivos Específicos:

---

- 1) Evaluar en tiempo real el crecimiento tumoral y volumen, en función de la inhibición de NOTCH con la droga DAPT. Monitorear la secreción endócrina de GH y Prolactina en suero y el contenido de las hormonas intratumorales; evaluar la evolución del peso del animal.
- 2) Cuantificar la inhibición de la vía de señalización NOTCH, midiendo por Western Blot el NICD liberado al citoplasma; evaluar la presencia de los parálogos NOTCH y de sus ligandos, en función del tratamiento, mediante técnicas de Western Blot y qRT-PCR.
- 3) Evaluar la expresión utilizando qRT-PCR y Western Blot de efectores río abajo de Notch, en función de la inhibición con DAPT.
- 4) Evaluar la expresión de marcadores de proliferación, como por ejemplo PCNA.

## RESULTADOS DEL CAPÍTULO II

### **La inhibición de NOTCH decrece el volumen de tumores xenotrópicos, el contenido intratumoral de GH y prolactina, y la liberación de prolactina**

Los ratones NUDE/NUDE hembra inoculados con 700000 células GH3 en uno de sus flancos, desarrollaron tumores luego de 21 días de la inoculación (Volumen aproximado 70 mm ± 6.2 mm). En este momento se comenzó con el tratamiento con DAPT (8mg/kg, intra-peritoneal cada tres días). Los tumores xenotrópicos tratados con DAPT fueron considerablemente más pequeños que los tratados con vehículo en todos los tiempos de medición, con diferencias significativas en los días 14 y 16 después de la iniciación del tratamiento (**Figura 16 A**). Al momento de sacrificar los animales los tumores de ratones tratados fueron en promedio un 42% más pequeños (**Figura 16 A y C**). Los ratones tratados y controles se pesaron a lo largo de todo el tratamiento, con el propósito de monitorear la salud del animal, controlando que el tratamiento no tuviera ningún efecto adverso en el crecimiento, desarrollo, y estado general de los animales (**Figura 16 B**). La Prolactina y GH intratumoral, así como la Prolactina sérica disminuyeron significativamente con la administración de DAPT, no sucedió lo mismo con la GH sérica, en la cual no se observaron diferencias (**Figura 17 A-D**).

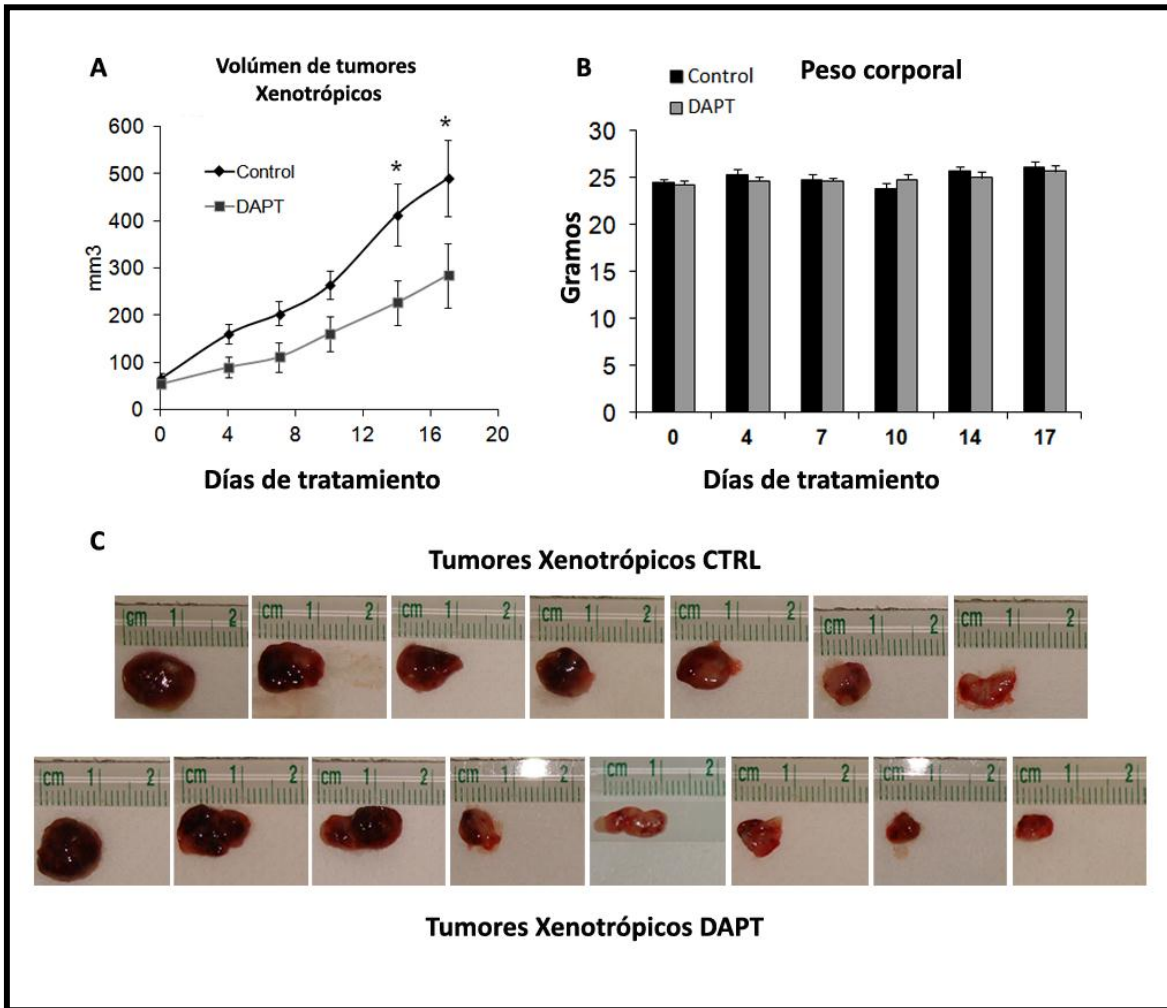


Figura 16: El tratamiento con DAPT disminuyó el volumen de tumores xenotrópicos de la línea celular GH3. A) Volúmenes tumorales de animales Control (n=12) y de animales tratados (n=11) con DAPT en una dosis 8mg/Kg, i.p. El volumen se calculó con la fórmula: (Lado mayor) X (Lado menor)² X 0.52=Volumen Tumoral. Se tomó la medida de cada tumor con un calibre cada tres días comenzando antes del tratamiento, (\*p<0.05). B) Evolución del promedio de pesos corporales de animales tratados con solución Control o con DAPT. C) Imágenes representativas de 15 tumores, 7 pertenecientes a animales tratados con solución Control (fila superior) y 8 pertenecientes a animales tratados con DAPT (fila inferior). Imágenes tomadas en el momento de su extirpación al final del tratamiento.



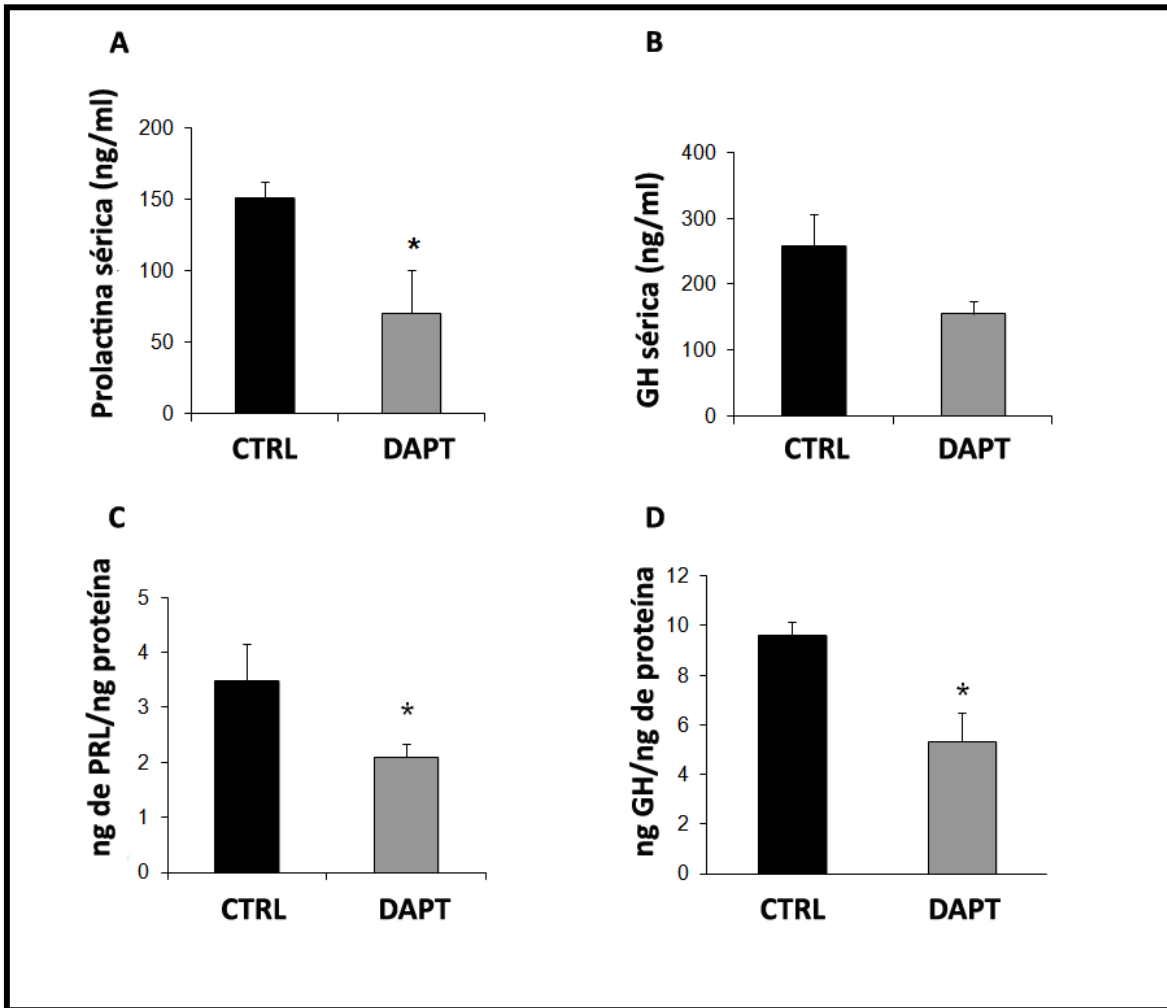


Figura 17: El DAPT disminuyó los niveles séricos de Prolactina, y el contenido intratumoral de Prolactina y GH. A-B) Concentración de Prolactina y GH sérica, Control (n=12) y Tratados con DAPT (n=11) (\*p=0.045 y 0.1, respectivamente), medición por RIA. C-D) Niveles de Prolactina y GH intratumorales mediante RIA (\*p=0.021 y 0.005 respectivamente). Muestras tomadas el día de sacrificio. Medición por RIA.

### El tratamiento con DAPT disminuyó la activación de NOTCH, redujo el NOTCH 1-2 ICD, y el efector río abajo HES1.

Mediante Western Blot identificamos el dominio activo NICD, de un peso aproximado de 80 KDa, y dos dominios de membrana (110 y 130 KDa). N2ICD se redujo de forma considerable y significativa luego de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa por el DAPT, de forma inesperada observamos una disminución significativa del dominio de membrana de NOTCH2 que pesa 130 KDa (**Figura 18 A, C, D**). El N1ICD se redujo de forma considerable, mientras que el dominio de membrana de 130 KDa, evidenció una reducción menor, en ambos casos las diferencias no fueron significativas (**Figura 18 A, C, D**). Asimismo, el dominio transmembrana de 110 KDa (**Figura 18 B, D**) no presentó diferencias significativas en ninguno de los dos receptores. Al examinar la proteína HES1 (**Figura 18**

E, F), gen diana de NOTCH, se observó una reducción significativa luego del tratamiento con DAPT. Tomando en cuenta estos datos, podemos afirmar que el DAPT efectivamente redujo la activación de NOTCH y su señalización río abajo, en los tumores xenotrópicos generados con la línea celular GH3.

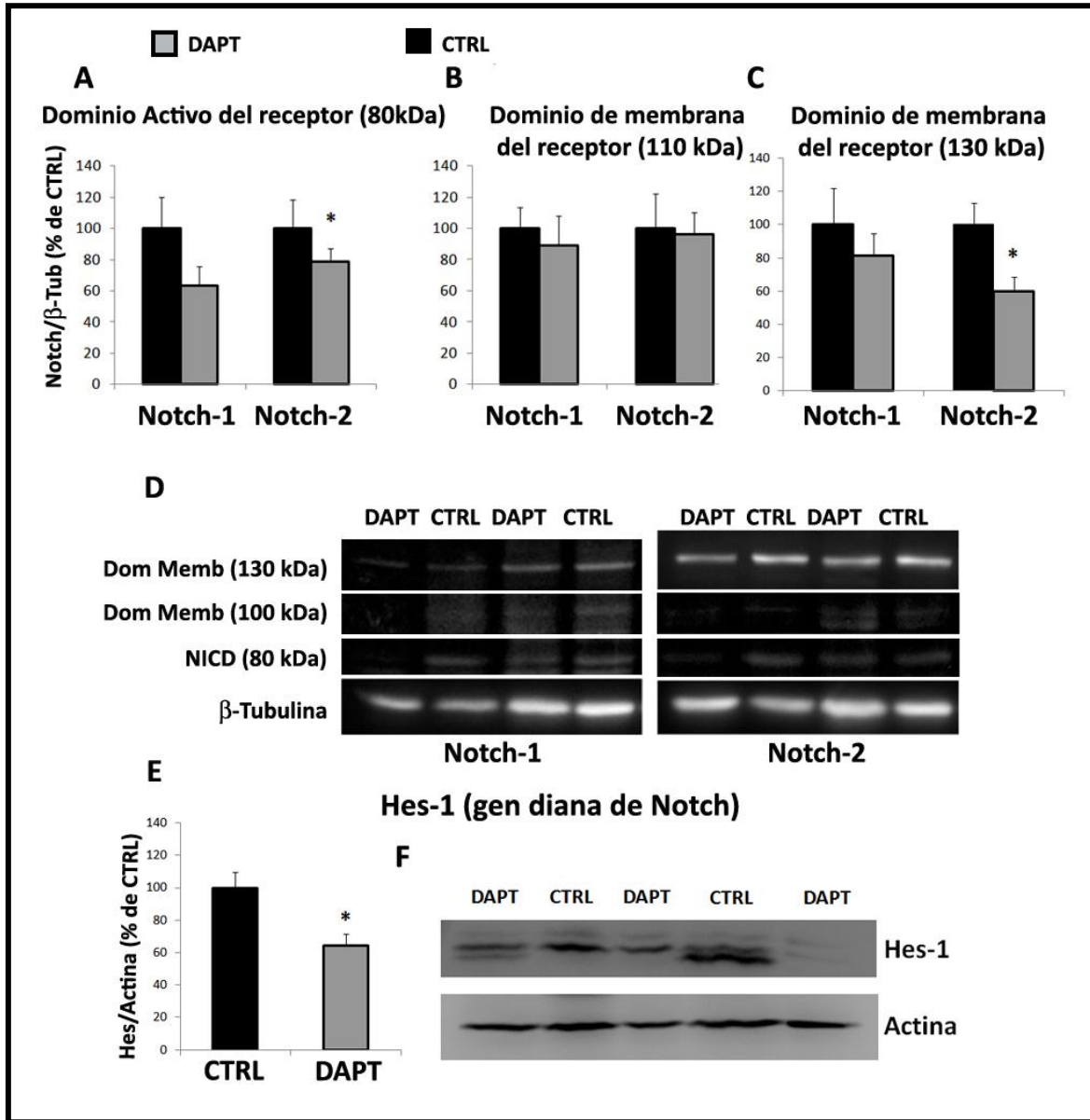


Figura 18: El tratamiento con DAPT disminuyó los niveles de N2ICD, así como los niveles de HES1. A-C) Niveles de las proteínas NOTCH1 y NOTCH2 en tumores tratados con solución Control y con DAPT, medidos por Western Blot con anticuerpos específicos, relativizadas al control de carga  $\beta$ TUBULINA. A) Densitometría de dominio activo en tumores Control y Tratados con DAPT (N1ICD: n=11 y 12 respectivamente; N2ICD: n=6 y 8 respectivamente, \*p=0,02). B-C) Densitometría de los dominios de membrana de 110kDa (Notch-1-2: n=7 y 8, Control y DAPT, respectivamente) y 130kDa (NOTCH1: n=7 y 8; NOTCH2: n=11 y 12, Control y DAPT, respectivamente; \*p=0,02). D) Imágenes representativas

para cada uno de los dominios cuantificados de NOTCH1-2 y del gen  $\beta$ TUBULINA. E) Densitometría de HES1, medido por western blot en tumores Control (n=12) y DAPT (n=11), \*p=0,033, relativizado al control de carga Actina. F) Imágenes representativas de HES1 y ACTINA, cuantificados en muestras Control y tratadas con DAPT.

### El tratamiento con DAPT redujo la expresión del gen *Hey2*

Se cuantificaron los niveles del ARNm de *Notch2*, los ligandos de NOTCH *Jagged1*, *Dll1* y numerosos genes diana de NOTCH (*Hey-1*, *Hes-1*, *Ciclina D1* y *D3* y *TGF $\beta$*  (un marcador de EMT) de forma *ex vivo* en los xenotransplantes por qRT-PCR. No se encontraron diferencias en los niveles del ARNm de *Notch2* (que codifica para el receptor entero, es decir, las fracciones activa y las que están ancladas a membrana), y tampoco en los ligandos de NOTCH (Figura 19 A, B). Entre los genes diana solo el gen *Hey2* evidenció una disminución marcada y significativa (Figura 20).

Los genes vinculados a la señalización por Notch, como *Ciclina D1* y *Ciclina D3*, y *TGF $\beta$*  tampoco fueron modificados por la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa (Figura 21). Las *Ciclinas D1* y *D3* cumplen funciones en la regulación del ciclo celular, por ende están ligadas a procesos proliferativos. En numerosos trabajos se ha reportado la influencia de NOTCH en sus niveles de expresión (209).

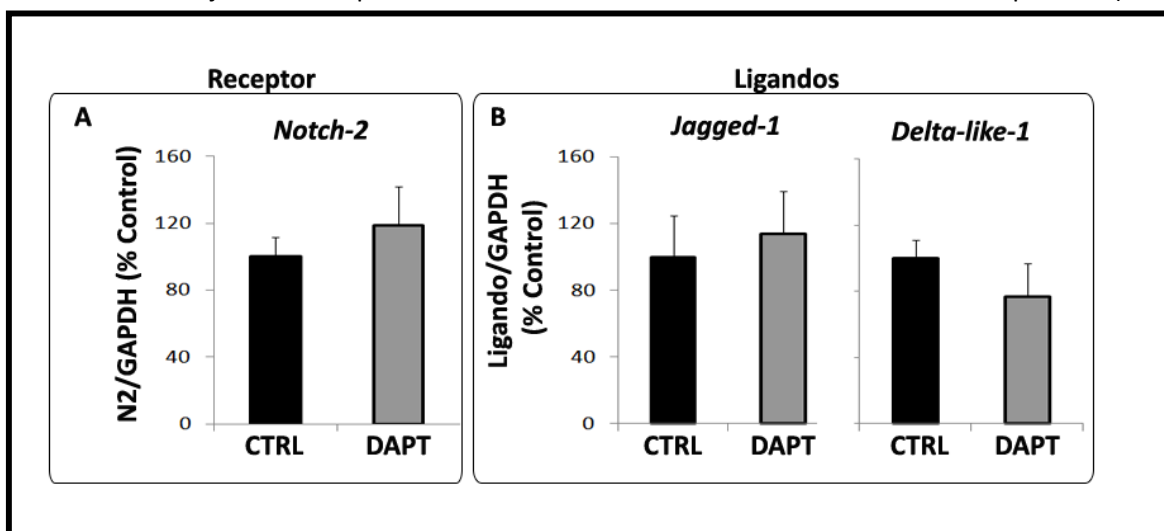


Figura 19: Expresión del ARNm de componentes del Sistema Notch en tumores xenotrópicos GH3. A-C) Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de tumores provenientes de animales Control, los cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideraron 100%. A) Expresión del gen *Notch2* en animales tratados con solución Control o con DAPT; n=12 y 11, respectivamente. B) Expresión de los genes ligando *Jagged1* (n=11 y 10) y *Deltalike1* (11 y 6) en animales Control y DAPT, respectivamente.

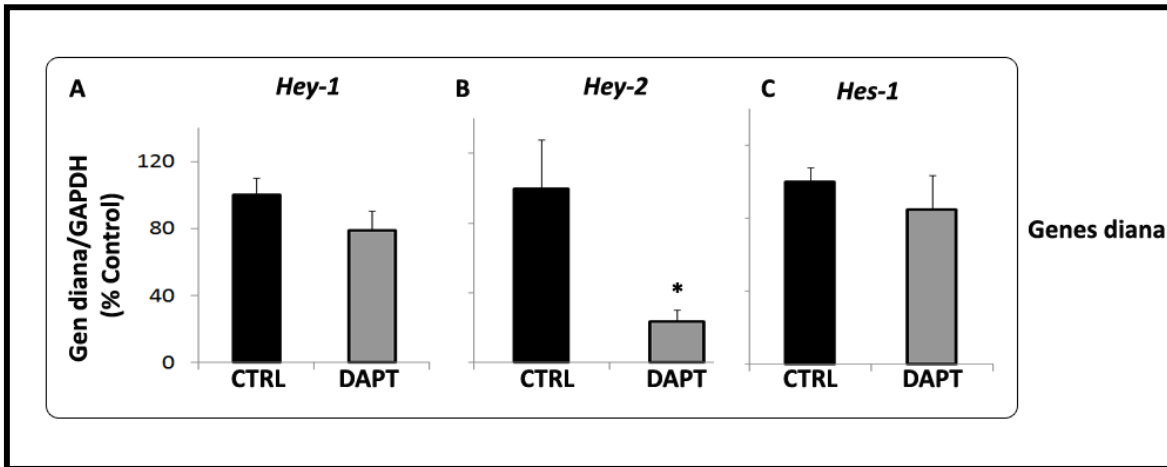


Figura 20: Expresión del *ARNm* de genes diana de la vía de NOTCH en tumores Xenotrópicos GH3. Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de tumores provenientes de animales Control, los cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideraron 100%. A-C) Expresión de los genes *Hey1* (n=11 y 10); *Hey2* (n=12 y 10), \*p=0,02; y *Hes1* (n=11 y 6) en tumores provenientes de animales tratados con solución Control o DAPT, respectivamente.

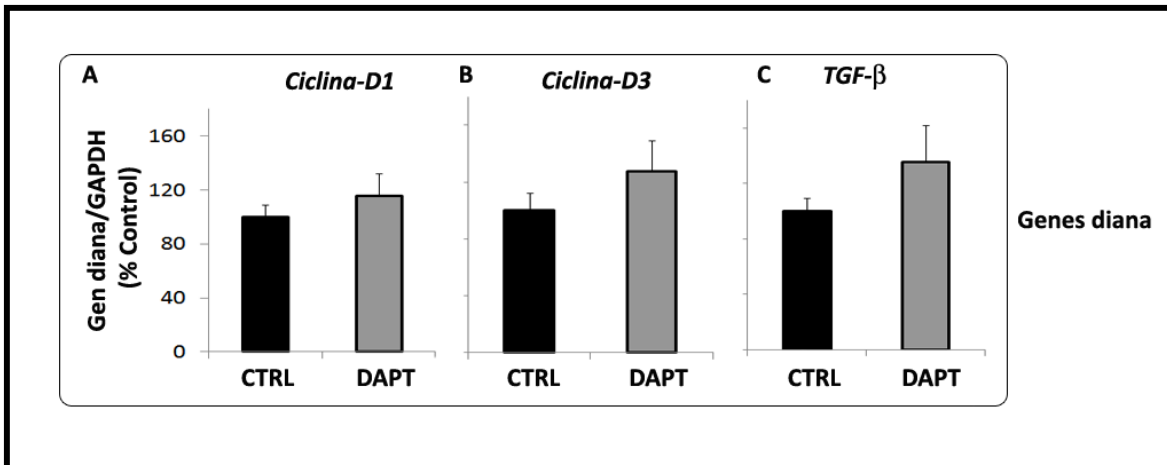


Figura 21: Expresión del *ARNm* de genes diana de la vía de NOTCH vinculados al ciclo celular, matriz extracelular y EMT, en tumores xenotrópicos GH3. Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de tumores provenientes de animales Control, los cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideraron 100%. A-C) Expresión de los genes *Ciclina D1* (n=12 y 11); *Ciclina D3* (n=7 y 8), y *TGFβ* (n=12 y 11) en tumores provenientes de animales tratados con solución Control o DAPT, respectivamente.

Los *ARNm* de los genes *Hes5* y el coligando *Dlk1* no pudieron ser detectados en los xenotransplantes. Adicionalmente, se determinaron los niveles de la proteína PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) y si bien se observa una tendencia a la disminución, la reducción no fue significativa (Figura 22).

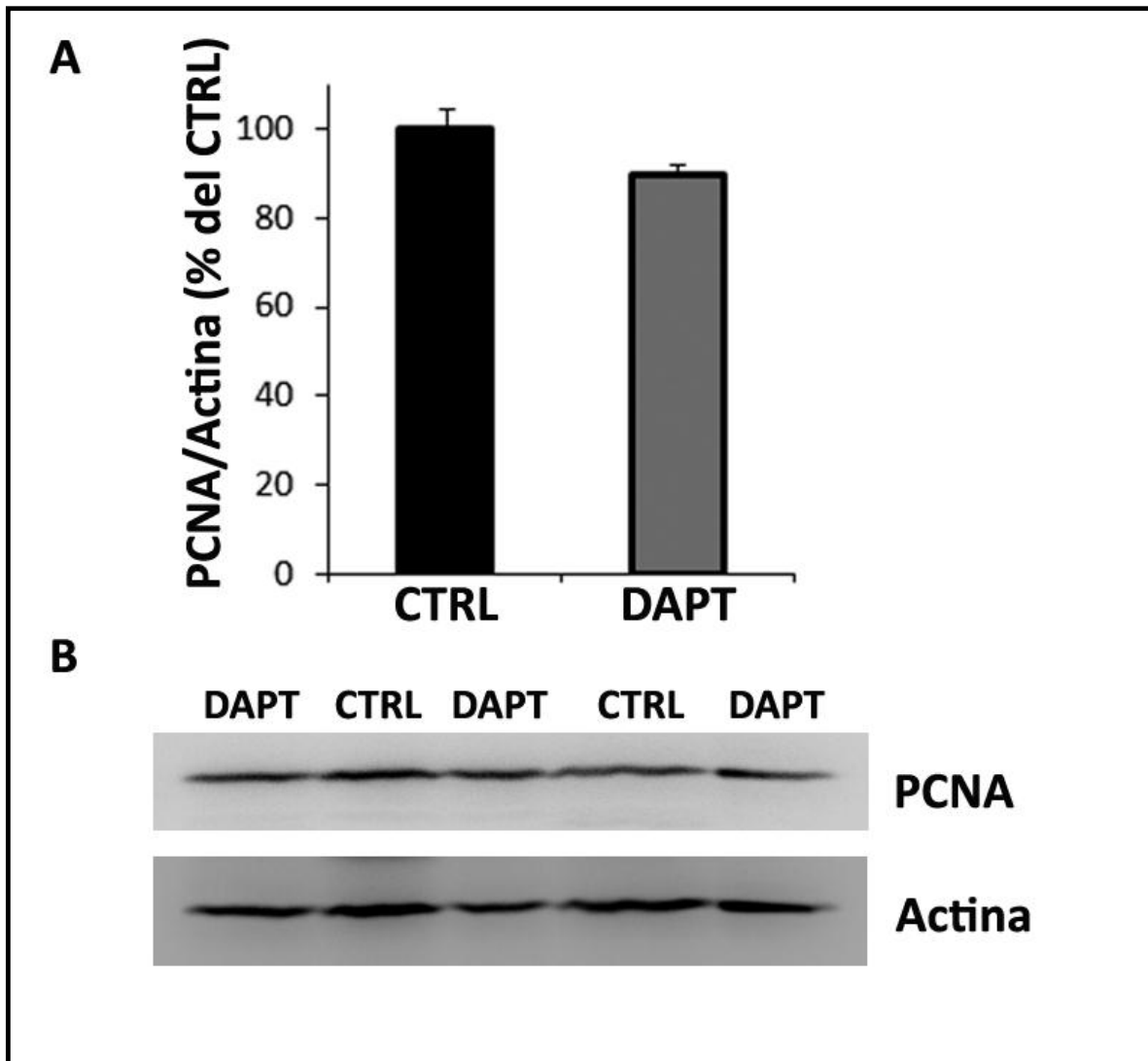


Figura 22: El tratamiento con DAPT no modificó los niveles de PCNA en tumores xenotrópicos. A-B) Niveles de la proteína PCNA en tumores tratados con solución Control y con DAPT, medidos por Western Blot con anticuerpos específicos, relativizados al control de carga ACTINA. A) Densitometría de PCNA en tumores Control y tratados con DAPT; n=12 y 13 respectivamente. B) Imágenes representativas de inmunoblots hechos para PCNA y ACTINA, provenientes de dos tumores Control y tres tratados con DAPT.

## DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II

Un desafío importante en el estudio de NOTCH es entender cómo esta vía de señalización aparentemente simple y sin amplificación de la señal, tiene efectos tan variados en diferentes contextos. Este tema no es menos relevante en la biología tumoral, en la que el Sistema Notch puede actuar de forma diversa como un oncogén o como un supresor de tumores, un represor o inductor de diferenciación terminal y tal vez un factor positivo de la proliferación de CSC en contextos específicos (95; 173). Cada vez son más los estudios que han ampliado y definido el papel multifacético de NOTCH en el cáncer, con vistas hacia las posibles implicaciones terapéuticas de los hallazgos (175).

A pesar de la abundancia de datos que sugieren un papel de NOTCH en tumores, hay pocos datos de alteraciones genéticas en los genes NOTCH, con la excepción T-ALL. Sin embargo, en muchos casos, incluyendo cánceres de mama, colon, páncreas, próstata y sistema nervioso central, la señalización NOTCH parece ser importante (112; 168; 169; 210). De cualquier forma, en todos estos antecedentes se sugiere que la activación aberrante de la vía, es la que determina el comportamiento tumorigénico.

El hecho de que NOTCH sea una vía de señalización que implica el contacto célula-célula muy estrecho hace que la sobreactivación ligando dependiente de NOTCH represente una oportunidad importante para evadir procesos de selección negativa a nivel celular. De esta manera la activación por mutación de los receptores queda relegada en importancia y en valor adaptativo en el contexto tisular. Es por esto, que en el caso de tumores sólidos, como los de la hipófisis, el desarreglo no se trata de una activación constitutiva de la vía, sino más bien una activación inapropiada de la misma (95; 98; 185). El funcionamiento del Sistema Notch, fuertemente dependiente del contexto espacio-temporal y fisiológico hace que no siempre la sobreexpresión asegure un comportamiento oncogénico, sino que el análisis debe hacerse en cada caso, y en cada estadio del desarrollo tumorigénico (189; 211).

La activación anómala del Sistema Notch puede producirse de diferentes formas, comúnmente por la desregulación de la expresión de los receptores NOTCH o cualquiera de sus ligandos. Se ha observado por ejemplo en tumores de próstata (212), tumores pancreáticos (206), glioblastomas (169), y tumores de mama (172).

En los últimos años NOTCH ha se posicionado como una vía de señalización importante en oncología, y esto aunque en menor medida, ha sido también reportado para los tumores hipofisarios (92; 93; 98; 100).

En el primer apartado de los **Resultados del Capítulo 2**, mostramos como utilizando un modelo de tumores xenotrópicos generados con la inyección de la línea GH3, se redujo el crecimiento de estos prolactinomas experimentales inhibiendo la vía de señalización NOTCH. Los tumores tratados con DAPT resultaron ser un 42% más pequeños en volumen que los tratados con solución

vehículo y evidenciaron un patrón endocrino distinto a los controles ya que los niveles de Prolactina y GH intratumorales disminuyeron significativamente, junto con la Prolactina liberada en suero. Mostramos además, que el tratamiento con DAPT en efecto, inhibió la vía de señalización de NOTCH, disminuyendo el dominio activo de NOTCH2 (N2ICD) de forma significativa, e incluso, provocando una disminución en el dominio de membrana (130kDa). Recordemos del **primer Capítulo**, que justamente el Notch2 era el parólogo de mayor expresión en la línea GH3, y en los tumores xenotrópicos. Más aún, uno de los efectores río abajo mas reportados en la literatura (109; 213; 214), HES1, también fue examinado, y su proteína disminuyó significativamente en función del tratamiento.

Fueron examinados otros componentes del Sistema Notch, como los ligandos *Jagged1* y *Delta like1*, los genes diana *Hey1* y *Hey2*, y el marcador de EMT, *TGFβ* y solo se observó una disminución marcada y significativa en el gen *Hey2*. Este dato podemos vincularlo a los resultados del **Capítulo I (Figura 10 C)**, en los que demostramos que únicamente se detectó la presencia de *Hey2* en hipófisis y tumor xenotrópico, pero no en las líneas celulares GH3 y MMQ, donde su expresión fue prácticamente nula. El patrón de expresión se repitió en la **(Figura 12 C)** con células AtT20. De manera que, como discutimos anteriormente, la expresión de *Hey2* puede estar vinculada a la presencia de componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo la vasculatura del tumor. Es posible teorizar entonces, debido a la mecánica célula-célula del Sistema Notch, que el impacto del DAPT, esté modificando de forma directa o indirecta la conformación y el estado de la matriz extracelular.

Otros miembros de la señalización por NOTCH como las *Ciclinas D1* y *D3*, fueron examinados. En ninguno de los dos marcadores se observaron cambios. Fueron seleccionados como blancos posibles en nuestro modelo, porque esta descrito que existen otros genes además de los pertenecientes a la familia de *Hes* y *Herp* que tienen en sus promotores sitios de unión a RBP-JK (proteína con la cual interacciona el NICD para unirse al DNA a través de su dominio RAM). Uno de estos genes es *Ciclina D1* (109). En células S100 positivas se demostró que un tratamiento con DAPT disminuyó de forma considerable la presencia de células del mismo tipo positivas para CICLINA D1. Cuando la vía fue estimulada con JAGGED1 soluble, se observó el efecto contrario, y las células S100 positivas expresaron niveles mayores de *Ciclina D1* (127). También, en trabajos con células de retina rMC-1 en cultivo, inhibiendo la vía de NOTCH con DAPT en condiciones de hipoxia, *Ciclina D1* verificó una disminución al igual que *Ciclina D3* (107). *TGFβ* está implicado en el proceso de EMT, en el que a su vez NOTCH tiene influencia (82; 83; 215), sin embargo no fue modificado por DAPT.

HES (“Hair Enhancer of Split”) es un represor transcripcional del tipo hélice rulo hélice (109)(bHLH: Basic helix-loop-helix) que reprime la expresión de genes diana, activadores de la transcripción tejido-específicos, tales como NEUROGENINA, MASJH y MIOD. Por esto, HES directamente afecta la decisión del destino celular, como un efector primario de NOTCH. Existe otra familia relacionada

de factores bHLH denominada HERP (HES-related represor, también llamada HEY/HESR/HRT/CHF/GRIDLOCK). En este grupo situamos a HEY2 y en el primero a HES1.

De acuerdo con lo descrito por Miyamoto y colaboradores (206) *Hes1* aparece anormalmente elevado en metaplasias ductales en epitelios pancreáticos, sugiriendo que la activación de NOTCH puede estar vinculada a eventos tumorigénicos en este órgano. La expresión ectópica de los dominios activos de NOTCH1 y NOTCH2 en explantes epiteliales, provocó un aumento del efector HES1, y en menor medida de *Hey1* y *Hey2*. Los N1ICD y N2ICD provocaron una transformación metaplásica, e indujeron una subpoblación indiferenciada en tejidos del páncreas exócrino. NOTCH además puede regular la expresión de ligandos de vías que intervienen en el desarrollo como WNT, modificando los patrones de expresión de WNT3 y WNT4 a través de HES1; evidenciando una forma más de incentivar la tumorigénesis inhibiendo WNT (216). En adenocarcinomas de pulmón, HES1 es un marcador de mal pronóstico que correlaciona fuertemente con pobres tasas de supervivencia (204). En nuestros resultados, vemos que la disminución de HES1, como consecuencia del tratamiento con DAPT, es significativa. De forma similar a los antecedentes, la disminución de este marcador, está asociada con la disminución del volumen tumoral.

Existen evidencias de la vinculación de HEY2 al proceso de EMT, invariablemente influenciado por la matriz extracelular circundante. En el desarrollo del corazón, que implica varias rondas de EMT y MET, *TGFβ2*, es el responsable de iniciar el proceso. A su vez, este gen está regulado por NOTCH, a través de su dominio activo, que tiene como blanco a SNAIL1 y tres miembros de la familia *Hey bHLH*. *Snail1*, reprime la transcripción de *VE-caderina*, un gen muy asociado a la matriz extracelular, y promueve la EMT (217). En este contexto se ha descrito que la inactivación de *Hey2* y *Hey1*, provoca severas malformaciones congénitas en el corazón. Estos dos factores colaboran con el proceso de EMT y cuando son inactivados inducen defectos en la válvulas atrioventriculares (80; 218). *Hey2* también está involucrado en la remodelación vascular de la retina (219). Si bien, el papel de *Hey2* en cáncer humano no está esclarecido, su sobreexpresión ha sido reportada en cáncer de próstata, en adenocarcinomas de páncreas ductales, y hemangiomas (220-222). Es más, *Hey2* aparece ligado a hepatocarcinomas celulares promoviendo la proliferación y la migración celular, incluso, mediante mecanismos independientes de la señalización de NOTCH (223).

Procesos de desarrollo, diferenciación, rondas de EMT y MET, todos a su vez inmersos en la dinámica de la matriz extracelular, parecen estar gobernados en buena medida por la vía de NOTCH, a través de sus efectores inmediatos, entre los cuales están HEY2, y HES1. En este contexto, nuestros aportes posicionan a HES1 y HEY2 como importantes blancos para inhibir el crecimiento tumoral en los tumores hipofisarios (95; 189; 200; 224). Es evidente que la inhibición de la señalización del Sistema Notch tiene un efecto en el crecimiento tumoral, que el funcionamiento endocrino de los prolactinomas se ve disminuido por la droga, y que dos importantes efectores río abajo de la vía (HES1 y *Hey2*) aparecen modificados luego del



tratamiento *in vivo* realizado sobre los animales portadores de tumores. Estos resultados aportan avances originales en la comprensión y la incidencia que tiene el Sistema Notch, en la progresión de prolactinomas.

Al realizar el monitoreo de la respuesta de la vía de Notch, como consecuencia del tratamiento con DAPT, observamos y reportamos varios de los dominios de activación y de membrana que aparecen en la literatura como consecuencia del ensamblaje molecular y la activación de los receptores Notch. Sabemos que la señalización canónica por Notch, está regulada por una serie de eventos proteolíticos. El primero, en el sitio S1, lo que da lugar al ECD o dominio de unión a ligando, y el dominio de membrana NTM (*“Notch transmembrane”*), que quedan unidos por unión no covalentes. La unión del ligando, deja al receptor susceptible de ser clivado en S2, generando a su vez un intermediario NTM\*, que es clivado por la  $\gamma$ -secretasa en S3 dando lugar al NICD (225).

Detectamos los dominios activos producto de la activación en S3 por la  $\gamma$ -secretasa, de NOTCH1 y NOTCH2, ambos con una tendencia de respuesta al DAPT, pero solo el segundo se redujo de forma estadísticamente significativa. Pero además, detectamos los dominios transmembrana, con dos pesos distintos, 110kDa, el más frecuentemente reportado en la literatura (226), y el que pesa 130kDa. Si bien NTM de mayor tamaño no aparece reportado en los trabajos previos, consideramos importante no ignorar su aparición en nuestro modelo, teniendo en cuenta la complejidad molecular del receptor y de sus dominios conformacionales, y considerando que en los Western Blots se observó una señal muy clara y precisa. La explicación molecular de su génesis y más aún de su franca disminución en función del DAPT podría relacionarse al NTM que todavía no ha sufrido el clivaje en S2. Mientras que el NTM de 110 kDa, es el intermediario en camino a ser clivado en S3.

Existen también, modificaciones postraduccionales que todavía no se comprenden totalmente, es sabido que los receptores Notch pueden sufrir glicosilaciones, y algunos reportes los nombran directamente como “glicoproteínas”. Esta banda de mayor peso molecular, de 130kDa podría tratarse de una fracción glicosilada (87).

La expresión de Notch2 así como la de varios miembros de la familia NOTCH disminuyen a medida que avanza el desarrollo hipofisario, lo que indica una correlación inversa con la diferenciación celular (181); (182). Sin embargo, en la glándula pituitaria adulta persisten los componentes de la vía de señalización NOTCH, particularmente en localizaciones que contienen células progenitoras/madre (92; 95), pero también en los adenomas hipofisarios hormono-nulos (187). Este aspecto está en línea con su papel en el mantenimiento de las células progenitoras en un estado indiferenciado (como se documenta en el cerebro y el intestino). Las células madre hipofisarias cancerosas son más resistentes a la quimioterapia que sus células hijas diferenciadas y generan tumores intracraneales cuando se trasplantan en ratones NOD/SCID (187).

Los conceptos básicos manejados actualmente en tumorigénesis del adenoma hipofisario pueden provenir de estudios de desarrollo hipofisario y diferenciación celular. Los genes que son

importantes durante el desarrollo o la diferenciación a menudo contribuyen a la promoción y supervivencia del tumor cuando se desregulan. De hecho, el cáncer puede considerarse una enfermedad del desarrollo, y las vías como NOTCH que pueden afectar a los destinos celulares, y el equilibrio entre la diferenciación, la apoptosis y la proliferación, están obligados a participar en la oncogénesis.

Luego del tratamiento con DAPT, comprobamos una significativa inhibición de los componentes del Sistema Notch, viendo que la vía está implicada en el desarrollo y la progresión de los somatoprolactinomas desarrollados con nuestro modelo. No obstante, los marcadores que detectamos y que fueron modificados, fueron escasos. De los genes diana de NOTCH más frecuentemente reportados en la literatura, solo dos, HES1 y *Hey2* sufrieron una alteración como consecuencia de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa en nuestro modelo. Por este motivo, planteamos el objetivo de detectar nuevos genes diana río abajo que pudieran ser modificados al incidir la señalización por NOTCH. Para ello, desarrollamos una estrategia basada en técnicas bioinformáticas, que será detallada en el próximo capítulo, con el propósito de identificar genes de interés fisiológico para nuestros modelos de trabajo, realizando todo con aproximaciones *in silico*, y con bases de datos disponibles en Internet.

De forma complementaria, rápidamente comprendimos que debíamos averiguar si la vía de NOTCH, incide en características proliferativas y propiedades migratorias de las células GH3 actuando en forma directa sobre las células. Por lo tanto, los experimentos llevados a cabo para contestar estas preguntas, se expondrán en el último y **cuarto Capítulo**.

## CAPÍTULO III: ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DEL PAPEL DEL SISTEMA NOTCH EN ADENOMAS HIPOFISARIOS.

### Introducción del Capítulo III

---

Entre los objetivos específicos que mencionamos al comienzo del **Capítulo II**, pretendíamos evaluar la expresión utilizando qRT-PCR y Western Blot de ligandos y efectores río abajo de NOTCH, en función de la inhibición con DAPT. Nos interesaba evaluar genes vinculados a la activación o represión del Sistema Notch que pudieran participar en la inhibición del tumor, inducida por la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa.

Si bien en términos fisiológicos, endócrinos, y de masa tumoral observamos modificaciones notables en los tumores provenientes de animales tratados en comparación con los controles, estimamos que la cantidad de genes clásicos de la vía de NOTCH alterados por el tratamiento, en particular medidos por qRT-PCR fue escasa. Detectamos una modificación estadísticamente significativa en el caso del factor de transcripción *Hey-2*, de innegable trascendencia en nuestro modelo, pero exiguo respecto de la meta que nos habíamos propuesto.

Es así que decidimos recurrir a otras herramientas disponibles en la investigación biomédica, en búsqueda de nuevos marcadores vinculados a la señalización del Sistema Notch. Discurrimos en la hipótesis, que si los factores de transcripción que más abundantemente son reportados en la literatura no responden, o no se modifican con la inactivación de NOTCH en nuestro modelo experimental de células hipofisarias, otros genes se estarían modificando, y lograr su detección aportaría datos específicos de la vía de señalización de NOTCH para la hipótesis. Al observar todos los parámetros fisiológicos, endócrinos, anatómicos y de señalización que estaban siendo alterados, la búsqueda de genes respondedores río abajo de NOTCH, aparte de *Hey2* resultaba un desafío.

Recientemente, las herramientas computacionales han adquirido una envergadura innegable en la investigación biomédica y oncológica (227-231). La evolución de la informática en los últimos 40 años, en paralelo con la capacidad de generar información y procesarla hizo que toda una rama nueva de la investigación diese a luz, cuya denominación es la Bioinformática. La Biología molecular moderna y la investigación médica desde hace algunos años aumentaron exponencialmente la información disponible, sumado a que la variedad de la información y los matices que presenta también han incrementado su complejidad. La utilización de la informática para organizar, procesar, y analizar los datos se transformó en un elemento de casi obligado manejo. La bioinformática es la fusión de varias disciplinas: la computación, las matemáticas, la biología, la ingeniería y la investigación clínica con la meta final de comprender y modelar los sistemas vivos. De acuerdo con una definición bastante difundida se trata de “un brazo de la actividad científica racionalizada con el manejo de grandes bases de datos de información bioquímica y farmacéutica” (232).

La demanda del manejo de datos informáticos seguirá en ascenso con la explosiva cantidad de información que brota de los estudios a gran escala en análisis a nivel molecular, celular y de organismo entero. Ante cada pregunta biológica que un investigador desee realizar, la bioinformática puede utilizarse como un paso en el cual los datos previos se reorganizan, separan, y se asignan prioridades, para hacer una cantidad apropiada de predicciones y sacar las conclusiones pertinentes. Quizás éste no ha sido exactamente el derrotero de los pasos de esta Tesis; acaso haya sido más sinuoso, dado que las preguntas biológicas comenzaron cuando no nos planeábamos siquiera la alternativa computacional. Sin dudas, “la mesada” nos obligó a buscar nuevos horizontes técnicos para los cuales nos contactamos con el Dr. Santiago Rodríguez Seguí, quien nos auxilió de modo notable en las dudas que le acercamos.

Si bien el campo de aplicación va desde el modelado molecular, el análisis de expresión de proteínas, y su regulación, medición de la biodiversidad, modelado de sistemas biológicos o la biología evolutiva computacional, la mayor parte de la Bioinformática pivotea sobre el análisis de secuencias a DNA y RNA. El DNA lleva la información de muchos de los aspectos de la vida de todos los organismos, tanto en su funcionamiento normal, como patológico. Obtener en detalle un panorama de cómo los genes y otras secuencias genómicas trabajan conjuntamente, e interactúan con los factores ambientales, desembocará en última instancia en el descubrimiento y la asignación de vías de señalización implicadas en procesos normales, y la patogénesis de enfermedades. Tal es el caso del Sistema Notch, el cual está implicado en nuestra pregunta biológica que resulta el puntapié de este trabajo; **¿su desregulación tiene implicancias en la patología tumoral hipofisaria?**

Para contestar tal pregunta, en el contexto de la patología tumoral hipofisaria necesitábamos contar con una técnica que nos brindase información de todo el transcriptoma de células neotransformadas. El transcriptoma es el grupo completo de transcriptos que puede generar un tipo celular, incluyendo ARNm, ARNs no codificantes, con detalles de la abundancia relativa de los mismos, para un momento determinado del desarrollo o condición fisiológica. Comprendiendo el funcionamiento y las particularidades de un transcriptoma se pueden identificar constituyentes moleculares de un tejido o una célula y relacionar a éstos con el desarrollo o con situaciones patológicas, como la que nosotros pretendemos describir. Incluso, comparando dos transcriptomas de dos estadios celulares distintos, del desarrollo, o patológico vs normal, pueden identificarse diferentes variantes de *splicing*, patrones de expresión diferencial de determinados ARNs codificantes o no codificantes.

Numerosas son las técnicas que han surgido para cuantificar, catalogar, comparar y describir las particularidades de varios transcriptomas: las técnicas basadas en la hibridización tuvieron su auge en un momento, dentro de las cuales los *microarrays* fueron rutilantes y aun hoy son una herramienta de profusa utilización. Otro gran grupo de técnicas, se basa en directamente determinar la secuencia del ADNc. La secuenciación de DNA y RNA explora la variabilidad genética en individuos, familias, y poblaciones, permitiendo abordar el estudio de problemas o patologías

ligadas a anomalías genéticas. En combinación con la secuenciación de RNA, que nos permite identificar los niveles de expresión de los genes codificados en el genoma, estas técnicas nos permiten una comprensión de los efectos de la variación del código genético. Las técnicas de secuenciación tuvieron una evolución importante durante los últimos 30 años, pero dieron un salto espectacular con el desarrollo reciente de los métodos de secuenciación de DNA de alto rendimiento; en el técnicamente más manejado inglés: *novel high-throughput DNA sequencing methods*. La técnica más masivamente utilizada para mapear y cuantificar ARNs de transcriptomas se denomina **RNA-seq (por RNA sequencing)** (233; 234).

Este método revolucionó en los últimos diez años la forma en la que los transcriptomas eucariotas son analizados (235). Facilitó el análisis para detectar variantes de *splicing*, modificaciones postranscripcionales, determinar las adyacencias exón/intrón, verificar los extremos 5' y 3' previamente reportados, detectar la fusión de genes y por su puesto los cambios en su nivel de expresión (235). RNA-seq utiliza técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS; término equivalente a *high-throughput sequencing*). Dentro de lo que se conoce como NGS están las tecnologías de Illumina (Solexa) sequencing, Roche 454 sequencing, Ion torrent: Proton/PGM sequencing y SOLiD sequencing (235).

En general, un grupo grande de RNAs (totales o fraccionados, como por ejemplo solo los *ARNm* con poliA) son convertidos en una librería de DNAC con adaptadores en cada uno de sus extremos o solo en uno de ellos (**Figura 23**). Cada una de las moléculas incluida en la librería, habiendo sido o no amplificada, es secuenciada con técnicas NGS, para obtener pequeñas secuencias correspondientes a uno de los extremos (*single end sequencing*), o a ambos de los extremos (*pair end sequencing*). Luego las lecturas suelen estar entre 30 y 400 pb, dependiendo de la tecnología de secuenciación de DNA utilizada.

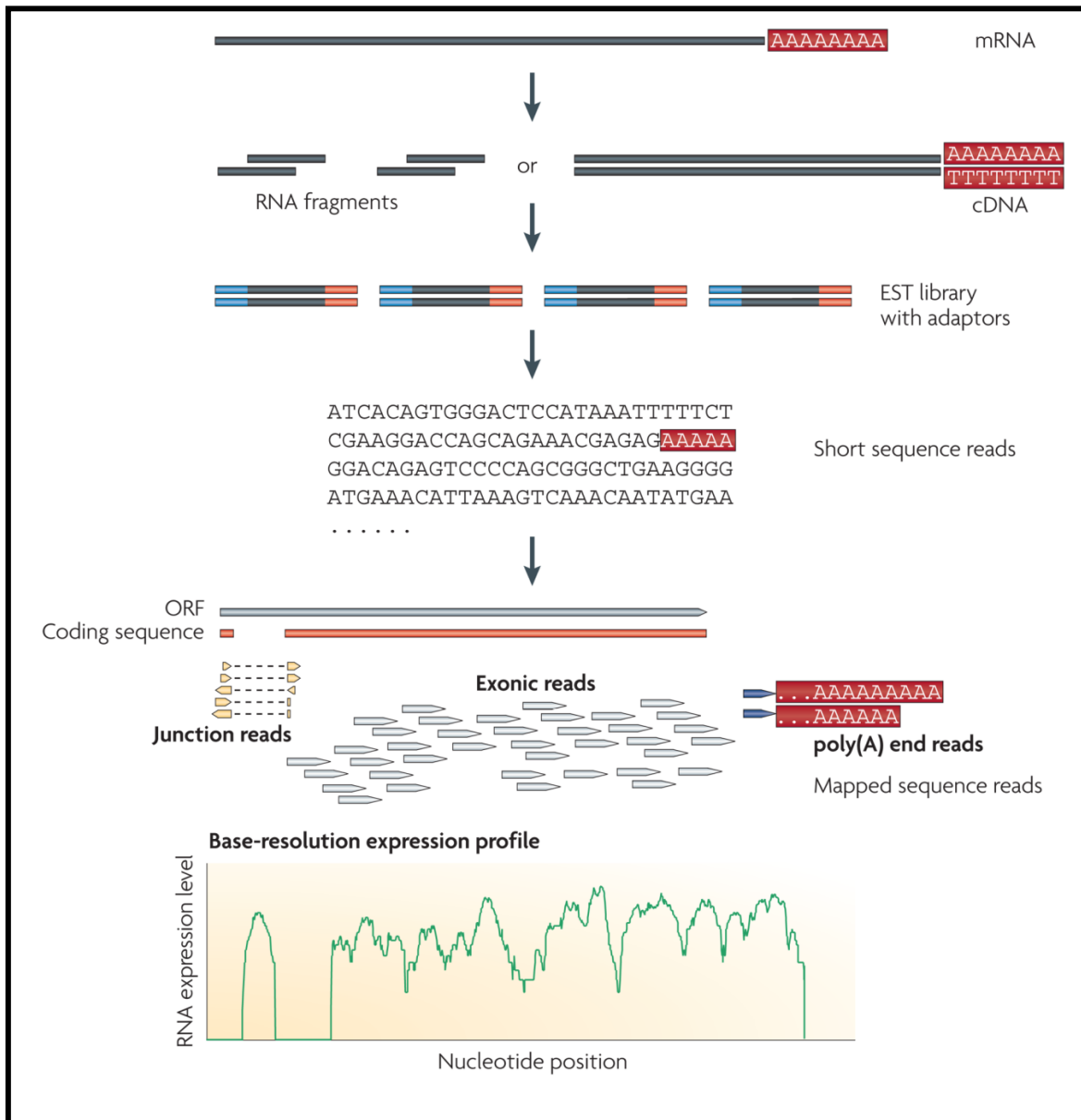


Figura 23: Un típico experimento de RNA-seq. Los *ARNm* largos son primero convertidos en una librería de DNAc, por fragmentación del RNA. Luego se adicionan los adaptadores para la secuenciación, a cada uno de los fragmentos de DNAc; utilizando técnicas NGS una pequeña secuencia es obtenida de cada DNAc. Las lecturas resultantes de la secuenciación de cada DNAc, son alineadas con el transcriptoma de referencia, y clasificadas por tres tipos: lecturas exónicas, lecturas de empalme, y lecturas de poliA. Estos tres tipos mencionados, son utilizados para generar una resolución de secuencia a nivel de la bases nitrogenadas para cada gen, como es ilustrado al final de la figura; como ejemplo se muestra un marco de lectura abierto de levadura, (tomado de (235)).

Luego de la secuenciación, los resultados son alineados a un genoma de referencia o un grupo de transcriptomas utilizados como referencia lo que da lugar a un mapa de la transcripción a escala genómica donde se combina la información física del cada transcripto (estructura, variantes de

splicing, etc.), con su nivel de expresión. El procesamiento rápido de los resultados, es esencial para formular cualquier tipo de hipótesis. A partir de aquí se abre una etapa en la que se dedica un tiempo considerable a las tareas de análisis de datos, en la que biólogos y bioingenieros especializados se preparan como científicos del genoma. Contamos con esta tarea con el Dr. Rodríguez Seguí, quien tiene el manejo fluido de un número considerable de algoritmos, métodos estadísticos y herramientas de software para realizar los pasos de análisis diferentes NGS (Tyler 2016). Lo que en la jerga bioinformática se conoce como “*pipeline*” (ver **Materiales y Métodos Bioinformática**). Nos propusimos trabajar con datos ya secuenciados que aparecen disponibles en bases de datos públicas en la *web*, de RNA-seq de diferentes tipos de tejidos hipofisarios realizando comparaciones entre tejidos en estado patológico y normal. Si bien logramos hallar secuencias de RNA-seq correspondientes a tumores hipofisarios en humano en las bases de datos de acceso público, para obtener las secuencias del tejido hipofisario normal fue necesario tramitar una autorización especial de la “Database of Genotypes and Phenotypes” (dbGaP), por hallarse dichas secuencias depositadas en bases de datos de acceso restringido.

A pesar de que la técnica de RNA-seq, permite obtener secuencias en gran escala, extraer información e ideas biológicas de estas secuencias requiere de herramientas sofisticadas. Uno de los métodos analíticos computacionales más conocidos que nos permitió extraer abundantes detalles sobre los RNA-seqs, se llama *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), específico para interpretar datos de expresión o transcriptomas. Su gran utilidad y poder de análisis reside en identificar “grupos de genes” o “gene sets”, que comparten una función biológica determinada, localización cromosomal, o algún tipo de regulación transcripcional (125).

Los “grupos de genes” se definen basándose en conocimientos biológicos previos, por ejemplo, información publicada sobre vías bioquímicas o coexpresión en experimentos previos. Las estrategias más antiguas, el análisis de expresión estaba focalizado de una forma individual, gen por gen, en una comparación entre dos estados de interés. De esta forma, los procesos biológicos, las vías metabólicas, o vinculadas a transformaciones neoplásicas, respuestas a estados de estrés quedan fuera del análisis, dado que son fenómenos multigénicos. En las comparaciones transcriptómicas que presentaremos en este trabajo, de grandes masas de tejidos, la herramienta GSEA se vuelve indispensable. Los detalles técnicos computacionales, así como los algoritmos que la técnica utiliza, escapan a los objetivos de esta tesis. Sin embargo queremos destacar que cuando los miembros de un conjunto de genes muestran una fuerte correlación cruzada, GSEA puede aumentar la relación señal-ruido y hacer que sea posible detectar cambios modestos en los genes individuales. De esta característica, nos valimos en este trabajo, para la detección de marcadores específicos del conjunto de genes de la vía de Notch (125).

El conocimiento molecular previo que tenemos sobre NOTCH, implica tener en cuenta que estos receptores en última instancia, luego de su activación, translocan al núcleo celular y funcionan como factores de transcripción (87; 108). Esto implica la interacción de la fracción clivada activa NICD, con el ADN, formando parte de un complejo molecular con otras proteínas. NICD media la

conversión de CBF-1-Su(H)1 (CSL), un complejo represor, en un factor de transcripción activacional, reclutando a MAML1 (106). De manera que una opción interesante para localizar genes diana de NOTCH, es indagando sobre posibles secuencias de unión para NOTCH en los promotores o regiones regulatorias de genes candidato.

Para esto recurrimos a una técnica de localización de la unión de proteínas al ADN de manera global, que forma parte de las tecnologías NGS, porque consiste en realizar una inmunoprecipitación de la proteína de interés seguida de una secuenciación de alto rendimiento: CHIP-seq (236). Esta técnica permite localizar sitios de interacción entre el ADN y proteínas (en nuestro caso la proteína NOTCH) y genes que pudieran estar siendo regulados por éste, pero que todavía en la bibliografía biomédica no estén profusamente reportados, y que nos sirvan para completar nuestro trabajo (237). En un experimento típico de CHIP-seq, los ácidos nucleicos que están implicados en una interacción proteína-DNA, son purificados luego de una inmunoprecipitación efectuada con un anticuerpo contra el factor de transcripción o proteína de interés; luego estos fragmentos son secuenciados masivamente por *high throughput sequencing* (234). De igual forma que ocurre con el RNA-seq, una vez obtenidas las secuencias, comienza el arduo trabajo del bioinformático, para trabajar con ellas en base a algoritmos, herramientas estadísticas y programas de software, para alinear estas secuencias cortas al genoma de referencia e identificar en última instancia los sitios de unión en todo el genoma para la proteína precipitada.



## OBJETIVOS DEL CAPÍTULO III

En base a los antecedentes presentados nos propusimos estudiar la participación de la señalización de NOTCH en adenomas hipofisarios recurriendo a herramientas bioinformáticas, e identificar marcadores novedosos no descritos en la bibliografía que estén siendo regulados por NOTCH en la hipófisis.

### Objetivos específicos del Capítulo III

---

1. Sirviéndonos de bases de datos públicas, utilizar los datos disponibles de CHIP-seq que nos permitan identificar genes con promotores y/o potenciales regiones regulatorias con sitios de unión para NOTCH que estén activos y con especificidad para tejido hipofisario.
2. Utilizando bases de datos públicas disponibles en la web que contienen resultados de RNA-seq de muestras tumorales hipofisarias e hipófisis normales, realizar un estudio comparativo de diferentes transcriptomas de tumor vs. control que permitan identificar marcadores diferencialmente regulados en una y otra situación fisiológica. Hacer análisis de GSEA para determinar el comportamiento de toda la vía de señalización de NOTCH en forma comparativa. A partir de ello, establecer cuál es el comportamiento de los componentes de la vía de señalización de NOTCH en cada contexto, y de sus genes río abajo.
3. Cruzar la información obtenida en el punto 1 y el punto 2 para identificar posibles marcadores relacionados a la vía que puedan ser testeados en el contexto de los modelos y líneas celulares presentados en los **Capítulos I y II**.
4. Determinar por RT-PCR en Tiempo Real la expresión diferencial de marcadores identificados en el punto 3 en el contexto de los modelos experimentales y líneas celulares presentados en los **Capítulos I y II**.

## RESULTADOS DEL CAPÍTULO III

### Resultado del análisis de ChIP seq de células hipofisarias GC, en búsqueda de genes activos transcripcionalmente, específicos de hipófisis y con sitios de unión para NOTCH1

Nuestros resultados del **Capítulo II** nos dieron el puntapié para iniciar la búsqueda de nuevos marcadores diana de NOTCH en los tejidos hipofisarios. Siguiendo una estrategia bioinformática; en primer lugar se analizó información de ChIP-seqs disponibles en la *web* en las bases de datos SRA y dbGAP (ver **Mat. y Métodos Bioinformática**), para inferir regiones regulatorias de genes en los que putativamente NOTCH1 tendría sitios de unión. La estrategia consistió en definir regiones regulatorias que pudieran estar siendo diana de NOTCH1, en el genoma de células GC (secretoras de GH) de rata. Para ello se cruzó la información de dos ChIP-seq distintos. El ChIP-seq contra la modificación de histonas (H3K4me1+), permite identificar potenciales regiones regulatorias (activas o latentes) en el genoma. Si bien presenta su mayor enriquecimiento en regiones distales a los promotores (o regiones *enhancer*), también se encuentra enriquecida en las zonas cercanas a los mismos aunque con menor intensidad. En función de los parámetros empleados para el análisis de zonas de enriquecimiento es posible captar tanto promotores como regiones *enhancer*. El ChIP-seq contra la modificación de histonas (H3K27ac+), por otro lado, nos permite identificar regiones regulatorias activas del genoma. Por ende, al combinar la información de (H3K4me1+) y (H3K27ac+) tenemos un mapa de las regiones regulatorias (promotores y *enhancers*) activos del genoma. Es decir que las regiones donde debía pegarse NOTCH1 serían H3K27ac+/H3K4me1+. Dado que no se cuenta en la actualidad con datos de ChIP-seq para NOTCH en líneas celulares de hipófisis, del total de regiones regulatorias activas se eligieron aquellas regiones (H3K27ac+; H3K4me1+) que podrían unir NOTCH1 cruzando los resultados con datos de un ChIP-seq de Notch en otro tejido. Se trata de una línea celular de ratón *T-cell acute lymphoblastic leukemia* (T-ALL) mutante L1601P, con sobre-expresión de NOTCH1. Para ello fue necesario hacer un *lift-over* para encontrar las regiones de unión de NOTCH equivalentes en el genoma de rata, y así poder realizar la intersección de estos parámetros. Para el análisis se usó la herramienta GREAT (<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>) para asociar las regiones *enhancer* (con potencial unión de NOTCH) a genes, y realizar un análisis de *Gene Ontology*. Por último, se empleó también un ChIP-seq contra el factor Pit-1 (Pit1+), un factor de transcripción específico de hipófisis (238-240) que per se, define regiones promotoras y *enhancers* de fuerte expresión en la hipófisis. De esta forma, pudimos evaluar cuáles de las regiones con potencial unión de NOTCH1 en células GC tienen también unión de este factor específico.

En este análisis salió enriquecido significativamente el grupo de genes involucrados en la regulación positiva de los procesos catabólicos de ARNm, "*Genes involved in positive regulation of mRNA catabolic process*" y de modificación postraducciona de histonas, "*histone lysine methylation*". En estos grupos aparecen *Btg2*, *Cnot1*, *Men1* y *Zfp36* (**Figura 24**).

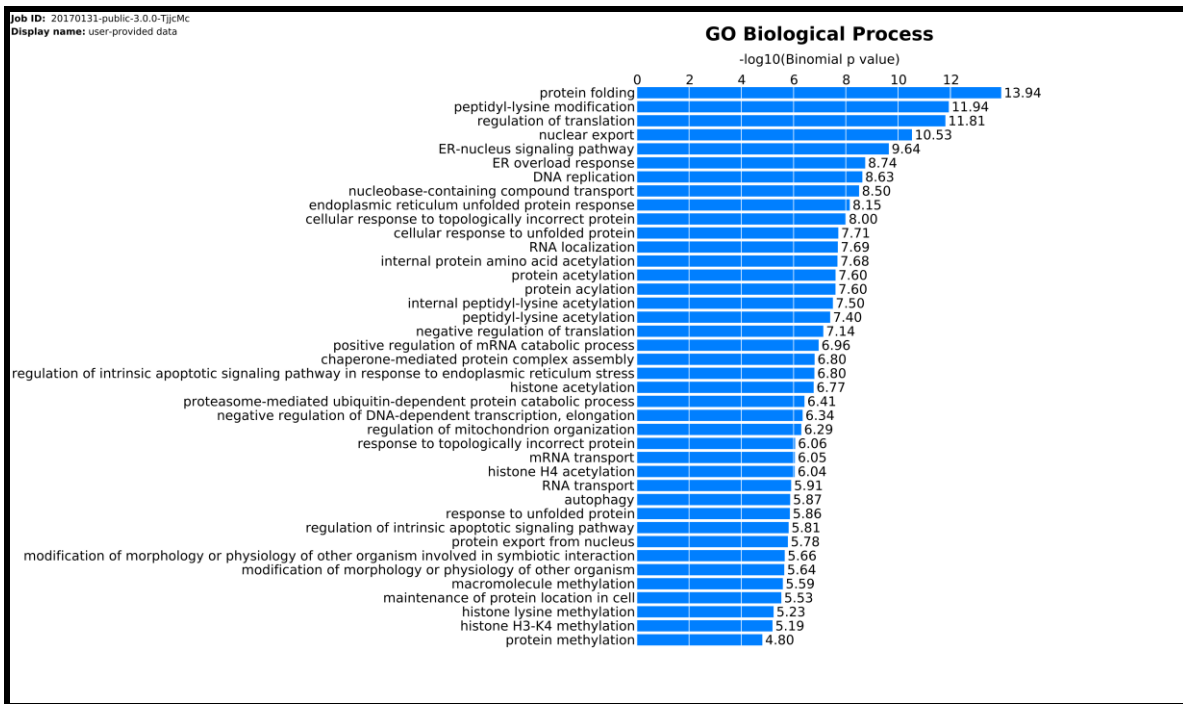


Figura 24: Análisis de *Gene Ontology* con GREAT. *Men1* sale en la categoría “*histone lysine methylation*” de Biological process. *Btg2*, *Cnot1* y *Zfp36*, salen en la categoría “*Genes involved in positive regulation of mRNA catabolic process*”.

En la **Figura 25 A-E** se muestran los resultados *in silico* de 3 putativos efectores de NOTCH en células de la hipófisis que pertenecen a la categoría de “*Genes involved in positive regulation of mRNA catabolic process*”: *Zfp36*, *Btg2*, y *Cnot1*. Además en la categoría “*histone lysine methylation*” aparece como gen candidato: *Men1*. Los cuatro tienen sitios de unión para NOTCH1 (cajas grises), además estos marcadores aparecen con marcas de cromatina abierta, y *enhancers* activos en células GC de rata (marcas amarilla y marrón) además de sitios de unión para PIT1, señal que le da especificidad de marcador hipofisario a todo el análisis (marca violeta) (**Figura 25**).

En resumen, en este análisis de *Gene Ontology*, se observó el solapamiento de H3K4me1+ y H3K27ac+ con los picos de NOTCH1; nos quedamos solo con los 15000 picos que tienen mayor señal en la línea T-ALL L1601P. La señal de PIT1+ es un agregado de especificidad, post-análisis. A partir de toda esta información se genera la **Figura 25**.

*Btg2* codifica para un péptido que forma parte del grupo de proteínas inducibles por el factor de crecimiento nervioso (*NGF-inducible anti-proliferative protein*), también conocida como PC3 en rata o Tis21 en ratón. *Btg2*, es un gen supresor que controla el ciclo celular, y la expresión de genes proneurales, fundamentalmente actuando como factor de transcripción co-regulatorio que aumenta o inhibe la actividad de expresión de genes que también codifican para factores de transcripción. Tiene características antiproliferativas, frenando el ciclo celular. Además tiene

función mediando la interacción de subunidades del complejo CCR-NOT, cuya principal función es deadenilar moléculas de *ARNm* (241).

*Cnot1* es un gen que codifica para una proteína que forma parte del complejo macromolecular CCR4-NOT. También es un gen supresor, su principal función es deadenilar los *ARNm*, *Cnot1* actúa como proteína andamiaje uniendo otras subunidades del complejo, que en total suman nueve subunidades entre las que tienen actividades enzimáticas y las que no la tienen. El complejo está implicado en la regulación postranscripcional de *ARNm*, a través de la deadenilación, un paso en la regulación de su estabilidad (242).

*Zfp36* codifica para una proteína con dedos de zinc, al igual que *Btg1* pertenece a la misma familia de proteínas por TPA (Tis: TPA induced sequence). Esta familia de proteínas tiene dominios de unión a los *ARNm*, específicamente AU-rich elements (AREs), en las zonas 3'UTR de los *ARNm*. Estamos en presencia de proteína implicadas en la degradación de mensajeros, junto con *Cnot1*, y *Btg2* (241). Por otra parte, se ha descrito que los ratones carentes de *Zfp36*, aparece una sintomatología similar a la sobreexpresión del TNF (Factor de necrosis tumoral), gracias a la estabilización de su *ARNm* (243; 244).

Siguiendo en la línea del gen *Btg2*, *Men1* codifica para la proteína MENINA, un conocido supresor tumoral. Esta proteína, es predominantemente nuclear, con papeles importantes en la regulación de la transcripción, estabilidad genómica, división celular y proliferación. Es un componente esencial del complejo MLL/SET-1 Histona Metiltransferasa, un complejo que específicamente metila Lys-4 de la histona H3 (H3K4). Funciona como un regulador transcripcional. Se une al promotor TERT y reprime la expresión de la telomerasa. Juega un papel en la inhibición de la proliferación celular mediada por TGF $\beta$ 1, posiblemente regulando la actividad transcripcional de SMAD3. Reprime la activación transcripcional mediada por JUN-D en sitios AP1 (<http://www.genecards.org/>). Las mutaciones en este supresor tumoral, dan lugar a tumores en las paratiroides, páncreas, y la hipófisis (Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)) (245).

### **Resultado del análisis de RNA-seq comparativo entre hipófisis controles y adenomas hipofisarios en búsqueda de genes diferencialmente expresados y relacionados a la vía de NOTCH1**

---

Los posibles marcadores que surgieron del análisis de ChipSeq, constituían una información valiosa, pero con el objetivo de hacer un análisis más profundo y global, decidimos obtener y reanalizar RNA-seqs públicos presentes en bases de datos SRA y los datos protegidos de dbGAP (estudio phs000424) (ver **Mat. Y Métodos Bioinformática**). Se obtuvieron RNA-seqs provenientes de hipófisis normales e hipófisis tumorales en humano, y se efectuaron varios análisis de GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), buscando indagar si existía alguna alteración en los componentes del Sistema Notch, comparando fenotipos normales con tumorales.

Para los análisis de GSEA se probaron dos estrategias alternativas. Por un lado, se realizó un GSEA en el que comparamos los datos de seis muestras control, es decir de hipófisis normales, contra tres adenomas hipofisarios distintos (dos adrenocorticotropinomas, y un prolactinoma secretante de Prolactina y GH), que pese a las diferencias de histotipo se los englobó como “tumoraes”. Con respecto a la señalización de NOTCH, no se obtuvo ninguna tendencia clara en numerosos marcadores examinados. Al comparar todos los controles, contra todos los tumores agrupados en una misma categoría no se ven diferencias significativas en genesets relacionados con la vía de NOTCH. Seguidamente, en otra comparación GSEA, se compararon las muestras controles, con los dos adenocorticotropinomas de los que se tenían datos, uno secretante de ACTH y el otro no funcionante. No se encontró un enriquecimiento contundente para efectores de NOTCH. Creemos que debido a que los dos tumores, son de carácter distinto, pues uno es secretor y el otro no. Por otro lado, en el GSEA se compara si hay subida o bajada de todos los componentes de la vía de NOTCH, pero esto no discrimina si son genes supresores o activadores. Por ello se decidió analizar en forma individual los cambios de expresión en los genes activadores y supresores de la vía de NOTCH, y hay significancia estadística de tres supresores *Btg2*, *Nr4a1* y *Hes1* y el ligando *Jagged2* que disminuyen en todos los tipos de tumores, respecto a los controles.

En resumen, y posteriormente, todas las confrontaciones GSEA que realizamos fueron:

- 1) Hipófisis Control (6 muestras) vs Adrenocorticotropinoma secretante (1 muestra);
- 2) Hipófisis Control (6 muestras) vs Adrenocorticotropinoma no secretante (1 muestra) ;
- 3) Hipófisis Control (6 muestras) vs Adenoma secretante de Prolactina-GH (1 muestra);
- 4) Adrenocorticotropinoma secretante (1 muestra) vs Adrenocorticotropinoma no secretante (1 muestra);
- 5) Adrenocorticotropinoma secretante (1 muestra) vs Adenoma secretante de Prolactina-GH (1 muestra);
- 6) Adrenocorticotropinoma no secretante (1 muestra) vs Adenoma secretante de Prolactina-GH (1 muestra).

De todos estos cotejos se extrajo información útil de genes marcadores que pudieran interesarnos (todas las tablas en **ANEXO**). Lo más importante y destacado del análisis fue que al hacer un análisis global, detectamos que la vía de NOTCH tiene una intervención distinta según el histotipo del tumor. En las comparaciones de *Hipófisis control vs Adrenocorticotropinoma secretante* (GSEA nro. 1) numerosos puntos de la vía de NOTCH aparecen aumentados (**Tabla 9**), en cambio en el caso del adenoma secretante de Prolactina-GH (GSEA nro. 3), varios integrantes de la vía estaban disminuidos (**Tabla 10**). Todas estas aseveraciones son de carácter cualitativo; debido al no disponible en las bases de datos, y por ello fue necesario combinar los resultados obtenidos con el estudio epigenético mencionado anteriormente.

Al realizar el cotejo de transcriptomas de un tumor secretante de ACTH versus seis Hipófisis normales (GSEA nro. 1), los genes *Notch2* y *Notch3*, *Jagged2* aparecen significativamente aumentados en el tejido tumoral. Mientras que, los ligandos de NOTCH, *Dll1*, *Dll3*, y *Hes1* están disminuidos significativamente respecto del tejido control. Apoyando todo el análisis epigenético de *Gene Ontology*, el supresor tumoral, *Btg-2* está cinco veces aumentado en la Hipófisis normal, comparado al adrenocorticotropinoma (**Tabla 9**).

### Resultados combinando los análisis de ChIP-seq y RNA-seq para el caso del estudio de la vía de NOTCH en prolacto-somatotropinomas

Dentro de las condiciones mencionadas, y teniendo en cuenta las limitaciones analíticas (son las únicas muestras de RNA-seq humanas disponibles en la *web*), se halló información útil en relación modelo de prolacto-somatotropinomas que se viene trabajando desde el **Capítulo II**. Se observó que las vías de señalización por NOTCH (GSEA nro. 3) estaban alteradas en adenomas secretores de GH y de Prolactina (**Tabla 10**), y cruzando estos datos con los del ChIP-seq surgió que los genes con cromatina activa, PIT1+ y con sitios de unión a NOTCH1 en sus promotores: *Btg2*, y *Zfp36* estaban disminuidos en la muestra de tumor secretante de Prolactina y GH con respecto a las hipófisis control. También aparecían disminuidos de forma significativa, *Notch1-2-3*, *Jagged2*, *Dll1*, *Hey2* y *Hes1* en los Prolactinomas. Cabe mencionar, que al analizar los resultados de RNA-seq surgieron importantes diferencias en el marcador *NR4A1*, que también había aparecido como posible gen diana de NOTCH en el *Gene Ontology* hecho en base a ChIP-seqs. Solo que no se pudo identificar desde un principio, debido a que aparece en las categorías "*Genes involved in Downstream Signaling Events Of B Cell Receptor (BCR)*" y "*Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes*" del MsigDB pathway, que *a priori* no daban una información demasiado cercana a lo que es la patología hipofisaria que estamos estudiando. El gen *NR4A1* codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia Nur, Factor de Crecimiento Nervioso IB "*Nerve growth factor IB*". Está involucrado en la mediación del ciclo celular, procesos inflamatorios y apoptosis (Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor también llamado Nur77). En la **Figura 25 E** está esquematizada la posición del gen *Nr4a1* y los sitios de regiones de unión a NOTCH1 marcas de cromatina abierta, y *enhancers* activos en células GC de rata. Los sitios de unión para PIT1, se encuentran distantes del promotor, pero lo más importante son los 3 picos de PIT1 de señal muy alta que hay río arriba del promotor, y que coinciden con *enhancers* activos en células GC (tienen señal muy alta de H3K27ac+ y H3K4me1+). Dos de estos *enhancers*, además, son potencialmente unidos por NOTCH. Si bien para demostrar que realmente estos son *enhancers* de *Nr4a1* habría que hacer un experimento de 3C (Chromosome Conformation Capture (246)), se puede sugerir que son *enhancers* potenciales de *NR4A1*, porque caen dentro de un TAD (*Topologically associated domain*); reportado en otro trabajo para tejido cerebral (247). Que los *enhancers* caigan junto con un gen dentro de un TAD es mucho más predictivo de que regulen a ese gen (y probablemente otros genes dentro del mismo TAD). Eso, sumado a que es uno de los dos genes más cercanos a estos *enhancers* (el otro es

“Grasp”) permitieron sugerir que son *enhancers* potenciales de *Nr4a1* (la Figura o “screenshot” de TAD esta agregada en el “Anexo” de la Tesis, **Figura 34**, al igual que el resto de las tablas con los genes de interés de este trabajo, obtenidos de los 27000 genes analizados al realizar las comparaciones nro 2, 4, 5 y 6 (**Tablas 11-14 respectivamente**), de los que no extrajimos información particularmente concluyente).

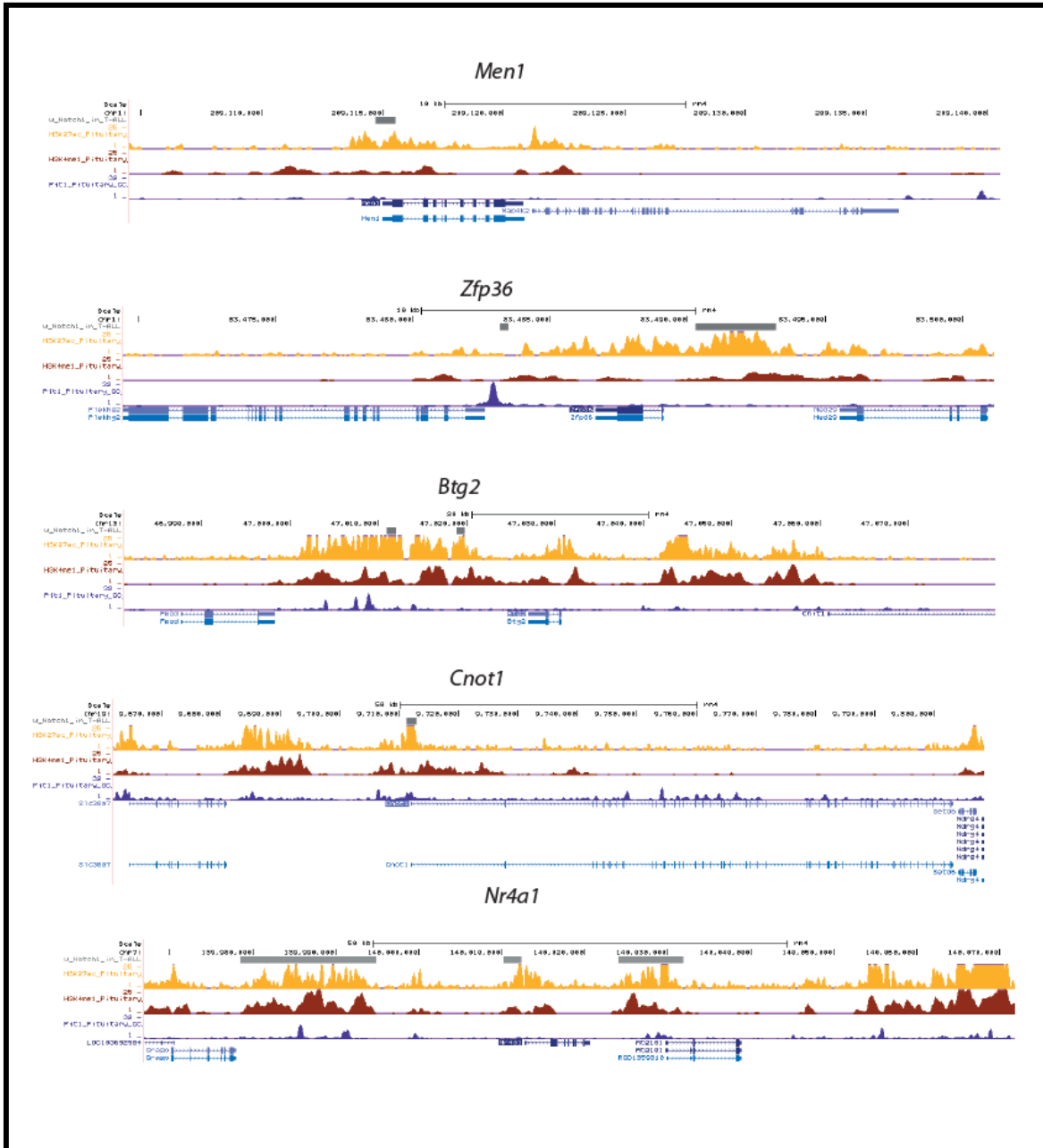


Figura 25: Se identificaron cinco putativos genes target de NOTCH por *Gene Ontology*. Se muestran cinco capturas de pantalla resultado de intersectar datos de de ChIP-seqs. De A a E se muestran los sitios de pegado de NOTCH1 (cajas grises), señal de “cromatina abierta” (H3K27ac+; picos y mesetas amarillas), señal de promotores o *enhancers* activos

(H3K4me1+; picos y mesetas marrones) y sitios de unión del factor PIT1 (Pit1+; picos violeta), respectivamente para *Men1*, *Zfp36*, *Btg2*, *Cnot1*, *NR4A1*. Debajo de las señales de los ChIP-seq, se esquematizan los genes identificados por el *Gene Ontology*, así como genes alelados en la secuencia genómica.

La recopilación y análisis de toda la información obtenida de los análisis *in silico* epigenético y de transcriptomas nos habilitó, en base a las preguntas biológicas que queremos contestar (ver objetivos del **Capítulo III**) para elegir algunos de los supresores tumorales y genes vinculados con la señalización de NOTCH, y evaluarlos en nuestros modelos experimentales. Los genes elegidos fueron: *Btg2*, *Nur4A1*, *Men-1*, *Zfp36* y *Cnot1* (Ver **Tabla 10** donde se definen las cantidad de regiones activas y reguladoras de cada gen, y la expresión diferencial en prolactosomatotropinomas vs. hipófisis normales).

Componente	gene_id	Gen	Muestra	Valor Hf. Control	Valor Adenoma	log2(fold change)	test_stat	q_value	significativo	# de Regiones Activas p/ Notch
Receptor	XLOC_023761	<b>NOTCH1</b>	Ad_ACTH	9.2	19.4	1.06593	1.87878	0.09689	no	0
Receptor	XLOC_001804	<b>NOTCH2</b>	Ad_ACTH	6.4	38.1	2.5679	3.54329	0.00118	yes	2
Receptor	XLOC_011668	<b>NOTCH3</b>	Ad_ACTH	14.0	71.2	2.3428	3.74988	0.00118	yes	0
Ligand	XLOC_019693	<b>DLL1</b>	Ad_ACTH	7.2	2.0	-1.8276	-2.35773	0.04564	yes	0
Ligand	XLOC_011106	<b>DLL3</b>	Ad_ACTH	3.3	0.5	-2.72873	-2.50449	0.05249	no	0
Ligand	XLOC_007287	<b>DLL4</b>	Ad_ACTH	6.2	6.2	0.0049864	0.007625	0.99551	no	0
Ligand	XLOC_014077	<b>JAG1</b>	Ad_ACTH	8.2	33.9	2.04492	3.41726	0.00351	yes	0
Ligand	XLOC_007178	<b>JAG2</b>	Ad_ACTH	43.5	4.2	-3.36175	-5.33536	0.00118	yes	0
Target	XLOC_018951	<b>HEY2</b>	Ad_ACTH	4.8	2.2	-1.12966	-1.33261	0.23444	no	0
Target	XLOC_001507	<b>HEYL</b>	Ad_ACTH	16.4	27.4	0.744491	1.32583	0.22613	no	
Target	XLOC_015808	<b>HES1</b>	Ad_ACTH	60.5	6.3	-3.263	-4.37446	0.00118	yes	0
Target suppressor	XLOC_001013	<b>BTG2</b>	Ad_ACTH	258.3	47.2	-2.45237	-3.09335	0.02660	yes	3
Target suppressor	XLOC_008821	<b>CNOT1</b>	Ad_ACTH	26.8	27.7	0.0494363	0.077643	0.95738	no	2
Target suppressor	XLOC_004992	<b>NR4A1</b>	Ad_ACTH	1075.3	232.6	-2.20891	-2.01375	0.31102	no	4
Target suppressor	XLOC_011102	<b>ZFP36</b>	Ad_ACTH	249.4	444.1	0.83268	0.755294	0.47179	no	1
Target suppressor	XLOC_004434	<b>MEN1</b>	Ad_ACTH	22.5	14.9	-0.592462	-1.05247	0.36926	no	2

Tabla 9: Comparación Hipófisis Control vs Corticotropinoma secretante Nro: 1. De los 27000 genes analizados se muestran los de interés que pertenecen al Sistema Notch, como ligandos, receptores o efectores río abajo. En la tabla aparecen los valores “q”, que indican cuando la diferencia de expresión en entre ambos transcriptomas es significativa (q<0.05; en rojo). Resaltado en celeste indica genes que están aumentados en los adenomas, y en amarillo aquellos que están disminuidos.



Componente	gene_id	Gen	Muestra	valor Hf. Control	valor Adenoma	log2(fold_change)	test_stat	q_value	significativo	# de Regiones Activas p/ Notch
Receptor	XLOC_023761	<b>NOTCH1</b>	Ad_PRL_GH	9.2	1.0	-3.28	-4.59383	0.0012	yes	0
Receptor	XLOC_001804	<b>NOTCH2</b>	Ad_PRL_GH	6.4	0.4	-3.91487	-4.40234	0.0012	yes	2
Receptor	XLOC_011668	<b>NOTCH3</b>	Ad_PRL_GH	14.0	6.0	-1.23	-2.24874	0.0391	yes	0
Ligand	XLOC_019693	<b>DLL1</b>	Ad_PRL_GH	7.2	1.2	-2.55	-3.16906	0.0081	yes	0
Ligand	XLOC_011106	<b>DLL3</b>	Ad_PRL_GH	3.3	2.8	-0.22	-0.22272	0.8830	no	0
Ligand	XLOC_007287	<b>DLL4</b>	Ad_PRL_GH	6.2	2.2	-1.53	-2.05215	0.0697	no	0
Ligand	XLOC_014077	<b>JAG1</b>	Ad_PRL_GH	8.2	5.4	-0.60	-0.96445	0.4125	no	0
Ligand	XLOC_007178	<b>JAG2</b>	Ad_PRL_GH	43.5	8.8	-2.30	-3.93449	0.0012	yes	0
Target	XLOC_018951	<b>HEY2</b>	Ad_PRL_GH	4.8	0.6	-2.97	-3.16248	0.0187	yes	0
Target	XLOC_015808	<b>HES1</b>	Ad_PRL_GH	60.5	8.4	-2.84878	-4.03063	0.0012	yes	0
Target	XLOC_001507	<b>HEYL</b>	Ad_PRL_GH	16.4	4.6	-1.82508	-2.95558	0.0053	yes	0
Target suppressor	XLOC_001013	<b>BTG2</b>	Ad_PRL_GH	258.3	10.3	-4.64156	-5.62201	0.0012	yes	3
Target suppressor	XLOC_008821	<b>CNOT1</b>	Ad_PRL_GH	26.8	21.6	-0.30961	-0.48129	0.7055	no	2
Target suppressor	XLOC_004992	<b>NR4A1</b>	Ad_PRL_GH	1075.3	17.5	-5.93824	-5.54196	0.0480	yes	4
Target suppressor	XLOC_011102	<b>ZFP36</b>	Ad_PRL_GH	249.4	34.0	-2.87456	-2.71986	0.0567	no	1
Target suppressor	XLOC_004434	<b>MEN1</b>	Ad_PRL_GH	22.5	18.7	-0.270617	-0.49683	0.7073	no	2

Tabla 10: Comparación Hipófisis Control vs Prolactinoma secretante nro: 3. De los 27000 genes analizados se muestran los de interés que pertenecen al Sistema Notch, como ligandos, receptores o efectores río abajo. En la tabla aparecen los valores “q”, que indican cuando la diferencia de expresión en entre ambos transcriptomas es significativa (q<0.05; en rojo).

### Expresión diferencial de *Btg2*, *Nr4a1*, *Men1*, *Zfp36*, y *Cnot1* en células GH3 y en xenotransplantes tumorales de GH3

Primero se comparó la expresión de los genes en células GH3 y tumores xenotrópicos. Se observó que los niveles de *ARNm* de los dos supresores *Btg2* y *Nr4a1* fueron significativamente menores en los tumores (**Figura 26 A**). No se obtuvieron diferencias significativas en cambio para los genes *Men1*, *Zfp36*, y *Cnot1*.

### Efecto del tratamiento con DAPT en la expresión de *Btg2*, *Nr4a1*, *Men1*, *Zfp36*, y *Cnot1* en los xenotransplantes tumorales de GH3

Los *ARNm* de los genes supresores *Btg2* y *Cnot1*, estaban significativamente incrementados en el caso de los xenotransplantes tratados con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (**Figura 26 B**), evidenciando que estamos en presencia de dos nuevos genes diana de NOTCH en hipófisis hasta ahora desconocidos en la literatura. El *ARNm* de *Men1*, supresor tumoral, aparece aumentado en los tumores tratados, pero la diferencia no es significativa con respecto al control, mientras que los otros dos genes estudiados (*Zfp36* y *Nr4a1*) no mostraron cambio alguno con el tratamiento.

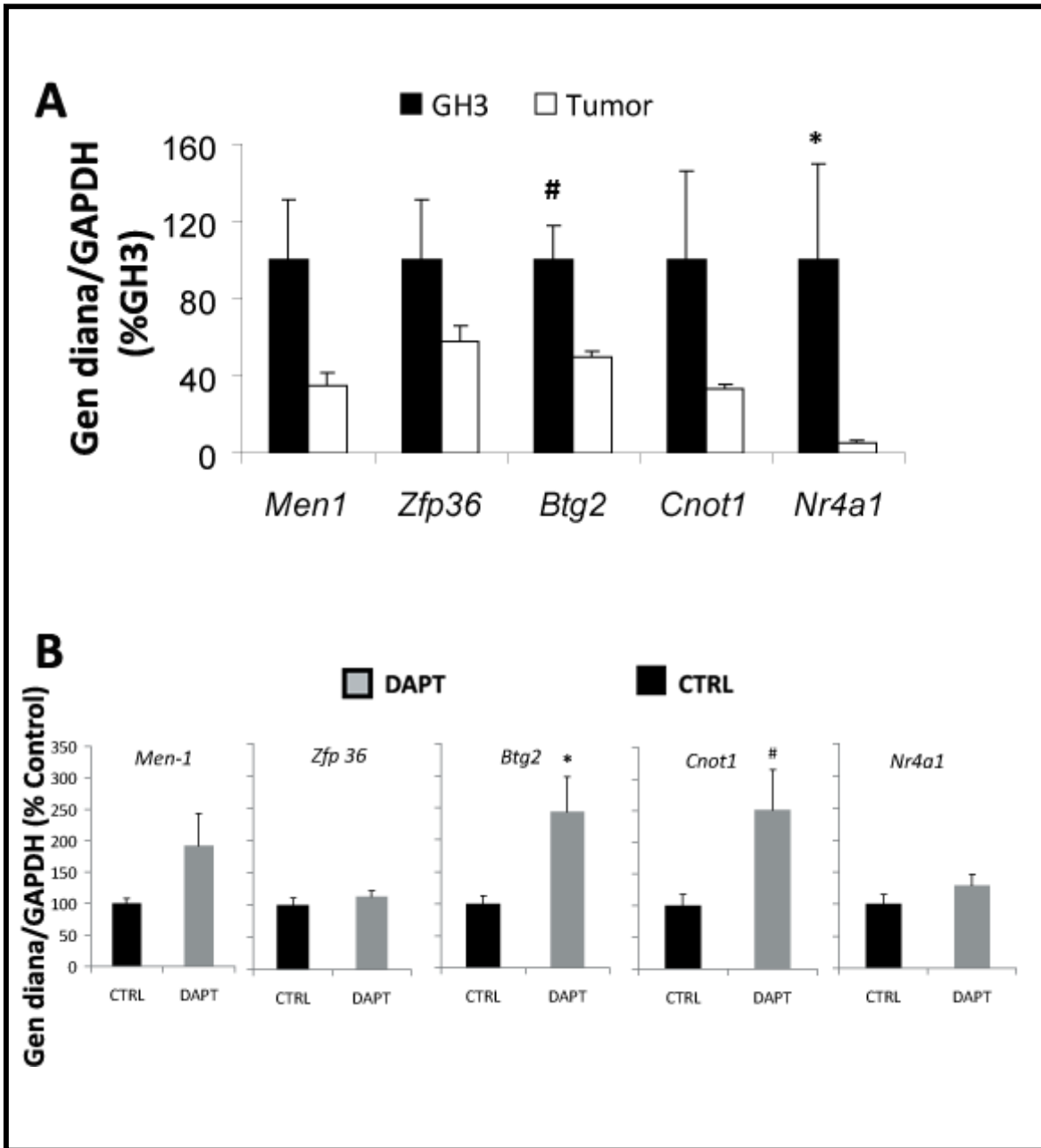


Figura 26: Los efectores de NOTCH tienen un patrón de expresión diferencial en células GH3 y en xenotransplantes. A) Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* en GH3 y xenotransplantes de ratón cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de las células GH3, las cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideró 100%. #  $p = 0.048$ , \* $p=0.020$  para *Btg2* y *NR4A1*; *Men1*, *Zfp36*, *Cnot1* no significativo NS,  $n = 3-3$ ; para GH3 y tumor xenotrópico respectivamente.

B) Expresión del *ARNm* de putativos genes diana de la vía de NOTCH. Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de tumores provenientes de animales Control, los cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideraron 100%. De izquierda a derecha: Expresión de los genes *Btg2* y *NR4A1*; *Men1*, *Zfp36*, *Cnot1* ( $n=7$  y  $8$ ); en tumores provenientes de animales tratados con solución Control o DAPT, respectivamente.

## DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO III

Entre los objetivos que nos propusimos alcanzar estaba identificar nuevos genes diana de la vía de señalización NOTCH en el tejido hipofisario, que sean útiles para comprender la patología de tumores en la pituitaria. En el **Capítulo II**, utilizando el modelo de xenotransplantes de células GH3, solo uno de los marcadores que habíamos analizado dio una respuesta en función de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa. Para seguir indagando en la descripción molecular de la señalización por NOTCH, sacamos provecho de herramientas informáticas que nos dieron numerosos e interesantes resultados.

La cantidad de material obtenida por *Gene Ontology*, analizando datos epigenéticos en base a ChIP-seqs, es muy valiosa. En principio, cruzando información de ChIP-Seqs en células GC, y líneas de ratón de T-ALL, identificamos, entre otros, cuatro marcadores de alto interés: *Btg2*, *Cnot1*, *Zfp36* y *Men1*. Los tres primeros, están implicados en mecanismos de degradación de *ARNm*, de forma directa o indirecta, y pueden ser clasificados como supresores tumorales, mientras que el último tiene una importante función en la mutación de proteínas, incluyendo las histonas, y por ende en la configuración de la cromatina.

Haber identificado a *Btg2* como efector de NOTCH, es un dato importante; pertenece a una familia conformada por siete péptidos, que están presentes evolutivamente desde los nematodos hasta los humanos. Vinculados a procesos antiproliferativos, y lo que es más interesante, a procesos de diferenciación en varios modelos animales y celulares (241; 248-251). Hemos mencionado aquí, que en el modelo de CSC, se estipula que cuanto más desdiferenciado esté un grupo celular, mayor es su agresividad y su capacidad metastásica. Nuestros experimentos, mostrados en la **Figura 26 A-B**, coinciden con esta idea; los tumores xenotrópicos tienen menor cantidad de *Btg2* que la línea celular GH3, y a su vez, cuando los tumores son tratados con DAPT, aumentan significativamente la cantidad de *Btg2* expresado. Analizando la expresión desde los procesos de proliferación, también los resultados, tanto bioinformáticos, como “de mesada” apoyan lo existente en la literatura, dado que a *Btg2*, se lo reporta como regulado por p53 (252), y se ha descrito que al inactivarse en células madre embrionales se interrumpen los mecanismos de protección al DNA, que se inician con el arresto del ciclo celular en la fase G2/M (249). *Btg2*, tiene dominios conservados que tienen un papel destacado en la regulación y localización de la CICLINA D1, y su propia actividad inhibitoria de la proliferación. En tumores de mama, la proporción de los mismos que tienen regulado negativamente este marcador llega al 50%, y la pérdida de su localización nuclear, correlaciona inversamente con el tamaño del tumor (253).

*Btg2*, inicialmente identificado como un gen estimulado por factor de crecimiento nervioso (NGF: *Nerve Growth factor*) durante la diferenciación neuronal (250), tiene como otros reguladores negativos hormonales a los estrógenos y las progestinas. Es interesante ver que los estrógenos, son uno de los factores tumorigénicos en hipófisis más importantes, y existen numerosos modelos de tumores hipofisarios experimentales generados a base de la estimulación con *pellets* de

estrógenos (153; 154). La supresión de BTG2 además, por estos dos esteroides, correlaciona con la estimulación de CICLINA D1 (254).

La relación entre el potencial oncoprotector de BTG2, los reportes de la literatura y nuestros resultados, es muy alta. Consideramos este marcador, como muy importante entre los mencionados, y la regulación por NOTCH, merece aún investigaciones mas profundas para establecer claramente cuál es la dinámica. En nuestros modelos, no pudimos observar cambios en *Ciclina D1*, gen que aparece profusamente reportado, junto con NOTCH y junto con *Btg2*. Éste es un punto a esclarecer. Otro, sería establecer cuál es la vinculación entre *Btg2*, y la proliferación ligada a procesos de diferenciación, sumando a actores importantes para nuestro modelo como son CSC y EMT, sabiendo que en estudios *in vivo* mostraron que la expresión de BTG2 está asociada con la división asimétrica de neuronas progenitoras (251; 255; 256). Con respecto a su participación en la hipófisis son escasos los datos en la literatura. Se lo describió en el hipófisis embrionaria y adulta (257), y usando la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) para analizar la expresión diferencial de genes en tumores hipofisarios plurihormonales y somatotropinomas en comparación con hipófisis normales se encontró que este gen estaba disminuido en los tumores (258; 259), sugiriendo su rol como supresor en la hipófisis.

*Cnot1*, además de estar relacionado con *Btg2* (241), es un regulador de la estabilidad de *ARNms* mediante deadenilación. *Cnot-1* codifica para un péptido que forma parte del complejo macromolecular CCR4-NOT, que es el que regula la dinámica de los mensajeros. El complejo esta altamente conservado desde humanos hasta levaduras (260). También está asociado, todo el complejo, a procesos metastáticos. Esta reportado que el componente CNOT2 de CCR4-NOT es un marcador de metástasis, al igual CNOT7 (261). Paradójicamente, pese a que no se trata de la misma subunidad, cuando inhibimos los tumores xenotrópicos con DAPT, *Cnot1*, aumentó significativamente. La cantidad de funciones que abarca el complejo macromoleular CCR4-NOT sugieren un funcionamiento pleiotrópico; sus componentes están esparcidos por el núcleo y el citoplasma, median funciones regulatorias, transcripcionales y postrcripcionales. Además, estos controles, se ejercen a nivel epigenético (262). Los cual indica que no es un marcador (*Cnot-1*) para analizar livianamente, y en un contexto drástico de oncogén o anti-oncogén. Además, en las tablas de expresión de genes como resultado del análisis de RNA-seq (con Cufflinks+CuffNorm+CuffDiff, en los que podemos ver que genes tienen expresión significativamente distinta en las diversas comparaciones de tejido pero a nivel individual de marcador) en la sección de **Resultados** de este capítulo (**Tablas 9 y 10**) no reporta cambios. Mas trabajo es necesario para establecer una función clara para este marcador, en el contexto de la patología hipofisaria tumoral, ya que es éste el primer reporte de *Cnot1* en hipófisis. Sin dudas, la estabilidad de los *ARNm* constituye un camino claro a seguir, en la respuesta de estas preguntas.

*Zfp36*, codifica par una proteína llamada TRISTETRAPROLIN, que tiene sitios de unión (AREs) a *ARNm* en los extremos UTRs (263). *Zfp36* inicialmente descripto como un factor de transcripción,

numerosos son los reportes que lo vinculan con la desestabilización del *ARNm* de *TNF $\alpha$*  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*: Factor de Necrosis Tumoral alfa), un potente agente proinflamatorio (244). Es una citoquina sintetizada por varias células del sistema inmune con el objetivo de generar procesos de inflamación ante algún daño o injuria (243). Reúne, *Zfp-36*, en este sentido, características similares con *Cnot1*, como regulador de la estabilidad de *ARNm*. Sin embargo, pese a haberlo identificado como posible gen diana en el estudio epigenético del *Gene Ontology*, en nuestros modelos (**Figuras 24 y 25**) no evidenció cambios en respuesta a DAPT (**Figura 26 B**). Lo mismo ocurrió con el marcador *Men1*, sin cambios en los resultados presentados en éste capítulo, pese a que se trata de un supresor tumoral. La MENINA es una proteína nuclear, que también tiene roles en la regulación de la transcripción, la estabilidad genómica, la división celular y la proliferación (245). La mutación de este gen, desencadena la aparición combinada de tumores en las glándulas paratiroides, los islotes pancreáticos, y la hipófisis anterior. En un principio aparecía como un marcador promisorio en nuestro modelo, y en la patología que venimos estudiando.

A pesar que la cantidad de datos de esta sección es muy alta, algunos marcadores útiles pueden no haber sido identificados todavía. No siempre la información se presenta de forma obvia. Sucedió así con el marcador *Nr4a-1*, cuando apareció en categorías (ver **Figura 24**) del *Gene Ontology* que en un comienzo no las identificamos como importantes para describir la evolución de tumores hipofisarios, sin embargo los datos de RNA-seq lo postulaban como un gen que se expresaba diferencialmente en los tumores en forma muy significativa. De nuestros resultados experimentales surge que este gen también se expresa en forma diferencial entre la línea celular GH3 y los xenotransplantes (**Figura 26 A**), con menor expresión en los segundos. *Nr4a1* es un marcador que está regulado negativamente en procesos metastáticos (264). Está vinculado a procesos de inflamación, regulación del ciclo celular, y apoptosis. Esto es congruente, con la menor expresión de su *ARNm* en xenotransplantes comparado a los somatolactotropos GH3 (**Figura 26 A**). Pertenece a la familia de receptores nucleares Nur77, y se los ha descrito con funciones importantes en la apoptosis de linfocitos y otros tipos celulares (265). A pesar de esto, los resultados al comparar tumores xenotrópicos control, contra los tratados con DAPT, donde la vía de NOTCH había sido inhibida, *Nr4a1* no evidenció diferencias. Vislumbramos que es un marcador interesante con el cual seguir trabajando, dado que entre las proteínas con las cual interacciona está BCL2. Es un conocido factor protector antiapoptótico, pero que al interaccionar con NR4A1, muta su rol como protector y pasa a ser un agente de muerte (266). Este es un dato molecular interesante para el estudio de procesos neoplásicos como el de los tumores hipofisarios. En particular, los escasos datos de la literatura de *Nr4a1* e hipófisis relacionan a *Nr4a1* con los corticotropinomas y no con prolactinomas. En la hipófisis se ha descrito que la subfamilia de receptores nucleares NR4A1, a las que pertenece este gen es crítica para la inducción de POMC por CRH en corticotropos (267) , y por otro lado que los niveles de expresión de *Nur77* estarían relacionados a la diferente autonomía de producción de ACTH comparando la enfermedad de Cushing florida, con el Cushing subclínico (268).

Estamos en condiciones de afirmar que hemos encontrado nuevos efectores río abajo de la vía de NOTCH, que no están reportados en la literatura para el desarrollo de adenomas hipofisarios: *Nr4a1*, y fundamentalmente *Btg2*.

Estos dos por las funciones que desempeñan, el mapa molecular de interacciones que despliegan, su modificación en nuestro esquema experimental y por las características de los reportes en la bibliografía, serían los más importantes.

## CAPÍTULO IV: EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE NOTCH EN CÉLULAS GH3 EN CULTIVO CELULAR

### Introducción del Capítulo IV

La línea de células GH3 es uno de los modelos más utilizados para el estudio de somatotrofinomas *in vitro* (155). Su origen y características se delinearon en la Introducción del **Capítulo I**. Por otro lado, hemos descrito numerosas características moleculares del Sistema Notch, como la presencia de sus receptores, sus ligandos y diferentes componentes de la vía de señalización en los somatotrofinomas GH3. Además, en un modelo más cercano a lo fisiológico, generamos tumores xenotrópicos por inyección subcutánea de células GH3 en ratones hembra NUDE/NUDE, lo que nos permitió describir la función de la vía de NOTCH en el desarrollo, y proliferación de los tumores en función de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa. Identificamos algunos genes diana que respondieron al tratamiento, y mediante herramientas de bioinformática, completamos el panorama de genes respondedores a la inhibición por DAPT, que participarían en el crecimiento tumoral enmarcados en el contexto de la vía de NOTCH.

El modelo de tumores xenotrópicos tiene como variable indisociable la matriz extracelular, en la cual están implicados distintos tipos celulares, vasos sanguíneos y un contexto molecular en el que participan tejidos del ratón huésped, así como la línea inyectada. En los estudios oncológicos la matriz extracelular cobra una relevancia notable, pero también las propiedades funcionales de las células tumorales son objeto de estudio permanente, entre éstas, la migración celular, la proliferación, la capacidad de secreción endócrina. Estos rasgos adquieren trascendencia desde el momento en que los prolactinomas que no responden a tratamientos con agonistas dopaminérgicos, son en general los que predominantemente se tornan invasivos, con características más proclives a comportamientos agresivos y malignos. El uso de células GH3 *in vitro* nos aporta un modelo adecuado para evaluar la función del Sistema Notch sin la intervención de los componentes de la matriz extracelular, es decir solo en las células hipofisarias tumorales. Nuestro objetivo es diseccionar conceptualmente el impacto de la inhibición del Sistema Notch, en la vía de señalización a nivel celular. Y ver cómo impacta en los procesos de proliferación y en las características funcionales de los somatotrofinomas GH3, independientemente de lo que sucede cuando están inmersos en la matriz extracelular y surcados por vasos.

Mertens y colaboradores, utilizaron la línea celular AtT20, como estudio complementario a la SP encontrada en tumores hipofisarios humanos. Reportaron la existencia de una SP dentro del conjunto de células AtT20, que además tiene propiedades tumorigénicas. Sumado a esto, realizaron un estudio funcional *in vitro*, en el que se analizó la capacidad migratoria de las células con un ensayo de herida en función de la inhibición de la vía de señalización de CXCR4. A su vez, establecieron una relación entre la pérdida de la capacidad de migración por el tratamiento, con el proceso de EMT. En paralelo, analizaron la expresión de una batería de genes implicados en EMT, también estimulando las células AtT20 *in vitro* con la droga AMD3100 un antagonista de CXCR4, y

por otro lado con TGF $\beta$  (95). Estos resultados demostraron la importancia de la vía de señalización no solo de EMT sino de células madre en este subtipo de línea hipofisaria celular.

La evaluación de la capacidad de migración celular, por ensayos de cierre de herida, o sencillamente “ensayos de herida” (*wound assays*) es empleada en varios campos de la investigación oncológica (170; 269-271). La capacidad de migración evaluada con esta herramienta está estrechamente vinculada a la agresividad y la capacidad invasiva de células neoplásicas (170; 269). Procesos en los que también intervienen rearrreglos del citoesqueleto (272), además de los ya mencionados ciclos intercalados de EMT y MET (80). La mortalidad de varios tipos de cáncer, por ejemplo el cáncer de mama, está cercanamente emparentada con la habilidad de invadir y generar metástasis en otros tejidos. Esto implica adherencia a la membrana basal, secreción de enzimas proteolíticas, pero sobre todo capacidad migratoria hacia vasos sanguíneos para extravasarse a otros tejidos (269).

La adquisición de movilidad y un fenotipo invasivo características del comportamiento agresivo tumoral, requieren del contacto célula-célula (272), donde el Sistema Notch, importante en el contacto intercelular adquiere una notoriedad sobresaliente. Si bien los tumores hipofisarios secretantes de prolactina, rara vez producen metástasis, cuando invaden localmente las consecuencias clínicas, como por ejemplo alteraciones en la visión y alteraciones de tipo hormonal y dolores de cabeza producidos por la masa tumoral, son frecuentes.

Por otro lado, mediante ensayos de proliferación MTS, utilizando los somatolactotopos GH3, se ha podido probar el efecto de los estrógenos sobre la vía de señalización Wnt. Se observó una respuesta leve pero significativa en la proliferación *in vitro*. Incluso se verificó el concomitante aumento en el *ARNm* de Prolactina por qRT-PCR (273).

En trabajos previos, nuestro grupo ha caracterizado la capacidad proliferativa y angiogénica de células de la adenohipófisis. Ha determinado la cantidad del factor VEGF expresado y secretado, la secreción de Prolactina, y la proliferación basal en cultivos primarios de células de la adenohipófisis provenientes de ratones *wild-type* y Knock out totales para el RD2. A pesar de encontrar niveles aumentados con respecto al *wild type*, de VEGF y Prolactina, la tasa de proliferación basal medida por MTS en este grupo fue menor (117). En otro trabajo, utilizando la técnica de MTS, nuestro grupo testeó el efecto que podría tener el FGF2 en la proliferación de células de la adenohipófisis de ratones wild type y knock out totales para RD2. El FGF2 estimuló la proliferación celular de forma significativa con respecto a las células controles sin tratamiento, sin observarse diferencias significativas entre los genotipos (274; 274).

Sumando los resultados de los tres capítulos anteriores, y considerando los antecedentes y reportes explayados en esta introducción, realizamos la descripción funcional del comportamiento de las células GH3 en un modelo *in vitro*, en función de la inhibición de NOTCH, y evaluamos parámetros relacionados a la patología tumoral hipofisaria como son secreción hormonal, la proliferación y la migración celular.



## OBJETIVOS DEL CAPÍTULO IV

Proponemos realizar una caracterización funcional específica de las células GH3 mantenidas *in vitro* en cultivo celular en función de la inhibición del Sistema Notch. Evaluamos parámetros celulares relacionados con la patología tumoral hipofisaria generada por adenomas secretantes de Prolactina y GH.

### Objetivos Específicos:

---

- 1) Caracterizar la capacidad de secreción hormonal de las células GH3 *in vitro*, en función del tratamiento con DAPT.
- 2) Monitorear la vía de señalización de Notch *in vitro*, en función de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa, monitoreando por qRT-PCR distintos componentes del Sistema Notch.
- 3) Realizar el mismo monitoreo molecular, pero a nivel proteico, cuantificando los dominios activos y de membrana de los receptores Notch, así como efectores que se encuentren río abajo de la vía.
- 4) Evaluar la capacidad migratoria celular de los somatolactotropos GH3, en función de la inhibición de Notch, mediante ensayos de herida.
- 5) Evaluar la capacidad proliferativa *in vitro* de las células GH3, en función de la inhibición de la vía de Notch, utilizando ensayo MTS, y área celular.

## RESULTADOS DEL CAPÍTULO IV

### El DAPT disminuyó la secreción de Prolactina y GH por parte de células GH3 *in vitro*

Para testear el efecto directo del DAPT sobre células cultivadas *in vitro*, se evaluó la respuesta secretoria de Prolactina y GH al tratar los somatolactotopos GH3 con concentraciones crecientes de DAPT por 24 y 48 horas. La secreción de Prolactina disminuyó a las 24 y a las 48 horas en forma dependiente de la concentración (**Figura 27 A**). En cambio, no se observaron diferencias significativas en el patrón de secreción de GH (**Figura 27 B**).

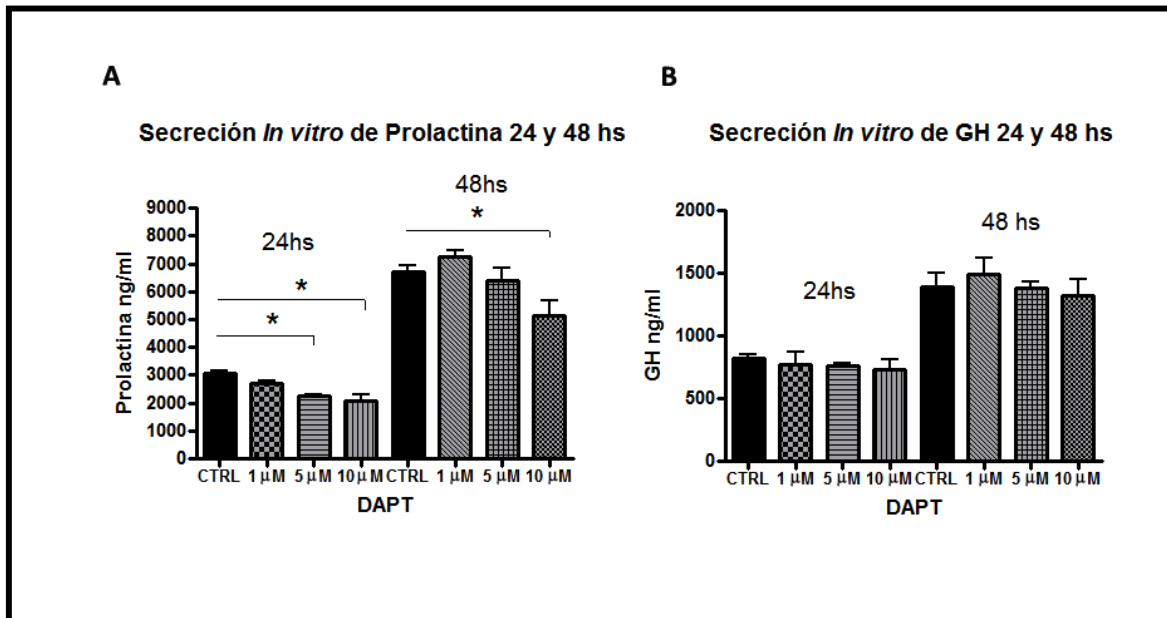


Figura 27: El DAPT disminuyó la secreción de Prl y GH por parte de células GH3 *in vitro*. Células GH3 fueron tratadas con distintas concentraciones de DAPT o con solución Control durante 24 o 48 horas. Se midió por RIA la liberación al medio de cultivo de A) Prolactina (\* $p < 0.05$ ) o B) GH.  $n = 3$  y 3 DAPT y Control, respectivamente para ambas hormonas.

### Efecto del DAPT *in vitro* en los componentes del Sistema Notch

Luego de 48 horas de incubación de células GH3 mantenidas en cultivo celular con DAPT, se observó una disminución en el dominio activo de NOTCH2 (N2ICD), permaneciendo sin alteraciones los dominios de membrana (**Figura 28 A, B, C, G**), lo que implica una inhibición mediada por la enzima  $\gamma$ -secretasa. La proteína del gen *Hes1*, no se modificó con el tratamiento (**Figura 28 D, H**). También se midieron por Western Blot las proteínas PCNA, y ERK fosforilada. PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) es un marcador muy importante en la proliferación que actúa como factor de procesamiento para la ADN polimerasa  $\delta$  en células eucariotas y es esencial para la replicación. Recluta proteínas implicadas en la duplicación y la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina y la epigenética (275); mientras que la vía de señalización de MAPK/ERK es un conjunto de proteínas que actúan en una cadena de proteínas de la cual forma

parte ERK como serín-treonín-kinasa, comunicando señales proliferativas desde la superficie celular hacia el núcleo, muy estudiada en reportes vinculados al estudio oncológico (276; 277). No se observaron cambios en los niveles proteicos ni de PCNA, ni de ERK fosforilada (**Figura 28 E, F, H**).

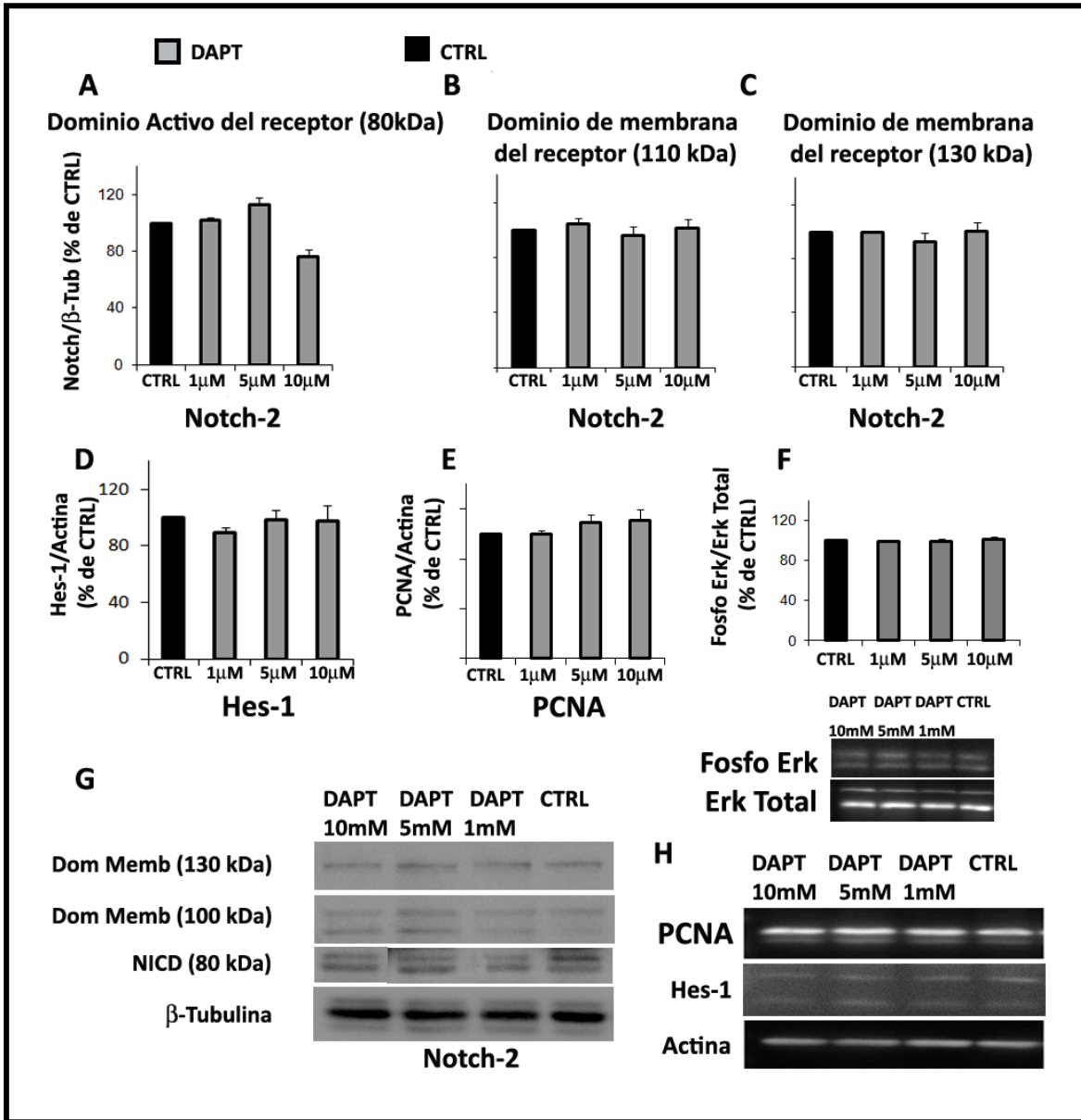


Figura 28: El tratamiento con DAPT disminuyó los niveles de N2ICD. A-C) Niveles de la proteína NOTCH2 en células GH3 tratadas con solución Control y con DAPT, medidos por Western Blot con anticuerpos específicos, relativizadas al control de carga  $\beta$ -TUBULINA. A) Densitometría de dominio activo en tumores Control y Tratados con DAPT (N2ICD: n=2, 2 y 2 respectivamente) B-C) Densitometría de los dominios de membrana de NOTCH2; 110kDa (n=2, 2 y 2, Control y DAPT, respectivamente) y 130kDa (NOTCH2: n=2, 2 y 2, Control y DAPT, respectivamente). D-F) Niveles de las proteínas HES1, PCNA (relativizadas a Actina) y Fosfo ERK (relativizada a ERK total) medidas por Western Blot con anticuerpos específicos

en células GH3 tratadas con solución Control o con DAPT (5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M). D) Densitometría de la proteína HES1 en células GH3 tratadas con solución Control y con DAPT (n=2, 2 y 2 respectivamente). E) Densitometría de la proteína PCNA en células GH3 tratadas con solución Control y con DAPT (5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M) (n=2, 2 y 2 respectivamente). F) Densitometría de la proteína Fosfo-ERK en células GH3 tratadas con solución Control y con DAPT (5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M) (n=2, 2 y 2 respectivamente). Inmediatamente por debajo se muestran imágenes representativas de los blottings para Fosfo-ERK y para ERK. G) Imágenes representativas de los blottings realizados para la proteína NOTCH2, cada uno de sus dominios y el control de carga ACTINA. H) Imágenes representativas de los blottings realizados para PCNA, HES1 y el control de carga ACTINA.

Al cuantificar los niveles de *ARNm* mediante qRT-PCR luego de 48 horas con estímulo de DAPT, se observó una tendencia no significativa hacia la disminución de *Notch2*, (**Figura 29 A**). En el caso del efector río abajo *Hes1*, la disminución fue significativa cuando las dosis aplicadas de DAPT fueron de 1 $\mu$ M y de 5 $\mu$ M. Cuando se aplicó la dosis mayor de 10 $\mu$ M, si bien se observó una disminución, esta no resultó estadísticamente significativa (**Figura 29 B**). El gen diana *Ciclina D3*, no mostró diferencias en función del tratamiento con DAPT aplicado (**Figura 29 C**).

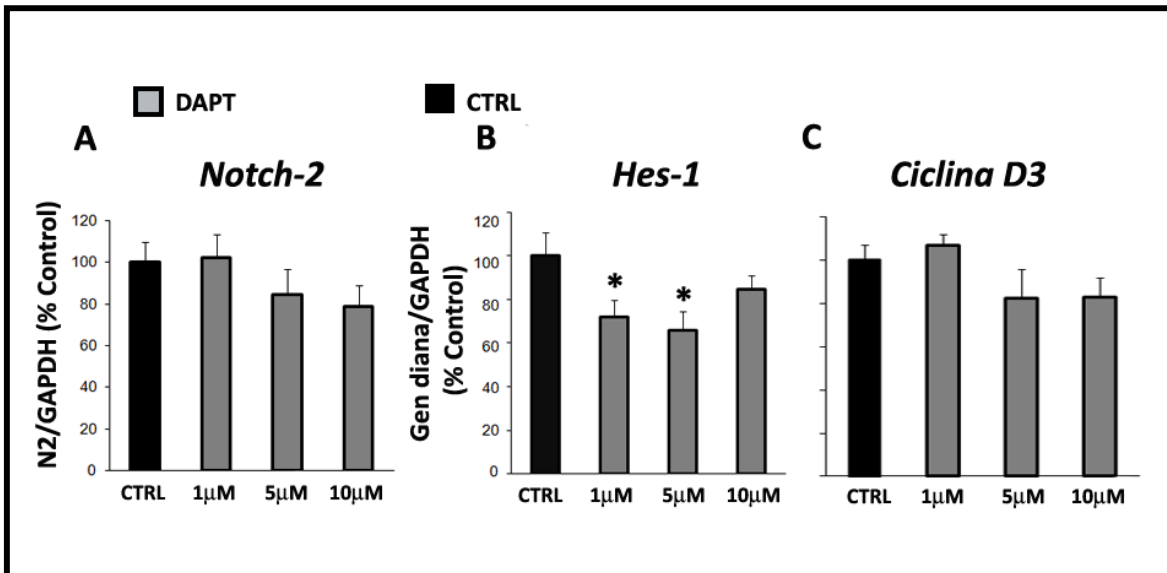


Figura 29: La inhibición de NOTCH modifica la expresión de *ARNms* pertenecientes a la vía. A-C) Expresión de los genes normalizada a *GAPDH* cuantificadas por qRT-PCR, expresadas como un porcentaje del cambio de células GH3 tratadas con solución Control, las cuales sus niveles de expresión en los marcadores se consideraron 100%. **A)** Expresión del gen *Notch2* en células GH3 tratadas con solución Control o con DAPT (5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M); n=4, 4 y 4, respectivamente. **B)** Expresión del gen efector *Hes1* (n=4, 4 y 4), \*p<0.05; y **C)** *Ciclina D3* (n=4, 4 y 4) en animales Control y DAPT (5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M), respectivamente.

### El DAPT previene la cicatrización de heridas de células GH3 en cultivo.

Se decidió evaluar la capacidad migratoria de las células GH3, en función de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa. Para ello se efectuaron “ensayos de herida” evaluando el cierre de la misma o el avance sobre la superficie descubierta, de las células GH3 desde el borde de la herida.

Como ensayo preliminar, se llevó a cabo la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa, pero en dos condiciones diferentes, en presencia y ausencia de Mitomicina (nro. Cat: 475820, Millipore). La Mitomicina inhibe la replicación celular, de manera que el efecto observado sobre el avance de la herida, sea solo debido a fenómenos de migración, y no de aumento del número celular. El resultado que obtuvimos, es que no existe una diferencia en el patrón de comportamiento migratorio. El avance del frente de herida no fue muy distinto entre los dos tratamientos, y en ambos casos se observó una inhibición del cierre de herida por DAPT. Solamente a las 72 horas se observó que el tratamiento con DAPT y Mitomicina se potenciaba, sin embargo el efecto no fue pronunciado (Figura 30).

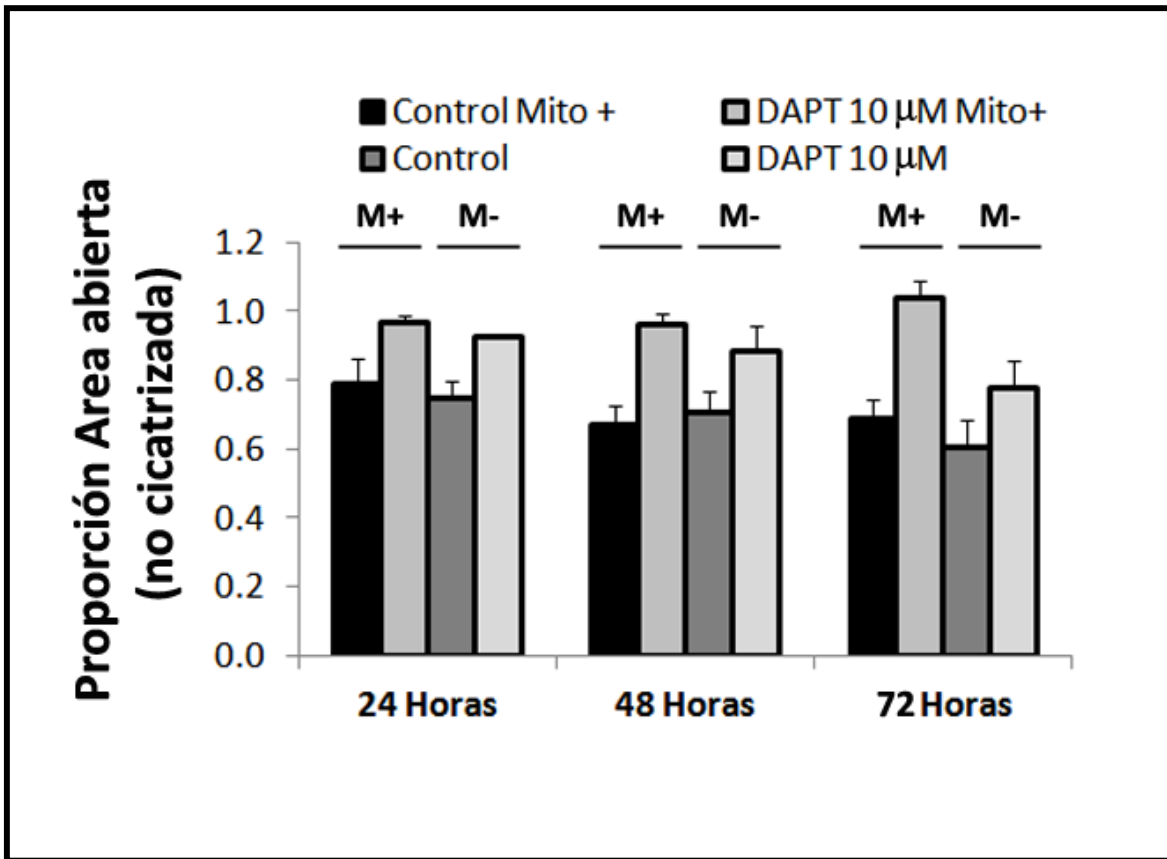


Figura 30: Ensayos de herida con células GH3. El tratamiento con DAPT inhibe la cicatrización de las heridas, con y sin Mitomicina. Células GH3 fueron tratadas con solución Control y con 10 $\mu$ M DAPT (n= 2 y 2 respectivamente), con y sin Mitomicina (n=2 y 2 respectivamente), durante 72 horas reponiendo el estímulo cada día, y tomando imágenes de la herida a las 24, 48 y 72 horas. Se graficó la proporción de área abierta de la herida cuantificada con ImageJ, partiendo del tiempo 0 horas, en el cual para las cuatro condiciones la proporción era igual a 1.

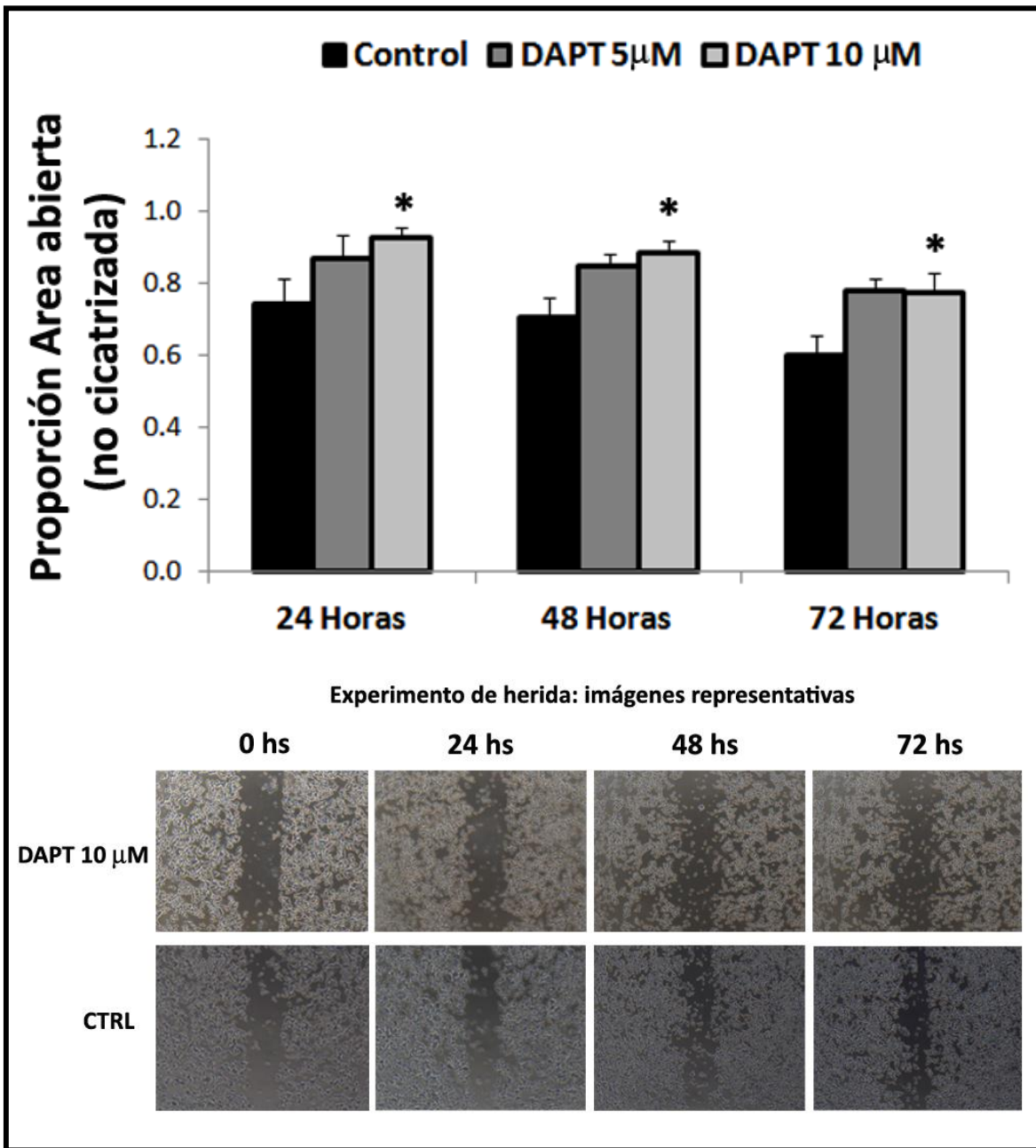


Figura 31: El tratamiento con DAPT inhibe la migración de células GH3. Células GH3 fueron tratadas con solución Control, con 5 μM y 10 μM DAPT (n= 5, 5 y 5 respectivamente) durante 72 horas reponiendo el estímulo cada día, y tomando imágenes de la herida a las 24, 48 y 72 horas. A) Se graficó la proporción de área abierta de la herida cuantificada con ImageJ, partiendo del tiempo 0 horas, en el cual para las cuatro condiciones la proporción era igual a 1; \*p=0.027. B) Imágenes representativas de las heridas efectuadas sobre las células Control y tratadas con 10μM de DAPT, tomadas para cada uno de los tiempos.

En un ensayo más completo y teniendo en cuenta estos antecedentes técnicos, se realizaron ensayos de herida usando tres dosis de DAPT. Nuevamente el DAPT (10 μM) evitó la cicatrización

de los surcos en el ensayo de herida usando células GH3 (**Figura 31 A y B**), a las 24, 48 y 72 horas de incubación de forma significativa (\* $p=0,027$ ). La concentración de DAPT 5  $\mu\text{M}$  también evitó la cicatrización de las heridas, aunque no llegó a ser significativa ( $p=0,055$ ). Estos resultados indican una acción de la inhibición de señalización de Notch en la migración celular de las células hipofisarias, aun en ausencia de matriz celular. Este fenómeno es sin duda importante en el proceso de generación de los tumores xenotrópicos *in vivo*.

### **El DAPT disminuye la capacidad proliferativa de células GH3 *in Vitro*.**

Se llevaron a cabo experimentos de proliferación MTS con el objetivo de monitorear la capacidad replicativa celular en función de la inhibición de la vía de NOTCH con DAPT. Utilizando como estímulo 10  $\mu\text{M}$  de DAPT durante 24 horas, y solución vehículo como Control, se midió la proliferación en dos condiciones de suero diferentes; condiciones de “bajo suero” (2% suero de caballo + 1% suero fetal bovino) y condiciones de “alto suero” (10% suero de caballo +5% suero fetal bovino) (**Figura 32**). El DAPT disminuyó la proliferación de forma significativa, solo cuando fueron utilizadas condiciones de “bajo suero”.

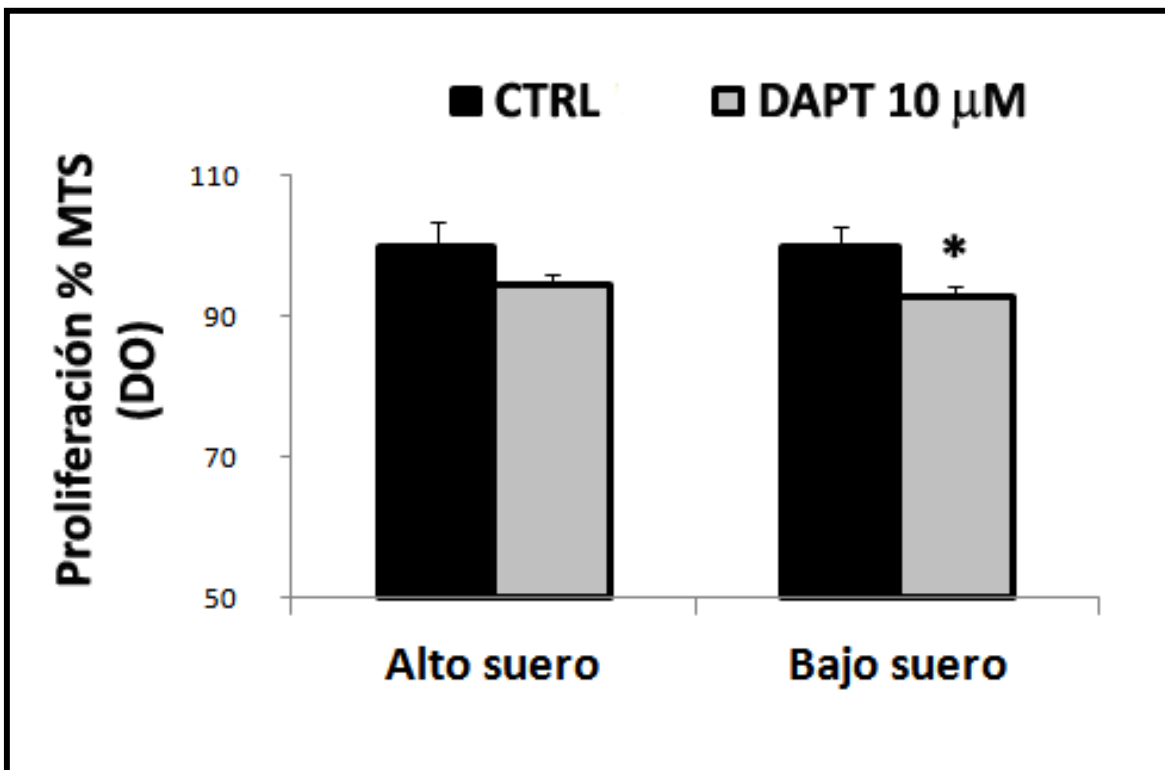


Figura 32: El DAPT disminuye la capacidad proliferativa de células GH3 en condiciones de bajo suero. Ensayo de proliferación MTS. Los resultados son expresados como densidad óptica a 490nm; \* $p=0.01$ ; (N=4). Las células GH3 fueron estimuladas con solución Control o con DAPT 10  $\mu\text{M}$ , por 24 horas, en dos condiciones diferentes de suero: “bajo suero” (2% suero de caballo + 1% suero fetal bovino) y condiciones de “alto suero” (10% suero de caballo +5% suero fetal bovino).

Posteriormente, se realizó un ensayo con dos dosis de DAPT, 5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, durante 24 y 48 horas, con la condición de suero más baja. Se observó una disminución significativa de la capacidad de proliferación celular a las 24 horas y con una concentración de 10 $\mu$ M de DAPT (**Figura 33 A**). El mismo experimento fue llevado a cabo en condiciones de “alto suero”, y no se observaron diferencias en cuanto a la proliferación celular de la línea GH3 (**Figura 33 B**).

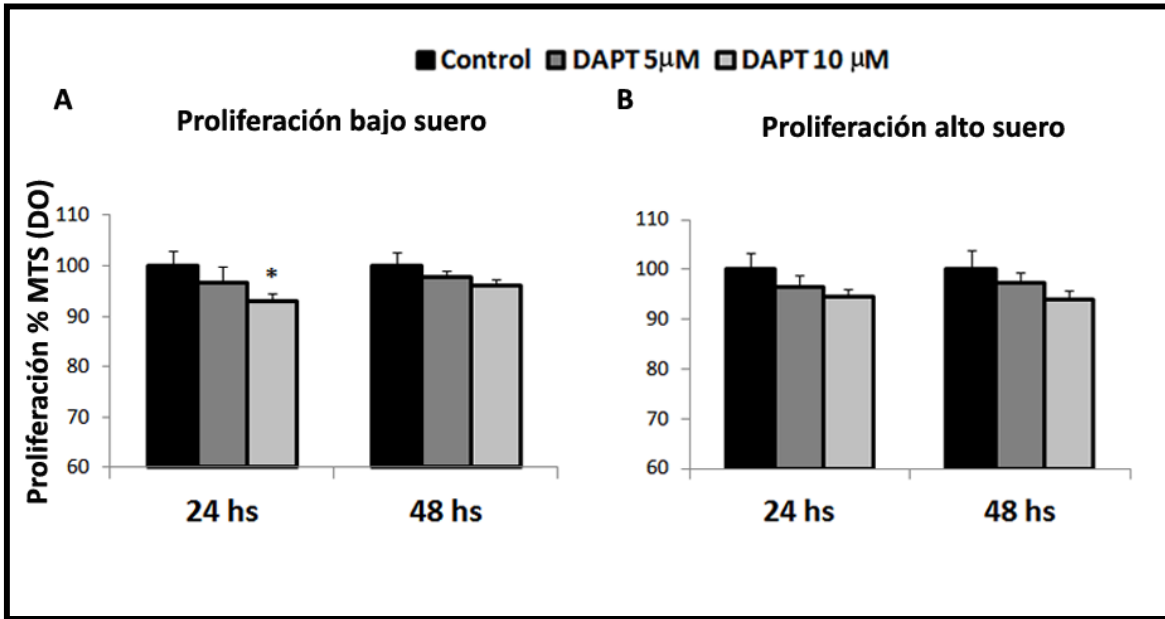


Figura 33: El DAPT disminuye la capacidad proliferativa de células GH3 a las 24 horas de estímulo. Ensayo de proliferación MTS. Los resultados son expresados como densidad óptica a 490nm. Las células GH3 fueron estimuladas con solución Control o con DAPT, 5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, por 24 horas y por 48 horas, en dos condiciones diferentes de suero: A) “bajo suero” (2% suero de caballo + 1% suero fetal bovino); \*p<0.05 y B) condiciones de “alto suero” (10% suero de caballo +5% suero fetal bovino). n=4 y 5, para 24 y 48 horas respectivamente, en A y en B.

Los resultados presentados indican que la inhibición de la vía de NOTCH mediante la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa, utilizando el fármaco DAPT influye significativamente la proliferación de las células GH3 en cultivo. Por ende, la vía de señalización NOTCH propia de las células GH3 está fuertemente implicada en los procesos proliferativos y de migración en este sistema experimental, en el cual las células GH3 están desprovistas de cualquier matriz extracelular que pueda influir en su capacidad de división celular.



## DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO IV

Los resultados obtenidos en capítulos anteriores dejaban abiertos numerosos interrogantes acerca del comportamiento de las células GH3. En particular cuál sería el comportamiento de la inhibición del sistema NOTCH en las células en un contexto desprovisto de matriz extracelular, cuya principal característica es aumentar la complejidad y en la multiplicidad de las señalizaciones existentes activadas de manera simultánea en un tipo celular determinado. Si bien la inhibición *in vivo* resulta de un alcance mucho más fisiológico, más cercano a la realidad de un tumor hipofisario *in situ*, la simplificación de un modelo experimental permite aislar algunas variables, para poder medir las, y reducir los efectos que se obtienen como consecuencia de su modificación desde el exterior.

Tal es el caso del Sistema Notch, y de la inhibición de su activación mediante la  $\gamma$ -secretasa. Nuestro objetivo era separar los efectos del DAPT, que se generaran como consecuencia de su acción en la matriz y otros tipos celulares que se encuentren en ella (células de epitelio vascular, de tejido conectivo, etc.), de los que ocurren estrictamente sobre las células GH3. A pesar de la información obtenida de que la inactivación farmacológica de la vía de NOTCH provocaba una disminución del volumen tumoral, y de sus patrones endócrinos, poco sabíamos del efecto exclusivo de esta inactivación sobre los somatotropos a nivel molecular, pero sobre todo funcional. Es importante recordar una vez más, que esta línea celular, es un buen modelo para el estudio de prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos, debido a la extremadamente baja expresión de RD2 que evidencian (195).

Los antecedentes de la bibliografía indicaban que estudios de la inhibición con DAPT en cultivos celulares apuntaban los trabajos *in vivo* demostrando la función en el desarrollo de diversas patologías tales como, carcinoma de pulmón (209), leucemia (101), proliferación de células retinales de Muller (107), o fibrosis hepática (278), entre otras.

Nuestros resultados *in vitro* determinaron fehacientemente que el Sistema Notch propio de las células GH3 participaban en la generación del tumor y su inhibición por DAPT que demostráramos en el **Capítulo II**. En primer lugar comprobamos que en este modelo experimental *in vitro*, la inhibición de la vía de NOTCH inducida por DAPT, reduce el NOTCH activo y no su *ARNm* (NOTCH total) o el NOTCH anclado en membranas, y en forma adicional se comprueba con la disminución de los niveles de *ARNm* del efector río abajo *Hes1*. Este resultado muestra la efectividad del tratamiento para inactivar NOTCH (aunque sea parcialmente) en las condiciones elegidas para trabajar en cultivo celular. En la bibliografía, existen numerosos reportes de inhibición *in vitro* de NOTCH utilizando DAPT u otros fármacos en distintas líneas celulares, pero no en células hipofisarias. La variabilidad de las condiciones informadas es muy grande, indicando proporciones de 1 o 10% de SFB (101; 127; 201; 202; 278). Las proporciones de SFB (Suero Fetal Bovino) y SC (Suero de caballo) que se emplean en experimentos de inhibición, en vías de señalización vinculadas directa o indirectamente con eventos funcionales y proliferativos resultan cruciales para recabar resultados significativamente apreciables. En los experimentos de inhibición con

DAPT durante 48 horas, utilizamos las condiciones de suero máximas, reportadas por ATCC para mantener las células en cultivo, 15% de Suero de Caballo, y 2,5% Suero Fetal Bovino. Quizás, ésta sea una de las causas por las cuales la magnitud de la inhibición no fue muy alta. Si bien el gen *Hes1* se inhibió en su expresión, no se observó una variación significativa comparada al control en los *ARNm* de *Ciclina D3* y de *Notch2*, o incluso en los niveles de proteína de PCNA, en estas condiciones.

Es sabido que los sueros utilizados en cultivo celular, proveen a las líneas de toda una batería enorme de factores de crecimiento y estimuladores de la proliferación que hacen posible su replicación en las particulares condiciones de una estufa de CO<sub>2</sub>. Este conglomerado de moléculas, puede haber influido de tal manera en el efecto de DAPT *in vitro*.

No obstante, a pesar de las limitaciones señaladas, registramos una inhibición de la vía de NOTCH que sin lugar a dudas participó en las acciones funcionales que se evaluaron a continuación.

Si bien la capacidad secretoria de los somatolactotopos GH3 mantenidos en cultivo celular es conocida (134; 154; 160; 192; 193; 279) uno de nuestros objetivos era caracterizar dicha característica en función de la inhibición del NOTCH. Observamos que esta vía de señalización tiene un papel importante en la secreción de Prolactina por parte de los somatolactotopos. Por otro lado la secreción de GH no fue modificada. Es decir que la vía de señalización de NOTCH, de forma directa o indirecta impacta el patrón de secreción hormonal de las GH3, pero no descartamos que el DAPT esté actuando en otras vías de señalización como ERB4, E-CADERINA, EPHB, CD44 (280-283), y que éstas tengan también su efecto en la cantidad de Prolactina secretada en el medio celular.

Al evaluar la capacidad migratoria de las células GH3, en los ensayos de cicatrización de herida, contábamos ya con la experiencia de los ensayos *in vitro* anteriores y por ende efectuamos algunos ensayos preliminares en los que consideramos diferentes condiciones de suero, y del inhibidor Mitomicina. En primer lugar, realizamos experimentos precedentes, que no detallamos en los resultados, en los que probamos diferentes cantidades de suero (1% SC + 0,5% SFB; y 10% SC + 5% SFB). El propósito fue cuantificar cualitativamente la velocidad cicatrización de la herida, utilizando como parámetros los tiempos en los cuales tomaríamos las imágenes. Optamos por la primera condición, en base a nuestra apreciación de la velocidad de cicatrización, pero sobre todo por información previa con la que contábamos al colaborar con el Dr. Vankelecom, con gran experiencia en este tipo de ensayos. Mertens y colaboradores reportan ensayos de las mismas características, en los cuales las condiciones de suero son mínimas, durante todo el experimento de “wound healing” (95).

Nuestros resultados indicaron que el DAPT inhibe la migración de células GH3 tanto en presencia como en ausencia de Mitomicina. La cicatrización de la herida se debe a fenómenos migratorios de las células, y cuando los somatolactotopos eran tratados con DAPT la cicatrización fue inhibida.

Luego de efectuar los experimentos de cierre de herida, era importante determinar el impacto de DAPT sobre la proliferación celular, proceso primordial en la generación y mantenimiento de tumores. Observamos, en un proceso similar a lo esbozado más arriba, que convenía trabajar en condiciones de bajo suero (2% SC+1% SFB), comparando nuestro modelo celular con los reportados en la bibliografía para otro tipo de cultivos celulares hipofisarios (117; 201; 274; 284). Vimos que la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa, es decir la inactivación de NOTCH, constituye un freno en la proliferación celular de los somatolactotropos. La magnitud de esta inhibición, no supera el 10%, pero es significativa, y fisiológicamente relevante, teniendo en cuenta las características poco proliferativas de los somatolactotropos, *in situ* y experimentales.

Debemos considerar los resultados mostrados en el **Capítulo I y III**, de esta Tesis, en el cual vimos que la expresión y activación del Sistema Notch es menor en GH3 que en AtT20, la línea hipofisaria de corticotropos. Estos datos quizás están en consonancia con las características benignas de los Prolactinomas que son mayores que en los corticotropinomas. Es quizás por ello que la inhibición de la proliferación no sea de gran magnitud, aunque significativa. Debemos destacar que los estudios tanto de “Wound healing assay” o proliferación frecuentemente se realizan con líneas celulares con rasgos agresivos mucho más altos, incluso que los corticotropos AtT20 (80; 84; 95; 170).

En resumen, los presentes resultados aportan la caracterización funcional *in vitro* de la línea celular GH3, describiendo el funcionamiento de NOTCH en este contexto. Está claro que la relevancia de esta vía de señalización, es muy importante en este tipo celular. A nivel de la secreción endócrina, de procesos proliferativos y de migración.

## DISCUSIÓN FINAL

En el presente Trabajo de Tesis Doctoral, nos propusimos estudiar la vía de señalización del Sistema Notch en el contexto de la patología hipofisaria tumoral. Los tumores de Hipófisis poseen diversas características hormonales, citológicas y proliferativas, y una característica destacada es que no son metastásicos. Se definen como verdaderos carcinomas sólo en presencia de metástasis craneoespinal y/o sistémica, y éstas son raras con una incidencia menor al 0,5% de los tumores hipofisarios (42). Los adenomas pituitarios que son intervenidos quirúrgicamente son predominantemente monoclonales en su origen, y cerca de la mitad presentan aneuploidía (46; 285; 286). El principal objetivo del tratamiento de estos tumores, es la eliminación o reducción de la masa tumoral, la normalización de los patrones de secreción hormonal, y a la vez la conservación de la función de la glándula.

Dentro de los tumores hipofisarios los prolactinomas son de los más prevalentes. Aquellos invasivos son capaces de comprimir el quiasma óptico y causar daños a la altura del hipotálamo y el tercer ventrículo, pero muy pocas veces llegan a ser metastásicos y verdaderos carcinomas hipofisarios. En general responden a la terapia farmacológica con agonistas dopaminérgicos pero un porcentaje de pacientes es intolerante a las drogas, resistente desde un comienzo o se vuelve resistente con el transcurso del tiempo (29; 51). Por otro lado, los tumores de corticotropos representan aproximadamente el 5-15% de los adenomas hipofisarios y se observan principalmente en mujeres. Aproximadamente un 90% de los tumores secretores de ACTH son microadenomas, y producen la enfermedad de Cushing. Este síndrome fue descrito por primera vez en 1912 por Harvey Cushing; y desde entonces se ha avanzado mucho en su fisiopatología y en el reconocimiento de diversos orígenes (29). En general los adenomas corticotropos tiene un patrón monoclonal a diferencia de la policlonalidad observada en la hiperplasia corticotropa (287).

La hipótesis general de este trabajo pivotea sobre la idea de que las CSC son importantes en el crecimiento, angiogénesis, invasión y resistencia a terapia de los tumores hipofisarios. Dentro de este cuadro el Sistema Notch, asociado a células madre en otros tejidos, cumpliría un papel destacado en los procesos que desencadenan la aparición o mantenimiento del tumor hipofisario (225).

La trascendencia de las CSC en la investigación oncológica ha adquirido en los últimos años niveles destacados. Existen reportes en la literatura, que indican que en distintos tipos de cáncer, cerca del 25% de las células de un tumor pueden tener características típicas de “*stem cells*” (84; 288; 289). Si bien la definición de CSC ha tenido una trayectoria no exenta de cuestionamientos, se ha ido consolidando, y siempre es conveniente ajustarse a las evidencias experimentales que van surgiendo. La definición de CSC se basa en su habilidad para generar tumores en animales hospedadores, tener una casi ilimitada capacidad de autorrenovación, y de generar subpoblaciones celulares diferenciadas de distinto tipo (290). Otra definición importante que se desprende de estos conceptos, es que la presencia en proporción de CSC dentro de una población

---

de células cancerosas puede ser estipulada por el número de células que son requeridas, haciendo diluciones seriadas, para generar nuevos tumores en un hospedador. Es válido tanto para cultivos primarios de tumores como para células cancerosas mantenidas en cultivo celular (84). Esta definición, inicialmente descrita sobre células de leucemia (66), se ha ido extendiendo a otro tipo de tumores sólidos como el cáncer de cerebro (68; 291), cáncer de mama (67), de cabeza y cuello, páncreas (292), pulmón (71), próstata (188; 293), colon (69; 294) y sarcoma.

La glándula hipófisis es un punto de control maestro de un conjunto vital de procesos en el organismo, incluyendo el crecimiento, el metabolismo, la maduración sexual, la reproducción, situaciones de estrés, e incluso la defensa inmunitaria. Esto exige a la glándula la suficiente flexibilidad como para adaptar las respuestas hormonales a situaciones del ambiente siempre cambiantes, y necesariamente se traduce en una alta plasticidad celular como respuesta a estas eventualidades (295). Hay verdaderos flujos de composición celular, debidas al crecimiento, el estrés, la pubertad, la inflamación y el ciclo reproductivo (21; 296-298). La reposición celular que requiere este proceso, sugiere la participación adicional de células que son nulas hormonalmente, se diferencian y dividen dando lugar a células nuevas que además son productoras de hormonas, que podrían llegar a ser catalogadas como células madre o “stem”(96).

Debido a estos antecedentes la presencia de células madre progenitoras en la hipófisis ha sido postulada en numerosas oportunidades. Ocurrió que las evidencias empíricas experimentales que apoyan esta hipótesis no empezaron a salir a luz hasta no hace más de nueve o diez años (91-93; 98; 299; 300). Y, a pesar del carácter benigno de los tumores hipofisarios, la identificación de células con rasgos *stem* dentro de los mismos ha ido en aumento.

Nuestros resultados demuestran la relevancia del Sistema Notch en la patología tumoral hipofisaria. Esta vía de señalización está vinculada a numerosos tipos cáncer (168; 172; 174; 301-303) y a la vez es un marcador de CSC y procesos de EMT (80; 96; 106; 304; 305). En el estudio de los mecanismos de señalización de la hipófisis, no había demasiada información; tan solo descripciones en las que NOTCH comenzaba posicionarse como un marcador más, típico de transformaciones neoplásicas. Pero la descripción completa de los distintos componentes de la vía en la hipófisis, y el cometido preciso en la generación, crecimiento y desarrollo de prolactinomas y corticotropinomas (los dos histotipos que fundamentalmente trabajamos en esta Tesis) no estaba descrito.

En el **Capítulo I**, mostramos una caracterización de los componentes del sistema Notch en hipófisis de ratas y ratones, en líneas celulares hipofisarias, y en modelos de prolactinomas. Medimos cada uno de los receptores, así como sus ligandos y efectores más conocidos en la bibliografía, en las líneas AtT20 (corticotropos), GH3 (somatolactotropos) y MMQ (lactotropos), en hipófisis normales de ratón y rata. Y finalmente en ratones *lacDrd2KO*, que generan prolactinomas *in situ*, en comparación con hipófisis control provenientes de ratones tipo salvajes. Como principal corolario observamos que la señalización de NOTCH, el perfil de expresión de cada uno de los componentes

---

del Sistema, y su composición, es distinto en cada histotipo y línea celular. Esto es fundamental para establecer la relevancia de un vía de señalización y diseñar en el futuro terapias dirigidas que deberán ser específicas en cada tipo de tumor hipofisario.

Queda claro que en un sistema cuya principal característica es que está integrado por cuatro receptores parálogos, no solo importa cuál de los parálogos se está expresando en mayor proporción, sino también, cómo es la expresión de ese NOTCH, en relación a los otros tres y en relación a los efectores y ligandos que estén completando la vía en ese estado fisiológico o patológico. Sumado a esto, *a priori* es muy difícil aventurar qué tipo de incidencia tendrá la vía en cuanto al crecimiento tumoral. Hemos dicho aquí, en repetidas ocasiones, que NOTCH, se ha descrito tanto con roles proliferativos, como inhibitorios (108; 110; 189; 225; 306), incluso, en un mismo tipo de cáncer o tumor, dependiendo de la fase del desarrollo y crecimiento en que se encuentre. Teniendo en cuenta todas estas complejidades, llegamos a la conclusión de que la utilidad de la caracterización es muy alta. Incluso, trabajamos con líneas celulares, las cuales quizás no se ajustan a una situación fisiológica real, en términos de las patologías que pueden observarse en la clínica, pero como herramienta para la investigación, tienen una potencialidad que es difícil de ignorar.

Un ejemplo de esto lo constituye la línea celular AtT20. Mertens y sus colaboradores, utilizaron estos corticotropos como herramienta para suplir la imposibilidad técnica de generar xenotransplantes a partir de células de tumores benignos humanos. En el campo de la investigación hipofisaria, es conocida esta dificultad; la de generar tumores a partir de células con características “*stem*” obtenidas a partir de tumores benignos humanos, como de cepas murinas. Es por esto que la denominación ha tenido algún ajuste, debido a que las CSC, son las que se encuentran en tumores malignos, y generan xenotransplantes posteriormente. Las células “*stem*” tumorales obtenidas desde la hipófisis se las ha comenzado a llamar TSC (*Tumor stem cells*).

Decíamos que para suplir esta falta técnica, las células AtT20 han sido utilizadas, y no solo presentan una SP con características de *stemness*, sino que pueden regenerar un tumor luego de un trasplante xenotrópico, tal cual lo exige la definición de CSC. Sorprendentemente, se ha logrado aislar una fracción SP desde células GH3, la línea celular que mayormente se ha utilizado en este trabajo de tesis doctoral. Sería interesante, en el contexto de los resultados de esta Tesis, indagar sobre la existencia de la vía de NOTCH y su actividad en la fracción SP. Además, sería interesante probar, si la fracción SP perteneciente a las células GH3, es capaz de recapitular la generación de un tumor, tal como lo hace la misma fracción perteneciente a las células AtT20, si DAPT logra la inhibición de la generación del tumor. Más aún, como los tumores hipofisarios no pueden crecer *in vivo* (xenotransplantados) pero tampoco *in vitro*, para el estudio de los procesos de EMT, las líneas AtT20 y GH3 se vuelven imprescindibles.

Otra incógnita que se desprende de esto, sería contestar porqué rara vez los tumores hipofisarios malignizan, en contraposición con otras neoplasias de otros tejidos. Más allá de las implicancias

---

evolutivas que tiene la importancia de la hipófisis en el contexto de todo un organismo, ¿Por qué si casi todos los tipos tumorales malignos tienen componentes de CSC malignas, porque es que las TSC de la hipófisis no malignizan? Sería interesante indagar en las diferencias de marcadores en cuanto a expresión y tipo, no solo para ubicar nuevos blancos terapéuticos específicos de la hipófisis, sino para iluminar la investigación oncológica con nuevas aristas.

Nuestro trabajo demuestra una gran activación del sistema NOTCH en células corticotropas AtT20, con alta expresión de los dominios activos de NOTCH1-3, del ligando *Jagged1* y del gen blanco *Hes1* en comparación con hipófisis normales. En relación al estudio de modelos de prolactinoma y líneas celulares derivadas de prolactinomas, observamos el Sistema Notch completo en las líneas GH3 y MMQ, y, a diferencia de las células corticotropas, solamente el dominio activo de NOTCH2 estaba incrementado en las células MMQ, mientras que el dominio activo de NOTCH1 estaba incrementado en tumores xenotrópicos y no en la línea GH3 que les había dado origen. Sin embargo esta línea presentó altos niveles de ligandos de NOTCH, a diferencia de las MMQ, mientras que en todos los casos la expresión de los diferentes genes blanco demostró un patrón diferencial y específico para cada modelo. La relevancia del Sistema Notch en la generación de prolactinomas se pudo inferir en ratones *lacDrd2KO* en los que tanto los niveles de *ARNm* de *Notch1* y *Notch3*, como los dominios de membrana de NOTCH2 y 3, y el dominio activo de NOTCH1 estaban incrementados en comparación con los ratones salvajes sin prolactinomas.

Además de caracterizar el sistema nuestros resultados avalan el papel funcional de la vía de NOTCH en el crecimiento, capacidad de secreción endócrina, y la preponderancia de los marcadores que conforman el Sistema Notch en los xenotransplantes de células GH3. Profundizamos en las características funcionales de las células que componen nuestro modelo. NOTCH tiene un papel activo, en las propiedades de migración y proliferación *in vitro* de las células GH3. No existía en ningún reporte de la literatura, el efecto de la inhibición de NOTCH por DAPT de forma directa, en el contexto del estudio de tumores hipofisarios.

Tanto en los experimentos *in vivo*, como *in vitro* (**Capítulos II III y IV**), intentamos medir el grado de la inhibición por el DAPT, monitoreando directamente la vía a través de qRT-PCR y Western Blot. Debido a la escasez de efectores río abajo que respondían al tratamiento con DAPT, en el **Capítulo III** incursionamos en el estudio bioinformática del Sistema Notch en el contexto de la glándula hipófisis cruzando datos de Chip-seq y RNA-seq. Identificamos varios genes como blancos de señalización de NOTCH, en particular los genes supresores *Btg2*, *Cnot1* y *Nr4a1*. Aún queda mucho estudio por delante, con respecto a estos efectores, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primer caso, en función de la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa, y en el segundo sería interesante observar la expresión de estos genes en la línea celular AtT20; y además hacer la comparación entre las hipófisis tumorales *lacDrd2KO* vs hipófisis normales. Sin embargo nuestros resultados experimentales basados en el análisis bioinformático demuestran que estos los supresores *Btg2* y *Cnot1* están disminuidos (aunque solo el primero de forma significativa) en las células GH3 de los tumores

xenotrópicos, en relación con las células aisladas, y que el tratamiento con DAPT aumentaba su expresión significativamente en ambos, posicionándolos como posibles blancos en la terapia tumoral de somatoprolactinomas. Es un resultado promisorio y sumamente original.

Finalmente nuestros estudios *in vitro* demuestran que si bien varios de los cambios de expresión se deberían al efecto del DAPT en factores de la matriz o de células que se interrelacionan con los tumores xenotrópicos GH3, el Sistema Notch propio de la línea celular también participa en direccionar los niveles de proliferación y migración celular, y secreción, en particular de prolactina, aportando de este modo a la generación de los tumores *in vivo*.

Como corolario final, en este trabajo realizamos una descripción amplia de los componentes del Sistema Notch en distintos modelos de adenomas hipofisarios experimentales y demostramos en forma funcional tanto *in vivo* como *in vitro* que el Sistema Notch representa es una vía de señalización relevante en los tumores hipofisarios, y que constituye un posible blanco terapéutico para avanzar en el tratamiento contra estas patologías.



Cristina



**BIBLIOGRAFÍA**

1. **Berne RM and Levy MN.** *Physiology*. St. Louis, Missouri: Mosby Year Book, 1993.
2. **Norris DO.** *Vertebrate Endocrinology*. Elsevier Academic Press, 2007.
3. **Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G and Colao A.** Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 27: 485-534, 2006.
4. **Conn PM and Freeman ME.** *The Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. New Jersey: The Humana Press, 1999.
5. **Houssay BA, RODRIGUEZ RR and CARDEZA AF.** [Diabetogenic action of the pituitary growth hormone]. *C R Seances Soc Biol Fil* 148: 910-911, 1954.
6. **Houssay BA and RODRIGUEZ RR.** Diabetogenic action of different preparations of growth hormone. *Endocrinology* 53: 114-116, 1953.
7. **Foglia VG.** The History of Bernardo A. Houssay's Research Laboratory, Instituto de Biología y Medicina Experimental: The First Twenty Years, 1944-1963. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 35: 380-396, 1980.
8. **Halasz B.** The Hypothalamus as an Endocrine Organ: The Science of Neuroendocrinology. In: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edited by Conn M and Freeman ME. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000, p. 3-21.
9. **Melmed S.** *The Pituitary*. Elsevier, 2011.
10. **Zhu X, Gleiberman AS and Rosenfeld MG.** Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87: 933-963, 2007.
11. **Pocock G and Richards CD.** *Fisiología Humana: La base de la medicina*. Masson, 2005.
12. **Tovar S and Dieguez C.** Prolactin and energy homeostasis: pathophysiological mechanisms and therapeutic considerations. *Endocrinology* 155: 659-662, 2014.
13. **Fink G.** Neuroendocrine Regulation of Pituitary Function: General Principles. In: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, edited by Conn PM and Freeman ME. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000, p. 107-133.
14. **Cristina C, Luque GM, Demarchi G, Lopez VF, Zubeldia-Brenner L, Perez Millan MI, Perrone S, Ornstein AM, Lacau-Mengido IM, Berner SI and Becu-Villalobos D.** Angiogenesis in pituitary adenomas: human studies and new mutant mouse models. *Int J Endocrinol* 2014: 608497, 2014.
15. **Bevan JS, Webster J, Burke CW and Scanlon MF.** Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocr Rev* 13: 220-240, 1992.

16. **McEwen BS, Gray JD and Nasca C.** 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *J Endocrinol* 226: T67-T83, 2015.
17. **Ben Jonathan N, Mershon JL, Allen DL and Steinmetz RW.** Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17: 639-669, 1996.
18. **Ben Jonathan N, LaPensee CR and LaPensee EW.** What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29: 1-41, 2008.
19. **Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A and Nagy G.** Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523-1631, 2000.
20. **Lamberts SWJ and MacLeod RM.** Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70: 279-318, 1990.
21. **Melmed S.** Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* 112: 1603-1618, 2003.
22. **Missale C, Russel Nash S, Robinson S, Jaber M and Caron MG.** Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 78: 189-225, 1998.
23. **Ben Jonathan N and Hnasko R.** Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22: 724-763, 2001.
24. **Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N and Kelly PA.** Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19: 225-268, 1998.
25. **Ben Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD and LaPensee CR.** Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* 17: 110-116, 2006.
26. **Garcia-Tornadu I, Perez-Millan MI, Recouvreux V, Ramirez MC, Luque G, Risso GS, Ornstein AM, Cristina C, Diaz-Torga G and Becu-Villalobos D.** New insights into the endocrine and metabolic roles of dopamine D2 receptors gained from the *Drd2* mouse. *Neuroendocrinology* 92: 207-214, 2010.
27. **Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA and Martial JA.** Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev* 17: 385-410, 1996.
28. **Lewis UJ.** Growth Hormone What is it and what does it do? *Trends Endocrinol Metab* 3: 117-121, 1992.
29. **Bronstein MD and Guitelman M.** Hiperprolactinemia y prolactinomas. In: *Hipófisis Fisiopatología*, edited by Stalldecker G. Buenos Aires: Mediciencia, S.A., 2004, p. 271-292.

30. **Diaz-Torga G, Feierstein C, Libertun C, Gelman D, Kelly MA, Low MJ, Rubinstein M and Becu-Villalobos D.** Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology* 143: 1270-1279, 2002.
31. **Flavell DM, Wells T, Wells SE, Carmignac DF, Thomas GB and Robinson IC.** Dominant dwarfism in transgenic rats by targeting human growth hormone (GH) expression to hypothalamic GH-releasing factor neurons. *EMBO J* 15: 3871-3879, 1996.
32. **Moore JP, Jr., Cai A, Hostettler ME, Arbogast LA, Voogt JL and Hyde JF.** Pituitary hormone gene expression and secretion in human growth hormone-releasing hormone transgenic mice: focus on lactotroph function. *Endocrinology* 141: 81-90, 2000.
33. **Alba M and Salvatori R.** A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. *Endocrinology* 145: 4134-4143, 2004.
34. **Low MJ, Otero-Corchon V, Parlow AF, Ramirez JL, Kumar U, Patel YC and Rubinstein M.** Somatostatin is required for masculinization of growth hormone-regulated hepatic gene expression but not of somatic growth. *J Clin Invest* 107: 1571-1580, 2001.
35. **Luque RM and Kineman RD.** Gender-dependent role of endogenous somatostatin in regulating growth hormone-axis function in mice. *Endocrinology* 148: 5998-6006, 2007.
36. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M and Matsuo H.** Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999.
37. **Kojima M and Kangawa K.** Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85: 495-522, 2005.
38. **Herington AC, Cornell HJ and Kuffer AD.** Recent advances in the biochemistry and physiology of the insulin-like growth factor/somatomedin family. *Int J Biochem* 15: 1201-1210, 1983.
39. **Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR and Wees WL.** Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* 137: 3717-3728, 1996.
40. **Berryman DE, List EO, Kohn DT, Coschigano KT, Seeley RJ and Kopchick JJ.** Effect of growth hormone on susceptibility to diet-induced obesity. *Endocrinology* 147: 2801-2808, 2006.
41. **Farrell WE.** Pituitary tumours: findings from whole genome analyses. *Endocr Relat Cancer* 13: 707-716, 2006.
42. **Seilicovich A, Pisera D, Sciascia SA, Candolfi M, Puntel M, Xiong W, Jaita G and Castro MG.** Gene therapy for pituitary tumors. *Curr Gene Ther* 5: 559-572, 2005.

43. **Osamura RY, Kajiya H, Takei M, Egashira N, Tobita M, Takekoshi S and Teramoto A.** Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol* 130: 495-507, 2008.
44. **Daly AF, Tichomirowa MA and Beckers A.** The epidemiology and genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23: 543-554, 2009.
45. **Kovacs K, Horvath E and Vidal S.** Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 54: 121-127, 2001.
46. **Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K and Melmed S.** Clonal origin of pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinological Metabolism* 71: 1427-1433, 1990.
47. **Vlotides G, Siegel E, Donangelo I, Gutman S, Ren SG and Melmed S.** Rat prolactinoma cell growth regulation by epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Res* 68: 6377-6386, 2008.
48. **Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D, Nagashima AC, Hopfner U, Grubler Y, Chervin A, Goldberg V, Goya R, Hentges ST, Low MJ, Holsboer F, Stalla GK and Arzt E.** Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1034-1039, 2003.
49. **Molitch ME.** Dopamine resistance of prolactinomas. *Pituitary* 6: 19-27, 2003.
50. **Molitch ME.** Medical treatment of prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28: 143-69, vii, 1999.
51. **Molitch ME.** Pharmacologic resistance in prolactinoma patients. *Pituitary* 8: 43-52, 2005.
52. **Colao A, Sarno AD, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Somma CD, Faggiano A, Biondi B and Lombardi G.** Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *Eur J Endocrinol* 148: 325-331, 2003.
53. **Chanson P and Salenave S.** Acromegaly. *Orphanet J Rare Dis* 3: 17, 2008.
54. **Gurlek A, Karavitaki N, Ansorge O and Wass JA.** What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics. *Eur J Endocrinol* 156: 143-153, 2007.
55. **Ben-Jonathan N and Liu JW.** Pituitary lactotrophs: endocrine, paracrine, juxtacrine and autocrine interactions. *Trends Endocrinol Metab* 3: 254-258, 1992.
56. **Webster J, Piscitelli G, Polli A, Ferrari CI, Ismail I and Scanlon MF.** A comparison of cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. Cabergoline Comparative Study Group. *N Engl J Med* 331: 904-909, 1994.
57. **Oh MC and Aghi MK.** Dopamine agonist-resistant prolactinomas. *J Neurosurg* 114: 1369-1379, 2011.

58. **Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynak CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P and Enjalbert A.** Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 500-509, 1989.
59. **Caccavelli L, Feron F, Morange I, Rouer E, Benarous R, Dewailly D, Jaquet P, Kordon C and Enjalbert A.** Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology* 60: 314-322, 1994.
60. **Caccavelli L, Morange-Ramos I, Kordon C, Jaquet P and Enjalbert A.** Alteration of G alpha subunits mRNA levels in bromocriptine resistant prolactinomas. *J Neuroendocrinol* 8: 737-746, 1996.
61. **Passos VQ, Fortes MA, Giannella-Neto D and Bronstein MD.** Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists. *Neuroendocrinology* 89: 163-170, 2009.
62. **Hofland LJ, Feelders RA, de Herder WW and Lamberts SW.** Pituitary tumours: the sst/D2 receptors as molecular targets. *Mol Cell Endocrinol* 326: 89-98, 2010.
63. **Black PM, Hsu DW, Klibanski A, Kliman B, Jameson JL, Ridgway EC, Hedley-Whyte ET and Zervas NT.** Hormone production in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Neurosurg* 66: 244-250, 1987.
64. **Dick JE.** Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112: 4793-4807, 2008.
65. **Dick JE.** Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1044: 1-5, 2005.
66. **Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA and Dick JE.** A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367: 645-648, 1994.
67. **Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988, 2003.
68. **Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J and Dirks PB.** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828, 2003.
69. **Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C and De Maria R.** Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115, 2007.
70. **Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF and Simeone DM.** Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030-1037, 2007.

71. **Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C and De Maria R.** Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15: 504-514, 2008.
72. **Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA and Katz RL.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 7: 330-338, 2009.
73. **Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD and Rich JN.** Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760, 2006.
74. **Eyler CE and Rich JN.** Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 26: 2839-2845, 2008.
75. **Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL and Clarke MF.** Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458: 780-783, 2009.
76. **Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E and Lokshin AE.** Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PLoS ONE* 3: e3077, 2008.
77. **Diehn M and Majeti R.** Metastatic cancer stem cells: an opportunity for improving cancer treatment? *Cell Stem Cell* 6: 502-503, 2010.
78. **Diehn M, Cho RW and Clarke MF.** Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin Radiat Oncol* 19: 78-86, 2009.
79. **Dontu G, Al Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF and Wicha MS.** Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36 Suppl 1: 59-72, 2003.
80. **Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto MA.** Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890, 2009.
81. **Polyak K and Weinberg RA.** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273, 2009.
82. **Wendt MK, Allington TM and Schiemann WP.** Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol* 5: 1145-1168, 2009.
83. **Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J and Weinberg RA.** The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715, 2008.

84. **Gupta PB, Chaffer CL and Weinberg RA.** Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 15: 1010-1012, 2009.
85. **Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, Munchhof M, VanArsdale T, Beachy PA and Reya T.** Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458: 776-779, 2009.
86. **Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P and Altaba A.** Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* 1: 338-351, 2009.
87. **Kopan R and Ilagan MX.** The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216-233, 2009.
88. **Molofsky AV, Pardal R and Morrison SJ.** Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 16: 700-707, 2004.
89. **Zarate S, Zaldivar V, Jaita G, Magri L, Radl D, Pisera D and Seilicovich A.** Role of estrogens in anterior pituitary gland remodeling during the estrous cycle. *Front Horm Res* 38: 25-31, 2010.
90. **Levy A.** Stem cells, hormones and pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol* 20: 139-140, 2008.
91. **Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R and Robinson IC.** SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2907-2912, 2008.
92. **Chen J, Hersmus N, Van D, V, Caesens P, Denef C and Vankelecom H.** The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 146: 3985-3998, 2005.
93. **Chen J, Gremeaux L, Fu Q, Liekens D, Van Laere S and Vankelecom H.** Pituitary progenitor cells tracked down by side population dissection. *Stem Cells* 27: 1182-1195, 2009.
94. **Vankelecom H.** Non-hormonal cell types in the pituitary candidating for stem cell. *Semin Cell Dev Biol* 18: 559-570, 2007.
95. **Mertens F, Gremeaux L, Chen J, Fu Q, Willems C, Roose H, Govaere O, Roskams T, Cristina C, Becu-Villalobos D, Jorissen M, Poorten VV, Bex M, van Loon J and Vankelecom H.** Pituitary tumors contain a side population with tumor stem cell-associated characteristics. *Endocr Relat Cancer* 22: 481-504, 2015.
96. **Vankelecom H.** Pituitary stem/progenitor cells: embryonic players in the adult gland? *Eur J Neurosci* 32: 2063-2081, 2010.

97. **Lu R, Gao H, Wang H, Cao L, Bai J and Zhang Y.** Overexpression of the Notch3 receptor and its ligand Jagged1 in human clinically non-functioning pituitary adenomas. *Oncol Lett* 5: 845-851, 2013.
98. **Chen J, Crabbe A, Van D, V and Vankelecom H.** The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. *Mol Endocrinol* 20: 3293-3307, 2006.
99. **Vankelecom H and Gremeaux L.** Stem cells in the pituitary gland: A burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol* 166: 478-488, 2010.
100. **Yavropoulou MP, Maladaki A and Yovos JG.** The role of Notch and Hedgehog signaling pathways in pituitary development and pathogenesis of pituitary adenomas. *Hormones (Athens)* 14: 5-18, 2015.
101. **Luo X, Tan H, Zhou Y, Xiao T, Wang C and Li Y.** Notch1 signaling is involved in regulating Foxp3 expression in T-ALL. *Cancer Cell Int* 13: 34, 2013.
102. **Zanotti S and Canalis E.** Notch signaling in skeletal health and disease. *Eur J Endocrinol* 168: R95-103, 2013.
103. **Fitzgerald K, Wilkinson HA and Greenwald I.** glp-1 can substitute for lin-12 in specifying cell fate decisions in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 119: 1019-1027, 1993.
104. **Krebs LT, Iwai N, Nonaka S, Welsh IC, Lan Y, Jiang R, Saijoh Y, O'Brien TP, Hamada H and Gridley T.** Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* 17: 1207-1212, 2003.
105. **Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP and Kopan R.** Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* 134: 801-811, 2007.
106. **Ranganathan P, Weaver KL and Capobianco AJ.** Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* 11: 338-351, 2011.
107. **Wang Z, Sugano E, Isago H, Murayama N, Tamai M and Tomita H.** Notch signaling pathway regulates proliferation and differentiation of immortalized Muller cells under hypoxic conditions in vitro. *Neuroscience* 214: 171-180, 2012.
108. **Hansson EM, Lendahl U and Chapman G.** Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol* 14: 320-328, 2004.
109. **Iso T, Kedes L and Hamamori Y.** HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194: 237-255, 2003.
110. **Radtke F and Raj K.** The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3: 756-767, 2003.



111. **Talora C, Sgroi DC, Crum CP and Dotto GP.** Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev* 16: 2252-2263, 2002.
112. **Domingo-Domenech J, Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Castillo-Martin M, Quinn SA, Rodriguez-Barrueco R, Bonal DM, Charytonowicz E, Gladoun N, de I, I, Petrylak DP, Benson MC, Silva JM and Cordon-Cardo C.** Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer Cell* 22: 373-388, 2012.
113. **Cheung LY, Rizzoti K, Lovell-Badge R and Le Tissier PR.** Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *J Neuroendocrinol* 25: 391-401, 2013.
114. **Bello EP, Mateo Y, Gelman DM, Noain D, Shin JH, Low MJ, Alvarez VA, Lovinger DM and Rubinstein M.** Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci* 14: 1033-1038, 2011.
115. **Noain D, Perez-Millan MI, Bello EP, Luque GM, Casas CR, Gelman DM, Peper M, Tornadu IG, Low MJ, Becu-Villalobos D and Rubinstein M.** Central dopamine D2 receptors regulate growth-hormone-dependent body growth and pheromone signaling to conspecific males. *J Neurosci* 33: 5834-5842, 2013.
116. **Garcia-Tornadu I, Diaz-Torga GS, Risso G, Silveyra P, Cataldi N, Ramirez MC, Low MJ, Libertun C and Becu-Villalobos D.** Hypothalamic orexin, OX1,  $\alpha$ MSH, NPY and MCRs expression in dopaminergic D2R knockout mice. *Neuropeptides* 43: 267-274, 2009.
117. **Cristina C, Diaz-Torga G, Baldi A, Gongora A, Rubinstein M, Low MJ and Becu-Villalobos D.** Increased pituitary vascular endothelial growth factor-A in dopaminergic D2 receptor knockout female mice. *Endocrinology* 146: 2952-2962, 2005.
118. **Langmead B, Trapnell C, Pop M and Salzberg SL.** Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25, 2009.
119. **Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W and Liu XS.** Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9: R137, 2008.
120. **Quinlan AR and Hall IM.** BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26: 841-842, 2010.
121. **Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM and Haussler D.** The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12: 996-1006, 2002.
122. **Yashiro-Ohtani Y, Wang H, Zang C, Arnett KL, Bailis W, Ho Y, Knoechel B, Lanauze C, Louis L, Forsyth KS, Chen S, Chung Y, Schug J, Blobel GA, Liebhaber SA, Bernstein BE, Blacklow**

- SC, Liu XS, Aster JC and Pear WS.** Long-range enhancer activity determines Myc sensitivity to Notch inhibitors in T cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E4946-E4953, 2014.
123. **Trapnell C, Pachter L and Salzberg SL.** TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111, 2009.
124. **Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL and Pachter L.** Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7: 562-578, 2012.
125. **Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES and Mesirov JP.** Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15545-15550, 2005.
126. **Vankelecom H.** Pituitary stem cells drop their mask. *Curr Stem Cell Res Ther* 7: 36-71, 2012.
127. **Tando Y, Fujiwara K, Yashiro T and Kikuchi M.** Localization of Notch signaling molecules and their effect on cellular proliferation in adult rat pituitary. *Cell Tissue Res* 351: 511-519, 2013.
128. **Batchuluun K, Azuma M, Yashiro T and Kikuchi M.** Notch signaling-mediated cell-to-cell interaction is dependent on E-cadherin adhesion in adult rat anterior pituitary. *Cell Tissue Res* 2016.
129. **Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, Hashida H, Takabayashi A, Sasaki M, Robine S, Itoh K, Yoshioka K, Kakizaki F, Kitamura T, Oshima M and Taketo MM.** Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell* 19: 125-137, 2011.
130. **Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R and Israel A.** Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377: 355-358, 1995.
131. **Potten CS and Loeffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020, 1990.
132. **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.
133. **Chang CV, Araujo RV, Cirqueira CS, Cani CM, Matushita H, Cescato VA, Fragoso MC, Bronstein MD, Zerbini MC, Mendonca BB and Carvalho LR.** Differential Expression of Stem Cell Markers in Human Adamantinomatous Craniopharyngioma and Pituitary Adenoma. *Neuroendocrinology* 104: 183-193, 2017.

134. **Diaz-Torga G, Gonzalez IA, Achaval-Zaia R, Libertun C and Becu-Villalobos D.** Angiotensin II-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *Am J Physiol* 274: E534-E540, 1998.
135. **Suarez C, García-Tornadú I, Khalil W and Becu-Villalobos D.** Dehydroepiandrosterone treatment attenuates estrogen induced pituitary hyperplasia. *J Endocrinol* 174: 447-454, 2002.
136. **Goya RG, Lu JK and Meites J.** Gonadal function in aging rats and its relation to pituitary and mammary pathology. *Mech Ageing Dev* 56: 77-88, 1990.
137. **Cai A, Bowers RC, Moore JPJ and Hyde JF.** Function of galanin in the anterior pituitary of estrogen-treated Fischer 344 rats: autocrine and paracrine regulation of prolactin secretion. *Endocrinology* 139: 2452-2458, 1998.
138. **McAndrew J, Paterson AJ, Asa SL, McCarthy KJ and Kudlow JE.** Targeting of transforming growth factor  $\alpha$  expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology* 136: 4479-4488, 1995.
139. **Borrelli E, Sawchenko PE and Evans RM.** Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2764-2768, 1992.
140. **Ezzat S, Zheng L, Zhu XF, Wu GE and Asa SL.** Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest* 109: 69-78, 2002.
141. **Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL and Low MJ.** Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 110: 973-981, 2002.
142. **Garcia-Tornadu I, Rubinstein M, Gaylinn BD, Hill D, Arany E, Low MJ, Diaz-Torga G and Becu-Villalobos D.** GH in the dwarf dopaminergic D2 receptor knockout mouse: somatotrope population, GH release, and responsiveness to GH-releasing factors and somatostatin. *J Endocrinol* 190: 611-619, 2006.
143. **Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK and Low MJ.** Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19: 103-113, 1997.
144. **Asa SL, Kelly MA, Grandy DK and Low MJ.** Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 140: 5348-5355, 1999.
145. **Saiardi A, Bozzi Y, Baik J-H and Borrelli E.** Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia. *Neuron* 19: 115-126, 1997.

146. **Hoess RH, Wierzbicki A and Abremski K.** The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 14: 2287-2300, 1986.
147. **Abremski K, Hoess R and Sternberg N.** Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32: 1301-1311, 1983.
148. **Noain D, Perez-Millan MI, Bello-Gay E, Luque GM, Casas Cordero R, Gelman D, Peper M, Garcia-Tornadu I, Low MJ, Becu-Villalobos D and Rubinstein M.** Central dopamine D2 receptors regulate growth hormone-dependent body growth and pheromone signaling to conspecific males. *J Neurosci* In press: 2013.
149. **Luque GM, Perez-Millan MI, Ornstein AM, Cristina C and Becu-Villalobos D.** Inhibitory effects of anti-VEGF strategies in experimental dopamine resistant prolactinomas. *J Pharmacol Exp Ther* 337: 766-774, 2011.
150. **Heaney AP, Fernando M and Melmed S.** PPAR-gamma receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas. *J Clin Invest* 111: 1381-1388, 2003.
151. **Le XF, Mao W, Lu C, Thornton A, Heymach JV, Sood AK and Bast RC, Jr.** Specific blockade of VEGF and HER2 pathways results in greater growth inhibition of breast cancer xenografts that overexpress HER2. *Cell Cycle* 7: 3747-3758, 2008.
152. **Yano T, Pinsky J, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K and Schally AV.** Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7090-7094, 1994.
153. **Recouvreux MV, Guida MC, Rifkin DB, Becu-Villalobos D and Diaz-Torga G.** Active and Total Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Are Differentially Regulated by Dopamine and Estradiol in the Pituitary. *Endocrinology* 152: 2722-2730, 2011.
154. **Recouvreux MV, Camilletti MA, Rifkin DB, Becu-Villalobos D and Diaz-Torga G.** Thrombospondin-1 (TSP-1) Analogs ABT-510 and ABT-898 Inhibit Prolactinoma Growth and Recover Active Pituitary Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). *Endocrinology* 153: 3861-3871, 2012.
155. **Sonnenschein C, Richardson UI and Tashjian AH, Jr.** Chromosomal analysis, organ-specific function and appearance of six clonal strains of rat pituitary tumor cells. *Exp Cell Res* 61: 121-128, 1970.
156. **Zhang X, Horwitz GA, Heany AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD and Melmed S.** Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 761-767, 1999.
157. **Schaaf C, Shan B, Buchfelder M, Losa M, Kreutzer J, Rachinger W, Stalla GK, Schilling T, Arzt E, Perone MJ and Renner U.** Curcumin acts as anti-tumorigenic and hormone-

- suppressive agent in murine and human pituitary tumour cells in vitro and in vivo. *Endocr Relat Cancer* 16: 1339-1350, 2009.
158. **Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K and Miyamoto E.** Mitogen-activated protein kinase activation by stimulation with thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary GH3 cells. *Biol Reprod* 61: 319-325, 1999.
  159. **Boockfor FR, Hoeffler JP and Frawley LS.** Cultures of GH3 cells are functionally heterogeneous: thyrotropin-releasing hormone, estradiol and cortisol cause reciprocal shifts in the proportions of growth hormone and prolactin secretors. *Endocrinology* 117: 418-420, 1985.
  160. **Dai C, Zhang B, Liu X, Ma S, Yang Y, Yao Y, Feng M, Bao X, Li G, Wang J, Guo K, Ma W, Xing B, Lian W, Xiao J, Cai F, Zhang H and Wang R.** Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway enhances temozolomide-induced cytotoxicity in pituitary adenoma cell lines in vitro and xenografted pituitary adenoma in female nude mice. *Endocrinology* 154: 1247-1259, 2013.
  161. **Judd AM, Login IS, Kovacs K, Ross PC, Spangelo BL, Jarvis WD and MacLeod RM.** Characterization of the MMQ cell, a prolactin-secreting clonal cell line that is responsive to dopamine. *Endocrinology* 123: 2341-2350, 1988.
  162. **Cao L, Gao H, Li P, Gui S and Zhang Y.** The Wnt/beta-catenin signaling pathway is involved in the antitumor effect of fulvestrant on rat prolactinoma MMQ cells. *Tumour Biol* 35: 5121-5127, 2014.
  163. **Leng L and Zhang Y.** Effects of an estrogen receptor antagonist on proliferation, prolactin secretion and growth factor expression in the MMQ pituitary prolactinoma cell line. *J Clin Neurosci* 18: 1694-1698, 2011.
  164. **FURTH J, GADSEN EL and UPTON AC.** ACTH secreting transplantable pituitary tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 84: 253-254, 1953.
  165. **Beuret N, Hasler F, Prescianotto-Baschong C, Birk J, Rutishauser J and Spiess M.** Amyloid-like aggregation of provasopressin in diabetes insipidus and secretory granule sorting. *BMC Biol* 15: 5, 2017.
  166. **Cawley NX, Rathod T, Young S, Lou H, Birch N and Loh YP.** Carboxypeptidase E and Secretogranin III Coordinately Facilitate Efficient Sorting of Proopiomelanocortin to the Regulated Secretory Pathway in AtT20 Cells. *Mol Endocrinol* 30: 37-47, 2016.
  167. **Erchegyi J, Wang L, Gulyas J, Samant M, Perrin MH, Lewis K, Miller C, Vaughan J, Donaldson C, Fischer W, Low W, Yakabi S, Karasawa H, Tache Y, Rivier C and Rivier J.** Characterization of Multisubstituted Corticotropin Releasing Factor (CRF) Peptide Antagonists (Astressins). *J Med Chem* 59: 854-866, 2016.
  168. **Yamaguchi N, Oyama T, Ito E, Satoh H, Azuma S, Hayashi M, Shimizu K, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai J, Ohwada S, Tatsuta K, Inoue J, Semba K**

- and Watanabe S.** NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 68: 1881-1888, 2008.
169. **Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG and Fine HA.** Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 65: 2353-2363, 2005.
170. **Roma J, Masia A, Reventos J, Sanchez dT and Gallego S.** Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro. *Clin Cancer Res* 17: 505-513, 2011.
171. **Monahan P, Rybak S and Raetzman LT.** The notch target gene HES1 regulates cell cycle inhibitor expression in the developing pituitary. *Endocrinology* 150: 4386-4394, 2009.
172. **Stylianou S, Clarke RB and Brennan K.** Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res* 66: 1517-1525, 2006.
173. **Wang K, Wu X, Wang J and Huang J.** Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *Int J Nanomedicine* 8: 899-908, 2013.
174. **Hahm ER, Chandra-Kuntal K, Desai D, Amin S and Singh SV.** Notch activation is dispensable for D, L-sulforaphane-mediated inhibition of human prostate cancer cell migration. *PLoS ONE* 7: e44957, 2012.
175. **Eyler CE and Rich JN.** Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 26: 2839-2845, 2008.
176. **Abravanel DL, Belka GK, Pan TC, Pant DK, Collins MA, Sterner CJ and Chodosh LA.** Notch promotes recurrence of dormant tumor cells following HER2/neu-targeted therapy. *J Clin Invest* 125: 2484-2496, 2015.
177. **Lefort K, Ostano P, Mello-Grand M, Calpini V, Scatolini M, Farsetti A, Dotto GP and Chiorino G.** Dual tumor suppressing and promoting function of Notch1 signaling in human prostate cancer. *Oncotarget* 7: 48011-48026, 2016.
178. **Konishi J, Kawaguchi KS, Vo H, Haruki N, Gonzalez A, Carbone DP and Dang TP.** Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers. *Cancer Res* 67: 8051-8057, 2007.
179. **Belandia B, Powell SM, Garcia-Pedrero JM, Walker MM, Bevan CL and Parker MG.** Hey1, a mediator of notch signaling, is an androgen receptor corepressor. *Mol Cell Biol* 25: 1425-1436, 2005.
180. **Hayashi T, Gust KM, Wyatt AW, Goriki A, Jager W, Awrey S, Li N, Oo HZ, Altamirano-Dimas M, Buttyan R, Fazli L, Matsubara A and Black PC.** Not all NOTCH Is Created Equal:

- The Oncogenic Role of NOTCH2 in Bladder Cancer and Its Implications for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res* 22: 2981-2992, 2016.
181. **Raetzman LT, Ross SA, Cook S, Dunwoodie SL, Camper SA and Thomas PQ.** Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev Biol* 265: 329-340, 2004.
  182. **Raetzman LT, Wheeler BS, Ross SA, Thomas PQ and Camper SA.** Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Mol Endocrinol* 20: 2898-2908, 2006.
  183. **Ansell PJ, Zhou Y, Schjeide BM, Kerner A, Zhao J, Zhang X and Klibanski A.** Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (Dlk1). *Mol Cell Endocrinol* 271: 55-63, 2007.
  184. **Evans CO, Moreno CS, Zhan X, McCabe MT, Vertino PM, Desiderio DM and Oyesiku NM.** Molecular pathogenesis of human prolactinomas identified by gene expression profiling, RT-qPCR, and proteomic analyses. *Pituitary* 11: 231-245, 2008.
  185. **Moreno CS, Evans CO, Zhan X, Okor M, Desiderio DM and Oyesiku NM.** Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res* 65: 10214-10222, 2005.
  186. **Miao Z, Miao Y, Lin Y and Lu X.** Overexpression of the Notch3 receptor in non-functioning pituitary tumours. *J Clin Neurosci* 19: 107-110, 2012.
  187. **Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M, Hu J, Hwang JY, Farkas DL, Black KL and Yu JS.** Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *Br J Cancer* 101: 303-311, 2009.
  188. **Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L and Tang DG.** Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25: 1696-1708, 2006.
  189. **Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A and Eberhart CG.** Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 64: 7787-7793, 2004.
  190. **Korsisaari N, Ross J, Wu X, Kowanetz M, Pal N, Hall L, Eastham-Anderson J, Forrest WF, Van Bruggen N, Peale FV and Ferrara N.** Blocking vascular endothelial growth factor-A inhibits the growth of pituitary adenomas and lowers serum prolactin level in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Cancer Res* 14: 249-258, 2008.
  191. **Castro CP, Giacomini D, Nagashima AC, Onofri C, Graciarena M, Kobayashi K, Paez-Pereda M, Renner U, Stalla GK and Arzt E.** Reduced expression of the cytokine transducer gp130 inhibits hormone secretion, cell growth, and tumor development of pituitary lactosomatotrophic GH3 cells. *Endocrinology* 144: 693-700, 2003.

192. **Mao ZG, Zhou J, Wang H, He DS, Xiao WW, Liao GZ, Qiu LB, Zhu YH and Wang HJ.** Artesunate inhibits cell proliferation and decreases growth hormone synthesis and secretion in GH3 cells. *Mol Biol Rep* 39: 6227-6234, 2012.
193. **Liu Y, Zhong Y, Pei J, Zhu Y, Hu Y, Chi S and Kaye AD.** Inhibitory effect of leptin on growth hormone secretion of GH3 cells: involvement of cell proliferation, apoptosis and intracellular free Ca<sup>2+</sup>. *Cytokine* 46: 245-250, 2009.
194. **Jeng YJ, Kochukov MY and Watson CS.** Membrane estrogen receptor-alpha-mediated nongenomic actions of phytoestrogens in GH3/B6/F10 pituitary tumor cells. *J Mol Signal* 4: 2, 2009.
195. **Al Azzawi H, Yacqub-Usman K, Richardson A, Hofland LJ, Clayton RN and Farrell WE.** Reversal of endogenous dopamine receptor silencing in pituitary cells augments receptor-mediated apoptosis. *Endocrinology* 152: 364-373, 2011.
196. **Hernandez F, Peluffo MC, Stouffer RL, Irusta G and Tesone M.** Role of the DLL4-NOTCH system in PGF2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat. *Biol Reprod* 84: 859-865, 2011.
197. **Accialini P, Hernandez SF, Bas D, Pazos MC, Irusta G, Abramovich D and Tesone M.** A link between Notch and progesterone maintains the functionality of the rat corpus luteum. *Reproduction* 149: 1-10, 2015.
198. **Gordon WR, Vardar-Ulu D, Histén G, Sanchez-Irizarry C, Aster JC and Blacklow SC.** Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat Struct Mol Biol* 14: 295-300, 2007.
199. **Gordon WR, Arnett KL and Blacklow SC.** The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* 121: 3109-3119, 2008.
200. **Tsao PN, Chen F, Izvolsky KI, Walker J, Kukuruzinska MA, Lu J and Cardoso WV.** Gamma-secretase activation of notch signaling regulates the balance of proximal and distal fates in progenitor cells of the developing lung. *J Biol Chem* 283: 29532-29544, 2008.
201. **Tsao PN, Wei SC, Huang MT, Lee MC, Chou HC, Chen CY and Hsieh WS.** Lipopolysaccharide-induced Notch signaling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response. *J Biomed Sci* 18: 56, 2011.
202. **Daudet N, Gibson R, Shang J, Bernard A, Lewis J and Stone J.** Notch regulation of progenitor cell behavior in quiescent and regenerating auditory epithelium of mature birds. *Dev Biol* 326: 86-100, 2009.
203. **Yang T, Arslanova D, Xu X, Li YM and Xia W.** In vivo manifestation of Notch related phenotypes in zebrafish treated with Alzheimer's amyloid reducing gamma-secretase inhibitors. *J Neurochem* 113: 1200-1209, 2010.
204. **Hassan KA, Wang L, Korkaya H, Chen G, Maillard I, Beer DG, Kalemkerian GP and Wicha MS.** Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and



- correlates with worse survival in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 19: 1972-1980, 2013.
205. **Meurette O, Stylianou S, Rock R, Collu GM, Gilmore AP and Brennan K.** Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 69: 5015-5022, 2009.
206. **Miyamoto Y, Maitra A, Ghosh B, Zechner U, Argani P, Iacobuzio-Donahue CA, Sriuranpong V, Iso T, Meszoely IM, Wolfe MS, Hruban RH, Ball DW, Schmid RM and Leach SD.** Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3: 565-576, 2003.
207. **Luque GM, Ornstein A.M., Cristina C and Becu-Villalobos D.** Antiangiogenic treatment of experimental prolactinomas. *Biocell* 32: A213, 2009.
208. **Luque GM, Perez-Millan MI, Ornstein AM, Cristina C and Becu-Villalobos D.** Inhibitory effects of antivascular endothelial growth factor strategies in experimental dopamine-resistant prolactinomas. *J Pharmacol Exp Ther* 337: 766-774, 2011.
209. **Yang Y, Yan X, Duan W, Yan J, Yi W, Liang Z, Wang N, Li Y, Chen W, Yu S, Jin Z and Yi D.** Pterostilbene exerts antitumor activity via the Notch1 signaling pathway in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS ONE* 8: e62652, 2013.
210. **Garcia-Heredia JM, Lucena-Cacace A, Verdugo-Sivianes EM, Perez M and Carnero A.** The cargo protein MAP17 (PDZK1IP1) regulates the cancer stem cell pool activating the Notch pathway by abducting NUMB. *Clin Cancer Res* 2017.
211. **Plentz R, Park JS, Rhim AD, Abravanel D, Hezel AF, Sharma SV, Gurumurthy S, Deshpande V, Kenific C, Settleman J, Majumder PK, Stanger BZ and Bardeesy N.** Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 136: 1741-1749, 2009.
212. **Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL, Kim R, Tang J, Montie JE, Chinnaiyan AM, Rubin MA and Aster JC.** JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Res* 64: 6854-6857, 2004.
213. **Yuan Z, Friedmann DR, VanderWielen BD, Collins KJ and Kovall RA.** Characterization of CSL (CBF-1, Su(H), Lag-1) mutants reveals differences in signaling mediated by Notch1 and Notch2. *J Biol Chem* 287: 34904-34916, 2012.
214. **Grynfeld A, Pahlman S and Axelson H.** Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer* 88: 401-410, 2000.
215. **Lamouille S and Derynck R.** Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol* 178: 437-451, 2007.

- 
216. **Devgan V, Mammucari C, Millar SE, Briskin C and Dotto GP.** p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev* 19: 1485-1495, 2005.
217. **Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC and de la Pompa JL.** Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18: 99-115, 2004.
218. **Fischer A, Steidl C, Wagner TU, Lang E, Jakob PM, Friedl P, Knobloch KP and Gessler M.** Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circ Res* 100: 856-863, 2007.
219. **Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, Zimmers TA, Lee SJ, Bidart M, Feige JJ and Bailly S.** BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* 119: 6162-6171, 2012.
220. **Cavard C, Audebourg A, Letourneur F, Audard V, Beuvon F, Cagnard N, Radenen B, Varlet P, Vacher-Lavenu MC, Perret C and Terris B.** Gene expression profiling provides insights into the pathways involved in solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas. *J Pathol* 218: 201-209, 2009.
221. **Tradonsky A, Rubin T, Beck R, Ring B, Seitz R and Mair S.** A search for reliable molecular markers of prognosis in prostate cancer: a study of 240 cases. *Am J Clin Pathol* 137: 918-930, 2012.
222. **Adepoju O, Wong A, Kitajewski A, Tong K, Boscolo E, Bischoff J, Kitajewski J and Wu JK.** Expression of HES and HEY genes in infantile hemangiomas. *Vasc Cell* 3: 19, 2011.
223. **Wu DC, Zhang MF, Su SG, Fang HY, Wang XH, He D, Xie YY and Liu XH.** HEY2, a target of miR-137, indicates poor outcomes and promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7: 38052-38063, 2016.
224. **Raafat A, Goldhar AS, Klauzinska M, Xu K, Amirjazi I, McCurdy D, Lashin K, Salomon D, Vonderhaar BK, Egan S and Callahan R.** Expression of Notch receptors, ligands, and target genes during development of the mouse mammary gland. *J Cell Physiol* 226: 1940-1952, 2011.
225. **Roy M, Pear WS and Aster JC.** The multifaceted role of Notch in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 52-59, 2007.
226. **Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P and Artavanis-Tsakonas S.** Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90: 281-291, 1997.
227. **An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.** *Nature* 489: 57-74, 2012.

- 
228. **Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, Landt SG, Yan KK, Cheng C, Mu XJ, Khurana E, Rozowsky J, Alexander R, Min R, Alves P, Abyzov A, Addleman N, Bhardwaj N, Boyle AP, Cayting P, Charos A, Chen DZ, Cheng Y, Clarke D, Eastman C, Euskirchen G, Fietze S, Fu Y, Gertz J, Grubert F, Harmanci A, Jain P, Kasowski M, Lacroute P, Leng J, Lian J, Monahan H, O'Geen H, Ouyang Z, Partridge EC, Patacsil D, Pauli F, Raha D, Ramirez L, Reddy TE, Reed B, Shi M, Slifer T, Wang J, Wu L, Yang X, Yip KY, Zilberman-Schapira G, Batzoglou S, Sidow A, Farnham PJ, Myers RM, Weissman SM and Snyder M.** Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 489: 91-100, 2012.
229. **Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu H, Brody J, Shafer A, Neri F, Lee K, Kutayavin T, Stehling-Sun S, Johnson AK, Canfield TK, Giste E, Diegel M, Bates D, Hansen RS, Neph S, Sabo PJ, Heimfeld S, Raubitschek A, Ziegler S, Cotsapas C, Sotoodehnia N, Glass I, Sunyaev SR, Kaul R and Stamatoyannopoulos JA.** Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* 337: 1190-1195, 2012.
230. **Bernstein BE, Meissner A and Lander ES.** The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669-681, 2007.
231. **Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, Kellis M, Marra MA, Beaudet AL, Ecker JR, Farnham PJ, Hirst M, Lander ES, Mikkelsen TS and Thomson JA.** The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol* 28: 1045-1048, 2010.
232. **Olaf Ilzins, Raul Isea and Johan Hoebeke.** Can Bioinformatics Be Considered as an Experimental Biological Science? *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 2, No. 5.: 60-62, 2015.
233. **Chen G, Shi T and Shi L.** Characterizing and annotating the genome using RNA-seq data. *Sci China Life Sci* 2016.
234. **Sims D, Sudbery I, Ilott NE, Heger A and Ponting CP.** Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 15: 121-132, 2014.
235. **Wang Z, Gerstein M and Snyder M.** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57-63, 2009.
236. **Bardet AF, He Q, Zeitlinger J and Stark A.** A computational pipeline for comparative ChIP-seq analyses. *Nat Protoc* 7: 45-61, 2011.
237. **Bailey T, Krajewski P, Ladunga I, Lefebvre C, Li Q, Liu T, Madrigal P, Taslim C and Zhang J.** Practical guidelines for the comprehensive analysis of ChIP-seq data. *PLoS Comput Biol* 9: e1003326, 2013.
238. **Lin C, Lin SC, Chang CP and Rosenfeld MG.** Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* 360: 765-768, 1992.

- 
239. **Zhang Z, Florez S, Gutierrez-Hartmann A, Martin JF and Amendt BA.** MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem* 285: 34718-34728, 2010.
240. **Fedele M, Palmieri D and Fusco A.** HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? *Mol Cell Endocrinol* 326: 19-24, 2010.
241. **Prevot D, Voeltzel T, Birot AM, Morel AP, Rostan MC, Magaud JP and Corbo L.** The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation. *J Biol Chem* 275: 147-153, 2000.
242. **Ito K, Takahashi A, Morita M, Suzuki T and Yamamoto T.** The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability. *Protein Cell* 2: 755-763, 2011.
243. **Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ.** The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501, 2001.
244. **Zhao XK, Che P, Cheng ML, Zhang Q, Mu M, Li H, Luo Y, Liang YD, Luo XH, Gao CQ, Jackson PL, Wells JM, Zhou Y, Hu M, Cai G, Thannickal VJ, Steele C, Blalock JE, Han X, Chen CY and Ding Q.** Tristetraprolin Down-Regulation Contributes to Persistent TNF-Alpha Expression Induced by Cigarette Smoke Extract through a Post-Transcriptional Mechanism. *PLoS ONE* 11: e0167451, 2016.
245. **Thakker RV.** Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24: 355-370, 2010.
246. **de Wit E and de Laat W.** A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes Dev* 26: 11-24, 2012.
247. **Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS and Ren B.** Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485: 376-380, 2012.
248. **Fletcher BS, Lim RW, Varnum BC, Kujubu DA, Koski RA and Herschman HR.** Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. *J Biol Chem* 266: 14511-14518, 1991.
249. **Rouault JP, Falette N, Guehenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C and Puisieux A.** Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* 14: 482-486, 1996.

- 
250. **Bradbury A, Possenti R, Shooter EM and Tirone F.** Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3353-3357, 1991.
251. **Iacopetti P, Barsacchi G, Tirone F, Maffei L and Cremisi F.** Developmental expression of PC3 gene is correlated with neuronal cell birthday. *Mech Dev* 47: 127-137, 1994.
252. **Boiko AD, Porteous S, Razorenova OV, Krivokrysenko VI, Williams BR and Gudkov AV.** A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation. *Genes Dev* 20: 236-252, 2006.
253. **Kawakubo H, Brachtel E, Hayashida T, Yeo G, Kish J, Muzikansky A, Walden PD and Maheswaran S.** Loss of B-cell translocation gene-2 in estrogen receptor-positive breast carcinoma is associated with tumor grade and overexpression of cyclin d1 protein. *Cancer Res* 66: 7075-7082, 2006.
254. **Kawakubo H, Carey JL, Brachtel E, Gupta V, Green JE, Walden PD and Maheswaran S.** Expression of the NF-kappaB-responsive gene BTG2 is aberrantly regulated in breast cancer. *Oncogene* 23: 8310-8319, 2004.
255. **Canzoniere D, Farioli-Vecchioli S, Conti F, Ciotti MT, Tata AM, Augusti-Tocco G, Mattei E, Lakshmana MK, Krizhanovsky V, Reeves SA, Giovannoni R, Castano F, Servadio A, Ben Arie N and Tirone F.** Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1. *J Neurosci* 24: 3355-3369, 2004.
256. **Farioli-Vecchioli S, Sarauli D, Costanzi M, Pacioni S, Cina I, Aceti M, Micheli L, Bacci A, Cestari V and Tirone F.** The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol* 6: e246, 2008.
257. **Terra R, Luo H, Qiao X and Wu J.** Tissue-specific expression of B-cell translocation gene 2 (BTG2) and its function in T-cell immune responses in a transgenic mouse model. *Int Immunol* 20: 317-326, 2008.
258. **Jiang Z, Gui S and Zhang Y.** Analysis of differential gene expression in plurihormonal pituitary adenomas using bead-based fiber-optic arrays. *J Neurooncol* 108: 341-348, 2012.
259. **Jiang Z, Gui S and Zhang Y.** Analysis of differential gene expression by bead-based fiber-optic array in growth-hormone-secreting pituitary adenomas. *Exp Ther Med* 1: 905-910, 2010.
260. **Winkler GS, Mulder KW, Bardwell VJ, Kalkhoven E and Timmers HT.** Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. *EMBO J* 25: 3089-3099, 2006.

- 
261. **Faraji F, Hu Y, Yang HH, Lee MP, Winkler GS, Hafner M and Hunter KW.** Post-transcriptional Control of Tumor Cell Autonomous Metastatic Potential by CCR4-NOT Deadenylase CNOT7. *PLoS Genet* 12: e1005820, 2016.
262. **Jayne S, Zwartjes CG, van Schaik FM and Timmers HT.** Involvement of the SMRT/NCoR-HDAC3 complex in transcriptional repression by the CNOT2 subunit of the human Ccr4-Not complex. *Biochem J* 398: 461-467, 2006.
263. **Carballo E, Lai WS and Blackshear PJ.** Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* 281: 1001-1005, 1998.
264. **Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES and Golub TR.** A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 33: 49-54, 2003.
265. **Pei L, Castrillo A and Tontonoz P.** Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 20: 786-794, 2006.
266. **Lin B, Kolluri SK, Lin F, Liu W, Han YH, Cao X, Dawson MI, Reed JC and Zhang XK.** Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116: 527-540, 2004.
267. **Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F and Arzt E.** Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16: 1638-1651, 2002.
268. **Tabuchi Y, Kitamura T, Fukuhara A, Mukai K, Onodera T, Miyata Y, Hamasaki T, Oshino S, Saitoh Y, Morii E, Otsuki M and Shimomura I.** Nur77 gene expression levels were involved in different ACTH-secretion autonomy between Cushing's disease and subclinical Cushing's disease. *Endocr J* 63: 545-554, 2016.
269. **Menna PL, Skilton G, Leskow FC, Alonso DF, Gomez DE and Kazanietz MG.** Inhibition of aggressiveness of metastatic mouse mammary carcinoma cells by the beta2-chimaerin GAP domain. *Cancer Res* 63: 2284-2291, 2003.
270. **Caino MC, Chae YC, Vaira V, Ferrero S, Nosotti M, Martin NM, Weeraratna A, O'Connell M, Jernigan D, Fatatis A, Languino LR, Bosari S and Altieri DC.** Metabolic stress regulates cytoskeletal dynamics and metastasis of cancer cells. *J Clin Invest* 123: 2907-2920, 2013.
271. **Caino MC, Lopez-Haber C, Kissil JL and Kazanietz MG.** Non-small cell lung carcinoma cell motility, rac activation and metastatic dissemination are mediated by protein kinase C epsilon. *PLoS ONE* 7: e31714, 2012.
272. **Schmitz AA, Govek EE, Bottner B and Van Aelst L.** Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261: 1-12, 2000.

- 
273. **Giles A, Madec F, Friedrichsen S, Featherstone K, Chambers T, Harper CV, Resch J, Brabant G and Davis JR.** Wnt signaling in estrogen-induced lactotroph proliferation. *J Cell Sci* 124: 540-547, 2011.
274. **Cristina C, Diaz-Torga G, Gongora A, Guida MC, Perez-Millan MI, Baldi A and Becu-Villalobos D.** Fibroblast Growth Factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1341-E1351, 2007.
275. **Moldovan GL, Pfander B and Jentsch S.** PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129: 665-679, 2007.
276. **Hilger RA, Scheulen ME and Strumberg D.** The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25: 511-518, 2002.
277. **Downward J.** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 11-22, 2003.
278. **Chen Y, Zheng S, Qi D, Zheng S, Guo J, Zhang S and Weng Z.** Inhibition of Notch signaling by a gamma-secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats. *PLoS ONE* 7: e46512, 2012.
279. **Vela J, Perez-Millan MI, Becu-Villalobos D and Diaz-Torga G.** Different kinases regulate activation of voltage-dependent calcium channels by depolarization in GH3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C951-C959, 2007.
280. **Ni CY, Murphy MP, Golde TE and Carpenter G.** gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294: 2179-2181, 2001.
281. **Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Eftthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T and Robakis NK.** A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21: 1948-1956, 2002.
282. **Georgakopoulos A, Litterst C, Ghersi E, Baki L, Xu C, Serban G and Robakis NK.** Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *EMBO J* 25: 1242-1252, 2006.
283. **Lammich S, Okochi M, Takeda M, Kaether C, Capell A, Zimmer AK, Edbauer D, Walter J, Steiner H and Haass C.** Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an Abeta-like peptide. *J Biol Chem* 277: 44754-44759, 2002.
284. **Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF and Marx SO.** Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 280: 207-214, 2005.

- 
285. **Levy A and Lightman S.** Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours. *Front Neuroendocrinol* 24: 94-127, 2003.
286. **Alexander J, Biller B, Bikkal H, Zervas N, Arnold A and Klibansky A.** Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* 86: 336-340, 1990.
287. **Biller BM.** Pathogenesis of pituitary Cushing's syndrome. Pituitary versus hypothalamic. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23: 547-554, 1994.
288. **Diehn M and Majeti R.** Metastatic cancer stem cells: an opportunity for improving cancer treatment? *Cell Stem Cell* 6: 502-503, 2010.
289. **Maenhaut C, Dumont JE, Roger PP and van Staveren WC.** Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis. *Carcinogenesis* 31: 149-158, 2010.
290. **Clarke MF and Fuller M.** Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 124: 1111-1115, 2006.
291. **Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD and Dirks PB.** Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401, 2004.
292. **Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ and Heeschen C.** Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313-323, 2007.
293. **Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ and Maitland NJ.** Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-10951, 2005.
294. **O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE.** A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445: 106-110, 2007.
295. **Seilicovich A.** Cell life and death in the anterior pituitary gland: role of oestrogens. *J Neuroendocrinol* 22: 758-764, 2010.
296. **Candolfi M, Zaldivar V, Jaita G and Seilicovich A.** Anterior pituitary cell renewal during the estrous cycle. *Front Horm Res* 35: 9-21, 2006.
297. **McNicol AM and Carbajo-Perez E.** Aspects of anterior pituitary growth, with special reference to corticotrophs. *Pituitary* 1: 257-268, 1999.
298. **Donangelo I, Gutman S, Horvath E, Kovacs K, Wawrowsky K, Mount M and Melmed S.** Pituitary tumor transforming gene overexpression facilitates pituitary tumor development. *Endocrinology* 147: 4781-4791, 2006.
299. **Vankelecom H and Chen J.** Pituitary stem cells: where do we stand? *Mol Cell Endocrinol* 385: 2-17, 2014.



- 
300. **Nassiri F, Cusimano M, Zuccato JA, Mohammed S, Rotondo F, Horvath E, Syro LV, Kovacs K and Lloyd RV.** Pituitary stem cells: candidates and implications. *Pituitary* 16: 413-418, 2013.
  301. **Dang L, Fan X, Chaudhry A, Wang M, Gaiano N and Eberhart CG.** Notch3 signaling initiates choroid plexus tumor formation. *Oncogene* 25: 487-491, 2006.
  302. **Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML and Artavanis-Tsakonas S.** Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6414-6418, 1995.
  303. **Choi JH, Park JT, Davidson B, Morin PJ, Shih I and Wang TL.** Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion. *Cancer Res* 68: 5716-5723, 2008.
  304. **Giancotti FG and Ruoslahti E.** Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999.
  305. **Giancotti FG.** Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* 155: 750-764, 2013.
  306. **Sjolund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT and Axelson H.** The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *Eur J Cancer* 41: 2620-2629, 2005.

## ANEXO

A continuación se muestran los genes de interés que pertenecen al Sistema Notch, seleccionados de lo 27000 genes utilizados en las comparaciones transcriptómicas que fueron realizadas en colaboración con el Dr. Santiago Rodríguez Seguí, que no se analizaron en el Capítulo III.

Componente	gene_id	Gen	Muestra	valor Hf. Control	valor Adenoma	log2(fold change)	test_stat	q_value	significativo	# de Regiones Activas p/ Notch
Receptor	XLOC_023761	<b>NOTCH1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	9,2	3,3	-1,49598	-2,56207	<b>0,02256</b>	yes	0
Receptor	XLOC_001804	<b>NOTCH2</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	6,4	3,1	-1,04867	-1,48455	0,16136	no	2
Receptor	XLOC_011668	<b>NOTCH3</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	14,0	27,6	0,97351	1,7476	0,11368	no	0
Ligand	XLOC_019693	<b>DLL1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	7,2	2,6	-1,48625	-1,98016	0,06156	no	0
Ligand	XLOC_011106	<b>DLL3</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	3,3	2,6	-0,350554	-0,36275	0,80202	no	0
Ligand	XLOC_007287	<b>DLL4</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	6,2	3,6	-0,80256	-1,1492	0,3073	no	0
Ligand	XLOC_014077	<b>JAG1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	8,2	10,2	0,315787	0,530975	0,67883	no	0
Ligand	XLOC_007178	<b>JAG2</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	43,5	16,7	-1,37903	-2,39894	<b>0,02635</b>	yes	0
Target	XLOC_018951	<b>HEY2</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	4,8	3,2	-0,596839	-0,75214	0,52422	no	0
Target	XLOC_015808	<b>HES1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	16,4	15,1	-0,119999	-0,21564	0,88148	no	0
Target	XLOC_001507	<b>HEYL</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	60,5086	6,08777	-3,31315	-4,47262	<b>0,00118</b>	yes	0
Target suppressor	XLOC_001013	<b>BTG2</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	258,3	10,1	-4,67488	-5,66212	<b>0,00118</b>	yes	3
Target suppressor	XLOC_008821	<b>CNOT1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	26,8	28,0	0,0633431	0,097187	0,94717	no	2
Target suppressor	XLOC_004992	<b>NR4A1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	1075,3	10,3	-6,71153	-6,1553	<b>0,02635</b>	yes	4
Target suppressor	XLOC_011102	<b>ZFP36</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	249,4	19,8	-3,65782	-3,42104	<b>0,02564</b>	yes	1
Target suppressor	XLOC_004434	<b>MEN1</b>	Adenoma_ACTH_2_Silente	22,5	12,9	-0,802112	-1,43729	0,18842	no	2

Tabla 11: Comparación Nro 2 Hipófisis Control (6 muestras) vs Adrenocorticotropinoma no secretante. Se muestran los genes de interés que pertenecen al Sistema Notch, como ligandos, receptores o efectores río abajo. En la tabla aparecen los valores “q”, que indican cuando la diferencia de expresión en entre ambos transcriptomas es significativa (q<0.05; en rojo).

Componente	gene_id	Gen	Muestra 1	Muestra 2	valor Adenoma ACTH	valor Adenoma silente	log2(fold change)	test_stat	q_value	significativo	# de Regiones Activas p/ Notch
Receptor	XLOC_023761	<b>NOTCH1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	19,3578	3,27827	-2,56191	-4,57268	0,00118	yes	0
Receptor	XLOC_001804	<b>NOTCH2</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	<b>38,10</b>	3,11	-3,61656	-5,97639	<b>0,00118</b>	yes	2
Receptor	XLOC_011668	<b>NOTCH3</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	71,2364	27,5744	-1,36928	-2,19755	0,10499	no	0
Ligand	XLOC_019693	<b>DLL1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	2,03405	2,57702	0,341345	0,397161	0,82303	no	0
Ligand	XLOC_011106	<b>DLL3</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	0,49473	2,57199	2,37817	2,29325	0,12662	no	0
Ligand	XLOC_007287	<b>DLL4</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	6,23E+00	3,56E+00	-0,807547	-1,1915	0,42389	no	0
Ligand	XLOC_014077	<b>JAG1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	33,9472	10,2396	-1,72913	-3,23371	0,01571	yes	0
Ligand	XLOC_007178	<b>JAG2</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	4,23118	16,7232	1,98272	3,37866	0,01474	yes	0
Target	XLOC_018951	<b>HEY2</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	2,20453	3,18943	0,532824	0,610195	0,7188	no	0
Target	XLOC_015808	<b>HES1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	27,44	15,07	-0,86449	-1,62731	0,23973	no	0
Target	XLOC_001507	<b>HEYL</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si							0
Target suppressor	XLOC_001013	<b>BTG2</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	47,19	10,11	-2,2225	-3,90937	<b>0,00284</b>	yes	3
Target suppressor	XLOC_008821	<b>CNOT1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	27,6924	27,9607	0,0139068	0,023037	0,99032	no	2
Target suppressor	XLOC_004992	<b>NR4A1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	232,59	10,26	-4,50261	-6,7742	<b>0,00118</b>	yes	4
Target suppressor	XLOC_011102	<b>ZFP36</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	444,122	19,7572	-4,4905	-6,979	0,00118	yes	1
Target suppressor	XLOC_004434	<b>MEN1</b>	Aden_ACTH-secr	Adenoma_ACTH_2_Si	14,9382	12,9178	-0,209651	-0,36318	0,84698	no	2

Tabla 12: Comparación Nro 4. Adrenocorticotropinoma secretante (1 muestra) vs Adrenocorticotropinoma no secretante (1 muestra). Se muestran los genes de interés que pertenecen al Sistema Notch, como ligandos, receptores o efectores río abajo. En la tabla aparecen los valores “q”, que indican cuando la diferencia de expresión en entre ambos transcriptomas es significativa (q<0.05; en rojo).

Componente	gene_id	Gen	Muestra 1	Muestra 2	valor Adenoma ACTH	valor Adenoma PRL-GH	log2(fold change)	test_stat	q_value	significativo	# de Regiones Activas p/ Notch
Receptor	XLOC_023761	NOTCH1	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	19,3578	0,950821	-4,3476	-6,25388	0,00118	yes	0
Receptor	XLOC_001804	NOTCH2	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	38,10	0,43	-6,48277	-7,99174	0,00118	yes	2
Receptor	XLOC_011668	NOTCH3	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	71,2364	5,97434	-3,57576	-5,81166	0,00118	yes	0
Ligand	XLOC_019693	DLL1	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	2,03405	1,23212	-0,723219	-0,79711	0,60769	no	0
Ligand	XLOC_011106	DLL3	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	0,49473	2,8174	2,50965	2,38308	0,11171	no	0
Ligand	XLOC_007287	DLL4	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	6,22716	2,15E+00	-1,53307	-2,11361	0,14339	no	0
Ligand	XLOC_014077	JAG1	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	33,9472	5,43448	-2,64308	-4,69533	0,00118	yes	0
Ligand	XLOC_007178	JAG2	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	4,23118	8,82688	1,06084	1,77818	0,20429	no	0
Target	XLOC_018951	HEY2	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	2,20453	0,617613	-1,8357	-1,82475	0,19445	no	0
Target	XLOC_001507	HEYL	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	27,44	4,62	-2,56958	-4,31972	0,00118	yes	0
Target suppressor	XLOC_001013	BTG2	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	47,19	10,35	-2,18919	-3,85112	0,00628	yes	3
Target suppressor	XLOC_008821	CNOT1	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	27,6924	21,5912	-0,359046	-0,60392	0,70814	no	2
Target suppressor	XLOC_004992	NR4A1	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	232,59	17,54	-3,72933	-5,88913	0,00118	yes	4
Target suppressor	XLOC_011102	ZFP36	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	444,122	34,0025	-3,70724	-5,95334	0,00118	yes	1
Target suppressor	XLOC_004434	MEN1	Adenoma_ACTH	Adenoma_PRL_GH	14,9382	18,6717	0,321844	0,570303	0,74797	no	2

Tabla 13: Comparación Nro 5. Adrenocorticotropinoma secretante (1 muestra) vs Adenoma secretante de Prolactina-GH (1 muestra). Se muestran los genes de interés que pertenecen al Sistema Notch, como ligandos, receptores o efectores río abajo. En la tabla aparecen los valores “q”, que indican cuando la diferencia de expresión en entre ambos transcriptomas es significativa (q<0.05; en rojo).

Componente	gene_id	Gen	Muestra 1	Muestra 2	valor Adenoma ACTHsil	valor Adenoma PRL-GH	log2(fold change)	test_stat	q_value	significativo	# de Regiones Activas p/ Notch
Receptor	XLOC_023761	NOTCH1	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	3,3	1,0	-1,78569	-2,5195	0,07676	no	0
Receptor	XLOC_001804	NOTCH2	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	3,106	0,426	-2,86621	-3,60599	0,01204	yes	2
Receptor	XLOC_011668	NOTCH3	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	27,6	6,0	-2,20648	-4,03828	0,00208	yes	0
Ligand	XLOC_019693	DLL1	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	2,6	1,2	-1,06456	-1,201	0,39077	no	0
Ligand	XLOC_011106	DLL3	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	2,6	2,8	0,131482	0,142124	0,94148	no	0
Ligand	XLOC_007287	DLL4	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	3,6	2,2	-0,725519	-0,94768	0,54788	no	0
Ligand	XLOC_014077	JAG1	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	10,2	5,4	-0,913943	-1,63495	0,26452	no	0
Ligand	XLOC_007178	JAG2	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	16,7	8,8	-0,921876	-1,71377	0,21048	no	0
Target	XLOC_018951	HEY2	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	3,2	0,6	-2,36852	-2,4652	0,08077	no	0
Target	XLOC_001507	HEYL	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	15,070	4,622	-1,70509	-2,8895	0,03298	yes	0
Target suppressor	XLOC_001013	BTG2	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	10,111	10,347	0,0333135	0,054306	0,9774	no	3
Target suppressor	XLOC_008821	CNOT1	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	28,0	21,6	-0,372953	-0,61078	0,69889	no	2
Target suppressor	XLOC_004992	NR4A1	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	10,2606	17,5371	0,773287	1,24355	0,41825	no	4
Target suppressor	XLOC_011102	ZFP36	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	19,8	34,0	0,78326	1,39429	0,3385	no	1
Target suppressor	XLOC_004434	MEN1	Aden_ACTH Silente	Adenoma_PRL_GH	12,9	18,7	0,531495	0,949951	0,54329	no	2

Tabla 14: Comparación Nro 6. Adrenocorticotropinoma no secretante (1 muestra) vs Adenoma secretante de Prolactina-GH Se muestran los genes de interés que pertenecen al Sistema Notch, como ligandos, receptores o efectores río abajo. En la tabla aparecen los valores “q”, que indican cuando la diferencia de expresión en entre ambos transcriptomas es significativa (q<0.05; en rojo).

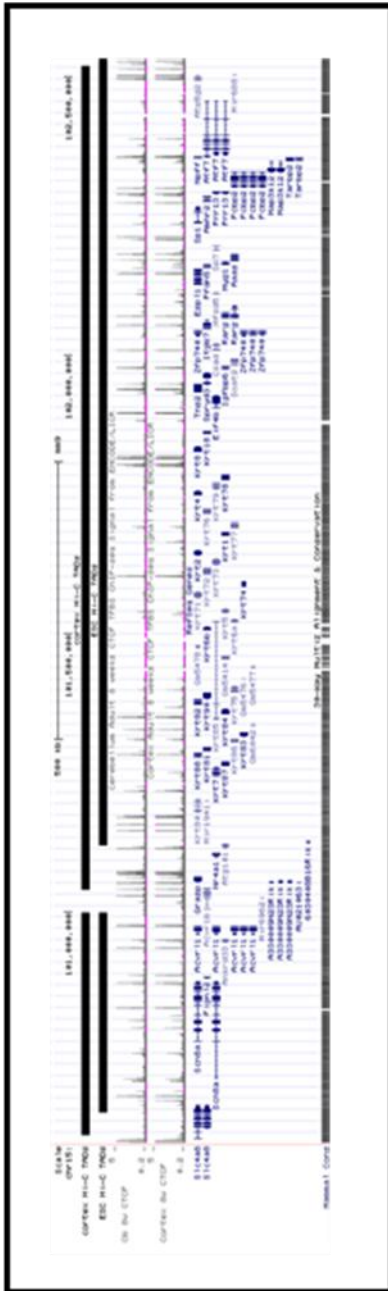


Figura 34: TAD con *enhancers* potenciales de NR4A1. Este TAD ha sido reportado en otro trabajo para tejido cerebral (247).

Muestra	Organismo de origen	Conjunto de datos	Total de lecturas	Lecturas alineadas de manera única	Longitud de la lectura (pb)	Número de picos (p valor 1E-5)	Números de acceso	Fuente
<i>Células GC hipofisarias</i>	Rattus norvegicus	H3K4me1	7.567.759	5.603.985	36	49.215	SRR1302420	Sequence Read Archive (SRA), ncbi
	Rattus norvegicus	H3K27ac	15.795.966	10.451.621	36	70.351	SRR1302421	Sequence Read Archive (SRA), ncbi
	Rattus norvegicus	Pit1	16.991.081	12.235.856	42	18956 (p value 1E-10)	SRR1302417	Sequence Read Archive (SRA), ncbi
<i>T cell acute lymphocytic leukemia</i>	Mus musculus	Notch1	NA*	NA*	NA*	49.728	GSE61504	Gene Expression Omnibus (GEO), ncbi

Tabla 15: Alineación y detalles de pico para los datos de CHIP-seq utilizados en esta Tesis Doctoral Capítulo III.