



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

***Participación de la calicreína tisular (KLK1) en
la función hipofisaria y el desarrollo de
prolactinomas***

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Alejandra Inés Abeledo Machado

Directora de tesis: Dra. Graciela Díaz-Torga
Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-
CONICET).

Buenos Aires, 2022

Participación de la caliceína tisular (KLK1) en la función hipofisaria y el desarrollo de prolactinomas

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más frecuentes y se caracterizan por una hiperplasia e hipertrofia de lactotropos, acompañada de una marcada hiperprolactinemia. Entre un 15-20% de pacientes no responden a la terapia actual con agonistas dopaminérgicos y son considerados prolactinomas resistentes (DARPs, por sus siglas en inglés). El tratamiento de este tipo de tumores sigue representando un desafío para los endocrinólogos ya que actualmente no existen terapias farmacológicas alternativas a los agonistas dopaminérgicos. En nuestro laboratorio estudiamos diferentes sistemas inhibitorios intrahipofisarios en búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

Se ha descrito que caliceína tisular (KLK1) activa TGF β 1, un potente inhibidor de la síntesis y secreción de PRL, en determinados tejidos. Dicha proteasa es conocida por clivar al quininógeno produciendo quininas, los péptidos bioactivos del sistema, que actúan sobre receptores específicos de 7 pasos transmembrana; B1R y B2R. Recientemente se encontró que el B2R se encuentra sobreexpresado (unas 20 veces) en prolactinomas humanos respecto a hipófisis normales. Se ha descrito que B2R y el receptor de dopamina tipo 2 (D2R) pueden formar un heterodímero funcional y que la activación de B2R en el heterodímero anula la cascada de señalización de D2R. Si bien el sistema caliceína-quininas (KKS) es muy conocido por su función en el sistema vascular, su función en hipófisis es desconocida.

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar al sistema KKS hipofisario y su participación en el control de la función normal y patológica (prolactinoma) del lactotrofo. El estudio se llevó a cabo en dos modelos animales de prolactinoma: 1) ratones deficientes del receptor dopaminérgico D2 (Drd2 $^{-/-}$); y; 2) ratones que sobreexpresan la subunidad β de gonadotrofina coriónica humana (hCG β).

Demostramos que:

1- Los diversos componentes del KKS se expresan localmente en la hipófisis (quininasas I y II, receptores de bradiquinina, B1R y B2R) y su expresión se altera con el desarrollo de un prolactinoma.

2- Existe una marcada diferencia sexual en la expresión de dichos componentes (mayor en machos respecto de las hembras).

3- Los principales factores regulatorios del lactotrofo (DA y estradiol) también regulan la expresión génica de los componentes de KKS: DA regula positivamente la expresión de KLK1 y BRs, principalmente en hembras, mientras que estradiol inhibe la expresión génica de KLK1 y B2R en ambos sexos.

4- KLK1 induce la liberación de PRL en ambos sexos.

5- La activación de B1R y B2R con agonistas específicos induce una liberación de PRL en los machos, pero una inhibición de la secreción de PRL en las hembras de forma dosis-dependiente.

6- La formación del heterodímero D2R/B2R por la metodología de NanoBiT® en HEK 293T transfectadas transcientemente (con ambos receptores) y validamos la funcionalidad de B2R mediante el reclutamiento de proteínas G α (principalmente Gq y en menor medida Gi).

7- En células co-transfectadas con B2R y D2R humano, la activación del B2R promueve la movilización de calcio intracelular y su respuesta no se ve alterada en el heterómero B2R/D2R.

8- Finalmente, mediante la técnica AlphaLiSA validamos la interacción de B2R y D2R en prolactinomas humanos y en adenomas no funcionantes humanos.

En el presente trabajo caracterizamos por primera vez al sistema KLK1-quininas hipofisario, encontramos importantes diferencias sexuales en su expresión y alteraciones del sistema con la formación de prolactinomas. Validamos la interacción de B2R/D2R en prolactinomas humanos y encontramos que también interactúan en adenomas hipofisarios no funcionantes. Estos resultados en su conjunto demuestran un rol importante del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de PRL, posicionando al sistema como un modulador intra-hipofisario sexualmente dimórfico con una potencial participación en el desarrollo de prolactinomas.

Palabras claves: Hipófisis, Prolactinoma, B1R, B2R, KLK1, TGF β 1

Involvement of tissue kallikrein (KLK1) in pituitary function and prolactinoma development

Prolactinomas are prolactin-secreting adenomas that can be effectively treated with dopamine D2 receptors (D2R) agonists. Nevertheless, a subset of prolactinomas (between 15 and 20%, known as dopamine agonist-resistant prolactinomas: DARPs) do not respond to the treatment. These tumors represent a major challenge for clinical management due to alternative therapies are not yet available. The long-term objective of our laboratory is to develop new treatments for patients with DARPs. We principally study the intra-pituitary inhibitory systems on lactotroph function.

It has been described that tissue kallikrein (KLK1) activates latent TGF β 1, a potent inhibitor of lactotroph cell proliferation and prolactin (PRL) secretion, in specific tissues. The main function of KLK1 is the proteolytic cleavage of kininogen to release kinins: Bradykinin and Kallidin, which exert their effect through their receptors B1R and B2R. Recently, B2R protein expression was found to be strongly increased (~20-fold increase) in human prolactinomas compared to normal pituitaries. Moreover, in HEK293 cell line it was demonstrated that D2R can heteromerize with B2R. The specific B2R-stimulation abolishes the downstream signal of D2R. Although the kallikrein-quinin system (KKS) has been associated with cardiovascular regulation, very little is known about the function of KKS in the pituitary gland and its involvement in prolactinoma development.

The main goals of this thesis are to characterize the pituitary KKS and to elucidate its participation, if any, in the control of lactotroph function in normal and tumoral pituitaries. This study was carried out in two animal models of prolactinoma: 1) mice lacking functional D2R (Drd2 $^{-/-}$); and 2) mice overexpressing the β -subunit of human chorionic gonadotrophin hormone (hCG β).

We demonstrated that:

- 1- The components of KKS are expressed in the pituitary (kininases I and II, BRs, KLK1) and its expression is altered in prolactinomas.
- 2- There are important gender differences in the expression of KKS components, being higher in male pituitaries than in females.
- 3- Dopamine and estradiol, the main factors controlling lactotroph function, regulate the expression of KKS components. DA has a positive regulation of KLK1

and BRs gene expression, principally in female pituitaries. While estradiol inhibits KLK1 and B2R expression in both genders.

4- KLK1 induces PRL secretion in both males and females.

5- The specific activation of B1R or B2R with selective agonists, induces PRL secretion in males. On the contrary, it exerts a dose-dependent inhibition of PRL secretion in females.

6- We also demonstrated the D2R/B2R complex formation in HEK 293T transiently transfected (with both human receptors) by using a NanoBiT[®] protein-protein interaction assay, and we validated the functionality of B2R by G α recruitment (mainly Gq and to a lesser extent Gi).

7- In HEK 293T transiently transfected with human B2R and D2R, the B2R activation induced intracellular calcium mobilization. This response was not altered in B2R/D2R complexes.

8- Finally, we demonstrated, using the AlphaLiSA assay, the B2R/D2R interaction in human prolactinomas and in non-functioning human pituitary adenomas.

Summarizing, we characterized, for the first time, the KLK1-kinins system in the pituitary gland, describing important gender differences in the expression of its components and in the impact on PRL secretion. We also described alterations of KKS in experimental prolactinomas. We validated B2R/D2R interaction in human prolactinomas and human non-functioning pituitary adenomas. These results show a gender-specific function of KKS in the control of PRL secretion and suggest a potential role of this system in prolactinoma development.

Key words: Pituitary, Prolactinoma, B1R, B2R, KLK1, TGF β 1

*"Sacar belleza de este caos
es virtud"*

Los resultados de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

“Gender-specific regulation of prolactin secretion by pituitary bradykinin receptors”. Abeledo-Machado A, Peña Zanoni M, Bornancini D, Camilletti MA, Faraoni EY, Marcial A, Rulli SB, Alhenc-Gelas F, Diaz-Torga G. **Endocrinology**, en2022-00253.R1 (en revisión).

“Impact of Dopamine D2 and Bradykinin B2 receptors interaction. Preliminary study in human pituitary adenomas”. Alejandra Abeledo Machado, Josep Argerich Bergadà, Milagros Peña Zanoni, Dana Bornancini, Noemi Vidal, Clàudia Garcia, Mariela Gironacci4 Francisco Ciruela Alférez and Graciela Díaz-Torga. **Manuscrito en preparación**

Y han recibido los siguientes premios:

1er Premio poster área ENDOCRINOLOGIA, SAIC 2019: *“The kallikrein-Kinin System in the pituitary gland is involved in lactotroph function and controlled by dopamine and estradiol”*. Alejandra Abeledo-Machado, María Andrea Camilletti, Milagros Peña and Graciela Díaz-Torga. Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Noviembre 2019.

Premio mejor trabajo Sesión Endocrinología: *“Impact of physical and functional interaction of Dopamine D2 and Bradykinin B2 receptors. Preliminary study in human pituitary adenomas”*. Alejandra I. Abeledo Machado, Josep Argerich Bergadà, Noemi Vidal, Clàudia Garcia, Mariela M. Gironacci, Francisco Ciruela Alférez and Graciela Díaz-Torga. Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Noviembre 2021.

Abreviaturas utilizadas

AC	Adenilato ciclasa
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AMPc	Adenosín Monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
B1R	Receptor de quininas B1
B2R	Receptor de quininas B2
BSA	Seroalbúmina bovina
cpm	Cuentas por millón
CPM	Carboxipeptidasa de membrana
CPN	Carboxipeptidasa nuclear
ct	ciclo umbral
D2R, Drd2	Receptor de dopamina D2
DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DARP	Prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E2	Estradiol
EA	Albúmina de huevo
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
g	Gramos
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
hCGβ	Subunidad β de la gonadotropina coriónica humana
HMWK	Quininógeno de alto peso molecular
HRP	Peroxidasa de rabanito
hs	Horas
IgG	Inmunoglobulina gamma
ip	Intraperitoneal
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramo
KKS	Sistema KLK1-quininas
KLK1	Calicreína tisular
KO	Knockout
LAP	Péptido de latencia

LMWK	Quininógeno de alto bajo molecular
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
ng	Nanogramo
NIH	Instituto nacional de la salud de los Estados Unidos
NRS	Suero normal de conejo
NS	No significativo
OVX	Ovariectomía
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBS-T	PBS con <i>Tween</i> 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRL	Prolactina
RIA	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Real Time PCR
sc	Subcutáneo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante β1
TH	Tirosina Hidroxilasa
THDA	Neuronas tuberohipofisarias dopaminérgicas
TIDA	Neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas
TLCK	Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride
TMB	3, 3',5 ,5'-Tetrametilbencidina
TPCK	Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone
u.a.	Unidades arbitrarias
vs	Versus
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild-type</i>
ZPCK	N-Benzyloxycarbonyl-Lphenylalaninylchloromethyl ketone
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar

ÍNDICE

Introducción General	13
Sistema endócrino	14
Eje hipotálamo-hipofisario	14
Irrigación sanguínea: sistema porta hipotálamo-hipofisario	17
Prolactina	18
Regulación de la secreción de prolactina	20
Patrones de secreción de PRL	24
Adenomas hipofisarios	25
Prolactinomas	26
Tratamientos actuales para hiperprolactinemia	27
Prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (DARPs)	28
Factor de crecimiento transformante β 1. Relevancia terapéutica	30
Caliceína tisular (KLK1) y sistema KLK1-quininas	32
Modelos experimentales de prolactinomas	33
Hipótesis y objetivos	35
Hipótesis	36
Objetivo general	36
Objetivos específicos	36
Materiales y métodos	37
Modelos animales	38
Ratones knock out para el receptor dopaminérgico D2 (Drd2KO)	38
Ratones que sobre-expresan la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (hCG β +)	39
Experimentos in vivo	41
Tratamiento agudo con drogas dopaminérgicas	41
Tratamiento agudo con estradiol	41
Ovariectomía	41
Metodologías generales	42
Marcación de la hormona prolactina	42
Radioinmunoensayo (RIA)	43
RIA prolactina	43
ELISA para la determinación de prolactina en medios condicionados	45
Extracción de proteínas	45
ELISA para la determinación de TGF β 1 activo	46
Inmunomarcación	47
Extracción de ARN	48
Retrotranscripción (RT)	49
Diseño de primers	49
PCR cuantitativa en tiempo real	50
Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa	51
Análisis estadístico	51

Capítulo 1: Caracterización del sistema <i>KLK1</i>-Quininas hipofisario	53
Introducción capítulo 1	54
Caliceínas	54
Sistema caliceína tisular-quininas (KKS)	58
Objetivos capítulo 1	62
Objetivos específicos	62
Resultados capítulo 1	63
Dimorfismo sexual en el desarrollo de prolactinomas en dos modelos animales: ratones <i>Drd2</i> KO y ratones <i>hCGβ+</i>	63
Caracterización del Sistema <i>KLK1</i> -quininas en hipófisis normales y tumorales (prolactinoma)	65
Regulación de dopamina y estradiol sobre el sistema <i>KLK1</i> -quininas	76
Conclusiones capítulo 1	81
Discusión capítulo 1	82
Capítulo 2: Impacto del sistema <i>KLK1</i>-Quininas hipofisario en el control de la secreción de prolactina	86
Introducción capítulo 2	87
<i>KLK1</i> como activador de <i>TGFβ1</i>	87
B2R en adenomas hipofisarios	88
Objetivos capítulo 2	89
Objetivos específicos	89
Experimentos ex vivo	90
Ensayos ex vivo con <i>KLK1</i>	90
Ensayos ex vivo con el agonista y antagonista específico de B2R	90
Ensayos ex vivo con el agonista específico de B1R	91
Resultados capítulo 2	93
Participación de <i>KLK1</i> en el control de la secreción de PRL	93
Participación de los BRs en el control de la secreción de PRL	94
Activación selectiva de B1R y su impacto en la liberación de PRL	95
Activación selectiva de B2R y su impacto en la liberación de PRL	96
Conclusiones capítulo 2	99
Discusión capítulo 2	100
Capítulo 3: Interacción entre B2R y D2R. Impacto en la fisiopatología hipofisaria	106
Introducción capítulo 3	107
Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)	107
Dimerización de GPCRs	108
La dimerización modula la afinidad por ligandos y la eficacia intrínseca de los receptores	109
Receptores de dopamina	109
Dopamina en hipófisis	110
Receptores de quininas: B1R y B2R	111
Heterodimerización B2R-D2R	112
B2R y D2R en prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas	113

Objetivos capítulo 3	114
Objetivos específicos	114
Células HEK293	115
Clonado molecular	115
Transfección celular	120
Ensayos de Nano Binary Technology: NanoBiT®. Estudio de la interacción entre receptores	120
Ensayos de NanoBiT®: validación de la funcionalidad de los receptores	121
Determinación de la movilización de calcio intracelular	121
Adenomas hipofisarios humanos	122
Procesamiento de las muestras para AlphaLISA	122
AlphaLISA	123
Resultados capítulo 3	124
Validación de la interacción entre B2R y D2R medida por NanoBiT	124
Funcionalidad de B2R: capacidad de reclutar proteínas G α	126
Interacción entre B2R y D2R en adenomas hipofisarios humanos	131
Conclusiones capítulo 3	133
Discusión capítulo 3	134
<i>Discusión general</i>	141
Conclusiones generales	147
<i>Referencias bibliográficas</i>	148

Introducción General

Sistema endócrino

El sistema endócrino cumple un rol indispensable en el mantenimiento de la homeostasis, la coordinación del crecimiento y en el desarrollo corporal. Al igual que el sistema nervioso, el sistema endócrino transmite información a diversas células y órganos periféricos. Las hormonas que se vuelcan al torrente sanguíneo viajan hasta las células o tejidos blanco ejerciendo así una función endocrina. Además, dentro de un tejido, efectores que viajan a través de la matriz extracelular pueden ejercer una función paracrina (si actúa sobre un tipo celular distinto al que lo secretó) o autocrina (si es reconocido por el mismo tipo celular que lo secretó). Si bien la respuesta del sistema endócrino es lenta respecto a la transmisión del impulso nervioso, debido a su mecanismo de acción, ésta perdura en el tiempo.

Eje hipotálamo-hipofisario

La glándula hipofisaria o hipófisis es una de las glándulas maestras del sistema endócrino dado que controla la función de numerosas glándulas endócrinas involucradas en la regulación de la reproducción, el metabolismo, el estrés, el crecimiento, etc. Esta glándula pesa aproximadamente 0,5g en el humano adulto y está anatómicamente ubicada en la base del cerebro, en una depresión del hueso esfenoides conocida como silla turca. Está conectada con el hipotálamo a través del infundíbulo y una red vascular que se detallará más adelante. A pesar de su ubicación en la base del cerebro, esta glándula se encuentra fuera de la barrera hemato-encefálica (Lechan & Toni, 2000).

Según el **criterio anatómico** se pueden distinguir dos lóbulos en la hipófisis; el anterior, que es bilobulado, y el posterior. De acuerdo al **criterio histológico** se distinguen 4 sectores; la *pars tuberalis*; la *pars distalis*; la *pars intermedia* y la *pars nervosa* (figura 1). Finalmente, según el **origen embriológico** se puede dividir a la hipófisis en **adenohipófisis** y **neurohipófisis**. La primera se origina de la placoda adeno-hipofisaria (ectodermo) en el techo del estomodeo, anteriormente denominada Bolsa de Rathke. La segunda, deriva del neuroectodermo del piso del diencéfalo.

La adenohipófisis abarca la *pars tuberalis*, la *pars distalis* y la *pars intermedia* (figura 1). Por un lado, la *pars tuberalis* forma parte del tallo hipofisario. Por otro

lado, la *pars distalis* constituye el 80% de la glándula y está constituida por cinco tipos celulares distribuidos en nidos, acúmulos y cordones, separados por capilares fenestrados. Estos tipos celulares se denominan de acuerdo a la hormona que producen: los somatotropos, secretores de hormona de crecimiento (GH); los lactotropos que sintetizan y secretan prolactina (PRL); los corticotropos productores de hormona adrenocorticotrófica (ACTH); los tirotropos, secretores de tirotrófina (TSH); y por último, los gonadotropos que sintetizan hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Además, en la *pars distalis*, se encuentra presente otro tipo celular; las células folículo estrelladas, que producen numerosos factores de crecimiento y citoquinas con funciones autócrinas y parácrinas intrahipofisarias (Lechan & Toni, 2000). Por otro lado, en la *pars intermedia* se encuentran los melanotropos que producen y secretan la hormona melanocitoestimulante (MSH). Finalmente, la *pars intermedia* es rudimentaria en humanos, pero tiene un mayor desarrollo y función en otras especies (Horvath & Kovacs, 2002; Inoue et al., 1999).

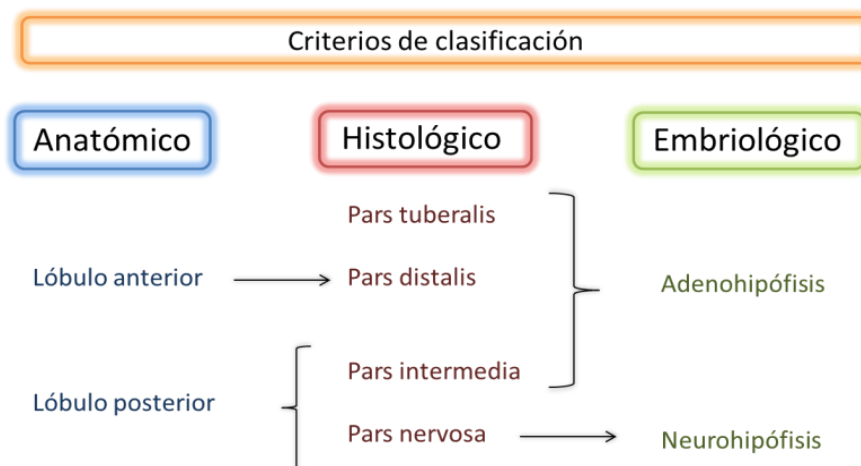


Figura 1: Clasificación de la glándula hipofisaria de acuerdo a tres criterios: anatómico, histológico y embriológico.

A diferencia de la adenohipófisis, **la neurohipófisis** constituye un órgano neurohemal que incluye a la eminencia media, el infundíbulo y la *pars nervosa*. La primera se encuentra en la base del hipotálamo y se continúa en el infundíbulo que, junto con la *pars tuberalis* forman el tallo hipofisario (figura 2). Éste contiene los axones que forman los tractos hipotálamo-hipofisarios y que finalmente terminan en la *pars nervosa*. De este modo, esta última, está constituida por un conjunto de terminales axónicas provenientes de neuronas secretoras cuyos somas se encuentran

en los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo. Dichos núcleos sintetizan, entre otros factores, oxitocina y vasopresina que se almacenan en las terminales axonales asociadas a capilares sanguíneos. Finalmente, las neurohormonas son liberadas al torrente sanguíneo frente a estímulos específicos (Ross & Pawlina, 1966).

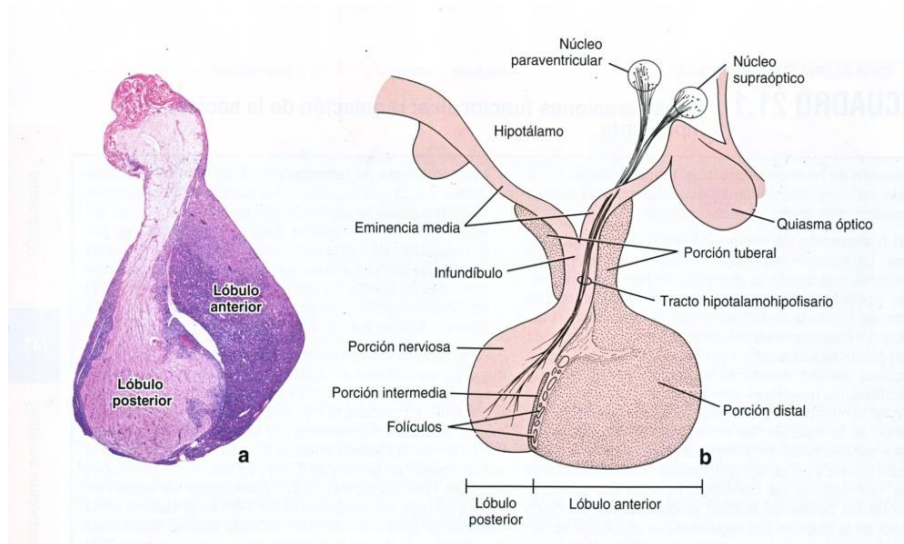


Figura 2: **a.** Corte histológico de la hipófisis humana. Se evidencia la diferencia entre la *pars distalis* del lóbulo anterior y la *pars nerviosa* del lóbulo posterior. **b.** Esquema de la anatomía de la unidad funcional hipotálamo-hipófisis. Imagen tomada de Ross y Pawlina. Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, 6ta Edición.

El hipotálamo está ubicado en la zona central de la base del cerebro, por debajo del tálamo, rodeando la zona ventral del tercer ventrículo. Forma parte del centro neuroendócrino primario de regulación hormonal: las neuronas de los núcleos hipotalámicos secretan neuro-péptidos y otros neurotransmisores que estimulan o inhiben la liberación de hormonas adenohipofisarias. Esta íntima relación entre hipófisis e hipotálamo regula la homeostasis de numerosos sistemas endócrinos. Además, interviene en la regulación de diversas funciones como ser: la tensión arterial, la temperatura corporal, el equilibrio hidroléctrico, el peso corporal y el apetito, entre otras.

Irrigación sanguínea: sistema porta hipotálamo-hipofisario

En humanos, la glándula hipofisaria está irrigada por dos grupos de vasos: por un lado las arterias hipofisarias superiores que irrigan a la *pars tuberalis*, la eminencia media y el tallo infundibular. Dichos vasos son ramas de las arterias carótidas internas y de las arterias comunicantes posteriores del polígono de Willis. Por otro lado, las arterias hipofisarias inferiores irrigan mayormente a la *pars nervosa*. Estos vasos provienen exclusivamente de las arterias carótidas internas (Akmayev & Popov, 1977; Takeuchi et al., 2013).

Además, existe un sistema exclusivo que provee una conexión íntima entre el hipotálamo y la hipófisis, denominado sistema porta hipotálamo-hipofisario (figura 3). A la altura de la eminencia media, las arterias hipofisarias superiores dan origen a una red de capilares fenestrados que drenan en venas denominadas venas porta hipofisarias. Estas venas corren a lo largo de la *pars tuberalis* y originan una segunda red de capilares fenestrados en la *pars distalis* de la adenohipófisis. Numerosas neuronas hipotalámicas vuelcan las neurohormonas al lecho capilar del sistema porta (a la altura de la eminencia media), viajan por las venas porta hipofisarias y llegan a la *pars distalis*. Este sistema porta mantiene una íntima relación entre el hipotálamo y la hipófisis (Grattan, 2015).

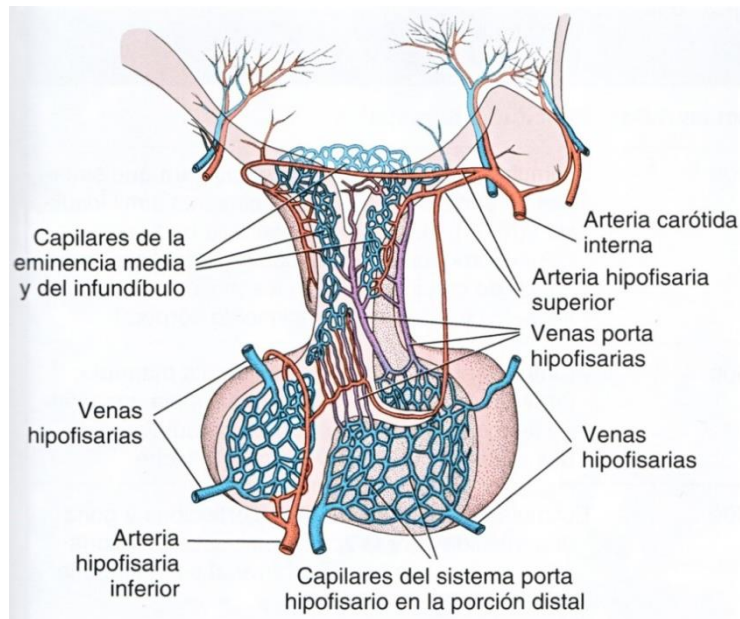


Figura 3: Esquema de la irrigación sanguínea de la glándula hipofisaria. En rojo se representa la sangre arterial y en azul la sangre venosa. La hipófisis está irrigada por las arterias hipofisarias superiores (arteria carótida interna) y por las arterias hipofisarias inferiores. Existe también un sistema porta hipotálamo-hipofisario que comunica al hipotálamo con la hipófisis mediante las venas porta hipofisarias, representadas en violeta. Imagen tomada de Ross y Pawlina. Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, 6ta Edición.

Si bien la circulación de la sangre es en gran parte descendente desde el hipotálamo hacia la hipófisis, existe un sistema porta intrahipofisario que comunica el lóbulo anterior con el posterior. De este modo, hay un flujo desde la *pars distalis* hacia la *pars nervosa* y hacia el hipotálamo, resultando en una vía corta por la cual las hormonas sintetizadas en la adenohipófisis ejercen una retroalimentación directa sobre el hipotálamo, sin pasar por la circulación sistémica (Ross & Pawlina, 1966).

Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica secretada por la adenohipófisis, que fue identificada en 1928 en aves como un factor osmorregulador que estimula la liberación de una secreción del buche, órgano que permite la alimentación de los pichones. La hormona fue descrita posteriormente en otros vertebrados y recibió su nombre debido a la acción de promover la lactancia en mamíferos, como respuesta a estímulos de succión. Hoy en día se conocen numerosas funciones biológicas de la

PRL, no necesariamente relacionadas con la función que le dio nombre. Por ejemplo, participa en el crecimiento y desarrollo, la reproducción, la osmorregulación, la inmunidad y el comportamiento (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000; Goffin et al., 1999; Grattan, 2015).

Como se mencionó anteriormente, **los lactotropos** son las células adenohipofisarias que sintetizan y secretan PRL. Si bien la hipófisis es la principal fuente de PRL endocrina, la hormona también es sintetizada localmente en la mayoría de los tejidos, como por ejemplo en el sistema nervioso central (SNC), en el útero, en la glándula mamaria y por células del sistema inmune. En humanos, la transcripción del gen de PRL está regulada por dos regiones promotoras, siendo una de ellas la responsable de la expresión extra-hipofisaria (Berwaer et al., 1993).

La PRL pertenece a la superfamilia de hormonas peptídicas, y está constituida por una única cadena de aminoácidos. Su estructura contiene tres puentes disulfuro. Existen variantes de la prolactina generadas por distintos mecanismos: *i* - *splicing* alternativo, aunque no son las más abundantes; *ii*- clivaje proteico: formándose variantes de 14-, 16-, y 22-kDa; *iii*- modificaciones post-traduccionales como dimerización (que da lugar a las prolactinas de alto peso molecular: dímeros de baja actividad biológica), polimerización, fosforilación de residuos serina y treonina y glicosilación, entre otras (Freeman et al., 2000).

Estas modificaciones post-traduccionales modifican la actividad biológica y la vida media de la hormona en sangre. Por ejemplo, la glicosilación disminuye la actividad biológica de la hormona, y esta variante es abundante en hembras no preñadas y machos (Freeman et al., 2000).

La PRL es una hormona pleiotrópica, es decir, no posee un órgano blanco bien definido ya que la expresión de sus receptores es ubicua. Se expresan en varios órganos periféricos como ser hipófisis, ovario, glándula mamaria, corazón, pulmón, timo, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, entre otros (Freeman et al., 2000). Además los receptores de PRL se expresan en numerosas regiones del SNC como ser en los plexos coroideos, en la amígdala, en el tálamo, hipotálamo, en el córtex cerebral y en el bulbo olfatorio (DeVito, 1988).

El receptor de prolactina pertenece a la familia de los receptores tirosín-quinasa, siendo receptor de citoquina tipo I. Se caracteriza por poseer un único dominio transmembrana que divide al receptor en dos porciones; un dominio extracelular con un sitio de unión a la prolactina, y un dominio intracelular con un motivo rico en

prolinas (box-1) esencial para la transducción de señales, que se encuentra constitutivamente asociado a la proteína JAK2. En humanos existen tres isoformas del receptor: la larga, la intermedia y la corta; en el resto de las especies se encuentran las isoformas larga y corta. Estas isoformas del receptor difieren en el número de aminoácidos del dominio intracelular, y son productos de *splicing* alternativo. Además de los receptores anclados a membrana, se han descrito receptores solubles o proteínas transportadoras de PRL. Todas las isoformas mencionadas poseen el mismo dominio de unión a la hormona (Freeman et al., 2000; Ignacak et al., 2012).

La unión de la PRL a su receptor induce la dimerización de este. El receptor no posee actividad quinasa endógena, pero la unión del ligando y posterior dimerización desencadena la transactivación de las proteínas JAK2 y, en el caso de la isoforma larga, la activación de la vía Jak-STAT. Las proteínas STAT fosforiladas translocan al núcleo en forma de dímero y activan la expresión de los genes blanco de PRL. Si bien la vía de Jak-STAT5 es la más importante, se han reportado otras vías de transducción de señales activadas por la unión del ligando, por ejemplo, la activación de MAP quinasas (MAPK). También se ha descrito un *cross talk* entre el receptor de PRL y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000; Ignacak et al., 2012).

Regulación de la secreción de prolactina

Como se mencionó anteriormente, la prolactina es sintetizada y secretada en numerosos tejidos, pertenecientes a distintos sistemas, pero nos enfocaremos en la regulación de la secreción de PRL en hipófisis, es decir, en la regulación de la función de los lactotrofos.

La secreción de prolactina hipofisaria está afectada por numerosos estímulos que pueden ser internos o externos. Ambos son integrados por el hipotálamo y en consecuencia se secretan hacia la hipófisis una serie de factores liberadores o inhibidores de la secreción de prolactina. Estos factores llegan a los lactotrofos a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario.

Dado que los lactotrofos presentan una actividad intrínseca de síntesis y secreción constitutiva de PRL, el principal control hipotalámico es inhibitorio, a

través de la **dopamina (DA)** (N Ben-Jonathan & Hnasko, 2001; Bernichtein et al., 2010; Goffin et al., 1999). La DA es un neurotransmisor catecolaminérgico que inhibe la secreción de PRL *in vitro* e *in vivo*. El receptor predominante por el cual la DA ejerce su efecto inhibitorio es el de tipo 2 (D2R o Drd2), expresado en los lactotrofos. A los pocos segundos de la interacción de DA con su receptor, aumenta la conductancia de potasio y se inactivan los canales de calcio dependientes de voltaje. En consecuencia se hiperpolariza la membrana y se inhibe la liberación de prolactina (figura 4). El D2R se acopla a una proteína G inhibitoria y en un lapso de minutos a horas, DA suprime la actividad de la adenilato ciclasa disminuyen los niveles de AMPc y la activación de PKA, inhibiendo de este modo la expresión génica de PRL (N Ben-Jonathan & Hnasko, 2001) (Figura 4).

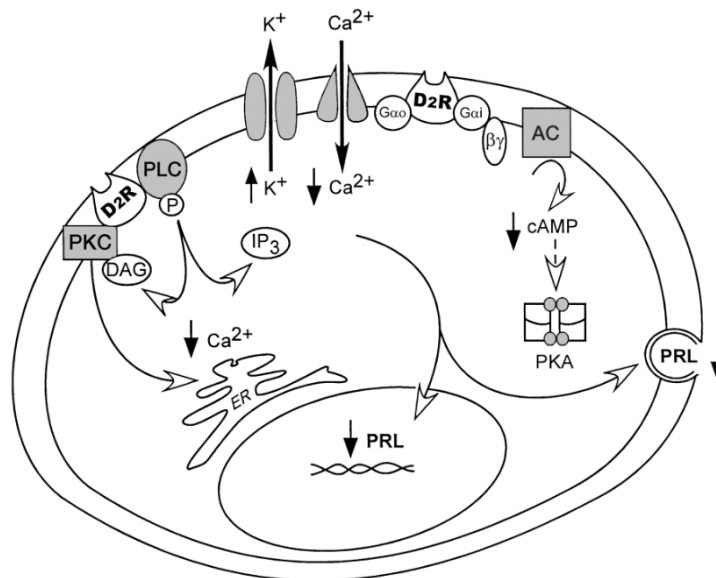


Figura 4: Diagrama de los mecanismos involucrados en la regulación dopaminérgica de la síntesis y secreción de prolactina en células lactotropas. Tomado de (Nira Ben-Jonathan & Hnasko, 2001)

De todas las vías dopaminérgicas del sistema nervioso central, las 2 más importantes involucradas en la regulación del lactotrofo son: la vía tuberoinfundibular dopaminérgica (TIDA) y la vía tuberohipofisario dopaminérgica (THDA) (figura 5). En el sistema TIDA, las neuronas dopaminérgicas presentes en el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal proyectan sus axones hacia la eminencia media, y la DA se libera a la red capilar del sistema porta hipotálamo-hipófisis llegando al lóbulo anterior de la hipófisis (figura 5, vía TIDA en negro). En

el sistema THDA, los somas de las neuronas también se encuentran en el hipotálamo medio basal, pero sus terminales axónicas se encuentran en el lóbulo neurointermedio (que abarca la *pars intermedia* y la *pars nervosa*). Es allí, donde liberan/secretan la dopamina, que a través del sistema porta intrahipofisario (vasos que comunican el lóbulo posterior con el anterior), llega a los lactotrofos y ejerce el efecto inhibitorio (figura 5, vía THDA en verde). Existe un tercer sistema dopaminérgico conocido como el sistema paraventricular hipofisario (PHDA), formado por neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo que proyectan sus axones hacia la *pars intermedia* de la hipófisis. Su función principal es regular la síntesis y secreción de MSH. Sin embargo, la DA liberada podría llegar a la *pars distalis* por difusión y ejercer un efecto sobre los lactotrofos (Goudreau et al., 1992; Holzbauer & Racke, 1985; Peters et al., 1981).

Dentro de los sistemas mencionados, el sistema TIDA es el de mayor importancia e influencia en la inhibición de la actividad del lactotrofo.

A su vez, en las neuronas dopaminérgicas la síntesis de DA es regulada por la actividad de una enzima limitante en su síntesis: la tirosina hidroxilasa (TH) (Freeman et al., 2000).

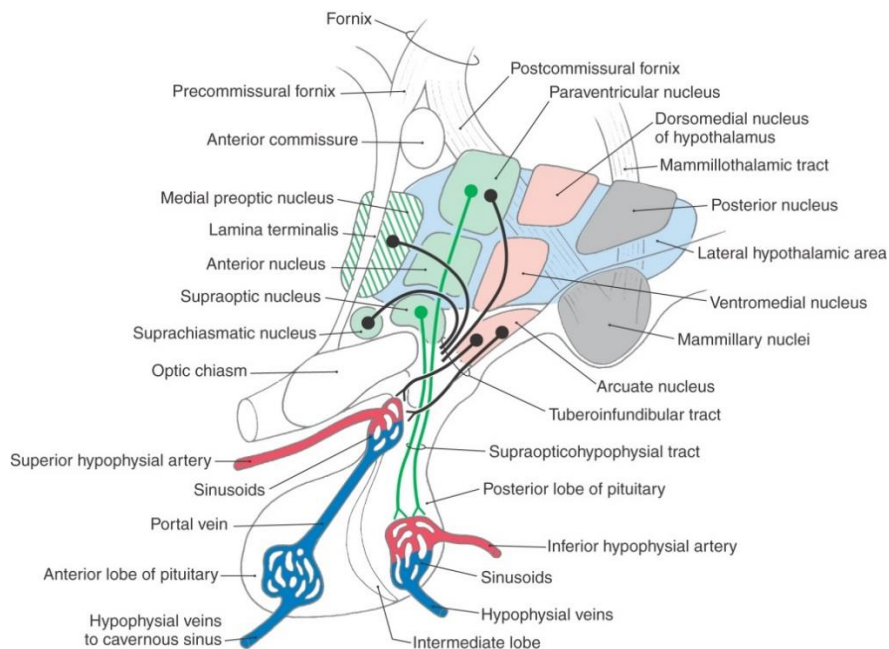


Figura 5: Esquema del eje hipotálamo-hipofisario con los núcleos hipotalámicos (verde, rosa y gris). En negro están representadas las neuronas que descargan su contenido en el sistema porta y en verde las neuronas cuyas terminales nerviosas se encuentran en la neurohipófisis.

Se han descrito factores estimuladores de las neuronas del sistema TIDA, con consecuente inhibición indirecta de la secreción de PRL, como por ejemplo, acetilcolina, oxitocina, vasopresina, angiotensina II, neuropéptido Y, VIP, glutamato, entre otros (DeVito, 1988). Pero también existen factores inhibitorios del sistema TIDA, que, en consecuencia e indirectamente, aumentan la liberación de PRL, como ser serotonina, noradrenalina, galanina, somatostatina, GABA, etc. La mayoría de estos agentes tienen múltiples niveles de acción y en algunos casos ejercen efectos biológicos opuestos si actúan a nivel hipotalámico, o directamente sobre las células hipofisarias.

La PRL, al igual que la DA y otros factores mencionados, también ejerce un efecto regulatorio sobre su propia secreción al actuar sobre las neuronas TIDA, donde altera la expresión y actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (Arbogast & Voogt, 1991). Frente un incremento en los niveles de PRL, la actividad de las neuronas DA aumenta y en consecuencia, la actividad de los lactotrofos disminuye. Aunque las neuronas dopaminérgicas responden a cambios agudos y crónicos, hay situaciones particulares en las cuales estas neuronas se vuelven refractarias a los altos niveles de prolactina y como consecuencia se observa una hiperprolactinemia. Esto ocurre en ciertos procesos fisiológicos como la preñez y lactancia; o patológicos, como por ejemplo durante el desarrollo de prolactinomas (Freeman et al., 2000).

Un incremento en los niveles de la PRL no siempre es debido a una concomitante disminución del tono dopaminérgico. Existen agentes que estimulan la secreción de la hormona directamente en los lactotrofos. Entre ellos se encuentran **los estrógenos**, que son potentes estimuladores de todas las funciones del lactotrofo; favorecen la conversión de somatotrofos a lactotrofos, aumentan la transcripción del gen de PRL, generan una hipertrofia de las células, aumentan los receptores hipotalámicos de otros factores estimuladores, disminuyen la expresión de los receptores de DA, etc. Los estrógenos también tienen un efecto a nivel hipotalámico activando los circuitos involucrados en la estimulación de la secreción de PRL (por ejemplo; serotonina, oxitocina, VIP) e inhibiendo la actividad de los circuitos pertenecientes a los factores inhibitorios de la secreción de PRL (Freeman et al., 2000).

Otro agente hipotalámico importante es el factor liberador de TSH (TRH) que estimula la secreción de PRL en una forma dosis-dependiente. También VIP, secretina y angiotensina II fueron propuestos como factores hipotalámicos estimuladores, actuando directamente sobre los lactotrofos.

Finalmente, también existe una regulación intrahipofisaria: los distintos tipos celulares de la adenohipofisis no solo secretan la hormona que les da nombre, sino que también sintetizan diversos péptidos y factores de crecimiento que de modo paracrino o autocrino regulan la síntesis de PRL o la expresión de diversos receptores en el lactotrofo. Entre los factores sintetizados y secretados en la hipófisis se encuentra **el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)** importante inhibidor de las funciones del lactotrofo, factor que describiremos detalladamente más adelante.

Patrones de secreción de PRL

La secreción de la PRL es pulsátil. Esta pulsatilidad puede verse afectada frente a diversos estímulos externos. Por ejemplo: *i*- la succión: estimula la secreción de prolactina y disminuye la concentración de dopamina en el sistema porta; *ii*- la luz: es sabido que hembras de diferentes especies colocadas en presencia de luz continua interrumpen su ciclo estral; *iii*- la audición y el olfato: en roedores los ultrasonidos emitidos por la crías y el olor de las mismas estimulan la secreción de PRL en la madre; y por último, *iv* - el estrés: que impacta directamente sobre el SNC incluyendo varios núcleos hipotalámicos y extra-hipotalámicos, afectando indirectamente la secreción de PRL (Egli et al., 2010).

Los niveles séricos de PRL también se ven afectados por un componente circadiano, siendo mayor la secreción de PRL durante la noche, concomitante con un aumento en los niveles de melatonina, y disminuyendo su secreción al mediodía. Este ritmo circadiano está regulado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo donde la actividad de las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas y, por lo tanto, los niveles de DA en la eminencia media, incrementan durante el día y disminuyen en la noche. Conjuntamente con la dopamina, la oxitocina también cumple un rol en la regulación del ritmo circadiano de PRL (Tyson et al., 1972).

Adenomas hipofisarios

Los adenomas hipofisarios son neoplasias que se originan a partir de las células endócrinas presentes en la adenohipófisis. Representan aproximadamente entre un 10-20% de todas las neoplasias intracraneales y son la segunda causa más común de tumores primarios cerebrales en humanos (Sylvia L. Asa & Ezzat, 2002; Inomoto et al., 2021).

Si bien la mayor proporción de tumores hipofisarios se origina de forma espontánea por expansión monoclonal de un tipo celular hipofisario, existe aproximadamente un 5% de los adenomas que se originan por mutaciones en la línea germinal, por ejemplo, las mutaciones en el gen de menina están asociadas al desarrollo de la neoplasia endócrina múltiple tipo I (MEN 1) (Klöppel G, Couvelard A, Hruban RH, 2017).

La mayoría de los adenomas hipofisarios son benignos y de crecimiento lento. Sin embargo, algunas lesiones invaden los tejidos circundantes como por ejemplo los senos cavernosos, el parénquima cerebral superior, los huesos inferiores, los senos paranasales y la mucosa nasal. Si bien estos tumores son considerados agresivos por su alta tasa de proliferación y capacidad de invasión en la base del cerebro ocasionando compresión sobre las estructuras circundantes, sólo se definen como verdaderos carcinomas aquellos que presentan metástasis cráneo-espinal y/o sistémica, lo cual se desarrolla en un número muy pequeño de adenomas hipofisarios (aproximadamente 0.2%) (Knosp et al., 1993).

Los tumores hipofisarios pueden clasificarse en funcionantes y no funcionantes de acuerdo con la capacidad de hipersecretar un tipo hormonal (funcionantes) o no (no funcionantes). Los pacientes que tienen adenomas funcionantes presentan un cuadro clínico asociado a una disregulación en la secreción de hormonas (Farrell, 2006), mientras que los pacientes con adenomas no funcionantes manifiestan principalmente síntomas asociados al efecto de masa del tumor que causa daño en los tejidos adyacentes por compresión, como por ejemplo dolores de cabeza y complicaciones visuales (Banskota & Adamson, 2021a).

Por un lado, los adenomas hipofisarios pueden clasificarse según su tamaño tumoral: las lesiones menores o iguales 10mm en diámetro se consideran microadenomas, mientras que las mayores a 10mm son macroadenomas (Arafah & Nasrallah, 2001).

Según la organización mundial de la salud (última actualización en 2017) los adenomas hipofisarios se clasifican de acuerdo con el tipo de hormona que se detecta por inmunohistoquímica en la biopsia del tumor. Además, se recomienda analizar la expresión de distintos factores de transcripción relacionados con el lóbulo anterior como son PIT1, TPIT, SF1/GATA2. De los 11 subtipos de adenomas hipofisarios, solo 5 se consideran agresivos, entre ellos los prolactinomas desarrollados en el sexo masculino (Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, 2017).

De todos los adenomas hipofisarios clínicamente diagnosticados, los prolactinomas son los tumores más comunes y representan entre un 40% y un 66% del total. Los adenomas no funcionantes son el segundo subtipo más común (14% a 43%), seguido de los adenomas hipersecretantes de GH y los adenomas hipersecretantes de ACTH (Banskota & Adamson, 2021a).

Prolactinomas

Como se mencionó anteriormente, los prolactinomas son los adenomas más frecuentemente hallados en la clínica y representan entre un 40-66% de todos los adenomas hipofisarios diagnosticados (Vroonen et al., 2019). Los prolactinomas son neoplasias benignas asociadas a la proliferación desregulada de los lactotrofos que tiene como consecuencia una producción elevada de la hormona prolactina. Por lo tanto, se caracterizan por la hiperplasia e hipertrofia de los lactotrofos, acompañada por una marcada hiperprolactinemia.

El exceso de los niveles séricos de prolactina tiene como consecuencia la inhibición de la liberación de GnRH por parte del hipotálamo y en consecuencia una disminución en la secreción de FSH y LH y la interrupción del ciclo estral. Se ha demostrado que PRL inhibe la expresión de kisspeptina en el núcleo arcuato de roedores. Dado que solo una subpoblación de neuronas GnRH expresan el receptor de PRL, se ha propuesto que la vía PRL/kisspeptina podría participar en los efectos inhibitorios de PRL sobre el eje gonadotrópico (Araujo-Lopes et al., 2014).

La inhibición de GnRH inducida por la hiperprolactinemia disrumpe el eje hipotálamo-hipofisis-gonadal que resulta en la disfunción gonadal. Por esta razón, la sintomatología clínica asociada a la hiperprolactinemia está relacionada principalmente con el hipogonadismo (Wildemberg et al., 2021).

En las mujeres la hiperprolactinemia se manifiesta como galactorrea, desórdenes en el ciclo menstrual debido a la disminución de LH y FSH séricos (oligomenorrea, amenorrea), pubertad retrasada e infertilidad. Esto puede provocar una caída en los niveles circulantes de estrógenos y derivar en osteoporosis (Romijn, 2014). Por otro lado, en los hombres, la hiperprolactinemia se manifiesta como infertilidad, impotencia, disfunción eréctil y/o disminución de la libido (Buvat, 2003; Casanueva et al., 2006; Raut et al., 2019).

Debido a las diferencias sexuales en la sintomatología, las lesiones en las mujeres suelen detectarse como microprolactinomas ya que las alteraciones en el ciclo menstrual llevan a una detección temprana del tumor. En cambio, en los hombres la primera consulta es tardía y basada en síntomas asociados al efecto de masa del tumor que van desde leves dolores de cabeza hasta severos problemas de visión e hipertensión intracraneal (Devuyst et al., 2020), indicando la presencia de un macroprolactinoma.

Existe una marcada diferencia en la incidencia de prolactinomas que depende del sexo y la edad. La incidencia en mujeres respecto de los hombre es de 10 : 1 en el período fértil de la mujer (18 a 50 años) y luego cae 1 : 1 en el período postmenopáusico (Colao, Di Sarno, et al., 2003). Hasta la fecha, las causas de las diferencias sexuales en la incidencia de estos adenomas hipofisarios no están del todo dilucidadas aunque algunos factores han sido propuestos. Un estudio mostró una mayor prevalencia en la expresión del receptor de estrógenos (ER) en un subtipo de prolactinomas (Burdman et al., 2008). Sin embargo, otros estudios retrospectivos fallaron en el intento de establecer una relación entre el uso de anticonceptivos orales a base de estrógenos y la incidencia de prolactinomas (Maheux et al., 1982).

Tratamientos actuales para hiperprolactinemia

Debido a que DA es el principal factor hipotalámico inhibitorio de las funciones del lactotrofo, los agonistas del receptor de dopamina tipo 2 (agonistas dopaminérgicos), representan la primera línea de terapia para los pacientes con prolactinomas. Estos tratamientos farmacológicos tienen como objetivo: *i*-normalizar los valores de prolactina en sangre y revertir el cuadro clínico asociado a la hiperprolactinemia (como por ejemplo infertilidad, falta de libido y disminución de

la densidad ósea), *ii*- reducir el tamaño tumoral, *iii*- preservar la función hipofisaria y *iv*- preservar la función gonadal (Banskota & Adamson, 2021a).

Actualmente la cabergolina y la bromocriptina son los agonistas dopaminérgicos más utilizados en la clínica para el tratamiento de prolactinomas (Tang et al., 2019). Ambos tienen efectos secundarios similares, pero la cabergolina posee una vida media mayor en sangre por lo que se requiere la administración de una dosis menor (0.5-1.5mg/semana para microprolactinomas) que bromocriptina (2-15mg/día para microprolactinomas) (Banskota & Adamson, 2021a). Además, se ha reportado una mayor eficiencia de cabergolina en la normalización de los niveles séricos de PRL y en la reducción del tamaño tumoral, así como una mayor tolerabilidad de los pacientes a esta droga en comparación con bromocriptina (menor frecuencia en la aparición de efectos adversos) (Melmed et al., 2011). Por estas razones, la cabergolina es la primera línea terapéutica para pacientes con hiperprolactinemia.

Prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (DARPs)

Los tratamientos con agonistas dopaminérgicos logran restaurar los niveles de prolactina en aproximadamente un 90% de pacientes con microprolactinomas y un 80% con macroprolactinomas (aprox. 1mg/semana) (Di Sarno et al., 2001; Verhelst et al., 1999). Sin embargo, entre un 15-20% de pacientes no responden a esta terapia. Estos tumores se denominan prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos (DARPs, por sus siglas en inglés).

El tratamiento de este tipo de tumores sigue representando un desafío para los endocrinólogos ya que actualmente no existen terapias farmacológicas alternativas a los agonistas dopaminérgicos. Estas lesiones se tratan con un abordaje multimodal que incluye: *i*- la sustitución o aumento de la dosis de la droga utilizada, aunque en muchos casos no resultan efectivos y los niveles de prolactina no se normalizan completamente (Musolino & Passos, 2005), *ii*- cirugía transeptoefenoidal y/o *iii*- radioterapia. El uso de esta última es todavía un tema de debate entre los médicos endocrinólogos ya que conlleva respuestas lentas y riesgos elevados para el paciente de desarrollar hipopituitarismo, daño en el nervio óptico y efectos neurológicos secundarios (A. Wong et al., 2015).

Los mecanismos moleculares por los cuales los pacientes con prolactinomas escapan a la regulación dopaminérgica inhibitoria no están del todo claros, aunque

algunos autores reportan una disminución en la expresión del D2R en prolactinomas resistentes, alteraciones en el ratio de las isoformas larga y corta del D2R o incluso alteraciones en la cascada de señalización intracelular del D2R, como por ejemplo, el reclutamiento de proteínas G (Gillam et al., 2006; Souteiro & Karavitaki, 2019), o la heterodimerización del D2R con otros GPCRs.

Al respecto, el impacto que genera la homo- o heterodimerización de un receptor tipo GPCRs ha cobrado mucha importancia en las últimas décadas. Este fenómeno da como resultado la modulación de las funciones moleculares del receptor, incluida la afinidad de unión a un ligando, la transducción de señales y su internalización. En el caso de dimerizaciones entre 2 GPCRs diferentes, la activación dada por el agonista específico de uno de los receptores participantes puede suprimir o promover alostéricamente la activación del segundo receptor (Ferré et al., 2014; Kleinau et al., 2016). **Este último punto (impacto de la heterodimerización del D2R) será desarrollado en profundidad en el capítulo 3 de esta tesis.**

En Argentina, uno de los últimos trabajos retrospectivos fue realizado en el año 2010 por la División de Endocrinología del Hospital de Clínicas José de San Martín, analizando datos recuperados de 847 pacientes con lesiones del área hipotálamo-hipofisaria desde el año 2001 hasta el 2009. El 19% de los adenomas hipofisarios fueron diagnosticados como prolactinomas, y, dentro de ese grupo, el 15% de los pacientes con prolactinoma no logró normalizar los niveles de prolactina o reducir el tamaño tumoral con las terapias clásicas (con agonistas dopaminérgicos). Este grupo tuvo que ser sometido a cirugía, en algunos casos acompañada por radioterapia (Albiero et al., 2010). Estos porcentajes son semejantes a los reportados en estudios retrospectivos a nivel mundial (Oh & Aghi, 2011; Vasilev et al., 2011; Vroonen et al., 2019). Un trabajo local más reciente confirma el porcentaje de resistencia a agonistas dopaminérgicos en pacientes con prolactinomas (Gonzalez Pernas et al., 2019).

Es indispensable encontrar terapias alternativas para pacientes con DARPs que evite la cirugía transesfenoidal o intracraneal, con los riesgos que las mismas implican y los altos costos para los sistemas de salud. Por esta razón es de primera necesidad la elucidación de los mecanismos subyacentes al desarrollo de esta patología y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

Factor de crecimiento transformante $\beta 1$. Relevancia terapéutica

Además de los factores extra-hipofisarios que regulan la síntesis y secreción de PRL que han sido ampliamente estudiados y detallados en el apartado “Regulación de la secreción de prolactina”, existen también reguladores locales intra-hipofisarios de las funciones del lactotrofo. Como se mencionó anteriormente, entre los factores sintetizados y secretados en la hipófisis se encuentra **el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)**, un potente inhibidor local de las funciones del lactotrofo. Además dicha citoquina media las acciones inhibitorias de la DA (D. K. Sarkar et al., 2005) y su actividad está regulada positivamente por DA y negativamente por estradiol, los dos factores principales en la regulación del lactotrofo (M Victoria Recouvreux et al., 2011).

Una vez sintetizado, principalmente por los mismos lactotrofos, TGF $\beta 1$ se secreta a la matriz extracelular formando parte de un complejo proteico que le confiere un estado inactivo (TGF $\beta 1$ latente). Mediante un proceso que se conoce como “activación”, TGF $\beta 1$ es liberado de sus complejos latentes (TGF $\beta 1$ activo) y en esta conformación se une a su receptor y desencadena una respuesta biológica. Por lo tanto, la matriz extracelular actúa como reservorio de TGF $\beta 1$ inactivo (figura 6).

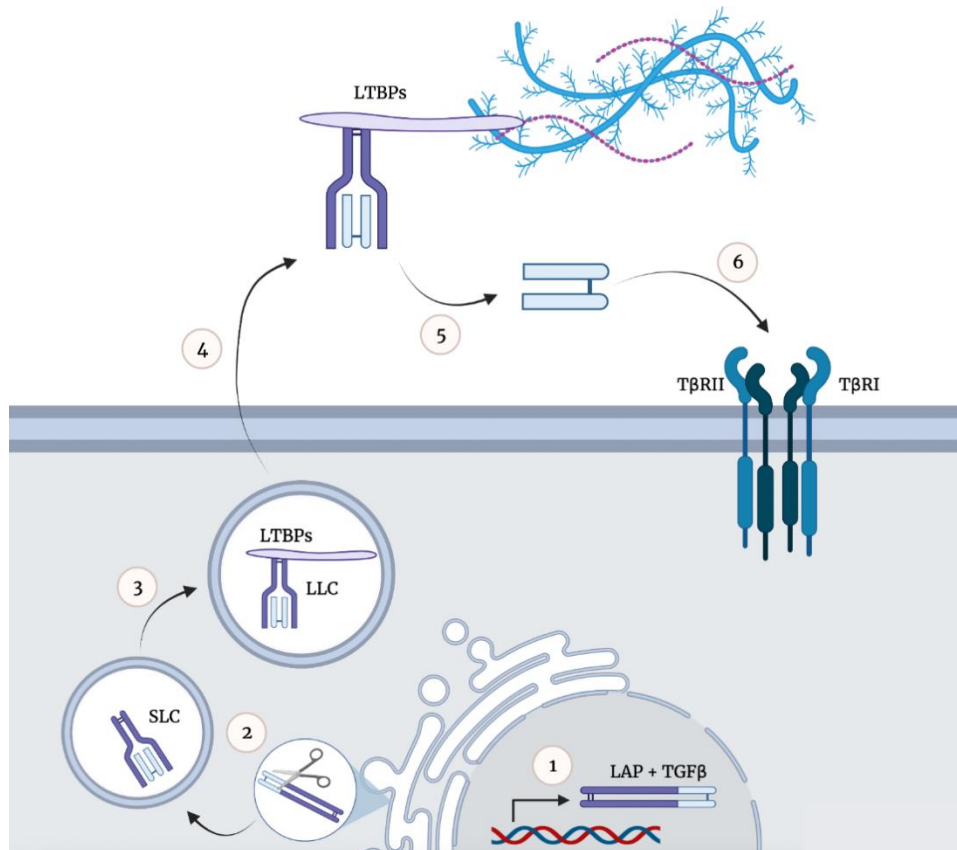


Figura 6: Biología del sistema TGF β . **1.** Se sintetiza el precursor de TGF β conteniendo a LAP (péptido de latencia, en violeta) y a la citoquina madura (en celeste). **2.** En el aparato de Golgi el precursor es clivado por la enzima Furina. LAP queda asociado a TGF β mediante uniones no covalentes formando el Complejo Latente Menor (SLC). **3.** El SCL se une a proteínas de unión a TGF β latente (LTBPs) y se forma el Complejo Latente Mayor (LLC). **4.** En esta conformación (LLC) se secreta. Las LTBPs forman uniones covalentes con las fibras de la matriz extracelular y así, el LLC permanece anclado en la matriz extracelular. **5.** Activación de TGF β 1: la citoquina madura (celeste) se libera de los complejos latentes. **6.** La citoquina madura, libre de sus complejos latentes ejerce su acción biológica al unirse a sus receptores de membrana.

Se han descrito numerosos factores activadores de TGF β 1: trombospondina 1 (TSP1) (Schultz-Cherry et al., 1994), integrinas α V β 6 y α V β 8 (Annes et al., 2004), especies reactivas de oxígeno (Barcellos-Hoff & Dix, 1996) y pH bajo (Oreffo et al., 1989). Estos factores promueven la disociación de TGF β 1 de sus complejos latentes. Además, las proteínas de latencia contienen secuencias sensibles de ser procesadas proteolíticamente. Dicho clivaje desestabiliza a los complejos latentes y favorece la liberación de la citoquina madura. Se han descrito diversas proteasas activadoras de la citoquina. Entre ellas se encuentran las metaloproteasas (MMP2, MMP9 y MT1-MMP), catepsina D, plasmina (Lyons et al., 1990) y **calicreína tisular (KLK1)**

(Emami & Diamandis, 2010a). Si bien han sido estudiados muchos posibles activadores de TGF β 1, la participación individual de cada uno de ellos en cada tejido es aún incierta.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que tanto los niveles de TGF β 1 activo, como su actividad biológica y la expresión de sus receptores se encuentran disminuidos en modelos animales de prolactinomas (E. Y. E. Y. Y. Faraoni et al., 2017; M. Victoria Recouvreux et al., 2011), sugiriendo la participación de esta citoquina en el desarrollo tumoral.

Como primera aproximación al estudio de los mecanismos involucrados en la activación de TGF β 1 localmente en la hipófisis, en nuestro laboratorio se estudió la expresión de los activadores previamente mencionados. De todos los activadores estudiados, **únicamente KLK1 y TSP1** demostraron tener una regulación por DA y estradiol análoga a la de TGF β 1 activo (M.V. Recouvreux et al., 2013). Estos resultados previos indican que KLK1 y TSP1 podrían estar involucrados en la activación fisiológica de TGF β 1 en hipófisis.

Además, demostramos que los bajos niveles de TGF β 1 activo contribuyen al crecimiento tumoral ya que un tratamiento farmacológico con un análogo sintético de TSP1 logró recuperar localmente la actividad de la citoquina y más aún, contrarrestar el crecimiento tumoral y la hiperprolactinemia en 2 modelos animales de prolactinoma (E. Y. E. Y. Y. Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2017).

En este contexto, estudiar a los activadores fisiológicos de TGF β 1 localmente en la hipófisis es importante para plantear nuevas líneas terapéuticas para aquellos pacientes con prolactinomas resistentes a las terapias actuales con agonistas dopaminérgicos. De acuerdo con los resultados previos de nuestro laboratorio, **KLK1 es un posible activador local de TGF β 1.**

Calicreína tisular (KLK1) y sistema KLK1-quininas

La calicreína tisular (KLK1) es una serin-proteasa que forma parte de un complejo sistema conocido como el sistema KLK1-quininas. Este sistema es ampliamente conocido tanto por su participación en diversos procesos fisiológicos como la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis del sodio, como en procesos patológicos como la injuria y la inflamación. El sistema involucra una

cascada de enzimas proteolíticas y péptidos bioactivos que serán detallados en el capítulo 1 del presente trabajo (Campbell, 2000).

Es importante remarcar que el estudio de KLK1 como activador local de TGF β 1 involucra también el estudio de todo el sistema del que forma parte la proteasa. Este punto será desarrollado en el capítulo 1.

Modelos experimentales de prolactinomas

El uso de modelos animales para el estudio de los mecanismos regulatorios del lactotrofo es fundamental. Uno de los modelos experimentales más utilizados en el estudio de la patogénesis lactotropa son los prolactinomas inducidos por un tratamiento crónico con estrógenos en ratas (Banerjee et al., 1994, 1997; G. G. Piroli et al., 1996). Un tratamiento *in vivo* de 4 semanas genera hiperplasia, hipertrofia y desgranulación de los lactotrofos, acompañado de un marcado aumento en los niveles de PRL sérica. Además hay una disminución en la proporción de otros tipos celulares hipofisarios (De Nicola et al., 1978; Phelps & Hymer, 1983; G. Piroli et al., 1994). Si bien este modelo se ha utilizado durante muchos años y se ha obtenido mucha información respecto de los mecanismos que regulan las funciones del lactotrofo, posee limitaciones que no pueden ser ignoradas a la hora de analizar los resultados obtenidos en este modelo. Por ejemplo, la dosis de estrógenos utilizada para la inducción del adenoma es supra-fisiológica (aproximadamente 20mg/pellet) (M. A. Camilletti et al., 2019; M Victoria Recouvreux et al., 2012). Por lo tanto las alteraciones observadas en este modelo de prolactinoma deben diferenciarse entre aquellas originadas directamente por la administración supra-fisiológica de estrógenos (exceso de estimulación continua) y las generadas específicamente por la desregulación de las funciones del lactotrofo.

Además de este modelo farmacológico, se han desarrollado modelos animales de prolactinomas a partir de ratones modificados genéticamente, como por ejemplo ratones con sobreexpresión de galanina (Cai et al., 1999), de TGF α (McAndrew et al., 1995) o del factor de crecimiento neural (NGF) (Borrelli et al., 1992), así como también ratones que sobre-expresan constitutivamente la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (ratones hCG β) (Rulli et al., 2002) y ratones transgénicos carentes de D2R funcionales (Ratones Drd2KO) (Kelly et al., 1997).

Todos estos modelos poseen ventajas y limitaciones. Conocerlas y entenderlas nos permite elegir distintos modelos complementarios para realizar un estudio riguroso que nos permita dilucidar los mecanismos involucrados en la patogénesis hipofisaria.

En este trabajo se utilizaron dos modelos de prolactinoma: los ratones *Drd2KO* y los ratones *hCG β* . Dichos modelos son de particular interés ya que presentan un fenotipo de hiperplasia e hipertrofia de lactotrofos sexualmente dismórfica: las hembras evidencian, a edades adultas, un marcado desarrollo de prolactinomas en comparación con los machos (Cristina et al., 2006; Rulli et al., 2002). Cada modelo será detallado en la sección “Modelos Animales” de Materiales y Métodos.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente postulamos que la calicreína tisular (KLK1) puede actuar como un regulador negativo de la secreción de prolactina mediante la activación de TGF β 1 en la hipófisis. Además, las alteraciones en el sistema calicreína-quininas podrían estar involucradas en el desarrollo de un prolactinoma.

Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el rol de KLK1 y del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de prolactina.

Objetivos específicos

Capítulo 1

Caracterizar al sistema KLK1-quininas hipofisario en condiciones fisiológicas y en el desarrollo de prolactinomas. Estudiar la regulación de sus componentes por dopamina y estradiol, los principales factores que controlan las funciones del lactotrofo.

Capítulo 2

Estudiar el impacto del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de prolactina.

Capítulo 3

Estudiar el rol del receptor de bradiquinina B2 (B2R) en el desarrollo de prolactinomas.

Materiales y métodos

Modelos animales

Ratones knock out para el receptor dopaminérgico D2 (Drd2KO)

Los ratones deficientes de *Drd2* (designación oficial: B6.129S2-*Drd2*^{tm1low}) fueron generados por mutagénesis dirigida del gen *Drd2* en células embrionarias (S L Asa et al., 1999). Por recombinación homóloga se realizó una delección completa del exón 7 y la mitad 5' del exón 8 del gen que codifica para el receptor de dopamina D2 (Kelly et al., 1997). Los ratones genéticamente modificados (de ahora en adelante ratones *Knock Out*, KO) carecen de receptores *Drd2* funcionales ya que los exones delecionados codifican para el dominio transmembrana 6, el 3er loop intracelular, el dominio transmembrana 7 y el extremo carboxi-terminal intracelular.

A partir de los 2 meses de edad las hembras KO manifiestan creciente hiperprolactinemia y aumento de peso hipofisario. A los 8 meses de edad las hembras presentan una marcada hiperplasia e hipertrofia hipofisaria, con un peso hipofisario de 2 a 3 veces más respecto al peso hipofisario de sus pares salvajes (*Wild Type*, WT). A esta edad (8 meses) no se observan signos de transformación neoplásica dado que se mantiene intacta la arquitectura determinada por la red de fibras de reticulina. En cambio, a los 17-18 meses de edad, las hembras KO desarrollan adenomas hipofisarios evidenciados por la presencia de nódulos multiformes y destrucción de fibras de reticulina, una característica típica atribuida a los adenomas. Por otro lado, los machos KO de 9 a 12 meses de edad no presentan mayores cambios adenohipofisarios, pero sí un leve aumento de los niveles de PRL sérica, siendo éstos mucho menos elevados respecto al presentado por las hembras de la misma edad. A los 17-18 meses de edad en las hipófisis de machos KO se distinguen nódulos multifocales pequeños con ruptura de la red de reticulina, indicando el desarrollo de múltiples adenomas focales. Sin embargo, estas alteraciones no están acompañadas de una marcada hiperplasia (Kelly et al., 1997).

Este modelo animal resulta de particular importancia para la búsqueda de terapias alternativas para pacientes con prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos ya que estos animales transgénicos carecen de D2R funcionales. Por

otra parte, el dimorfismo sexual que presenta en el desarrollo de la patología hipofisaria también provee una herramienta muy útil para estudiar las diferencias sexuales en los mecanismos regulatorios del lactotrofo.

Se utilizaron ratones de ambos sexos a las edades indicadas en cada experimento. El día del experimento los mismos fueron sacrificados por decapitación con guillotina. Se colectó sangre troncal para la determinación de prolactina sérica por radioinmunoensayo (RIA). Por otro lado, se extrajeron las adenohipófisis (removiendo la neurohipófisis) y se conservaron en: 1- QuickZol® para analizar la expresión de genes por RT-qPCR; 2- buffer de extracción (CaCl₂ 10mM, MgCl₂ 1mM, Tritón 100x al 1%, Tris-HCl 100mM pH 7,4) con inhibidores de proteasas (PSMF, TPCK, TAME, ZPCK y TLCK) para su posterior procesamiento para ELISA, o bien, 3- se incluyeron en Cryoplast para realizar técnicas inmunohistoquímicas.

Ratones que sobre-expresan la subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana (hCGβ+)

Los ratones hCGβ+ están modificados genéticamente para expresar la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana bajo el promotor de la ubiquitina C (Rulli et al., 2002). Los ratones hCGβ+ fueron generados mediante la técnica de microinyección pronuclear del transgén en oocitos fertilizados de ratones de la cepa FVB/N, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Turku, Finlandia (Rulli et al., 2002). Desde el año 2010 se mantiene su reproducción en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los ratones transgénicos hCGβ+ se obtuvieron a través de cruzamientos entre machos hCGβ+ y hembras de la cepa salvaje FVB/N (WT).

La elevada bioactividad de LH/hCG genera una sobre-estimulación ovárica y luteinización masiva, con un consecuente incremento en la secreción de progesterona (200 nmol/L en hembras hCGβ+ vs. 10 nmol/L en hembras WT). En este modelo, las hembras hCGβ+ presentan pubertad precoz e infertilidad con estructuras uterinas y ováricas anormales. Además, durante el período peripuberal exhiben un aumento transitorio de estradiol, mientras que en la adultez los niveles de dicha hormona se mantienen en valores fisiológicos normales. En cambio, los machos son fértiles y presentan espermatogénesis normal pese a los bajos niveles de FSH (Rulli et al., 2002).

A los 6 meses de edad, únicamente las hembras hCG β + presentan prolactinomas de gran tamaño (Ahtiainen et al., 2010). Nuevamente, este modelo nos permite estudiar el dimorfismo sexual en el desarrollo de los prolactinomas. A diferencia del modelo anterior (Drd2KO), estas diferencias pueden ser estudiadas en presencia de la regulación dopaminérgica inhibitoria sobre el lactotrofo.

Se utilizaron ratones de ambos sexos, los cuales, el día del experimento fueron eutanizados por decapitación con guillotina. En cada experimento se colectó sangre troncal para la determinación de prolactina por RIA y se extrajeron las adenohipófisis (removiendo la neurohipófisis). Los tejidos se conservaron en QuickZol® para analizar la expresión de genes por RT-qPCR.

Los animales de ambos modelos experimentales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET) de acuerdo con las normas dictadas por la Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Los animales se mantuvieron a 22°C con ventilación permanente y con un fotoperíodo de 12 horas de luz (7:00 – 19:00 hs) y 12 horas de oscuridad. Además, se les proporcionó alimento balanceado (Gepsa Feeds, Grupo Pilar) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por la Comisión CICUAL del IByME.

Experimentos in vivo

Tratamiento agudo con drogas dopaminérgicas

Para evaluar el impacto del sistema dopaminérgico sobre la expresión de los distintos componentes del sistema caliceína-quininas hipofisario se realizaron experimentos *in vivo* con agonistas y antagonistas del Drd2. Hembras y machos *wild type* (WT) de la cepa C57, de 5 meses de edad, fueron inyectados con el antagonista del Drd2 (Sulpiride 5mg/kg, ip, Vipral, Ivax Argentina), o el agonista del receptor (Cabergolina 2mg/kg, ip, Laboratorio Beta, Buenos Aires), o solución fisiológica (ip) como control. Los animales fueron sacrificados a las 3hs post inyección. Se colectó sangre troncal para la posterior determinación de la concentración sérica de prolactina por RIA. Por otro lado, se extrajeron las adenohipófisis en QuickZol® para el posterior análisis de la expresión génica.

Tratamiento agudo con estradiol

Se evaluó la regulación estrogénica del sistema caliceína-quininas hipofisario en animales WT de la cepa C57. Hembras y machos de 5 meses de edad fueron inyectados con valerato de estradiol (0,2 mg/kg, sc, Progynon Depot, Schering) o aceite de ricino (sc) como control. Los animales fueron sacrificados a las 3hs post inyección. Se juntaron las adenohipófisis en QuickZol® para el posterior análisis de la expresión génica por RT-qPCR.

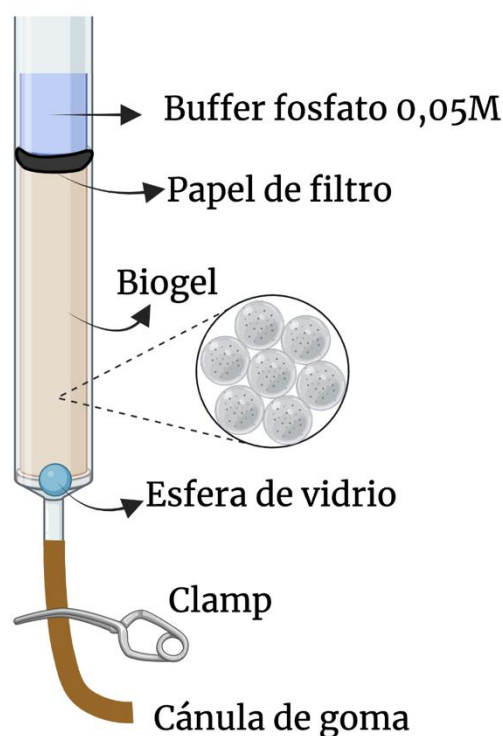
Ovariectomía

Ratones hembra WT de la cepa C57 de 2 meses de edad fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina:Xilacina (ip, 90mg/kg:10mg/kg). A un grupo de hembras, se les realizó una pequeña incisión dorsal a partir de la cual extrajeron los ovarios en forma bilateral (OVX). Otro grupo fue sometido a los mismos procedimientos quirúrgicos, pero los ovarios no fueron removidos (Sham-OVX). A los 8 meses de edad los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina. Se colectaron las adenohipófisis en QuickZol® para posterior análisis de la expresión génica por RT-qPCR.

Metodologías generales

Marcación de la hormona prolactina

Preparación de la columna de elución: se utilizó Biogel P10: 10g en 300ml de buffer fosfato (BP) 0,05M ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,008M; PO_4HNa_2 0,04M y azida sódica), previamente des-gaseado mediante vacío (30 minutos en agitación). Se colocó una esfera de vidrio en la base inferior de la columna (para contener el gel) y se cargó el Biogel (a temperatura ambiente y en agitación). Una vez que se alcanzó la altura deseada se continuó lavando con BP 0,05M hasta lograr que el biogel compacte. En el límite superior del gel se colocó un papel de filtro del diámetro de la columna. Se clameó la cánula de goma en la zona inferior y se dejó



a temperatura ambiente embebida con buffer fosfato 0,05M para evitar que se seque. La columna fue preparada 24 horas antes de la marcación.

El día de la marcación se “activó” la columna (se bloquean los sitios inespecíficos) haciendo pasar por el biogel 1ml de PBS-EDTA-BSA 2% (buffer fosfato 0,01M; NaCl 0,15M; EDTA 50mM; 2% BSA). Luego se lavó con buffer fosfato 0,05M durante 30 minutos y se clameó la cánula hasta el momento de la marcación.

Marcación: Se llevó a cabo en tubos de vidrio y bajo campana química. Se incubaron 1,25 μg de prolactina disuelta en buffer fosfato 0,5M con 0,3 μCi de ^{125}I y 15 μl de cloramina T (100mg/100ml de Buffer Fosfato 0,05M, reacción oxidante) durante 60 segundos. En este período ocurre la iodación de la hormona. Para detener la reacción oxidativa se agregaron 50 μl de metabisulfito de sodio (100mg en 10 ml de Buffer Fosfato 0,05M).

Purificación de la prolactina marcada: para separar la proteína marcada del yodo que no se incorporó (yodo libre) y del agente reductor, se realizó una filtración

molecular en la columna de Biogel preparada el día anterior. Se sembró el contenido de la reacción de marcación sobre el filtro en el extremo superior de la columna y se eluyó con buffer fosfato 0,05M. Se recolectaron 20 fracciones de 8 gotas cada una en tubos de ensayo que contenían 200µl de PBS-EA 1% (PBS: buffer fosfato 0,01M, NaCl 0,15M, azida sódica 0,01%, pH 7,4 con 1% de albúmina de huevo (EA)). A continuación, se tomaron 10µl de cada fracción y se midió la radiactividad en un contador γ. Las fracciones correspondientes a la PRL marcada con ¹²⁵I fueron alicuotadas en microtubos y congeladas a -20°C para su posterior uso en radioinmunoensayos.

La columna utilizada separa los compuestos por tamaño; las moléculas más pequeñas viajan más lentamente dado que quedan atrapadas en las esferas porosas del gel, mientras que las moléculas grandes (PRL iodada) no penetran en la estructura porosa de la columna y se desplazan por el gel hacia el extremo inferior de la columna. De este modo, el primer pico de radioactividad corresponde a la hormona marcada, y el segundo al [¹²⁵I] no incorporado.

Radioinmunoensayo (RIA)

Preparación de las muestras: El día de cada experimento los animales fueron eutanizados por decapitación, la sangre troncal se recolectó en tubos de 1,5 ml y los mismos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos (para separar suero del coágulo). El suero obtenido se guardó a -20°C hasta la medición de las hormonas por RIA.

RIA prolactina

Los niveles séricos de prolactina se determinaron en 10µl de suero de ratón en un volumen final de 200µl de PBS-EA 1% para ratones WT. En el caso de las muestras provenientes de hembras tumorales (Drd2KO y hCGβ+), la determinación hormonal se realizó en 10 µl de una dilución 1/10 de suero debido a la alta concentración de PRL característica de este fenotipo.

Se prepararon tubos para medir la unión inespecífica (por duplicado), la unión máxima (por cuadruplicado) y una curva de concentraciones crecientes del estándar de referencia (por duplicado). Las muestras se prepararon en un volumen final de 200µl de *buffer* EA (por duplicado) como lo indica la tabla 1. Se agregaron 100µl por

tubo del anticuerpo primario (1:140000, AFP131078, Parlow, NIH) preparado en buffer PBS con EDTA 50mM y suero normal de conejo 0,5% (NRS) junto con 100µl de la hormona marcada (correspondientes a 18000cpm/tubo aproximadamente) preparada en buffer PBS-EA 1% (tabla 1). La unión no específica se determinó incubando a la hormona marcada en ausencia del primer anticuerpo, y la unión máxima se realizó incubando la hormona con el anticuerpo primario en ausencia de hormona fría.

Se incubaron los tubos del ensayo durante 24 hs a temperatura ambiente. Al día siguiente se agregaron 500µl del segundo anticuerpo (1:360, suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo) preparado en PBS conteniendo 8% de polietilenglicol y se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 2 hs 30 min y luego a 4°C durante 30 min más (tabla 1). A continuación, se realizó una centrifugación a 2000rpm a 4°C durante 30 minutos para separar la fracción de hormona libre (presente en el sobrenadante) de la unida al anticuerpo (en el precipitado). Se aspiró el sobrenadante y sobre el precipitado se midió la radioactividad en un contador y (Hewlett Packard, eficiencia 82%). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 7,8 y 12,1% respectivamente. El nivel sérico de PRL fue expresado como ngPRL/ml suero.

Tabla 1. Protocolo del radioinmunoensayo.

	Cuentas totales x2	Inespecífico x2	Máximos x4	Curva x2	Muestras x2
µl (PRL estándar o muestra)	–	–	–	200	10
PBS-EA 1% (µl)	–	200	200	–	190
1° Ab en PBS-EDTA-NRS 0,5% (µl)	–	100 PBS-EDTA-NRS Sin Ab 1°	100	100	100
mPRL* en PBS-EA 1%(µl)	100	100	100	100	100
Over night a temperatura ambiente					
2° Ab en PBS-PEG 8%(µl)		500	500	500	500
	1) 2hs 30min a temperatura ambiente				
	2) 30min a 4°C				
	Centrifugación a 2000rpm (30' 4°C)				
	Se midió la radiactividad sobre el precipitado				

ELISA para la determinación de prolactina en medios condicionados

Los medios condicionados provenientes de ensayos *ex vivo* de hipófisis (capítulo 2) de hembras y machos fueron diluidos 1:1000 y 1:100, respectivamente, en PBS-BSA1%. La concentración de prolactina se determinó por ELISA con el kit comercial *Mouse Prolactin Duo Set ELISA* (#DY1445, R&D Systems) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, en una placa (*Corning® 96 well EIA/RIA plates #3590*) se incubaron 100µl del *Coating Antibody* por *well* durante una noche, a temperatura ambiente y cubierta con film para evitar evaporaciones. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con 300µl de buffer de lavado (PBS – 0,05% Tween® 20). A continuación, se realizó el bloqueo con 300µl de buffer de bloqueo (PBS-BSA 1%) por *well*, durante una hora a temperatura ambiente y cubierto con film. Nuevamente se hicieron 3 lavados con el buffer de lavado. Se sembraron 100µl de muestra por *well* y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados, se agregó el *Detection Antibody* (100µl/well) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados y se incubó con *Streptavidin – HRP* (100µl/well) durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados y se incubó con el sustrato de la peroxidasa de rabanito (100µl/well); TMB 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich, T4444) durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 50µl/well de H₂SO₄ 2N para finalizar la reacción y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de ELISA. La concentración de prolactina fue expresada como ngPRL/mg proteína/ml medio.

Extracción de proteínas

Las adenohipófisis provenientes de los ensayo *ex vivo* fueron recolectadas en 80 µl de Buffer de extracción (CaCl₂ 10mM, MgCl₂ 1mM, Tritón 100x al 1%, Tris-HCl 100mM pH 7,4) con un mix de inhibidores de proteasas (PSMF, TPCK, ZPCK y TLCK). El buffer de extracción utilizado no contiene agentes reductores pero si contiene un detergente no iónico (Tritón X-100) para minimizar la activación de TGFβ1 durante el procesamiento de las muestras. Las muestras fueron homogenizadas en hielo durante un minuto con homogeneizador manual. Los homogenatos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Sobre una

alícuota del sobrenadante se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford.

ELISA para la determinación de TGFβ1 activo

Detección del TGFβ1 activo (libre de sus complejos latentes) en hipófisis de ratón: se tomaron volúmenes de muestras correspondientes a 120-150µg de proteína (proveniente de las hipófisis de los ensayos *ex vivo*, capítulo 2) y se llevó cada muestra a un volumen final de 100µl con buffer RD (buffer del kit: 1,4 % suero bovino delipidizado en PBS¹ – 0,05% Tween® 20).

Protocolo: Se utilizó un kit comercial *TGFβ1 Duo Set ELISA development system* (#DY1679, R&D Systems), y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente: se incubó una placa (*Corning® 96 well EIA/RIA plates #3590*) con 100µl del *Coating Antibody* por *well* durante la noche a temperatura ambiente y cubierta con film para evitar evaporaciones. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con 300ul de buffer de lavado (PBS – 0,05% Tween® 20). A continuación, se realizó el bloqueo con 300µl de buffer de bloqueo (PBS – 5% Tween® 20) por *well*, durante una hora a temperatura ambiente y cubierto con film. Nuevamente se hicieron 4 lavados con el buffer de lavado. Se sembraron 100µl de muestra por *well* y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de los lavados, se agregó el *Detection Antibody* (100µl/well) durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se realizaron 4 lavados y se incubó con *Streptavidin – HRP* (100µl/well) durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posterior a los lavados se agregó el sustrato de la peroxidasa de rabanito (100µl/well); TMB 3,3',5,5'- tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich, T4444) y se incubó durante 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Se agregaron 50µl de H₂SO₄ 2N para finalizar la reacción y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de ELISA.

Dado que la técnica se basa en una reacción colorimétrica para detectar cantidades desconocidas de TGFβ1, simultáneamente se realizó una curva de calibración a partir de una solución madre de la citoquina provista por el kit.

El contenido hipofisario de TGFβ1 activo y total fue expresado como pg TGFβ1/mg de proteína o pg de TGFβ1/ml medio condicionado.

¹ NaCl 173mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, KH₂PO₄ 1,5mM, pH 7,2-7,4

Inmunomarcación

Para la evaluar la co-localización entre los distintos receptores de interés y los tipos celulares hipofisarios realizamos inmunomarcaciones indirectas dobles. Luego de la eutanasia por decapitación, las adenohipófisis fueron sumergidas en Cryoplast (Biopack, Bs. As. Argentina) y colocadas en hielo seco hasta la solidificación del medio de soporte. Se realizaron secciones de 10µm en un crióstato a -20°C y se sumergieron en metanol absoluto a -20°C durante 10 minutos para fijar el tejido. Luego se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno, en frío con PBS y un lavado de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS. A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS-BSA 5% durante una hora, a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron las secciones de hipófisis con 30µl del anticuerpo primario correspondiente a los receptores de interés, preparado en buffer de bloqueo (tabla 2). Se incubaron las secciones durante la noche con el anticuerpo primario en cámara húmeda, en heladera. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron los cortes con 30µl del anticuerpo primario correspondiente a hormonas hipofisarias (tabla 2) durante 2 horas en cámara húmeda, a temperatura ambiente. Luego de los lavados (3 de 5 minutos con PBS), se incubó con 30 µl de los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 2) durante 1 hora 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad, a temperatura ambiente. Finalizada la incubación con los anticuerpos secundarios, se realizaron los lavados y se incubaron los cortes con 30µl de una solución 1/500 de DAPI durante 15 minutos en cámara húmeda, en oscuridad. A continuación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y un lavado de 3 minutos con agua destilada. Una vez finalizado el último lavado se secaron bien los cortes, se montaron con Miwol y se sellaron con esmalte de uñas. Las inmunomarcaciones fueron guardadas en heladera y protegidas de la luz hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia. Para validar la especificidad de la inmunomarcación, se realizaron controles negativos incubando a las secciones con PBS-BSA 5% en lugar del anticuerpo primario. Además, para el anticuerpo anti-B2R, se incubaron algunos cortes en simultáneo con el péptido bloqueante.

Tabla 2. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunomarcación.

Proteína blanco	Nombre del anticuerpo	Dilución	Especie en la que está hecho; policlonal; monoclonal
Anticuerpos primarios			
PRL	AFP450191	1:1000	Guinea pig Policlonal
GH	AFP12121390	1:1000	Guinea pig Policlonal
LH	AFP1132093	1:1000	Guinea pig Policlonal
B1R	ABR 011	1:50	Conejo Policlonal
B2R	ABR 012	1:50	Conejo Policlonal
Anticuerpos secundarios			
IgG Guinea pig	ab 150185	1:1000	Conjugado a Alexa 488
IgG Conejo	sc-516251	1:100	Conjugado a CFL 647

Extracción de ARN

Las adenohipófisis fueron recolectadas en 80µl de QuickZoS[®] Reagent (Kalium Technologies). Las muestras fueron homogeneizadas en campana con un homogeneizador manual durante un minuto en hielo. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente para que se disocie el complejo núcleo-proteico. Luego se agregaron 20µl de cloroformo y se mezcló cada muestra por inversión. Los ácidos nucleicos fueron separados por centrifugación a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 50µl de isopropanol para precipitar el ARN de la fase acuosa y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 100 µl etanol 75%. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 7500g durante 5 minutos a 4°C para eliminar el etanol y el pellet se dejó secando al aire. Una vez seco, se resuspendió en 5µl de agua libre de ARNasas y se solubilizaron los precipitados colocando los tubos en una placa térmica (60°C) durante 10 minutos. Se cuantificó la cantidad de ARN obtenido mediante la medición de la absorbancia a 260 nm de 1 µl de muestra en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La calidad y pureza del ARN extraído se determinó mediante la relación de las absorbancias 260/280 nm y se utilizaron aquellas muestras donde dicha relación fue mayor a 1,8.

Retrotranscripción (RT)

Para obtener el ADN copia (ADNc) se partió de 1µg de ARN en agua desionizada libre de ARNasas. Se incubó cada muestra con 0,5µg de *random primers* (Biodynamics cat#B070-40) y se llevó a volumen final de 15µl por tubo. Luego se colocaron los tubos en una termocicladora y se calentaron a 70°C por 5 minutos. A continuación, se agregó a cada muestra 1µl de la enzima MMLV RT (200u/µl, 10000u total, Promega, REF M1701), 5µl del buffer 5X de la enzima (250mM Tris-HCl pH8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 50mM DTT), una mezcla de DNTPs (20Mm cada uno) y se llevó a volumen final de 25µl por tubo con agua deionizada libre de ARNasas. La reacción se llevó a cabo según el siguiente programa; 60 minutos a 37°C y 5 minutos a 95°C. El ADNc resultante se mantuvo a -20°C hasta el momento de uso. Para corroborar que no existiera contaminación con ADN genómico, se realizaron controles omitiendo la transcriptasa reversa y completando el volumen con agua libre de ARNasas. La ausencia de fragmentos de ADN amplificados por PCR en estos controles indicó el aislamiento de ARN libre de ADN genómico.

Diseño de primers

Para el análisis de la expresión génica se utilizaron *primers forward* y *reverse* específicos para la amplificación de cada uno de los genes de interés (tabla 3). Los mismos fueron diseñados en base a las secuencias nucleotídicas publicadas en el GenBank (NIH), utilizando el programa *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Se tuvieron en cuenta las siguientes características para la elección de los *primers*: el producto amplificado debe tener entre 80 y 180 pb, debe contener aproximadamente 50% de nucleótidos GC, la temperatura de disociación debe ser cercana a 60°C y no debe diferir en más de 1°C entre cada *primer*. En los casos que fue posible, los *primers* se diseñaron complementarios a una secuencia de unión entre diferentes exones de forma tal de evitar la amplificación de ADN genómico. También se verificó que los *primers* no formaran dímeros entre sí con el programa *Oligoanalyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>).

Tabla 3. Secuencias de los *primers* utilizados.

Gene	Accession Number	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
		5' → 3'	5' → 3'
<i>Rpl38</i>	NM_001048057	GTTCTCATCGCTGTGAGTGTGC	CAGCGAACCTTGAACCTTCACAT
<i>Bdkrb1</i>	NM_007539	CCGCTACAGGTTGCTGGTAT	GATGAGCAGGCAGGTCACCTT
<i>Bdkrb2</i>	NM_009747	GGCTCGCTTGAGAAAAGGAGGA	AGGGTCCCGTTAAGAGCAGA
<i>Klk1</i>	NM_010639	GCCCATCGACCTGCCCACTG	CACTGGAGCTCATCTGGGTATTCA
<i>Cpm</i>	NM_027468	GCACAGCATCGGGAAATCTG	CTCGCCCTACAGTCTCATCTC
<i>Cpn</i>	NM_030703	CACTTCAGGTGAACATGGGGAT	ATGAGCTTCGCTTGAGTTGGA
<i>Ace</i>	NM_207624	TGGGTCCGAGTACATCAACCT	GGTGTCCATCCCTGCTTTATC

PCR cuantitativa en tiempo real

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado en placas de 96 pocillos, selladas con film óptico adherente, en un termociclador CFX96 *Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) con el programa que se indica en la tabla 4. Se cargaron 5 µl de una dilución 1/20 en agua libre de ARNasas de los ADNc de cada muestra junto con 2µl del kit comercial *5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne), los *primers forward* y *reverse* (0,5µM final cada uno) y agua hasta completar un volumen final de 10µl.

Tabla 4. Programa de PCR en tiempo real.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo / ciclos	
Ciclo 1: desnaturalización inicial y activación de la enzima ADN polimerasa	95	15 min	1x
Ciclo 2: desnaturalización, apareamiento de <i>primers</i> y extensión	95	15 seg	40x
	60 ó 56	20 seg	
	72	30 seg	
Ciclo 3: curva de disociación	65-95*	10 seg	71x

*incremento de la temperatura de a 0,5°C a partir del ciclo 2

Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa

Se analizaron los datos utilizando el programa *CFX Manager Software* (Bio-Rad). Se registró el incremento de la fluorescencia (proporcional al número de copias de ADN) a lo largo de la reacción. Se estableció un valor de fluorescencia umbral en el cual el incremento de ésta es lineal y se determinó, para cada muestra, el número de ciclos en el cual se alcanza dicho umbral, denominado CT. Para determinar la expresión relativa de cada uno de los genes se utilizó el método de delta-delta CT ($\Delta\Delta CT$) mediante el cual se compara el CT del gen de interés con el CT del gen endógeno (delta CT) y luego este valor se compara con un calibrador interno (delta-delta CT). Finalmente, la expresión del gen se calculó como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los genes analizados por PCR cuantitativa en tiempo real se detallan en la tabla 3. Se tomó como calibrador interno al valor promedio de las hembras WT.

El gen endógeno utilizado para cada uno de los genes de interés fue determinado comparando las eficiencias obtenidas en la puesta a punto de cada primer. La eficiencia de reacción para cada uno de los genes se determinó utilizando una curva de concentraciones decrecientes de ADNc. Se evaluaron 2 genes endógenos: RPL38 y Ciclofilina B. Se eligió como control endógeno aquel gen que tuviera una eficiencia similar al gen de interés, y una curva de eficiencia paralela a la curva obtenida por el gen de interés. Para todos los genes evaluados, el mejor gen endógeno fue RPL38.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante el programa GraphPad Prism 9. Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar. Las pruebas estadísticas utilizadas para cada caso se detallan en la leyenda de la figura correspondiente. Se consideraron diferencias significativas cuando el $p < 0,05$. En todos los casos se verificó que se cumplieran los supuestos de las pruebas estadísticas: 4 tests de normalidad ($p > 0,01$): Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson omnibus y Kolmogorov-Smirnov; y 2 tests de homogeneidad de varianza ($p > 0,01$): Brown-Forsythe y Bartlett. En el caso de que algún supuesto no se cumpliera, se transformaron los datos y se volvió a verificar el cumplimiento de los supuestos.

A lo largo de la tesis, se aplicaron las siguientes pruebas paramétricas: a) prueba *t de Student*, para comparar las medias de dos grupos independientes; b) análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor, para comparar las medias de 3 o más grupos independientes, seguido de la prueba *post-hoc* de Dunnet; y c) ANOVA de 2 factores, en aquellos casos donde se deseó evaluar el efecto de 2 factores y su interacción (ej: sexo y genotipo, genotipo y tratamiento), seguido de la prueba *post-hoc* de Tukey.

Capítulo 1:
Caracterización del sistema
KLK1-Quininas hipofisario

Introducción capítulo I

Calicreínas

En la década de 1930 Dr. Warle y colaboradores descubrieron una sustancia generadora de quininas en el páncreas humano que denominaron “calicreína” (del griego “Kallikreas” que significa páncreas) (Prassas et al., 2015). Entre los años 1970s y 1990s muchas proteasas asociadas a calicreína han sido identificadas. Actualmente se dividen en dos grandes grupos; calicreína plasmática (PK o *KLK1B*) y la familia de calicreínas tisulares (*KLK1-KLK15*).

Calicreína plasmática

La calicreína plasmática difiere de la familia de *KLKs* tanto en la localización genómica como en su conformación estructural (Pathak et al., 2013). La calicreína plasmática está codificada por un único gen situado en el cromosoma 4q34-q35 en el humano y en el cromosoma 8 en el ratón. Está formado por 15 exones, los primeros dos contienen la región 5'-UTR (región no codificante, por sus siglas en inglés) y el péptido señal. Los 8 exones siguientes codifican para la cadena pesada de la proteasa formada por los 4 dominios repetidos A1-A4. Los últimos 5 exones codifican para la cadena liviana de PK que abarca el dominio catalítico. Dicho dominio posee tres residuos típicos del sitio activo de las serin-proteasas (Van der Graaf et al., 1982) (**figura 1.1**).

La calicreína plasmática es sintetizada principalmente en el hígado y luego se secreta al torrente sanguíneo. En éste circula dentro de un complejo unida a su sustrato, el quininógeno de alto peso molecular (HMWK, por sus siglas en inglés). La calicreína plasmática está involucrada principalmente en la cascada intrínseca de coagulación y en la fibrinólisis. Además, a través del péptido bioactivo que genera (bradiquina, BK) regula el tono vascular y la inflamación (M. K. S. Wong, 2016).

Calicreína tisular

Las KLKs pertenecen a la familia S1 de quimotripsin y tripsin-serin-endopeptidasas (Pathak et al., 2013; Yousef et al., 2000). Aproximadamente el 80% de las serin-proteasas conocidas en humanos forman parte de la familia S1, entre ellas: las tripsinas, las quimotripsinas, trombinas, etc.

La familia de KLKs está codificada por 15 genes que se localizan en tándem en un cluster en el cromosoma 19 en humanos y en el cromosoma 7 en ratones (Yousef et al., 2000). Los genes que codifican para las KLKs consisten en 5 exones cuyas longitudes son similares entre todas las KLKs, y 4 intrones con longitudes variables entre KLKs. Las KLKs son sintetizadas como pro-enzimas que contienen un péptido señal en la porción amino terminal (Pre) que las dirige al retículo endoplasmático para su posterior secreción, y un pro-péptido (Pro) que mantiene a las proteasas inactivas (zimógenos) (**figura 1.2**). Los zimógenos se activan en la matriz extracelular, principalmente por la hidrólisis de pro-péptido a cargo de una proteína tipo tripsina, luego de una lisina o una arginina, exceptuando el caso de la pro-KLK4 que es activada por metaloproteasas, luego de una glutamina (Yoon et al., 2009). También han sido descritos otros mecanismos de activación de zimógenos como la auto-activación (KLK2, KLK6 y KLK13) o la activación por otras KLKs (cascada de activación, KLK3 es activada por KLK2, KLK4 y KLK15) (Pampalakis & Sotiropoulou, 2007).

El proceso de activación de las pro-KLKs es importante en la regulación de la actividad de dichas proteasas en los distintos tejidos y por eso se ha postulado que la activación ocurre vía cascadas de activación similares a las involucradas en la coagulación, la fibrinólisis y el sistema de complemento (Pampalakis & Sotiropoulou, 2007; Yoon et al., 2007).

Por otro lado, la actividad proteasa de las KLKs está finamente regulada por inhibidores endógenos como las macroglobulinas y las serpinas (Goettig et al., 2010). Además, el pH y los cationes divalentes como el Zinc también han sido descritos como inhibidores de KLKs, en particular para KLK2 y KLK3 (Swedberg et al., 2010).

Los desbalances en la regulación de la actividad local de KLK han sido asociados a numerosas patologías como enfermedades respiratorias, neurodegeneración, inflamación patológica y cáncer (Prassas et al., 2015). De este modo, se han

desarrollado numerosos fármacos orientados a la inhibición específica de las KLKs como posible blanco terapéutico (Sotiropoulou & Pampalakis, 2012; Swedberg et al., 2010).

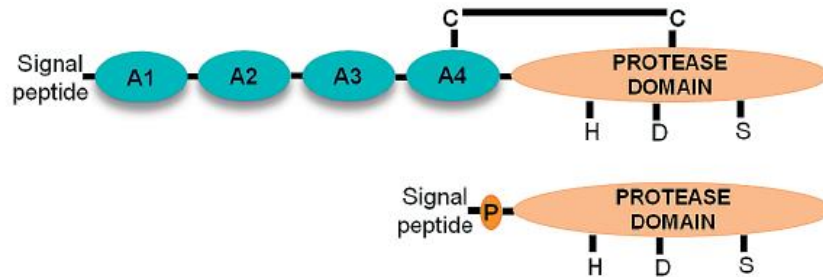


Figura 1.1. Dominios de PK y KLK. Arriba, ilustración de la caliceína plasmática. Posee 4 dominios A1-A4 y tres aminoácidos (His57, Asp102 y Ser195) en el dominio catalítico. La estructura de PK posee además un puente disulfuro (c-c) entre las cadenas pesada y liviana de la proteasa. En cambio, la caliceína tisular (abajo) sólo posee el dominio catalítico unido a un propéptido (P). Ilustración tomada de (Pathak et al., 2013).

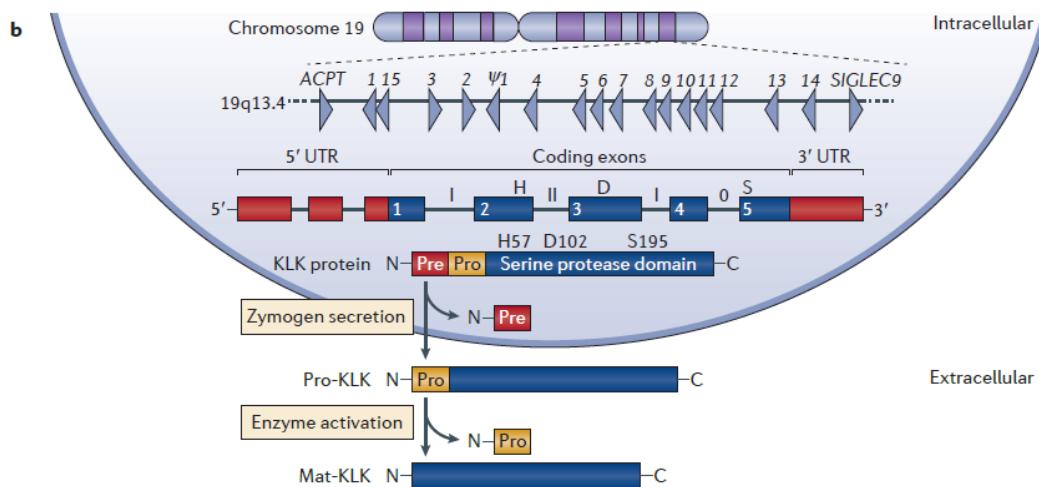


Figura 1.2. Estructura genómica y proteica de la familia de KLKs. En humanos el cluster de KLKs se encuentra en el cromosoma 19. Cada flecha representa un gen y la dirección de la transcripción. Las letras H, D y S refieren a la triada aminoacídica catalítica típica de las serin-proteasas (histidina, ácido aspártico y serina). Las KLKs se sintetizan como pre-pro-enzimas que se dirigen al retículo endoplasmático para su secreción post-clivaje proteico de la secuencia Pre. En matriz extracelular los zimógenos de KLK se activan por clivaje proteico de la secuencia Pro por proteasas del tipo tripsina. Esquema adaptado de (Prassas et al., 2015).

El perfil de expresión de las KLKs depende de la isoforma de KLK. Por un lado, algunas KLKs se expresan exclusivamente en un tejido, como por ejemplo KLK2 y KLK3 sólo están expresadas en la próstata. Por otro lado, su expresión puede estar restringida a un determinado número de tejidos, como en el caso de las KLKs5-8 y KLK13, o finalmente, su expresión puede ser ubicua, como por ejemplo KLK1, KLKs9-11 y KLK14 (Shaw & Diamandis, 2007). En la **tabla 1.1** se resumen las principales funciones de las KLKs y las enfermedades asociadas (Prassas et al., 2015).

Tabla 1.1. Listado de las principales KLKs, función, localización y enfermedades asociadas.

	Principal lugar de expresión	Función principal	Enfermedades asociadas
KLK 1	Ubicua	Reducción de la presión sanguínea Bronco-constricción e hipersecreción de mucus	Anomalías cardiovasculares Deficiencias en la absorción renal tubular Asma
KLK 3	Próstata	Cliva fibronectina, semenogelina I y II favoreciendo la licuación del semen y la motilidad espermática	Media la progresión y metástasis del cáncer de próstata, principalmente a los huesos.
KLK 4	Ubicua	Participación en la amelogénesis facilitando la expansión lateral del cristal de hidroxapatita de los dientes vía TGFβ	Media la transición epitelio-mesenquimal en el cáncer de próstata con metástasis a hueso Amelogénesis imperfecta
KLK 5	Piel, esófago, glándula salival, mama	Promueve la descamación y la proliferación de los queratinocitos. Modula la permeabilidad de la barrera epitelial. Induce la respuesta inmune innata por procesamiento antimicrobial.	Síndrome de Netherton Dermatitis atópica
KLK 6	Cerebro, sistema nervioso central	Cliva al precursor proteico amiloide (APP) Degrada alfa-synuclein	Enfermedad de Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple
KLK 7	Esófago, corazón, hígado, piel	Participa en la cascada de activación de KLK 5 en la piel	Síndrome de Netherton Dermatitis atópica Psoriasis
KLK 8	Hipocampo, núcleo lateral de la amígdala, mama, esófago, hígado	Cliva la molécula neural presináptica de adhesión L1 (L1CAM o NCAML1) estimulando <i>Long Term Potentiation</i> (LTP) Participa en la cascada de activación de KLK 5 en la piel	Esquizofrenia Psoriasis

De todas las *KLKs* mencionadas, en este trabajo nos focalizaremos en la *KLK1*. Fue la primera descrita en la década del 30 y se la asocia principalmente con el sistema cardiovascular y renal. *KLK1* no actúa sola, sino que forma parte de un complejo sistema conocido como el sistema calicreína-quininas (KKS).

Sistema calicreína tisular-quininas (KKS)

El sistema calicreína-quininas (KKS) es complejo y está involucrado tanto en procesos fisiológicos como por ejemplo la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis del sodio, como en procesos patológicos como la injuria y la inflamación (Campbell, 2000).

El KKS involucra una cascada de enzimas proteolíticas y péptidos bioactivos. La única fuente de quininas son los quinínógenos de alto o bajo peso molecular (HMWK y LMWK, respectivamente, por sus siglas en inglés). Ambas proteínas están codificadas por un mismo gen y se expresan principalmente en el hígado. Sin embargo, en menor medida también pueden producirse localmente en otros tejidos (Campbell, 2000; Julie Chao et al., 2014).

Las quininas se forman por clivaje proteico de los quinínógenos realizado por 2 enzimas; la calicreína plasmática (*KLK1B*) y la calicreína tisular (*KLK1*). *KLK1B* se sintetiza en el hígado y cliva HMWK para formar bradiquinina (BK), mientras que *KLK1* cliva al LMWK para producir Lys-bradiquinina (Lys-BK), también conocida como calidina (Leeb-Lundberg, Marceau, Muller-Esterl, et al., 2005) (**figura 1.3**). Posteriormente, Lys-BK puede metabolizarse a BK por acción de aminopeptidasas. Una vez producidas, las quininas son rápidamente digeridas por las quininasas I, generando quininas inactivas; o por las quininasas II (carboxipeptidasas nucleares y plasmáticas, CPN y CPM respectivamente) produciendo los metabolitos de Lys-BK y BK conocidos como Des-Arg-Lys-BK y Des-Arg-BK (**figura 1.3 y 1.4**). La quininasa II también se conoce con el nombre de enzima convertidora de angiotensina (ACE). Dado que el sistema calicreína-quininas y el sistema renina-angiotensina comparten una enzima, se propone que ambos sistemas actúan en conjunto regulando la homeostasis del sistema cardiovascular.

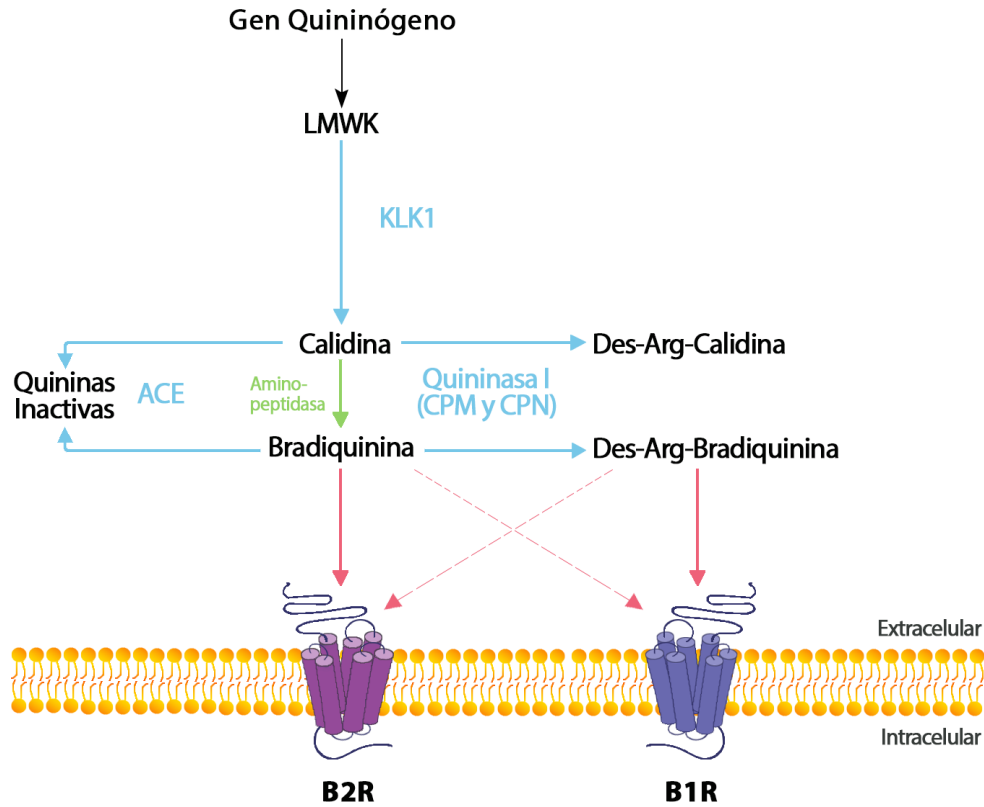


Figura 1.3. Esquema del sistema caliceína-quininas. La función más conocida de KLK1 es el clivaje proteico del quinínogeno de bajo peso molecular (LMWK) que da origen a Lys-Bradiquinina o calidina (Kallidin o Lys-BK). Posteriormente Lys-BK puede ser digerida a BK por aminopeptidasas. Las quininas actúan principalmente a través del receptor constitutivo B2 (B2R). Este receptor media las acciones clásicas de las quininas como por ejemplo vasodilatación, natriuresis e inflamación aguda, entre otras. Por otro lado, las quininas pueden ser inactivadas por quininasas de tipo I (también conocida como enzima convertidora de angiotensina, ACE) o metabolizadas por quininasas de tipo II (carboxipeptidasas de membrana o nucleares, CPM y CPN, respectivamente), formando los metabolitos de las quininas (Des-Arg-KD y Des-Arg-BK) que tienen mayor afinidad por el receptor de tipo inducible B1 (B1R).

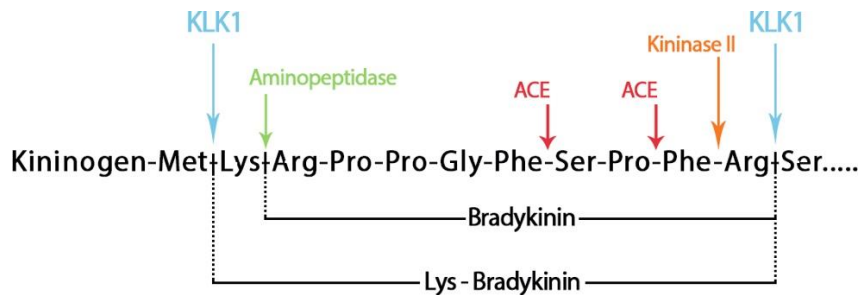


Figura 1.4. Estructura primaria de las quininas y su procesamiento por distintas proteasas.

Las quininas son péptidos involucrados principalmente en la regulación de la presión sanguínea en el sistema renal y cardiovascular, es por ello que se las ha implicado en distintas condiciones patológicas como la hipertensión y la inflamación (Bhoola et al., 1992).

La acción de las quininas está mediada por 2 tipos de receptores de siete dominios transmembrana, acoplados a proteínas G: B1 y B2. El receptor tipo 2 (B2R) es ubicuo y se encuentra constitutivamente expresado en los tejidos, mediando la mayor parte de las acciones conocidas de las quininas. Por el contrario, el receptor tipo 1 (B1R) se encuentra en muy baja o nula expresión en los tejidos, pero es fuertemente inducido frente a procesos patológicos como por ejemplo isquemia del miocardio (Foucart et al., 1997) e inflamación (Schremmer-Danninger et al., 1998). BK y Lys-BK se unen principalmente a B2R, mientras que los metabolitos de las quininas (originados por la quininasa II) poseen mayor afinidad por B1R (Regoli et al., 1989) (**figura 1.3 y 1.4**).

Tanto B2R como B1R actúan principalmente a través de la proteína Gq para estimular la fosfolipasa A2 y C, seguido por la hidrólisis de inositol fosfato y la movilización del calcio intracelular. Se ha descrito que también pueden activar la proteína Gi para inhibir a la adenilato ciclasa y activar la vía de MAPKs (Leeb-Lundberg, Marceau, Muller-Esterl, et al., 2005). La estructura y mecanismos de señalización de los receptores serán descritos en profundidad en el **capítulo 3**.

Finalmente el sistema KLK1-quininas cuenta con un inhibidor de serin-proteasas, fisiológico y específico de KLK1: la calistatina (J Chao et al., 1996, 2001; Goettig et al., 2010). Recientemente, se le han asignado a la calistatina importantes roles en la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento tumoral (J Chao et al., 2001).

Si bien la principal función fisiológica de la KLK1 está relacionada con el control de la función arterial y la vasodilatación fisiológica, siendo el quininógeno su sustrato más conocido y las quininas su principal producto, esta enzima se encuentra expresada en distintos tejidos con funciones endócrinas (Diamandis & Yousef, 2002). Es más, se ha descrito que KLK1 está regulada por hormonas esteroideas (Allen et al., 2002; Murone et al., 1999; Singh et al., 2011) y se la ha implicado en el procesamiento de factores de crecimiento y hormonas peptídicas en la hipófisis, el páncreas y otros tejidos. Se ha comprobado *in vitro* su capacidad de escindir pro-colagenasa, pro-insulina, pro-renina, Enac, lipoproteínas de baja densidad y POMC (Diamandis & Yousef, 2002). Por otro lado, ha sido descrito que en varios tejidos

existe una interacción entre los sistemas TGF β 1 y calicreína-quinina (Emami & Diamandis, 2010a; Moodley et al., 2005; Xia et al., 2005). Exceptuando su función renal y cardíaca, extensamente estudiada, la importancia fisiológica de KLK1 en otros tejidos es aún desconocida. Las hipótesis descriptas provienen de estudios principalmente *in vitro*, por lo tanto, se desconoce qué otros productos fisiológicos diferentes a las quininas son generados por KLK1 *in vivo*.

Sistema KLK1-quininas hipofisario

En la literatura ha sido descripta la expresión de ARNm y proteína de KLK1 en la glándula hipofisaria (Powers & Nasjletti, 1983). Powers y colaboradores, en 1984 encontraron una abundante expresión de KLK1 en la hipófisis de ratas colocalizando con prolactina y cuya expresión es inducida por estrógenos e inhibida por dopamina (Powers & Nasjletti, 1984). Curiosamente, describieron también una marcada diferencia sexual; la expresión de KLK1 es significativamente mayor en la adenohipófisis de ratas hembra comparada con machos (Powers & Nasjletti, 1984). Por otro lado, se ha descrito también la expresión de otros componentes del sistema calicreína quininas en hipófisis de ratas; BK, Lys-BK, B1R y B2R.

Finalmente, la expresión de calistatina, inhibidor fisiológico y específico de la acción de KLK1, no ha sido estudiada en la glándula hipofisaria. Tampoco se ha estudiado si existe alteración en la proporción de expresión de los receptores B1/B2 o las alteraciones del sistema KLK1-quininas hipofisario durante el desarrollo de un prolactinoma.

KLK1 en adenomas hipofisarios

Existen evidencias de que los prolactinomas humanos y los prolactinomas inducidos en ratas presentan una expresión incrementada de KLK1, que en el caso de los humanos disminuye si se realiza un tratamiento con agonistas del receptor de dopamina tipo 2 (Jones et al., 1990; S I Kuan et al., 1990). Por otro lado, en un estudio realizado en 1990, Jones y colaboradores encontraron que la inmunorreactividad de KLK1 colocaliza con prolactina en los once adenomas humanos secretores de prolactina examinados (Jones et al., 1990).

Objetivos capítulo 1

En base a los antecedentes mencionados y teniendo en cuenta que tanto el modelo animal *Drd2KO* como los ratones *hCG β +* presentan un marcado dimorfismo sexual en la generación de prolactinomas, nos propusimos caracterizar al sistema KLK1-quininas (KKS) en ambos modelos experimentales, tanto en hembras como en machos, como una primera aproximación al estudio del rol de KLK1 y su sistema en la fisio-patología hipofisaria.

Objetivos específicos

- ⇒ Estudiar la expresión génica de los distintos componentes del sistema KLK1-quininas comparativamente entre sexos y genotipos, tanto en el modelo *Drd2KO*, como en el de ratones *hCG β +*.
- ⇒ Estudiar la expresión proteica de los receptores de bradiquinina (B2R y B1R) específicamente en los distintos tipos celulares hipofisarios.
- ⇒ Estudiar la regulación aguda y crónica ejercida por DA sobre el sistema KLK1-quininas mediante tratamientos *in vivo* con drogas dopamiérgicas y en animales *Drd2KO* (respectivamente).
- ⇒ Estudiar la regulación aguda y crónica ejercida por E2 sobre el sistema KLK1-quininas mediante tratamientos *in vivo* con valerato de estradiol y hembras ovariectomizadas (respectivamente).

Resultados capítulo 1

Dimorfismo sexual en el desarrollo de prolactinomas en dos modelos animales: ratones *Drd2*KO y ratones *hCGβ*⁺

Comenzamos el estudio evaluando dos parámetros tumorales en los dos modelos animales de prolactinoma; ratones *Drd2*KO y ratones *hCGβ*⁺ comparativamente entre sexos y genotipos. Como fue previamente descrito, tanto las hembras *Drd2*KO como las hembras *hCGβ*⁺ a los 8 meses de edad y 6 meses de edad, respectivamente, presentan un aumento significativo del peso hipofisario respecto de sus pares WT y de los machos de ambos genotipos (**figura 1.4A y 1.4C**) (Erika Y. Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2013; Rulli et al., 2002). Por radioinmunoensayo (RIA) evaluamos los niveles séricos de prolactina y, como puede observarse en la **figura 1.4B y 1.4D**, las hembras *Drd2*KO y las hembras *hCGβ*⁺ presentan una marcada hiperprolactinemia. El aumento en los niveles de prolactina no se evidenció en los machos, independientemente del genotipo.

Estos resultados muestran que las hembras transgénicas de ambos modelos animales comparten las características asociadas al desarrollo tumoral: un aumento en el peso hipofisario acompañado de una marcada hiperprolactinemia.

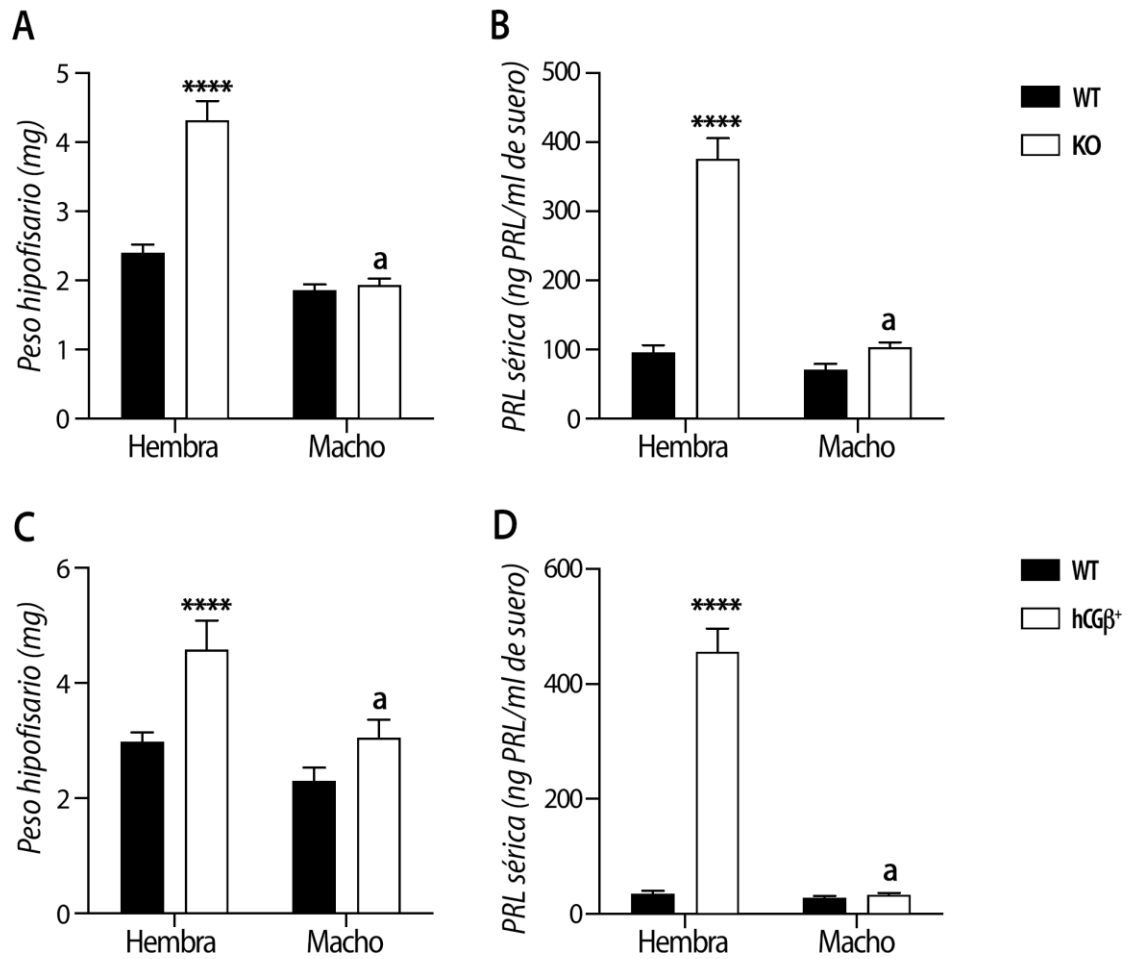


Figura 1.4. Parámetros tumorales en dos modelos animales de prolactinoma: *Drd2*KO and *hCGβ*⁺. (A) Peso hipofisario y (B) Prolactina en suero en el modelo *Drd2*KO. Análisis estadístico: ANOVA dos factores (sexo, genotipo e interacción $p < 0.0001$), seguido de la prueba de Tukey. **** $p < 0.0001$ vs hembra WT. “a” $p < 0.0001$ vs hembra KO. N=25 por grupo. (C) Peso hipofisario y (D) Prolactina en suero en el modelo *hCGβ*⁺. Análisis estadístico: ANOVA dos factores (sexo, genotipo e interacción $p < 0.0001$), seguido de la prueba de Tukey. **** $p < 0.0001$ vs hembra WT. “a” $p < 0.0001$ vs hembra *hCGβ*⁺. N=6 por grupo.

Caracterización del Sistema *KLK1*-quininas en hipófisis normales y tumorales (prolactinoma)

Iniciamos la caracterización del sistema *KLK1*-quininas (KKS) estudiando la expresión génica, por RT-qPCR de los distintos componentes de sistema en la hipófisis, en los dos modelos animales de prolactinoma.

A los 6 meses de edad, en las hembras *hCGβ+* se observa una alteración en la expresión génica de los componentes del KKS con el desarrollo de un prolactinoma, evidenciado por una disminución en los niveles de ARNm de *KLK1* y *ACE*, respecto las hembras WT (**figura 1.5A y 1.5D**, respectivamente) y un aumento de la expresión de los receptores (*B1R* y *B2R*) y de la enzima *CPM* (**figura 1.5B-C y 1.5E**, respectivamente) comparado con sus pares WT.

Observamos una marcada diferencia genotípica en la expresión génica de *CPM* en los machos (**figura 1.5E**), siendo ésta significativamente menor en los machos transgénicos (*hCGβ+*) respecto de sus pares WT, probablemente debido a un diferente entorno hormonal. Nuevos experimentos serán necesarios para conocer la causa de esta diferencia genotípica observada en machos.

Finalmente, observamos una marcada diferencia sexual en el KKS, siendo los niveles de ARNm de los diferentes componentes del sistema evaluados significativamente mayores en hipófisis provenientes de machos que en las hembras, independientemente de su genotipo.

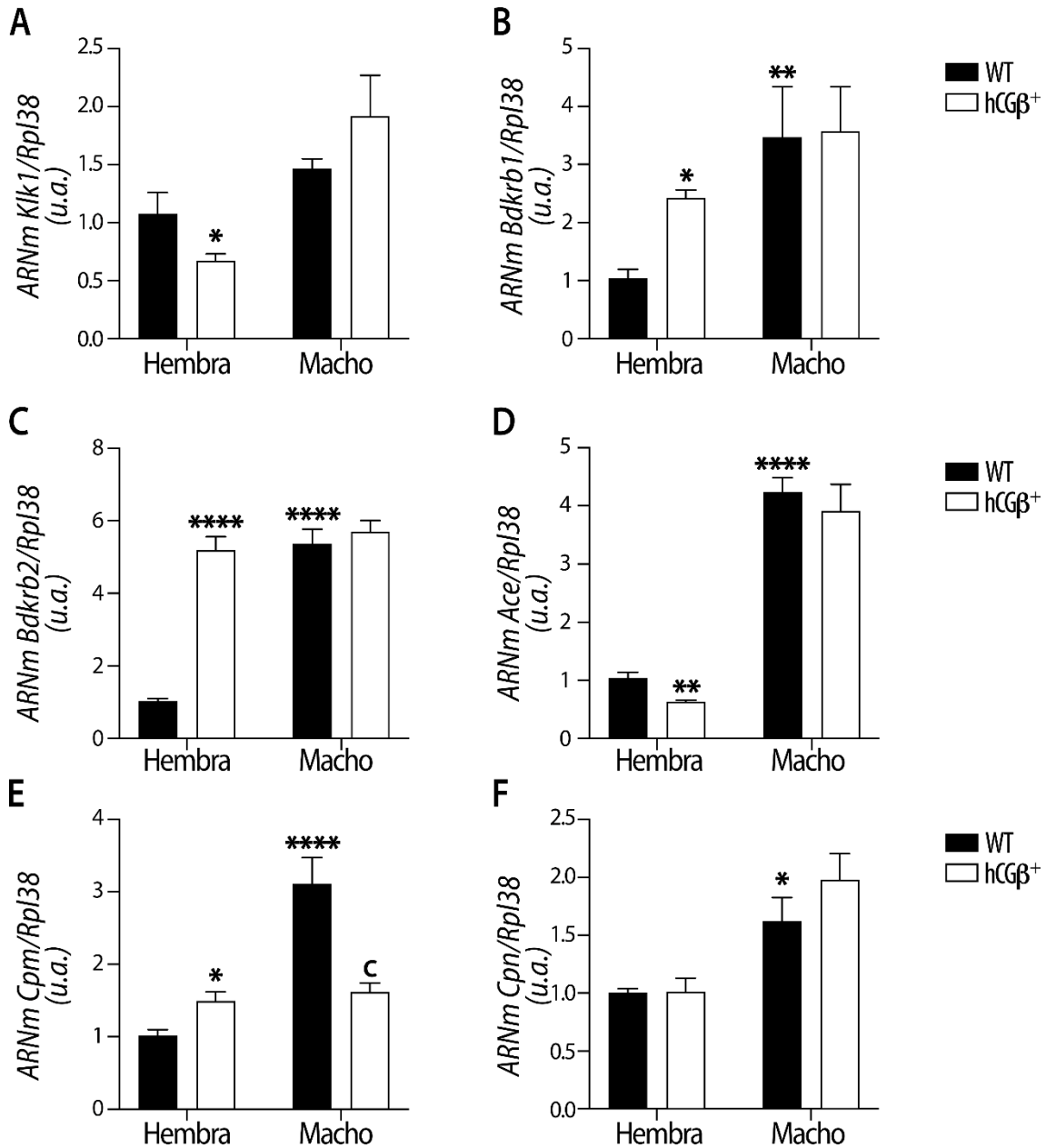


Figura 1.5. Expresión del ARN mensajero de los componentes del sistema *KLK1*-quininas hipofisario en el modelo animal hCG. La expresión relativa de ARNm fue evaluada por RT-qPCR. Los transcritos fueron amplificados con oligonucleótidos específicos para cada gen (tabla 3, sección materiales y métodos) y normalizados a Rpl38 y luego a hembras WT. Cada set de datos fue analizado estadísticamente con un ANOVA de dos factores, seguido de una prueba de Tukey. **(A) *Klk1*.** Interacción $p=0.0170$, sexo $p<0.0001$. “a” $p<0.0001$ vs hembra hCGβ⁺. N=6 por grupo. **(B) *Bdkrb1*.** Sexo $p=0.0030$, genotipo $p=0.0305$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs hembra WT. N=6 por grupo. **(C) *Bdkrb2*.** Interacción, sexo y genotipo $p<0.0001$. **** $p<0.0001$ vs hembra WT. N=6 por grupo. **(D) *Ace*.** Interacción $p=0.0428$, sexo $p<0.0001$ y genotipo $p=0.0028$. ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ vs hembra WT. N=6 por grupo. **(E) *Cpm*.** Interacción y sexo $p<0.0001$. * $p<0.05$, **** $p<0.0001$ vs hembra WT. “c” $p<0.01$ vs macho WT. N=6 por grupo. **(F) *Cpn*.** Sexo $p<0.0001$. * $p<0.05$ vs hembra WT. N=6 por grupo.

Por otro lado, en el modelo *Drd2KO* encontramos que la expresión génica de *KLK1* (**figura 1.6A**), *ACE* (**figura 1.6D**) y *CPN* (**figura 1.6F**) está disminuida en las hembras *KO*, mientras que la expresión de *CPM* no se vio alterada. Respecto a los receptores, observamos un incremento en la expresión de *B2R* en hipófisis tumorales (8 meses de edad) respecto de sus pares *WT* (**figura 1.6C**), sin verse alterada la expresión del *B1R* (**figura 1.6B**). Además, al igual que en el modelo *hCG β* , la expresión de todos los componentes del sistema evaluados presenta una marcada diferencia sexual: los machos presentan niveles de expresión relativa elevados respecto de las hembras *WT*, independientemente del genotipo (**figura 1.6**).

Finalmente, observamos una diferencia genotípica la expresión génica de *KLK1* y *ACE* tanto en machos como en hembras, sugiriendo una regulación dopaminérgica positiva en de la expresión de dichos genes. Este punto será desarrollado más adelante.

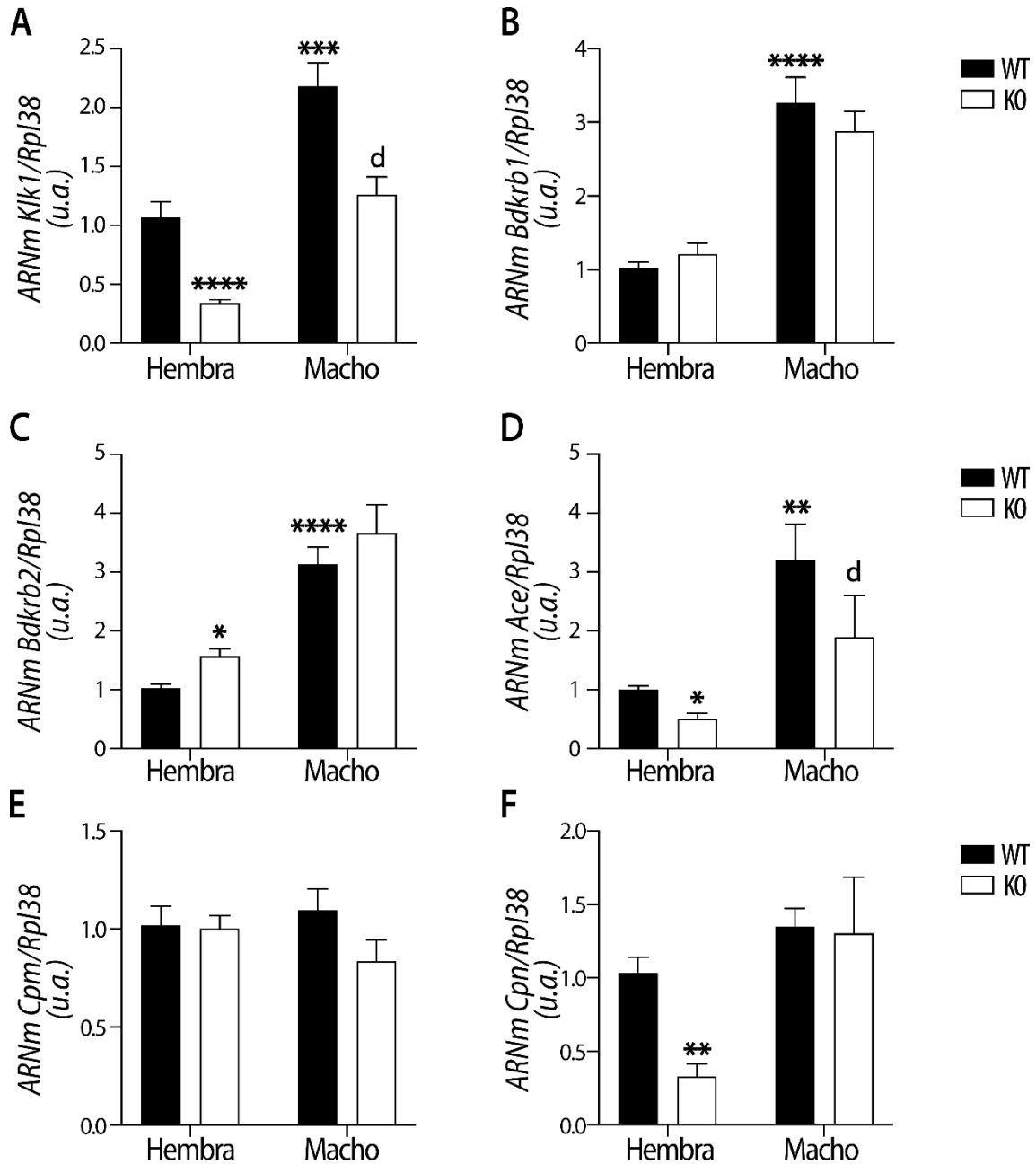


Figura 1.6. Expresión del ARN mensajero de los componentes del sistema *KLK1*-quininas hipofisario en el modelo animal *Drd2*KO. La expresión relativa de ARNm fue evaluada por RT-qPCR. Los transcritos fueron amplificados con oligonucleótidos específicos para cada gen (tabla 3, sección materiales y métodos) y normalizados a *Rpl38* y luego a hembras WT. Cada set de datos fue analizado estadísticamente con un ANOVA de dos factores, seguido de una prueba de Tukey, si hay interacción entre factores. **(A) *Klk1*.** Interacción $p=0.0316$, sexo y genotipo $p<0.0001$. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$ vs hembra WT. “d” $p<0.05$ vs macho WT. * $p<0.05$ N=8-11 por grupo. **(B) *Bdkrb1*.** Sexo $p=0.0001$. **** $p<0.0001$ vs hembra WT. N=10 por grupo. **(C) *Bdkrb2*.** Sexo $p<0.0001$. **** $p<0.0001$ vs hembra WT. N=10 por grupo. **(D) *Ace*.** Sexo $p<0.0001$ y genotipo $p=0.0008$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs hembra WT. “d” $p<0.05$ vs macho WT. N=5 por grupo. **(E) *Cpm*.** ANOVA no significativo (NS). N=5 por grupo. **(F) *Cpn*.** Interacción $p=0.0036$ y genotipo $p=0.0051$. ** $p<0.01$ vs hembra WT. N=5 por grupo.

Continuamos la caracterización evaluando la proporción relativa de los receptores de quininas (B1R y B2R) sobre el total de BRs (B1R + B2R). Para ello, con valores de $2^{-\Delta Ct}$ obtenidos por RT-qPCR se realizó un análisis cualitativo de la abundancia putativa de cada ARNm, el cual se representa con un gráfico de torta. Este análisis sugiere que el B2R representa alrededor del 97% de los BRs hipofisarios en el modelo *Drd2KO* (**figura 1.7**) y aproximadamente un 99% en los ratones *hCG β* (**figura 1.8**), independientemente del sexo y del genotipo. Sorpresivamente, la expresión relativa de B1R no se vio incrementada en las hembras tumorales (hembras KO y hembras *hCG β*).

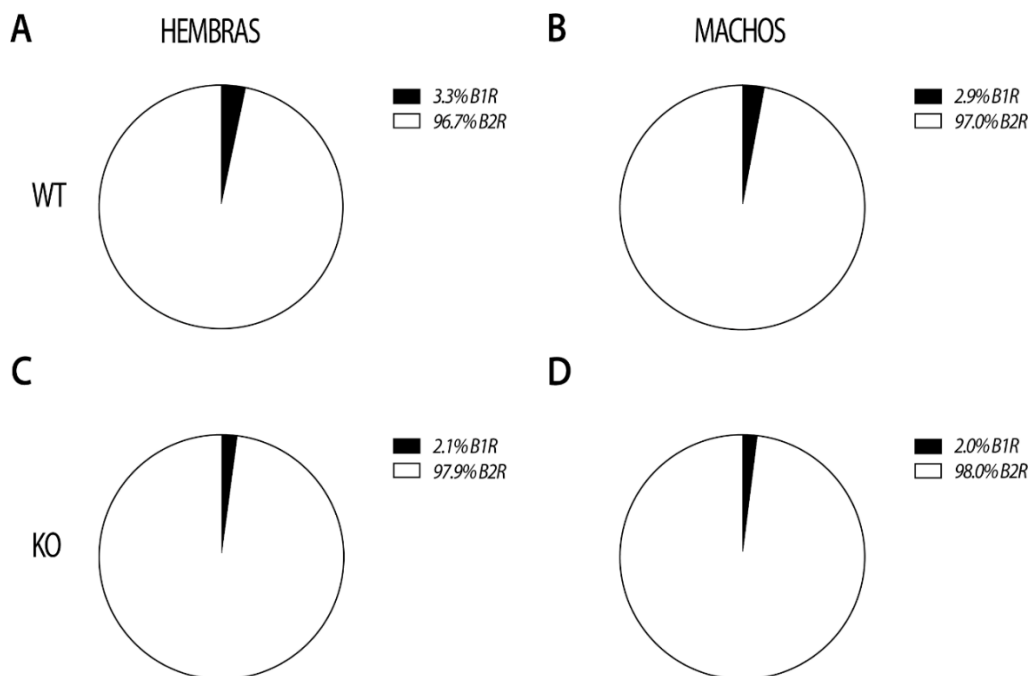


Figura 1.7. Representación gráfica de la proporción relativa de los BRs en ratones *Drd2KO* y WT. (A) Hembras WT, (B) Machos WT, (C) Hembras KO y (D) Machos KO. N=10. La proporción relativa de cada gen se calculó como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{RPL38}})}$). Los valores están expresados como % de BRs total (B1R+B2R).

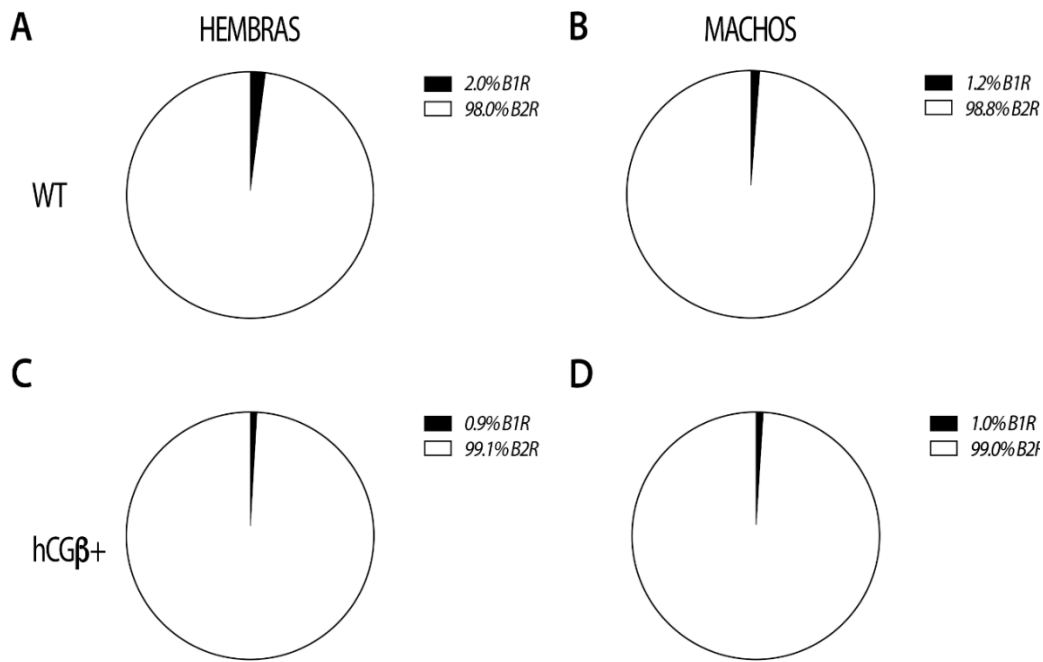


Figura 1.8. Representación gráfica de la proporción relativa de los BRs en ratones hCGβ+ y WT. (A) Hembras WT, (B) Machos WT, (C) Hembras hCGβ+ y (D) Machos hCGβ+. N=5. La proporción relativa de cada gen se calculó como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct \text{ gene}-Ct \text{ RPL38})}$). Los valores están expresados como % de BRs total (B1R+B2R).

Era de nuestro interés conocer en qué tipos celulares hipofisarios se expresaban los receptores de quininas. Para ello, una vez corroborada su expresión génica en la adenohipófisis, estudiamos su expresión proteica por inmunofluorescencia en cortes congelados de hipófisis de ratones WT y *Drd2*KO. Desafortunadamente, la expresión proteica de B1R no pudo ser determinada. Hipotetizamos que su expresión es muy baja en la hipófisis ya que por RT-qPCR fue difícil medirlo, incluso los ciclos a los cuales se detectó este gen fueron altos (alrededor del ciclo 32-34). Más aún, las figuras 1.7 y 1.8. muestran una abundancia relativa de aproximadamente 1-2% del total de los BRs. Teniendo en cuenta que B1R es un receptor inducible en condiciones patológicas, nuestros resultados sugieren que este receptor presenta una baja expresión constitutiva en la glándula hipofisaria y no se induce con el desarrollo de una hiperplasia hipofisaria en los modelos animales estudiados, a las edades estudiadas.

Respecto del B2R, primero estudiamos su expresión proteica específicamente en los lactotrofos realizando co-localizaciones con prolactina mediante doble inmunofluorescencias. Como se observa en la **figura 1.9** los lactotrofos (verde, PRL+) expresan B2R (magenta), independientemente del sexo y del genotipo.

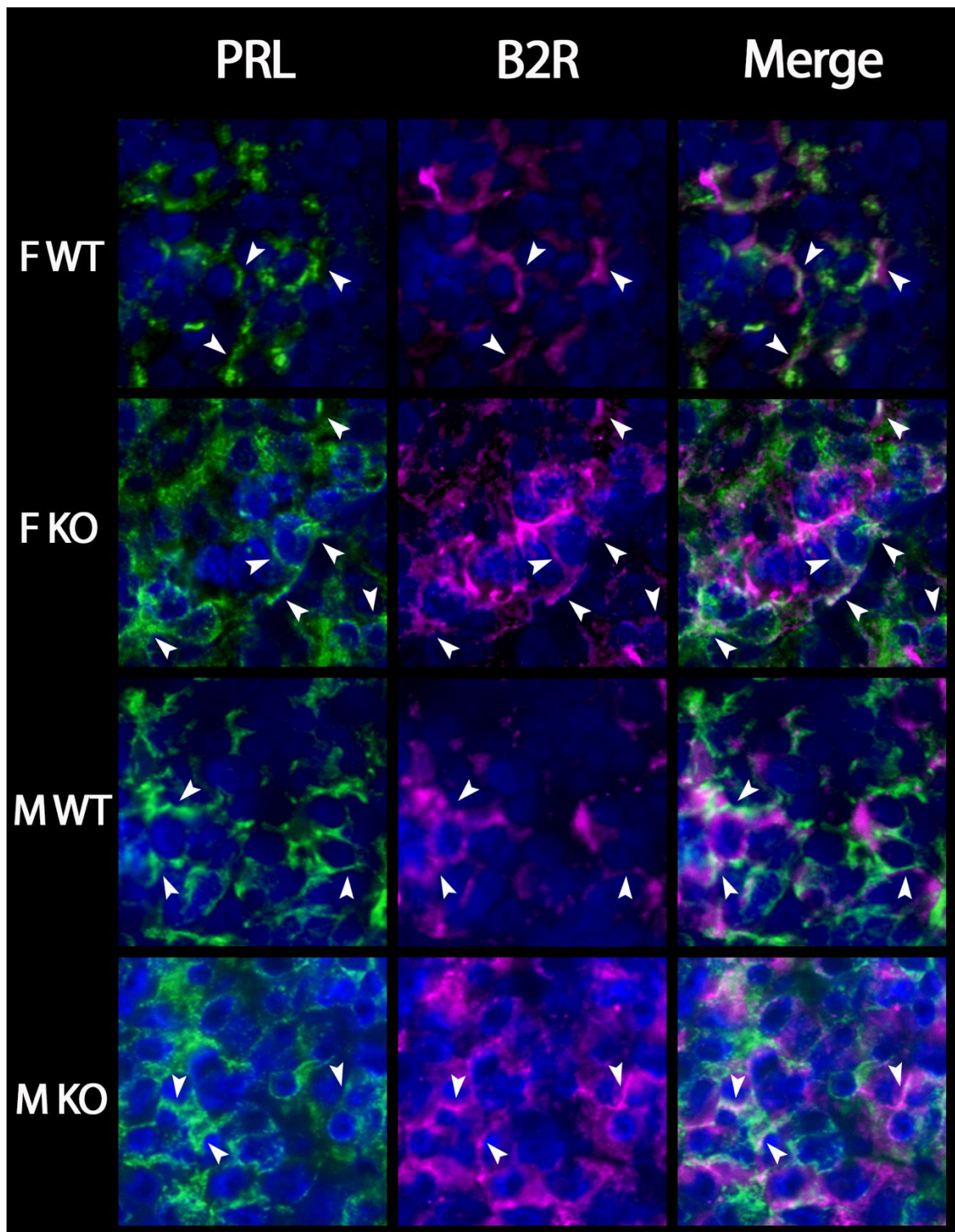


Figura 1.9. Expresión de B2R en lactotiros de ratones *Drd2*KO y WT. La identificación de B2R (magenta) y co-localización con PRL (verde) se realizó por doble inmunofluorescencia indirecta en cortes congelados de hipófisis de ratones *Drd2* WT y KO. Los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios específicos (anti-B2R 1:50, Alomone y anti-PRL 1:1000 Dr. A. Parlow) durante toda la noche y con anticuerpos secundarios acoplados a dos fluoróforos distintos (anti-rabbit 647 1:100, Santa Cruz, y anti-guinea pig 488 1:1000, Abcam). Los núcleos fueron identificados con DAPI (azul). Las flechas blancas indican zonas de co-localización.

Para profundizar aún ms nuestro estudio, cuantificamos la expresión de B2R y su co-localización con PRL utilizando el software FIJI/ImageJ. Como ha sido reportado anteriormente, en las hembras tumorales (Drd2KO) la proporción de lactotropos (PRL+) en la hipófisis aumenta en aproximadamente un 20% (**figura 1.10A**) (M. A. M. A. Camilletti et al., 2019), mientras que en los machos dicho incremento es de aproximadamente 10%.

Como se detalló en la introducción, la dopamina es el principal regulador inhibitorio de las funciones del lactotrofo, entre ellas, ejerce una regulación negativa de la proliferación celular de los lactotropos. En los ratones transgénicos Drd2KO existe una falta de regulación dopaminérgica ya que los animales carecen de receptores Drd2 funcionales, por lo tanto, la mayor proporción de lactotropos observada tanto en machos como en hembras Drd2KO podría estar dada principalmente por la ausencia del tono dopaminérgico.

Por otro lado, en concordancia con los resultados obtenidos al evaluar la expresión génica, la expresión proteica del receptor se encuentra incrementada en las hipófisis de hembras KO respecto de sus pares WT (**figura 1.10B**). Es interesante observar que este efecto está dado principalmente por el aumento de lactotropos positivos para el receptor. En la **figura 1.10C** se observa que la co-localización de B2R con PRL aumenta significativamente en los animales Drd2KO, tanto en hembras como en machos, sin alteración en la proporción de células lactotropas que no expresan B2R (**figura 1.10D**), independientemente del sexo y genotipo.

Además, los resultados de la cuantificación sugieren que hay células no lactotropas que expresan el receptor (B2R+PRL-), es decir, que expresan B2R, pero que no co-localizan con PRL. Este porcentaje de células es significativamente mayor en los machos respecto de las hembras (**figura 1.10E**). Estos resultados sugieren que en las hembras KO el aumento en la expresión de B2R podría estar dado específicamente en los lactotropos.

Finalmente, dado que existe una población de células no lactotropas que expresa B2R, realizamos doble inmunofluorescencias en cortes congelados de hipófisis para estudiar la co-localización de B2R con otras dos hormonas adenohipofisarias: GH y LH. Encontramos que tanto los somatotropos como los gonadotropos expresan B2R, independientemente del sexo y del genotipo (**figura 1.11** y **figura 1.12**, respectivamente).

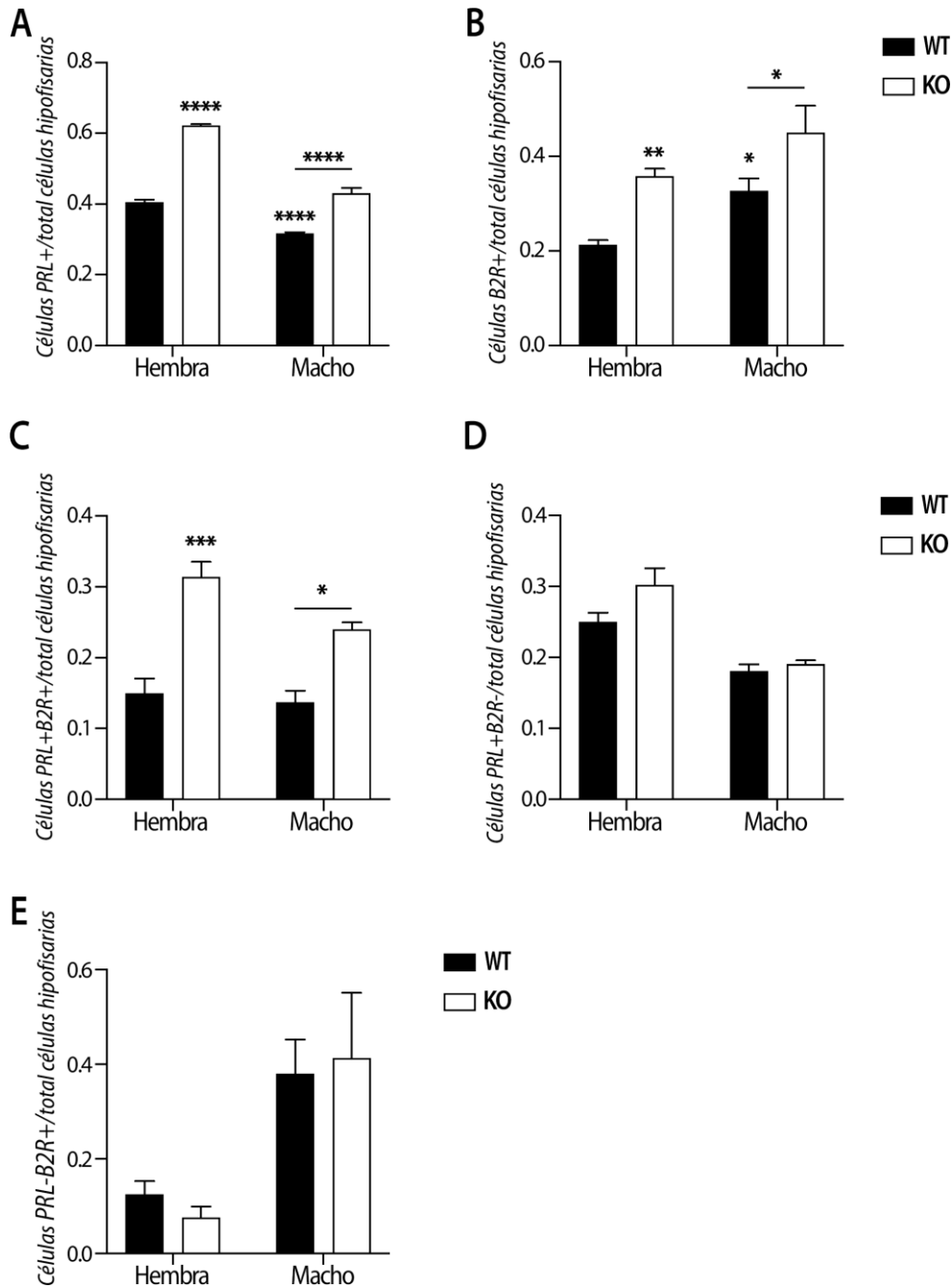


Figura 1.10. cuantificación de la expresión proteica de B2R y su co-localización con PRL en la hipófisis de animales *Drd2KO* y WT. La identificación de B2R y PRL fue determinada por doble inmunofluorescencia indirecta en cortes congelados de hipófisis. Los lactotropos y las células inmunorreactivas para B2R fueron cuantificadas en un total de 3000 – 7000 núcleos de 4-5 animales por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos factores, seguidos por la prueba de Tukey. **(A) Proporción de células PRL+ (lactotropos).** Interacción, genotipo y sexo $p < 0.0001$. **(B) Proporción de células B2R+.** Sexo $p = 0.0033$ y genotipo $p = 0.0005$. **(C) Proporción de lactotropos que expresan B2R (PRL+B2R+).** Genotipo $p < 0.0001$. **(D) Proporción de lactotropos que no expresan B2R (PRL+B2R-).** Sexo $p = 0.0005$. **(E) Proporción de células adenohipofisarias no lactotropas que expresan B2R (PRL-B2R+).** Sexo $p = 0.0008$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs hembra WT. “d” $p < 0.05$, “c” $p < 0.01$, “a” $p < 0.0001$ vs hembra KO.

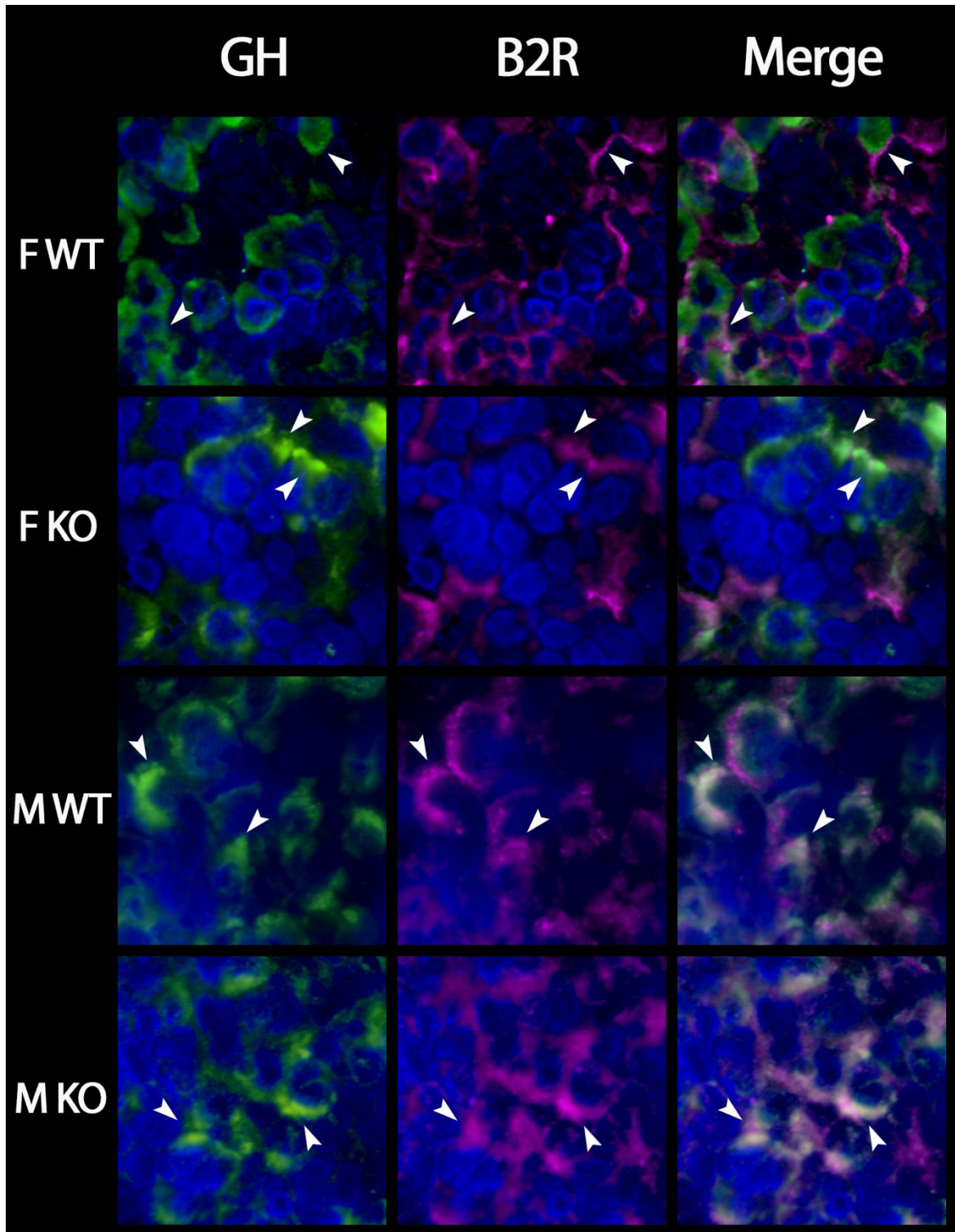


Figura 1.11. Expresión de B2R en somatotropos de ratones *Drd2*KO y WT. La identificación de B2R (magenta) y co-localización con GH (verde) se realizó por doble inmunofluorescencia indirecta en cortes congelados de hipófisis de ratones *Drd2* WT y KO. Los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios específicos (anti-B2R 1:50, Alomone y anti-GH 1:1000 Dr. A. Parlow) durante toda la noche y con anticuerpos secundarios acoplados a dos fluoróforos distintos (anti-rabbit 647 1:100, Santa Cruz, y anti-guinea pig 488 1:1000, Abcam). Los núcleos fueron identificados con DAPI (azul). Las flechas blancas indican zonas de co-localización.

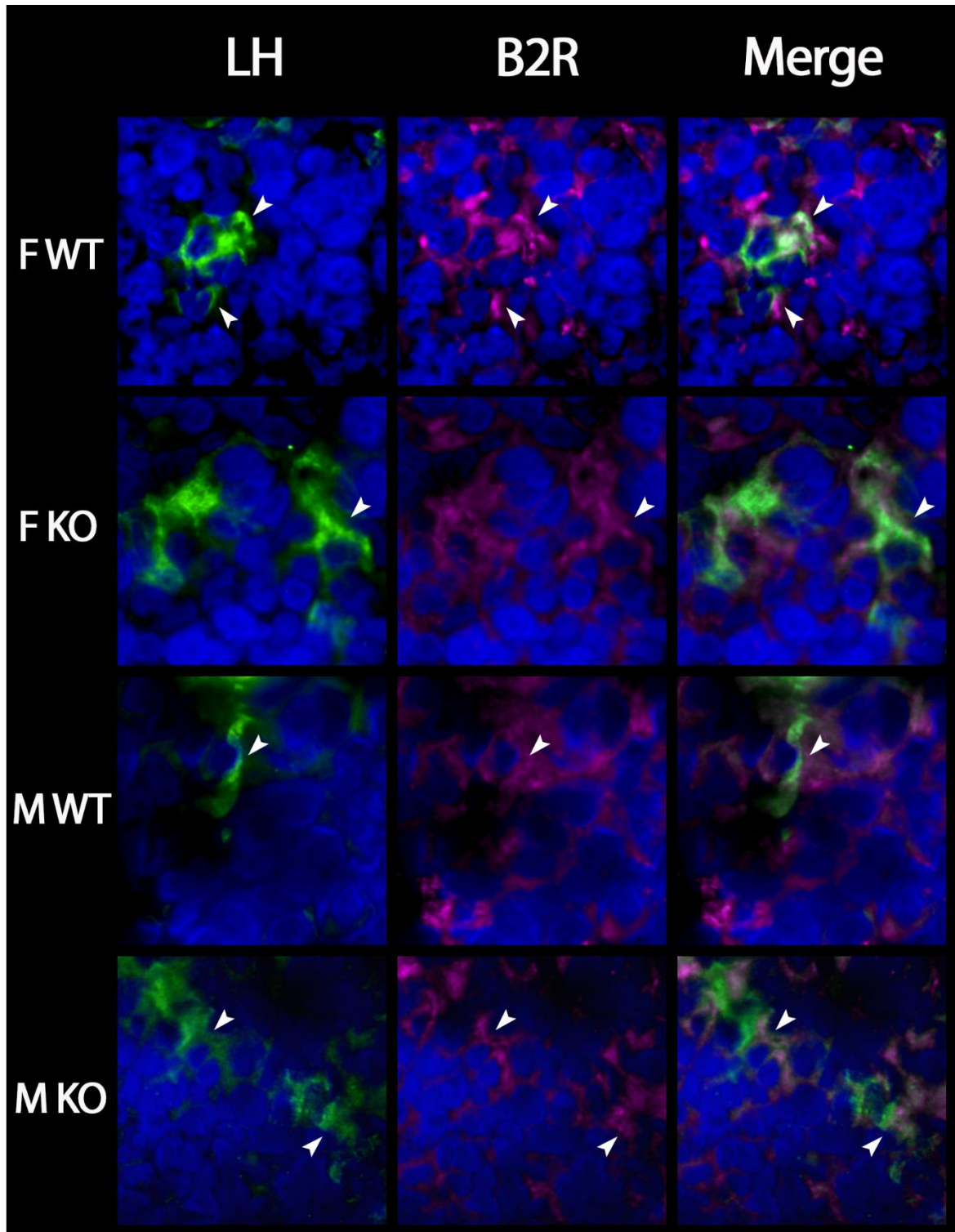


Figura 1.12. Expresión de B2R en gonadotropos de ratones *Drd2*KO y WT. La identificación de B2R (magenta) y co-localización con LH (verde) se realizó por doble inmunofluorescencia indirecta en cortes congelados de hipófisis de ratones *Drd2* WT y KO. Los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios específicos (anti-B2R 1:50, Alomone y anti-LH 1:1000 Dr. A. Parlow) durante toda la noche y con anticuerpos secundarios acoplados a dos fluoróforos distintos (anti-rabbit 647 1:100, Santa Cruz, y anti-guinea pig 488 1:1000, Abcam). Los núcleos fueron identificados con DAPI (azul). Las flechas blancas indican zonas de co-localización.

Regulación de dopamina y estradiol sobre el sistema *KLK1*-quininas

Como se mencionó anteriormente, la dopamina (DA) es el principal factor inhibitorio de las funciones del lactotrofo; regula negativamente la síntesis y secreción de prolactina e inhibe la proliferación de los lactotrofos actuando, principalmente, a través de los receptores de dopamina tipo 2.

Por otro lado, cuando realizamos la primera caracterización del sistema *KLK1*-quininas hipofisario, observamos variaciones en la expresión génica de sus componentes dependientes del genotipo e independientes del sexo (**figura 1.6A y 1.6D**), es decir alteraciones entre hembras y machos carentes de receptor dopaminérgico tipo 2 (*Drd2*KO) respecto a sus pares WT, sugiriendo una regulación de la expresión de estos componentes por DA.

Para corroborar esta hipótesis realizamos experimentos *in vivo* con drogas dopaminérgicas. Hembras y machos WT de 5 meses de edad fueron inyectados con el antagonista del *Drd2* (**Sulpiride** 5mg/kg, ip, Vipral, Ivax Argentina), o el agonista del receptor (**Cabergolina** 2mg/kg, ip, Laboratorio Beta, Buenos Aires), o solución fisiológica (ip) como control. Los animales fueron sacrificados a las 3hs post inyección, y se colectó sangre troncal para la medición de los niveles PRL sérica. Las adenohipófisis fueron recolectadas en QuickZol® para el análisis de la expresión génica de los distintos componentes del sistema *KLK*-quininas por RT-qPCR.

Como se observa en la **figura 1.13A**, el tratamiento con sulpiride produjo una marcada disminución de la expresión de *KLK1*, tanto en hembras como en machos, sugiriendo que la DA estimula la expresión de *KLK1* en ambos sexos. Este efecto positivo por parte de DA también fue observado sobre la expresión génica de las enzimas que degradan a las quininas: ACE y CPN (**figura 1.13D y 1.13E**, respectivamente), principalmente en hembras. Por el contrario, el tratamiento con sulpiride indujo un aumento en la expresión génica del B2R en hipófisis de hembras, lo que sugiere que DA inhibe la expresión génica de este receptor en este sexo, sin efecto en los machos (**figura 1.13C**). No se observa una regulación dopaminérgica en la expresión del gen que codifica para B1R (**figura 1.13D**).

Como control del tratamiento realizado evaluamos los niveles de prolactina en suero por RIA. Como ha sido ampliamente descripto, en las hembras se observa un marcado aumento de PRL en sangre con la administración de sulpiride y una disminución de los niveles de PRL luego de un tratamiento con cabergolina (**figura**

1.13F). En los machos el tratamiento con sulpiride elevó los niveles séricos de PRL, pero estos niveles no fueron modificados por cabergolina a la dosis y tiempo evaluados.

En resumen, estos resultados sugieren que DA regula la expresión de algunos de los componentes del sistema KLK1-quininas (*Klk1*, *Bdkrb2*, *Cpn* y *Ace*) y que dicha modulación es más importante en las hembras que en los machos.

Por otro lado, el E2 es el principal factor estimulador de los lactotropos; tiene un rol mitogénico sobre la población lactotropa, favorece la diferenciación de células somatotropas hacia el fenotipo de lactotrofo, estimula la síntesis y secreción de PRL, e inhibe la actividad de los receptores D2 localmente en la hipófisis, entre otras (N Ben-Jonathan & Hnasko, 2001; Freeman et al., 2000).

Como se observa en la **figura 1.6**, la expresión de los componentes del sistema KLK1-quininas presenta un marcado dimorfismo sexual. Dado que E2 un factor importante en la regulación de las funciones del lactotrofo y que encontramos importantes diferencias sexuales en la expresión del sistema KLK1-quininas, decidimos estudiar la regulación aguda y crónica de E2 sobre la expresión hipofisaria de los componentes del sistema.

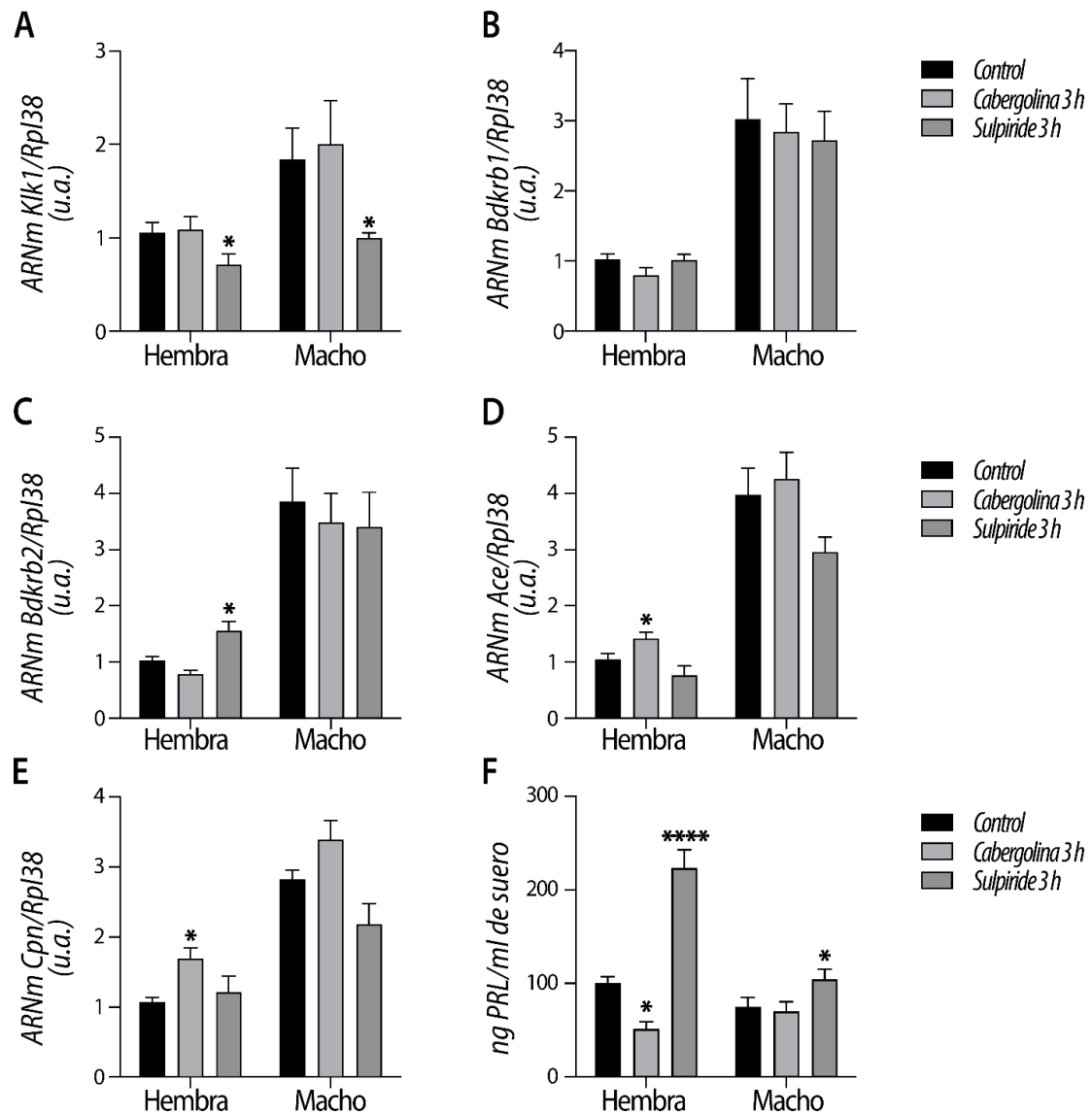


Figura 1.13. Regulación de la expresión de los componentes del sistema *KLK1*-quininas hipofisario por el agonista y antagonista de DA. Tratamientos *in vivo*. Ratones hembra y macho WT de 5 meses de edad fueron inyectados con solución salina (ip, control), con cabergolina (2 mg/kg, Laboratorio Beta, Buenos Aires) o con sulpiride (10 mg/kg, IVAX, Argentina) y sacrificados luego de 3 hs de tratamiento. La expresión génica de los componentes del sistema *KLK1*-quininas hipofisario fue medida por RT-qPCR. Los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y relativizados a las hembras control. Los resultados de hembras y machos fueron analizados estadísticamente por separado con un ANOVA de un factor seguido de la prueba de Dunnett. **(A) *Klk1*.** Hembras: ANOVA $p=0.0167$. * $p=0.0270$ vs control. Machos: ANOVA $p=0.0158$. * $p=0.0301$ vs control. **(B) *Bdkrb1*.** Hembras y machos ANOVA NS. **(C) *Bdkrb2*.** Hembras: ANOVA $p<0.0001$. * $p=0.0141$ vs control. Machos: ANOVA NS. **(D) *Ace*.** Hembras: ANOVA $p=0.0027$. * $p<0.05$ vs control. Machos: ANOVA $p=0.0653$. **(E) *Cpn*.** Hembras: ANOVA $p=0.0455$. * $p<0.05$ vs control. Machos: ANOVA $p=0.0041$. **(F) Niveles de PRL en suero medidos por RIA.** Los resultados de hembras y machos fueron analizados por separado con ANOVA de un factor seguido de la prueba de Dunnett. Hembras: ANOVA $p<0.0001$. * $p=0.0383$, **** $p<0.0001$ vs control. Machos: ANOVA $p=0.0502$. *t student* control vs sulpiride * $p<0.05$ N=9 por grupo.

Para estudiar la regulación aguda de E2 realizamos tratamientos *in vivo* administrando valerato de estradiol. Hembras y machos WT de 5 meses de edad fueron inyectados con valerato de estradiol (0,2 mg/kg, sc, Progyon Depot, Schering) o aceite de ricino (sc) como control. Los animales fueron sacrificados a las 3hs post inyección. Se colectó sangre troncal y las adenohipófisis fueron recolectadas en QuickZol® para el análisis de la expresión génica de los distintos componentes por RT-qPCR.

Encontramos que el E2 regula negativamente la expresión génica de *Klk1* y *Bdkrb2* tanto en hembras (figura 1.14A y 1.14C) como en machos (figura 1.14D y 1.14F). Se observa una tendencia no significativa a que la expresión de *Bdkrb1* disminuya con la administración de valerato de estradiol para ambos sexos (figura 1.14B y 1.14E).

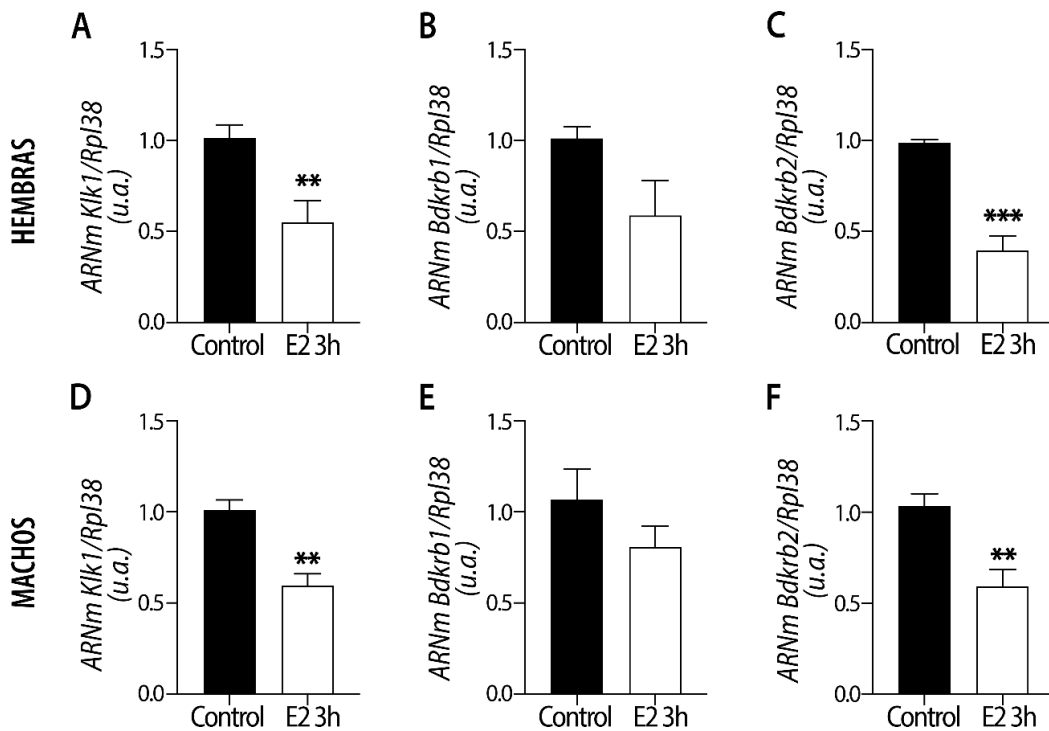


Figura 1.14. Regulación *in vivo* de E2 sobre la expresión génica hipofisaria de *Klk1*, *Bdkrb1* y *Bdkrb2*. Ratones hembra y macho WT de 5 meses de edad fueron inyectados con aceite de ricino (sc, control) o valerato de estradiol (sc, 0.2mg/kg, Progyon Depot; Bayer Schering) y sacrificados a las 3 hs. La expresión génica fue medida por RT-qPCR. Los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y relativizados al control tanto en hembras (A-C) como en machos (D-F). Análisis estadístico: prueba de t para comparar los datos entre control y E2 3hs para cada gen. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. N=6 por grupo.

Para estudiar el efecto crónico de E2 sobre la expresión génica del sistema *KLK1*-quininas, ratones hembra WT de 2 meses de edad fueron sometidos a una cirugía en la cual se removieron bilateralmente los ovarios (ovariectomía, OVX). Los animales fueron sacrificados a los 8 meses de edad.

Encontramos que la expresión génica de *KLK1*, *B1R* y *B2R* aumentó significativamente en las hembras OVX respecto de sus pares SHAM (**figura 1.15**).

Estos resultados sugieren una regulación crónica negativa por parte del E2. Sin embargo, dado que los ovarios son fuente de numerosos factores gonadales – no solamente de los estrógenos – no se puede descartar una posible regulación por parte de otros elementos ováricos sobre la expresión del sistema *KLK1*-quininas hipofisario.

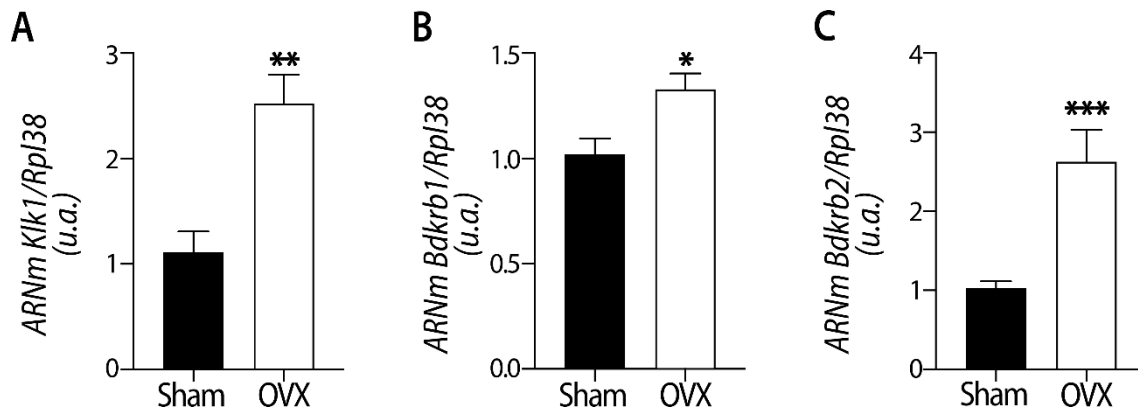


Figura 1.15. Efecto de una ovariectomía bilateral (OVX) sobre la expresión hipofisaria de *Klk1*, *Bdkrb1* y *Bdkrb2*. Hembras de 2 meses de edad fueron sometidas a una ovariectomía bilateral y sacrificadas a los 8 meses de edad. La expresión de ARNm fue medida en las adenohipófisis por RT-qPCR, determinada con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y relativizada a las hembras SHAM. Los datos fueron analizados estadísticamente con una prueba t para comparar los resultados entre OVX y SHAM para cada gen. (A) *Klk1*. (B) *Bdkrb1*. (C) *Bdkrb2*. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. N=8 por grupo.

Conclusiones capítulo 1

- ✎ El sistema KLK1-quininas se expresa en hipófisis de ratones *Drd2* y *hCGβ*.
- ✎ Existe una marcada diferencia sexual en la expresión de componentes del sistema en ambos modelos animales estudiados.
- ✎ El B2R representa más del 95% del total de BRs hipofisarios.
- ✎ B2R se expresa principalmente en lactotrofos en hembras.
- ✎ La expresión de los componentes del sistema se altera con el desarrollo de un prolactinoma.
- ✎ La expresión de B1R se induce significativamente en los prolactinomas desarrollados por las hembras *hCGβ+*, pero no así en aquellos derivados de hembras *Drd2KO*.
- ✎ El control dopaminérgico sobre la expresión génica de los componentes del KKS es más marcado en las hembras y en general estimula la expresión de los componentes del sistema.
- ✎ E2 inhibe la expresión génica de KLK1 y B2R tanto en hembras como en machos.

Discusión capítulo 1

En este capítulo caracterizamos al sistema KLK1-quininas hipofisario en dos modelos animales de prolactinoma, comparativamente entre hembras y machos. Tanto en el modelo *Drd2KO* como en el *hCG β* encontramos importantes alteraciones en la expresión de los componentes del sistema KLK1-quininas con el desarrollo de prolactinomas. En ambos modelos, la expresión génica de KLK1 se encontró disminuida en hembras tumorales respecto de sus pares WT, así como la expresión de algunas quininas. Además, la expresión del B2R aumentó significativamente en prolactinomas de los dos modelos animales utilizados, junto al concomitante aumento de la población lactotropa.

En la década del 80, en el lóbulo anterior de hipófisis provenientes de ratas, habían sido identificados algunos componentes del sistema KLK1-quininas, como por ejemplo KLK, las quininas y las quininasas (revisado en (Clements, 1989)). También se habían descrito diferencias sexuales en la abundancia de KLK en la hipófisis; siendo ésta mayor en las hembras respecto de los machos (Jones et al., 1992). Sin embargo, en este trabajo, encontramos que los machos presentan niveles significativamente mayores de ARNm de KLK1 que las hembras. Estos resultados contradictorios podrían deberse al método de detección utilizado en el trabajo de Jones, Figueroa y Bhoola, y al tipo de calicreína detectada en aquel momento. Si bien las primeras calicreínas fueron descritas a partir del año 1930, entre 1970 y 1990 muchas otras proteasas se asociaron posteriormente a la familia de las calicreínas y hasta la actualidad, con las nuevas metodologías desarrolladas década tras década, se han reportado 15 KLKs diferentes, con funciones específicas diferentes.

Los mayores niveles de KLK1 observados en hipófisis de machos pueden deberse, al menos en parte, a la regulación local de esta enzima. Por ensayos *in vivo* demostramos que la misma es regulada negativamente por el estradiol. Los menores niveles circulantes de estradiol en machos podrían favorecer la mayor expresión de KLK1 encontrada en hipófisis de este sexo.

No sólo la expresión de KLK1 es mayor en hipófisis de machos, respecto a las hembras, en ambos modelos tumorales, sino que también los receptores B1R y B2R

presentan una mayor expresión en machos. Nuestros ensayos *in vivo* indican, al igual que para *KLK1*, un efecto inhibitorio del E2 sobre la expresión de los BRs hipofisarios, hecho que podría estar determinando estas diferencias sexuales.

Más allá de estas marcadas diferencias sexuales, es importante destacar que en general en los machos no se observaron, alteraciones genotípicas en la expresión de los componentes del sistema *KLK1*-quininas en ninguno de los modelos experimentales. Sin embargo, marcadas diferencias genotípicas se encontraron en las hembras. Como describimos anteriormente, en nuestros modelos experimentales a las edades estudiadas, los machos no presentan desarrollo tumoral. Estos resultados en conjunto nos indicaría que las alteraciones del sistema *KLK1*-quininas que encontramos en las hembras transgénicas respecto a sus pares WT, en ambos modelos, estarían relacionadas al desarrollo del prolactinoma en este sexo.

La participación de B2R en el desarrollo de prolactinomas en humanos ha sido sugerida indirectamente mediante un estudio de proteómica en el cual se encontró que el B2R se sobre-expresa en prolactinomas, corticotropinomas, somatotropinomas y adenomas no funcionantes, sugiriendo un rol de este receptor en la tumorigénesis hipofisaria (A. Ribeiro-Oliveira et al., 2008).

En el presente trabajo demostramos que las hipófisis de hembras transgénicas de los dos modelos animales de prolactinoma presentan una mayor expresión génica y proteica de B2R respecto de sus pares WT. Si bien la expresión génica y proteica de dicho receptor no se vio alterada en hipófisis provenientes de machos *Drd2KO* comparado con los WT, es importante destacar que luego de un detallado análisis morfométrico de la co-localización del B2R en diferentes tipos celulares, demostramos que las hipófisis de machos presentan una fuerte presencia de B2R en células no lactotropas. La función de B2R en gonadotropos y somatotropos no formó parte de nuestro trabajo, pero este hallazgo abre nuevas incógnitas respecto a la función de B2R en otros tipos celulares hipofisarios.

Por otro lado, en hembras, el aumento de la expresión génica y proteica de B2R observado en prolactinomas y su alta expresión específica en lactotropos sugieren un rol importante de este receptor en el control de la función lactotropa y del desarrollo tumoral. Estos resultados en su conjunto nos llevaron a profundizar acerca de la función del B2R en la secreción de prolactina y en el desarrollo de un prolactinoma (ver capítulos 2 y 3).

Si bien se ha descrito que la expresión de B1R se puede inducir por citoquinas inflamatorias en tejidos tumorales o normales (da Costa et al., 2014), y en los prolactinomas existe una inflamación estromal (Renner et al., 2004; Wang et al., 2021), solo observamos un aumento en los niveles de ARNm de B1R en prolactinomas desarrollados en hembras hCG β +. Sin embargo, al realizar el análisis de la abundancia relativa entre BRs observamos que el B1R representa sólo entre el 1% y 3% del total de BRs hipofisarios y que dicha proporción no se altera en el desarrollo de un prolactinoma, en ninguno de los modelos animales estudiados.

La baja expresión de B1R hipofisario en prolactinomas de ambos modelos puede deberse al carácter benigno que presentan estos tumores, a las edades estudiadas, (6 meses para los ratones hCG β + y 8 meses para los ratones *Drd2*KO) momento en el cual se observa una marcada hiperplasia e hipertrofia de lactotropos en ambos modelos, pero sin signos de transformación celular, y manteniéndose intacta la arquitectura tisular determinada por la red de fibras de reticulina (Cristina et al., 2006; Rulli et al., 2002).

Las diferencias sexuales en el control dopaminérgico de las funciones hipofisarias han sido bien documentadas. La regulación negativa ejercida por la catecolamina en la síntesis y secreción de PRL es más marcada en hembras que en machos. Por un lado, el tono basal de la vía dopaminérgica tuberoinfundibular (TIDA) es mayor en hembras respecto de los machos (Freeman et al., 2000), y por otro lado, la concentración de DA en la eminencia media es siete veces mayor en ratas hembra en diestro que en machos (Gudelsky & Porter, 1981). De este modo, las alteraciones en la regulación dopaminérgica inducidas por la inactivación génica del *Drd2* (*Drd2*KO) tienen un efecto mayor en las hembras comparado con los machos (Casanueva et al., 2006; G. Díaz-Torga et al., 2002; Kelly et al., 1997). Desde los dos meses de edad, las hembras *Drd2*KO desarrollan hiperprolactinemia e hiperplasia de lactotropos más pronunciada que los machos, pese a que ambos sexos carecen de *Drd2* funcionales. Los machos *Drd2*KO desarrollan prolactinomas, pero a edades mucho más avanzadas; 17-20 meses de edad (S L Asa et al., 1999).

En este capítulo describimos una regulación dopaminérgica de la expresión génica de la mayoría de los componentes del sistema *KLK1*-quininas hipofisario. La manipulación farmacológica de la actividad de *Drd2* tuvo un efecto sexualmente dimórfico, observándose una regulación más pronunciada en hembras que en

machos, apoyando los antecedentes previamente detallados sobre un control dopaminérgico más importante en este sexo. Dopamina indujo la expresión génica hipofisaria de KLK1 y de las enzimas ACE y CPN. Por el contrario, un tratamiento agudo con sulpiride indujo un aumento de la expresión de B2R en hembras, sugiriendo un efecto inhibitorio de DA sobre B2R. Mas aún, cuando la regulación dopaminérgica se pierde crónicamente (Drd2KO), la expresión de B2R aumenta en ambos sexos, y en hembras específicamente en lactotropos. Sin embargo, cabe señalar que en las hembras tumorales (Drd2KO), el aumento en la expresión de B2R está dado en parte por el aumento en el número de lactotropos.

Resumiendo, describimos que el sistema KLK1-quininas se encuentra expresado en la hipófisis y presenta importantes diferencias sexuales. El B2R es el principal receptor del sistema. La expresión de B2R aumenta en prolactinomas y específicamente en los lactotropos, sugiriendo un potencial rol de este receptor en el control de las funciones de este tipo celular. Al igual que otros sistemas intra-hipofisarios inhibitorios de la secreción de PRL, el sistema KLK1-quininas está regulado por DA y por E2.

Capítulo 2:
*Impacto del sistema
KLK1-Quininas hipofisario
en el control de la secreción de
prolactina*

Introducción capítulo 2

En 1990, Kuan y colaboradores 1990 demostraron *in vitro*, en cultivo de células adenohipofisarias, que BK y Lys-BK aumentan la secreción de PRL, y que el efecto se encuentra mediado por los receptores de tipo 2 (B2R). Por otra parte, observaron que la dopamina inhibe la liberación de PRL estimulada por BK o Lys-BK (S I Kuan et al., 1990).

KLK1 como activador de TGFβ1

Como se mencionó en la introducción general, TGFβ1 es un potente inhibidor de las funciones del lactotrofo y se lo ha propuesto como un mediador de las acciones inhibitorias de la dopamina. Previamente se demostró en nuestro laboratorio que la actividad de TGFβ1 se encuentra disminuida en prolactinomas de 3 modelos experimentales. También demostramos que un tratamiento farmacológico con un análogo de TSP1 (un activador fisiológico local de la citoquina) reduce los niveles de PRL en sangre y contrarresta el desarrollo tumoral en 3 modelos animales de prolactinoma (Erika Y. Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2018; M Victoria Recouvreux et al., 2013). De este modo, la manipulación farmacológica de sus activadores representa una buena herramienta para recuperar los niveles de TGFβ1 hipofisarios, contrarrestar la hiperprolactinemia y el crecimiento tumoral. Estudiar a los activadores fisiológicos de TGFβ1 localmente en la hipófisis provee nuevas herramientas para el tratamiento de prolactinomas resistentes.

En el presente trabajo nos enfocamos en la posible participación de KLK1 como activador local de TGFβ1. Recientemente ha sido demostrado que la administración crónica de KLK1 recombinante humana en ratones diabéticos retrasa la aparición sintomática de diabetes mellitus tipo I, atenuando el grado de insulinitis y mejorando la masa de células beta pancreáticas. Estos efectos benéficos han sido asociados, en parte, al aumento de TGFβ1 activo inducido por el tratamiento crónico con KLK1 (Maneva-Radicheva et al., 2014). Por otro lado, posteriormente se comprobó que un tratamiento crónico con calistatina (el inhibidor fisiológico de KLK1) en ratones *db/db* con nefropatía diabética detiene la glomerulosclerosis y la injuria túbulo-

intersticial, y mejora la fibrosis renal al reducir localmente la actividad de TGF β 1 por inhibición de la actividad de calicreína (Yiu et al., 2016). En ambos casos KLK1 participaría de la activación local de TGF β 1.

Hara y colaboradores, en 2014, demostraron la participación de calicreína en el proceso de fibrosis hepática. Comprobaron que la enzima cliva el péptido LAP liberando TGF β 1 de su complejo latente, es decir, activando la citoquina durante el desarrollo de esta patología (Hara et al., 2014). Finalmente ha sido comprobado, *in vitro* y en *ex vivo*, que TGF β 1 latente es rápidamente clivado por KLK1 en el plasma seminal (Emami & Diamandis, 2010b).

Otros componentes del sistema KLK1-quininas podrían estar también involucrados en la activación de TGF β 1 (Akita et al., 2002). Se han descrito acciones de las quininas sobre la actividad de la citoquina. En tejido renal y cardíaco, mientras la expresión del receptor B2 es protectora y anti-inflamatoria (Ardiles et al., 2013; Yin et al., 2008) un aumento en la expresión de B1R estaría implicado en los procesos pro-inflamatorios, mediados en parte por el aumento de TGF β 1 (García-Tornadú et al., 2010).

Estas evidencias muestran la participación del sistema KLK1-quininas en la activación de TGF β 1 en diversos tejidos. Sin embargo, la relación entre KLK1 y TGF β 1, así como la acción de quininas sobre la actividad de TGF β 1 aún no ha sido estudiada en la fisiología y patología de la glándula hipofisaria.

B2R en adenomas hipofisarios

En el 2008 se publicó un análisis detallado de la expresión diferencial de proteínas entre hipófisis normales humanas y adenomas hipofisarios. Los autores encontraron principalmente cuatro proteínas expresadas diferencialmente con implicancia potencial en la tumorigénesis hipofisaria. Entre ellas, se encontró sobre-expresado al receptor B2 (A. J. Ribeiro-Oliveira et al., 2008). Sin embargo, a pesar de todos los antecedentes enunciados, aún se desconoce el papel fisiológico del sistema KLK1-quininas en hipófisis y su implicancia en la patogénesis de la glándula.

Objetivos capítulo 2

El rol de KLK1 en el control de la secreción de prolactina no está del todo dilucidado. Si KLK1 actúa como activador de TGF β 1 en la hipófisis, entonces podría estar involucrada en una regulación negativa de las funciones del lactotrofo. Sin embargo, como se detalló en el capítulo anterior, KLK1 forma parte de un complejo sistema que se expresa en la adenohipofisis. De este modo, si KLK1 participa en la regulación de la secreción de prolactina, podría tener al menos dos vías de acción; *i*- un efecto mediado por TGF β 1, y/o *ii*- un efecto mediado por las quininas (péptidos activos del sistema) a través de sus receptores B1R y B2R.

En base a los antecedentes anteriormente mencionados, nos propusimos estudiar el impacto del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de prolactina.

Objetivos específicos

En explantes adenohipofisarios de ratones WT de la cepa C57 incubados *ex vivo* nos propusimos estudiar:

- ⇒ el efecto de KLK1 sobre la secreción de prolactina y evaluar si dicho efecto está mediado por la activación de TGF β 1.
- ⇒ si la activación selectiva de B2R tiene un impacto sobre la secreción de PRL. Y de ser así, evaluar si está mediada por la activación de TGF β 1.
- ⇒ si la activación selectiva de B1R tiene un impacto sobre la secreción de PRL. Y de ser así, evaluar si está mediada por la activación de TGF β 1.

Experimentos ex vivo

Luego de la eutanasia, las adenohipófisis se juntaron en 250µl de Dulbecco Eagle's Modified Medium (DMEM) suplementado con 15 % v/v de suero de caballo, 2.5 % v/v de suero fetal bovino y gentamicina (20 µg/ml) estéril. En campana se realizó un primer lavado con medio DMEM suplementado y cada lóbulo de la hipófisis se seccionó en 2 con un bisturí. Los explantes se colocaron en una placa p96 con medio suplementado y se llevaron a una estufa de cultivo a 37°C con flujo de CO₂ al 5%. Luego de dejar estabilizar al tejido por 2 horas en la estufa, se realizó un lavado con DMEM suplementado y se incubaron los explantes con distintos estímulos detallados a continuación.

Ensayos ex vivo con *KLK1*

Los explantes de hipófisis de ratones hembra y macho WT, de 5-8 meses de edad fueron incubadas con *KLK1* (1U/ml) o con DMEM-BSA1% sin suero (vehículo) durante 30 minutos en estufa a 37°C con flujo de CO₂ al 5% (**figura 2.1A**).

Ensayos ex vivo con el agonista y antagonista específico de *B2R*

Los explantes hipofisarios de ratones hembra y macho WT, de 5-8 meses de edad fueron incubados con el agonista específico de *B2R* ([Hyp(3), Thi(5), (N)Chg(7), Thi(8)]-bradykinin, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹M) o DMEM-BSA1% sin suero (vehículo) durante 30 minutos en estufa a 37°C con flujo de CO₂ al 5% (**figura 2.1B**). En algunos experimentos, los explantes hipofisarios fueron pre-incubados con el antagonista específico de *B2R*, Icatibant (D-Arg-[Hyp3, Thi5, D-Tic7, Oic8]-bradykinin, 10⁻⁶M) o con DMEM-BSA1% libre de suero (vehículo) durante 30 minutos (previos a la incubación con agonista) en estufa a 37°C con flujo de CO₂ al 5% (**figura 2.1C**).

Ensayos ex vivo con el agonista específico de B1R

Los explantes hipofisarios de ratones hembra y macho WT, de 5-8 meses de edad fueron incubados con el agonista específico de B1R (SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinin, 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M) o DMEM-BSA1% sin suero (vehículo) durante 30 minutos en estufa a 37°C con flujo de CO₂ al 5% (**figura 2.1B**).

Los agonistas específicos para B2R y B1R fueron gentilmente donados por el Dr Francois Alhenc-Gelas, INSERM U1138, Universite Paris-Cite, Sorbonne Universite, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, Francia.

En todos los ensayos *ex vivo*, luego de finalizado el tiempo de tratamiento, los medios condicionados y los fragmentos de tejido fueron recolectados para posteriores determinaciones de TGFβ1 (ELISA, DY1679-05, R&D Systems) y de prolactina (ELISA, DY1445, R&D Systems) mediante ELISA.

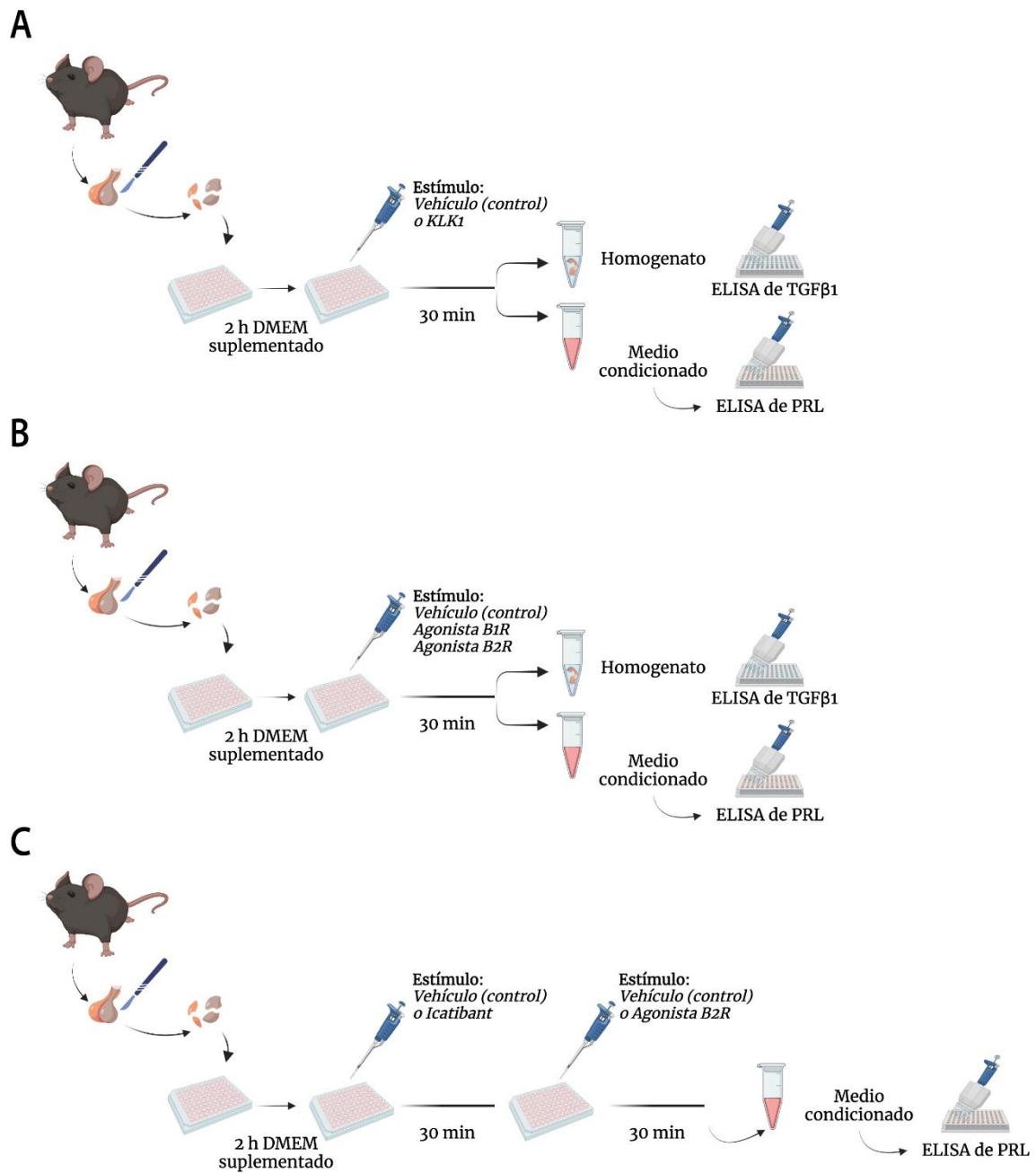


Figura 2.1. Esquema del diseño experimental de los ensayos *ex vivo* en explantes adenohipofisarios de ratones. (A) Ensayos con *KLK1*. (B) Ensayos con el agonista específico de B1R. (C) Ensayos con el agonista específico de B2R en presencia/ausencia del antagonista de B2R (Icatibant).

Resultados capítulo 2

Dada la complejidad del sistema hipotálamo-hipofisario, el impacto del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de prolactina fue estudiado en hipófisis incubadas *ex vivo*. La ventaja radica en la independización de las regulaciones indirectas extrahipofisarias. Los explantes mantienen la estructura tridimensional de la glándula hipofisaria, así como su matriz extracelular, preservando de este modo la comunicación paracrina, las uniones intercelulares y otros procesos que pueden estar involucrados en la comunicación intracelular. Es una herramienta que nos permite estudiar el impacto de distintos estímulos específicamente en la glándula hipofisaria.

Participación de KLK1 en el control de la secreción de PRL

En primera instancia evaluamos a KLK1 como activador local de TGF β 1 y su impacto en la liberación de PRL. Para ello, incubamos *ex vivo* hipófisis de ratones WT de la cepa C57 con KLK1 porcina 1U/ml o con DMEM-BSA 1% (control) durante 30 minutos. Luego, en los homogenatos de hipófisis medimos los niveles de TGF β 1 activo mediante un kit específico de ELISA. Encontramos que KLK1 activa a la citoquina en las adenohipófisis provenientes de las hembras (**figura 2.2A**), pero no tiene efecto en machos (**figura 2.2C**).

Luego, medimos los niveles de PRL en los medios condicionados mediante un kit específico de ELISA. Sorpresivamente, KLK1 tuvo un efecto liberador de prolactina tanto en machos (**figura 2.2D**) como en hembras (**figura 2.2B**), pese al aumento en los niveles de TGF β 1 activo en este sexo.

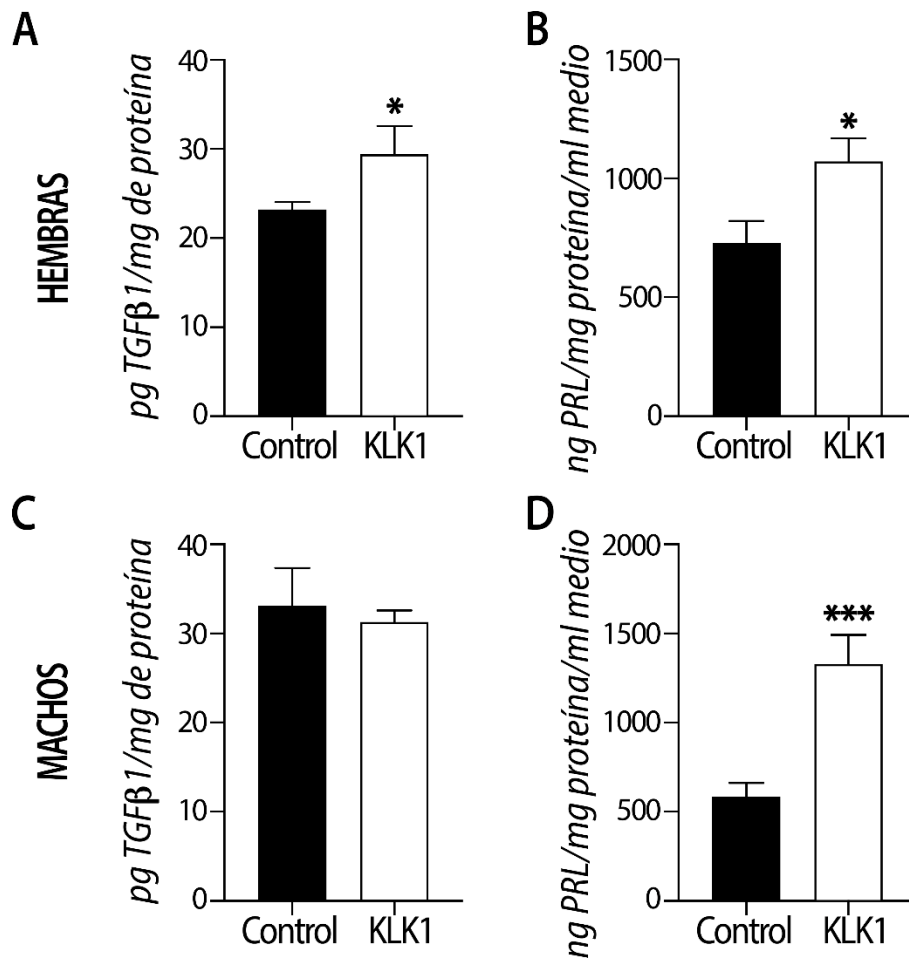


Figura 2.2. Efecto de KLK1 sobre la activación local de TGFβ1 y la liberación de PRL al medio. Los explantes hipofisarios de ratones hembra y macho WT y Drd2KO fueron incubadas *ex vivo* con KLK1 (1U/ml) o vehículo (control) durante 30 minutos. La concentración de PRL en el medio condicionado fue determinada por ELISA. Los niveles de TGFβ1 activos se midieron por ELISA en los homogenatos adenohipofisarios. Se realizó una prueba de t para comparar tratamiento vs control. **(A) Niveles de TGFβ1 activos en homogenatos de hembras.** * $p=0.0280$. N=8,6. **(B) Concentración de PRL en el medio condicionado de hembras.** * $p=0.0444$. N=8,6. **(C) Niveles de TGFβ1 activos en homogenatos de machos.** $p=0.6836$. N=7,8. **(D) Concentración de PRL en el medio condicionado de machos.** *** $p=0.0003$. N=7,8.

Participación de los BRs en el control de la secreción de PRL

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos sugieren que KLK1 podría tener un efecto en la liberación de prolactina independiente de TGFβ1 y que en el capítulo 1 demostramos que todo el sistema KLK1-quininas se encuentra expresado en la adenohipófisis, a continuación, estudiamos el impacto de la activación de los receptores de quininas (B1R y B2R) en la liberación de PRL y en la modulación de los niveles de TGFβ1 activos.

Activación selectiva de B1R y su impacto en la liberación de PRL

Para estudiar el efecto de la activación selectiva de B1R, explantes hipofisarios de ratones WT fueron incubados *ex vivo* con distintas dosis del agonista de B1R (10^{-7} M a 10^{-9} M) durante 30 minutos. Luego, los niveles de PRL fueron determinados por ELISA en los medios condicionados. Sorpresivamente, encontramos que el agonista de B1R inhibe la secreción de PRL en las hipófisis provenientes de hembras (**figura 2.3A**). Contrariamente, la estimulación de B1R promueve la liberación de PRL de forma dosis-dependiente en machos (**figura 2.3B**).

Por otro lado, evaluamos los niveles de TGF β 1 activos en los homogenatos de hipófisis post-incubación con el agonista. Concomitante a la inhibición de la secreción de PRL, el agonista de B1R aumenta los niveles de TGF β 1 en las adenohipófisis de hembras (**figura 2.4A**), pero no tiene efecto sobre la activación de la citoquina en machos (**figura 2.4B**).

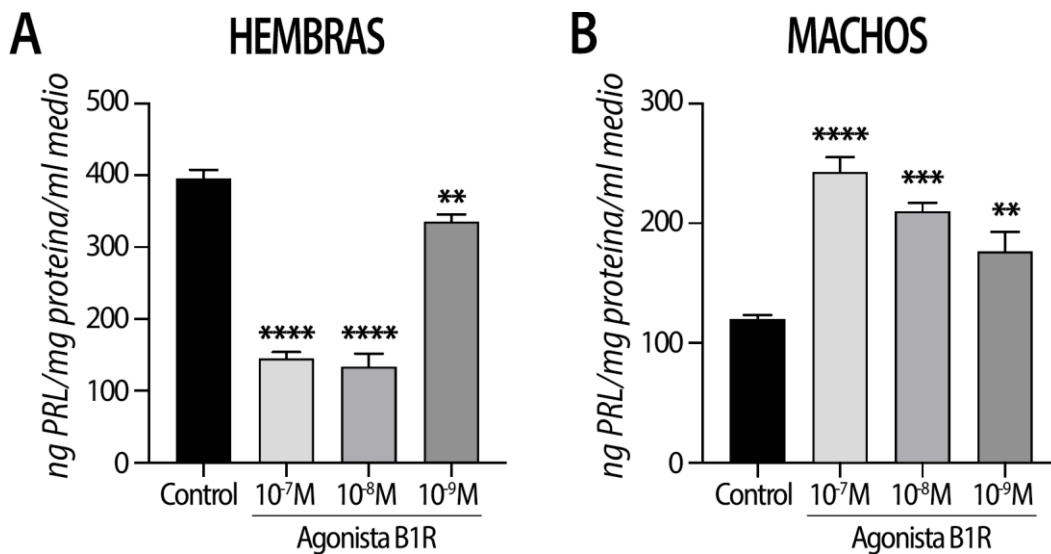


Figura 2.3. Impacto de la estimulación de B1R sobre la secreción de prolactina. Las hipófisis de ratones WT fueron incubadas con tres dosis del agonista específico de B1R (10^{-7} M – 10^{-9} M) o vehículo (control) durante 30 minutos. La concentración de PRL liberada al medio fue determinada por ELISA y relativizada a los mg de proteína y a ml de medio condicionado. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA de un factor, seguido del test de Bonferroni. **(A)** Hembras: ANOVA $p < 0.0001$. **(B)** Machos: ANOVA $p < 0.0001$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. N=7 por grupo.

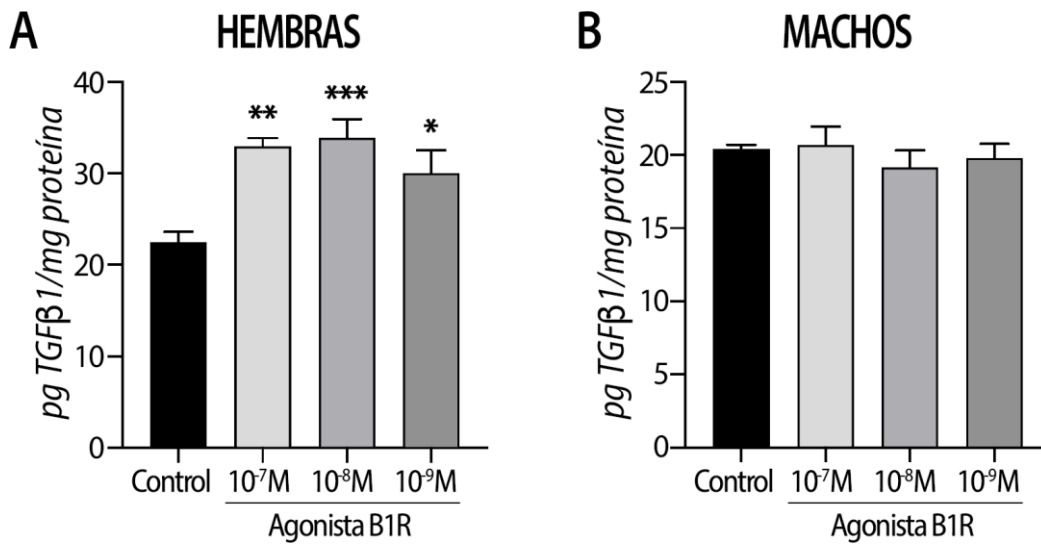


Figura 2.4. Impacto de la estimulación de B1R sobre la activación de TGFβ1. Las hipófisis de ratones WT fueron incubadas con tres dosis del agonista específico de B1R (10^{-7}M – 10^{-9}M) o vehículo (control) durante 30 minutos. Los niveles de TGFβ1 activo fueron determinados por ELISA en los homogenatos adenohipofisarios. Los datos fueron analizados estadísticamente con ANOVA de un factor, seguido del test de Bonferroni. **(A)** Hembras: ANOVA $p=0.0414$. **(B)** Machos: ANOVA $p=0.9604$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$. $N=7$ por grupo.

Activación selectiva de B2R y su impacto en la liberación de PRL

A continuación, estudiamos el impacto de la activación de B2R utilizando el mismo abordaje, con explantes hipofisarios incubados *ex vivo*. En este caso, las hipófisis fueron incubadas durante 30 minutos con distintas concentraciones del agonista de B2R (10^{-7}M , 10^{-8}M y 10^{-9}M). Luego, la concentración de prolactina fue determinada por ELISA en los medios condicionados. Nuevamente, encontramos un marcado dimorfismo sexual en el impacto de la activación del B2R sobre la liberación de prolactina. Mientras que en las hembras la estimulación de B2R inhibe la liberación de prolactina de forma dosis dependiente (**figura 2.5A**), en los machos se observa una correlación inversa (**figura 2.5B**), B2R promueve la liberación de PRL de forma dosis-dependiente. Por otro lado, tanto en las hembras como en los machos, el tratamiento con el agonista de B2R no tuvo efectos sobre la activación de TGFβ1 a ninguna de las dosis evaluadas (**figura 2.6A** y **2.6B**).

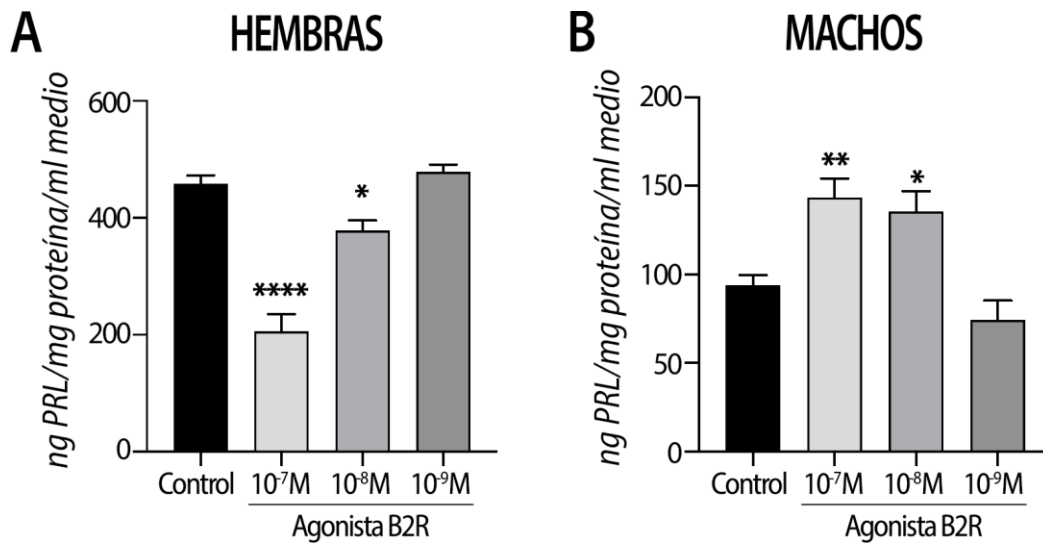


Figura 2.5. Impacto de la estimulación de B2R sobre la secreción de prolactina. Los explantes hipofisarios de hembras y machos WT fueron incubados *ex vivo* con tres concentraciones del agonista de B2R (10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M) o vehículo durante 30 minutos. La liberación de PRL fue determinada por ELISA en los medios condicionados. Cada set de datos fue analizado estadísticamente con un ANOVA de un factor. **(A) Concentración de PRL en medios condicionados de hembras.** ANOVA $p < 0.0001$. **(B) Concentración de PRL en medios condicionados de machos.** ANOVA $p = 0.0002$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ vs control. $N = 5$ por grupo.

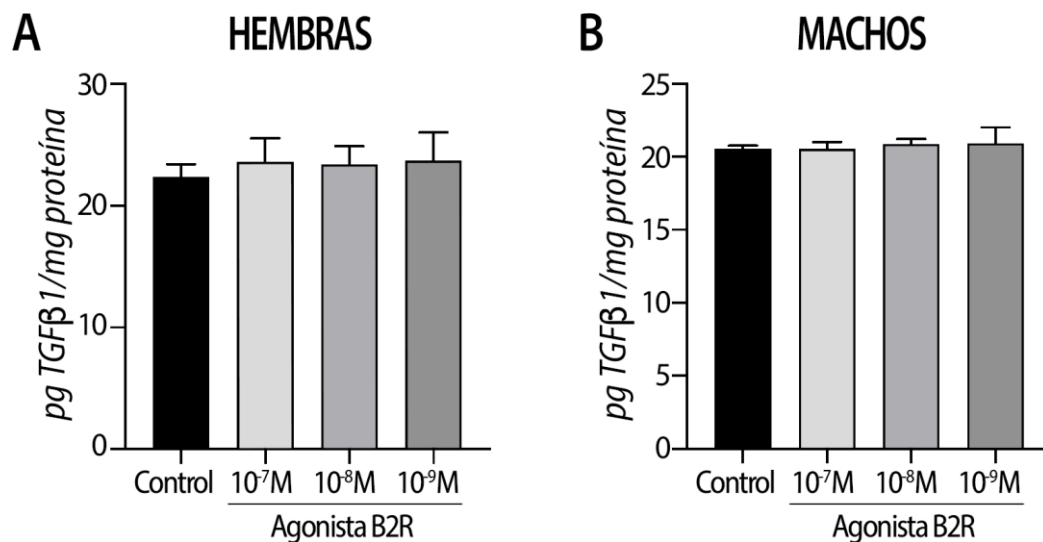


Figura 2.6. Impacto de la estimulación de B1R sobre la activación de TGFβ1. Los explantes hipofisarios de hembras y machos WT fueron incubados *ex vivo* con tres concentraciones del agonista de B2R (10^{-7} M, 10^{-8} M y 10^{-9} M) o vehículo durante 30 minutos. Los niveles de TGFβ1 activo fueron determinados por ELISA en los homogenatos de hipófisis. Cada set de datos fue analizado estadísticamente con un ANOVA de un factor. **(A) Niveles de TGFβ1 activo en homogenatos de hembras.** ANOVA NS. **(B) Niveles de TGFβ1 activo en homogenatos de machos.** ANOVA NS. $N = 5$ por grupo.

Para determinar la especificidad del efecto del agonista de B2R sobre la liberación de PRL, evaluamos su impacto en presencia del antagonista de B2R, también conocido como Icatibant. Para ello, pre-incubamos las hipófisis de hembras y machos durante 30 minutos con Icatibant (10^{-6}M). Luego, agregamos el agonista de B2R (10^{-7}M para las hembras y 10^{-8}M para los machos) durante 30 minutos. Como muestra la **figura 2.7**, la pre-incubación con Icatibant previene el efecto inducido por el agonista de B2R tanto en hembras (**figura 2.7A**) como en machos (**figura 2.7B**).

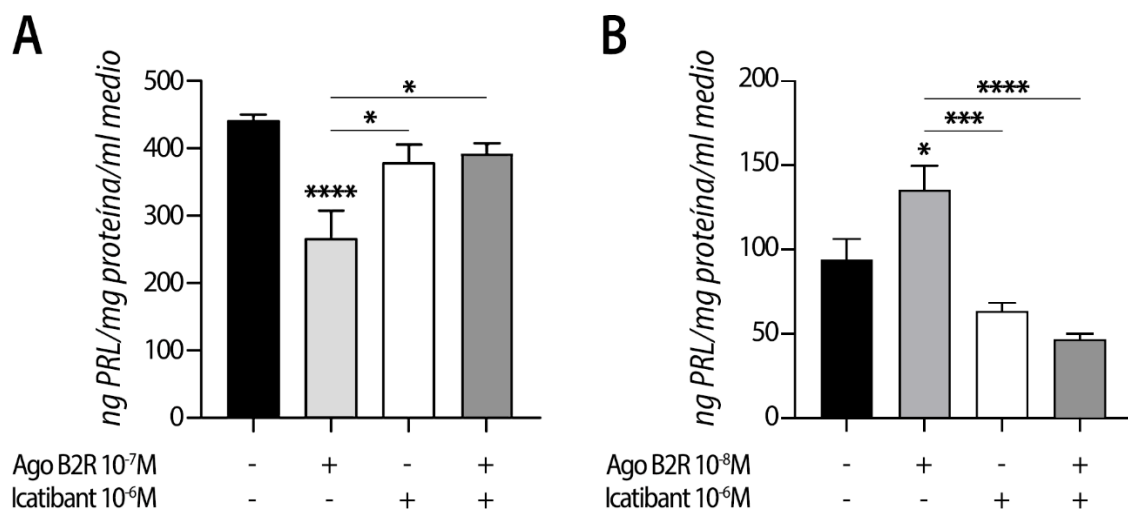


Figura 2.7. Impacto de la activación de B2R en la liberación de PRL Los explantes de hipófisis de ratones WT fueron pre-incubados *ex vivo* con el antagonista de B2R (Icatibant, 10^{-6}M) o vehículo (control) durante 30 minutos. Luego, las hipófisis fueron incubadas con el agonista de B2R (10^{-7}M para las hembras y 10^{-8}M para los machos) en presencia o ausencia del antagonista Icatibant durante 30 minutos. La liberación de PRL fue determinada por ELISA en los medios. Los datos fueron analizados estadísticamente con un ANOVA de un factor. **(A) Niveles de PRL en el medio condicionado de hembras.** ANOVA $p < 0.0003$. $N = 7-9$ por grupo. **(B) Niveles de PRL en el medio condicionado de machos.** ANOVA $p < 0.0001$. $N = 5$ por grupo. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

Conclusiones capítulo 2

- ✎ KLK1 activa a TGF β 1 localmente en la hipófisis únicamente en las hembras.
- ✎ La administración exógena de KLK1 induce la liberación de PRL tanto en hembras como en machos.
- ✎ La activación de B1R y B2R mostró un efecto sexualmente diferenciado:
 - ⇒ La activación específica de B1R y B2R promueve la liberación de PRL en machos.
 - ⇒ La activación específica de BRs inhibe la secreción de PRL en hembras.
- ✎ La estimulación del B1R hipofisario induce la activación de TGF β 1 sólo en hembras, hecho que mediaría la inhibición de PRL.
- ✎ En machos, el aumento en la secreción de prolactina generado por KLK1, podría estar mediado, al menos en parte, por la producción local de quininas que estimularían los BRs locales.

Discusión capítulo 2

En este capítulo estudiamos la participación del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de PRL directamente sobre la glándula hipofisaria.

Si bien la dopamina es considerada el principal factor inhibitorio que regula las funciones del lactotrofo, diversos péptidos y factores de crecimiento también participan en el control inhibitorio intra-hipofisario del lactotrofo. Por ejemplo, TGF β 1 y las activinas regulan negativamente la secreción de prolactina (Lacerte et al., 2004; Lebrun, 2009; D K Sarkar et al., 1998; Dipak K. Sarkar et al., 1992). Recientemente, trabajos de nuestro laboratorio han descrito diferencias sexuales en la actividad inhibitoria de dichos sistemas, siendo mayor la expresión de estos sistemas en hipófisis de machos respecto a las hembras (E.Y. Faraoni et al., 2020; M. Victoria Recouvreux et al., 2013). Mas aún, se ha sugerido que los sistemas inhibitorios intra-hipofisarios también podrían estar involucrados en el dimorfismo sexual observado en el desarrollo de prolactinomas en los modelos animales estudiados. Así mismo, otros sistemas intra-hipofisarios todavía no estudiados podrían participar.

Describimos en este capítulo un nuevo sistema intra-hipofisario que podría estar involucrado en las diferencias sexuales observadas en las funciones del lactotrofo y el desarrollo de prolactinomas.

Por un lado, encontramos que KLK1 es un activador local de TGF β 1 únicamente en hipófisis de ratones hembras (**figura 2.8A**). Al respecto, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que existe una marcada diferencia sexual tanto en la expresión hipofisaria de TGF β 1, siendo ésta mucho mayor en los machos, como así también en la regulación de los niveles de TGF β 1 activo por dopamina, siendo ésta más sensible en las hembras (E. Y. E. Y. Y. Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2013). En este trabajo describimos por primera vez otro mecanismo sexualmente dimórfico en la regulación local de TGF β 1: KLK1 es capaz de activar TGF β 1 sólo en hipófisis de hembras.

Sorpresivamente, un tratamiento con KLK1 exógena indujo la liberación de PRL en ambos sexos incluso en las hembras, pese al aumento en los niveles de TGF β 1 activos (**figura 2.8**).

Dado que observamos este efecto de KLK1 contrario al esperado sobre la secreción de PRL, hipotetizamos que su acción estimuladora podría estar mediada por las quininas locales generadas por la enzima que actuarían a través de sus receptores B1R y B2R.

Al evaluar el impacto de las quininas mediante agonistas específicos de B1R y B2R, encontramos que el efecto de la activación de los BRs también es sexualmente dimórfico: la activación selectiva de B1R y B2R promueve la liberación de PRL en machos (**figura 2.8B**). Contrariamente, la activación farmacológica de los receptores inhibe la secreción de PRL en hembras (**figura 2.8A**).

Cabe destacar aquí que en el capítulo uno habíamos demostrado que la expresión génica del B1R en hipófisis es muy baja, es más, no logramos detectar la expresión proteica por ensayos de inmunohistoquímica. Sin embargo cuando incubamos (*ex vivo*) los explantes hipofisarios, sí observamos un efecto mediado por el B1R.

Esto podría deberse a una inducción de la expresión del B1R durante el procedimiento experimental utilizado. Al respecto, se ha descrito en bibliografía que la expresión de B1R puede ser inducida *in vitro* en cultivos celulares o en tejidos, espontáneamente o mediante su propio agonista. Las razones por las cuales se induce la expresión del receptor en las condiciones enumeradas no están del todo claras, pero se hipotetiza que puede estar relacionado, al menos en parte, con alteraciones redox inducidas por metodologías *in vitro*, y por la activación de NF- κ B (Moreau et al., 2007; Sabourin, Morissette, et al., 2002; Schanstra et al., 1998). Aunque observamos en los ensayos *ex vivo* que la activación de B1R tiene un efecto en la regulación de la secreción de PRL, la baja abundancia y expresión de este receptor (evaluado en el capítulo 1) sugieren una participación mínima o nula en la regulación de las funciones del lactotrofo *in vivo*.

Por otro lado, los resultados obtenidos y mencionados en este capítulo muestran un fuerte dimorfismo sexual en la respuesta biológica desencadenada por la activación de B2R. En hipófisis provenientes de machos WT, la activación de B2R promueve la liberación de PRL, en forma dosis-dependiente, mientras que en las

hembras posee un efecto claramente inhibitorio. Además, demostramos que en los machos este efecto es específico de B2R ya que fue completamente prevenido por la pre-incubación con el antagonista específico Icatibant.

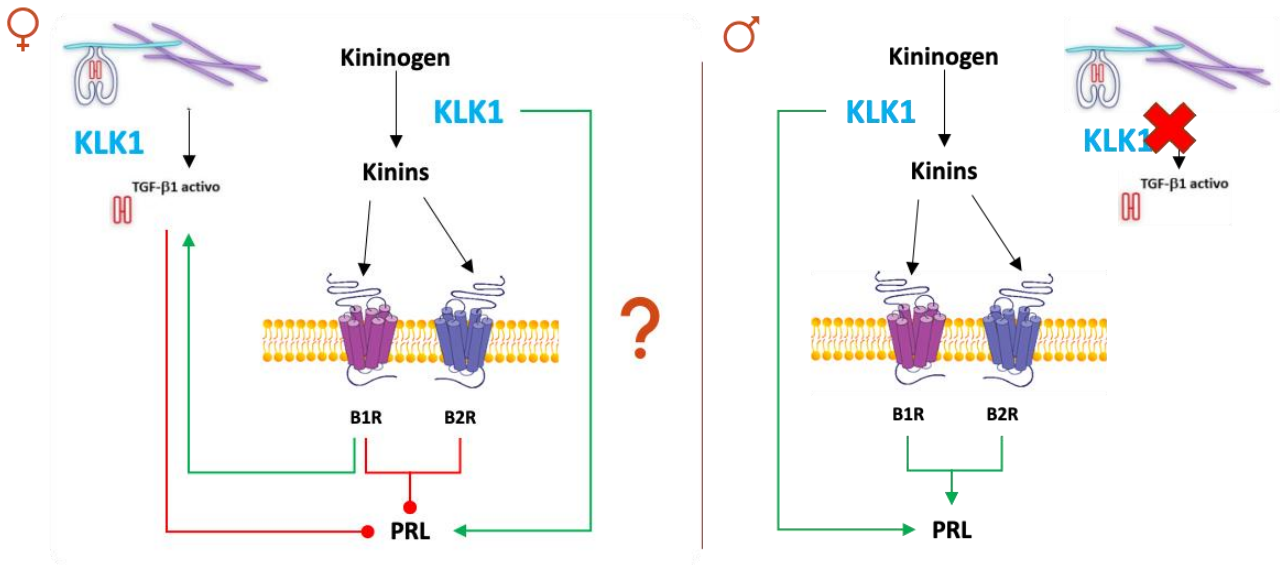


Figura 2.8. Esquema del mecanismo propuesto de la acción de los BRs y KLK1 en el control de la secreción de prolactina. Hembras: KLK1 activa localmente a TGFβ1 latente, pero induce la liberación de PRL al medio. Las quininas actuando a través de los receptores B1R y B1R inhiben la secreción de PRL y en el caso de B1R también aumenta los niveles de TGFβ1 activos. **Machos:** KLK1 induce la liberación de PRL al medio. Dicho efecto podría estar mediado, al menos en parte, por las quininas a través de los receptores B1R y B1R ya que la activación selectiva de dichos receptores promueve la secreción de PRL.

Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la cascada de señalización desencadenada por la activación o inhibición de los BRs sobre la secreción de PRL no están estudiados en hipófisis. Se ha reportado que ambos receptores pueden reclutar específicamente a Gαq, con la subsecuente activación de la fosfolipasa C, liberación de IP3 y DAG y un aumento transitorio de la concentración de Ca²⁺ intracelular (Girolami et al., 1992; Son I. Kuan et al., 1990; Morgan-Boyd et al., 1987). Se sabe que en los lactotrofos, dicha cascada de señalización intracelular provoca la liberación de prolactina al medio extracelular (revisado en (Freeman et al., 2000)).

El reclutamiento de $G\alpha_q$ por parte de los BRs y el subsecuente aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , podrían explicar el efecto estimulador de los agonistas de B1R y B2R sobre la liberación de prolactina, observado en las hipófisis provenientes de machos WT. Sin embargo, no es posible explicar por este mecanismo el efecto inhibitorio de los agonistas de BRs sobre la secreción de PRL en las hembras.

Dado que los BRs también pueden reclutar a proteínas $G\alpha_i$, con la subsecuente inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa y la activación de la vía de las MAPKs (Ewald et al., 1989; Linder et al., 1990) – dos vías fuertemente involucradas en la inhibición de la secreción de PRL (N. Ben-Jonathan, 2001; Freeman et al., 2000) – podemos hipotetizar que existe un reclutamiento de proteínas $G\alpha$ sexo-específico. En los machos, los BRs podrían acoplarse principalmente a $G\alpha_q$, mientras que en las hembras los BRs podrían reclutar principalmente $G\alpha_i$.

Como se mencionó anteriormente, $TGF\beta 1$ es sintetizado en la hipófisis y es un potente inhibidor de la secreción de PRL y del crecimiento de los lactotrofos (M.V. Recouvreux et al., 2011; Dipak K. Sarkar et al., 1992). Más aún, se ha propuesto a la citoquina como un mediador de los efectos inhibitorios de la dopamina; y es importante volver a señalar aquí que esta regulación de $TGF\beta 1$ por dopamina es más sensible en las hembras respecto de los machos.

En el presente trabajo describimos que la estimulación de B1R eleva los niveles de $TGF\beta 1$ activo, solo en hipófisis de hembras, sugiriendo que la activación de la citoquina podría mediar, al menos en parte, los efectos inhibitorios de B1R sobre la secreción de PRL observados en este sexo. Este efecto novel sobre la activación de $TGF\beta 1$ fue específico del B1R, ya que el agonista B2R no modificó los niveles activos de $TGF\beta 1$ hipofisarios, en ninguno de los sexos.

La liberación de PRL observada en hipófisis de machos al estimular tanto B1R como B2R podría explicar el efecto de *KLK1* observado en este sexo. Es decir, *KLK1* estaría generando quininas locales que al actuar sobre sus receptores liberan PRL en este sexo. En cambio, el aumento en la secreción de PRL inducida por *KLK1* en las hembras no puede explicarse por este mecanismo. Estos resultados en conjunto sugieren que *KLK1* podría tener una tercera vía de acción en la glándula hipofisaria por la cual regula la secreción de PRL.

Se ha descrito que tanto *KLK1B* como *KLK1* activan a renina por clivaje proteico de pro-renina (Schmaier, 2003) y por activación de otras proteasas que activan a

renina (Su, 2014). Se ha demostrado en ratones que KLK1 activa a renina a un pH alcalino cercano a 8.2 (HUMMERICH et al., 1979). Sumado a esto, se ha descrito que los ratones *knock out* para KLK1 (KLK1 *-/-*) presentan una disminución en la expresión génica de renina, comparado con sus pares WT (Trabold et al., 2002).

Renina es una proteasa que forma parte del conocido sistema renina-angiotensina (RAS). RAS desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del sodio y la hemodinámica renal (Nishiyama & Kim-Mitsuyama, 2010). Aparte del RAS sistémico, existen RAS locales en la mayoría de los tejidos, involucrados en otras funciones tejido-específicas como secreción hormonal, proliferación y activación neuronal (Becu-Villalobos et al., 1994; De Paul et al., 1997; G. S. Díaz-Torga et al., 1994; Suarez et al., 2004). Se ha reportado la expresión de todos los componentes del eje clásico del RAS en la hipófisis (Saint-Andre et al., 1986). Angiotensina II (ANGII) se produce localmente en la glándula y el receptor que predomina es AT1, expresándose principalmente en los lactotrofos (Lenkei et al., 1999). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran la acción prolactino-liberadora de ANGIO II a nivel hipofisario mediada por AT1, como así también la alteración en la relación de receptores AT1 y AT2 durante el proceso de tumorigénesis hipofisaria (Diaz-Torga et al., 1998; Iglesias et al., 1999). Más aún, este efecto prolactino-liberador de angiotensina II es mucho más pronunciado en hembras que en machos (G. S. Díaz-Torga et al., 1994). Todos estos antecedentes, en conjunto, podrían explicar la acción prolactino-liberadora de KLK1 observada en hembras.

De este modo, en las hipófisis provenientes de hembras, KLK1 podría estar clivando a pro-renina y favoreciendo la activación del RAS, aumentando los niveles de ANGIO II, que a través de los receptores AT1 promueven la liberación de PRL al medio (**figura 2.9**). Es de nuestro interés poder demostrar, en un futuro próximo, si ésta es la vía indirecta por la cual KLK1 libera PRL en hipófisis de hembras. No descartamos la participación del sistema renina-angiotensina en la regulación de la secreción PRL en hipófisis provenientes de machos.

En resumen, los resultados descritos en este capítulo demuestran que el sistema KLK1-quininas participa en la regulación de la secreción de PRL y que dicha participación es sexualmente dimórfica.

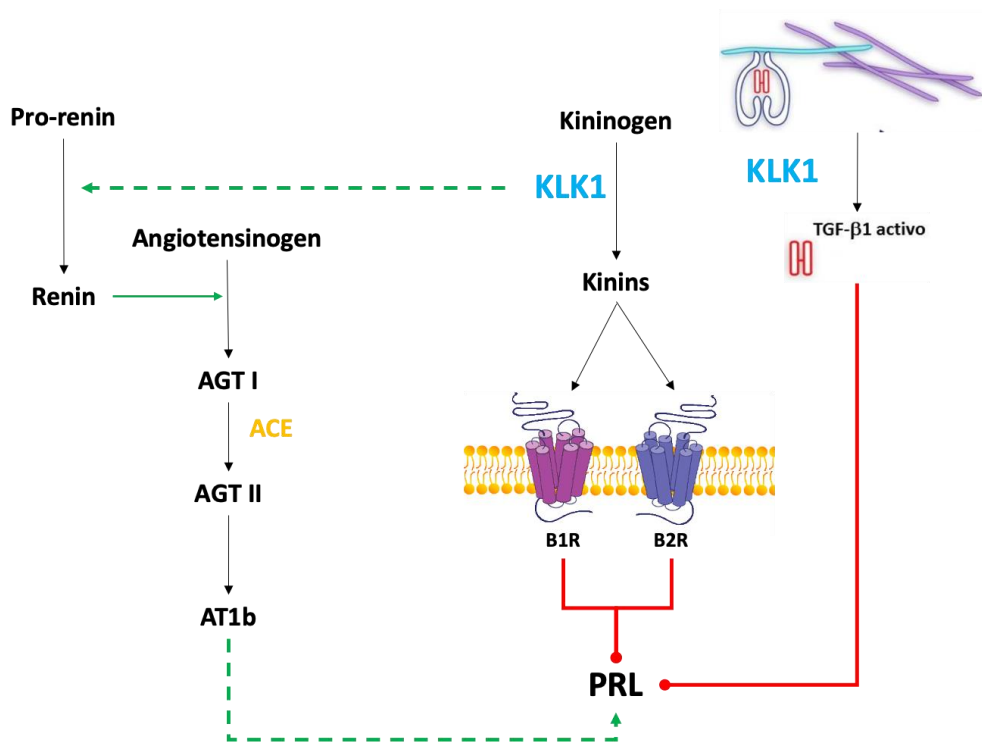


Figura 2.9. Esquema del mecanismo de acción propuesto para el sistema *KLK1*-quininas en hembras: *KLK1* activa localmente a *TGFβ1* latente, pero induce la liberación de *PRL* al medio. Las quininas actuando a través de los receptores *B1R* y *B1R* inhiben la secreción de *PRL* y en el caso de *B1R* también aumenta los niveles de *TGFβ1* activos. Por otro lado, *KLK1* podría clivar a pro-renina, favoreciendo la activación del *RAS*, aumentando los niveles de *ANGII* que a través de los receptores *AT1* promueven la liberación de *PRL* al medio.

Capítulo 3:
Interacción entre B2R y D2R.
Impacto en la fisio-patología
hipofisaria

Introducción capítulo 3

Luego de los interesantes y nóveles resultados obtenidos en el capítulo 2, más precisamente sobre la función sexo-específica del B2R en el control de la secreción de prolactina, nos avocamos a profundizar la respuesta biológica generada frente a la estimulación del B2R en lactotropos.

En esta etapa, 2 trabajos publicados llamaron nuestra atención:

- 1- En prolactinomas humanos **se encontró sobre-expresado (aproximadamente 20 veces) el B2R**, respecto a hipófisis normales (A. J. Ribeiro-Oliveira et al., 2008);
- 2- Demostraron en células HEK293 que el B2R forma un dímero funcional con el D2R, y **esta asociación anula la señalización mediada por la activación del D2R** (Niewiarowska-Sendo, Polit, Piwowar, et al., 2017a).

En base a dichos antecedentes y los resultados presentados en el capítulo 2 de esta tesis, nos preguntamos si la sobreexpresión del B2R encontrada en prolactinomas humanos podría estar involucrada en la falta de respuesta a drogas dopaminérgicas en los pacientes con DARPs. Para explorar esta hipótesis nos propusimos estudiar en profundidad la interacción entre estos dos GPCRs.

Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)

Los GPCRs conforman una superfamilia de aproximadamente 1000 proteínas. Responden a una variedad de estímulos extracelulares que van desde fotones y pequeñas moléculas hasta péptidos y proteínas, tales como hormonas y neurotransmisores, los cuales activan las vías de transducción de señales y, finalmente, dan origen a las respuestas celulares específicas. Siendo los GPCRs responsables de innumerables aspectos de la función celular, actualmente constituyen más del 35% de los blancos de drogas terapéuticas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration, USA)(Hauser et al., 2018; Sriram & Insel, 2018).

Su estructura consiste en 7 dominios trans-membrana (hélices alfa), 3 loops intracelulares, 3 loops extracelulares, 1 cola C-terminal intracelular y una cola N-terminal extracelular.

Dimerización de GPCRs

A mediados de los años 1970s, resultados de numerosos estudios farmacológicos sugerían la formación de dímeros de GPCRs. Sin embargo, pese a la acumulación de evidencia, la idea de heterodimerización de receptores no era ampliamente aceptada ya que los resultados se interpretaban principalmente como evidencias de cooperatividad negativa o positiva entre GPCRs.

La hipótesis sobre la formación de dímeros de GPCRs comenzó a tener más peso a mediados de los 90s, con el desarrollo de las técnicas de *trans*-complementación (Bouvier, 2001). En particular, en 1993 Maggio y colaboradores realizan un estudio con receptores quimera de α 2-adrenérgico/M3-muscarínico, compuesto por los primeros 5 pasos transmembrana de un receptor y los últimos dos dominios transmembrana del otro receptor. Cuando expresaban las dos quimeras por separado, no se detectaba unión del ligando ni transducción de la señal. Sin embargo, la co-expresión de las dos quimeras reestablecía la unión de los ligandos (muscarínico y adrenérgico) y su cascada de señalización (Maggio et al., 1993). Este trabajo junto con otros estudios funcionales de *trans*-complementación fueron interpretados como interacciones intermoleculares entre receptores inactivos de modo tal que reestablecían el dominio de unión al ligando y su cascada de transducción de señales en un complejo de GPCRs.

Se han propuesto diferentes tipos de interacción entre GPCRs, incluida la formación de enlaces disulfuro entre las colas N-terminales, la interacción de las colas C-terminales y las interacciones directas entre los dominios transmembrana (Michel Bouvier, 2001).

La dimerización modula la afinidad por ligandos y la eficacia intrínseca de los receptores

La homo- o hetero-dimerización de GPCRs da como resultado la modulación de las funciones moleculares del receptor, incluida la afinidad de unión a ligando, la transducción de señales y su internalización.

En el caso de la heterodimerización, los complejos macromoleculares están compuestos por dos unidades de receptores funcionales, con propiedades bioquímicas diferentes respecto de los componentes individuales. La heteromerización de los receptores afecta la afinidad por el ligando, y la señalización acoplada a cada uno de los receptores involucrados, otorgándoles propiedades farmacológicas distintas en comparación con los GPCRs monoméricos u homodiméricos (Ferré et al., 2014; Kleinau et al., 2016), definiendo una huella bioquímica específica para cada heterodímero. Es decir, la activación dada por el agonista específico de uno de los receptores participantes puede suprimir o promover alostéricamente la activación del segundo receptor; es más, puede inducir cambios conformacionales que conducen a la activación de diferentes señales, aún en ausencia de su propio agonista (Ferré et al., 2014; Kleinau et al., 2016). Por otro lado, la heterodimerización de GPCRs puede promover una funcionalidad selectiva, donde uno de los receptores induce al otro receptor a señalizar por una cascada de transducción de señales distinta a la convencional. Por último, en muchos casos es indispensable la dimerización para la correcta la internalización y tráfico de los receptores.

Receptores de dopamina

Como mencionamos en la introducción general, la dopamina es una catecolamina con importantes funciones como neurotransmisor en el sistema nervioso central. La dopamina actúa a través de receptores específicos pertenecientes a la familia de GPCRs. Se han distinguido dos grupos de receptores de dopamina, ambos ampliamente distribuidos en tejidos humanos. La sub-familia de receptores tipo D1 comprende los receptores D1 (D1R) y D5 (D5R), que, en general, se encuentran asociados a proteína Gas / olf, activando la adenilato ciclasa (AC) con la liberación de AMPc. Por el contrario, la subfamilia D2, que comprende los receptores D2, D3 y D4 (D2R, D3R y D4R, respectivamente), ejercen un efecto inhibitorio al acoplarse a

proteínas Gai/o, causando una disminución en la concentración de AMPc (Missale et al., 1998).

La respuesta final inducida por dopamina puede ser modificada por diversos factores, entre ellos:

- ambos tipos de receptores de dopamina pueden señalar independientemente de la activación/inhibición de la AC (Beaulieu et al., 2015);
- existen moléculas responsables de la fosforilación (quinasas que fosforilan GPCRs (GRKs)), y desensibilización del receptor (ej. las β -arrestinas), que pueden mediar las funciones de la dopamina en forma independiente de la proteína G (Peterson et al., 2015);
- se ha demostrado existen moléculas que modulan la actividad de las proteínas G (Anderson et al., 2010);
- la asociación entre 2 o más receptores (oligómeros: homómeros o heterómeros) puede modificar sustancialmente la respuesta final de un agonista (Guevara-Lora et al., 2016).

Ha sido demostrado que el D2R puede dimerizar con diferentes receptores de la familia de los GPCRs como por ejemplo D1R y A2A (Bouvier, 2001; Ferré et al., 2014). De particular interés para este trabajo, es el estudio que demuestra que D2R puede dimerizar con B2R, y que esta dimerización podría alterar la señalización de dopamina (Niewiarowska-Sendo, Polit, Piwowar, et al., 2017b).

Dopamina en hipófisis

Como se describió anteriormente, la DA es el principal factor inhibitorio de la secreción de prolactina (PRL). Luego de su interacción con los D₂R, en la membrana de los lactotopos, a los pocos segundos DA aumenta la conductancia de potasio e inactiva los canales de calcio sensibles al voltaje, lo que resulta en una hiperpolarización de la membrana plasmática e inhibición de la liberación de PRL. Dentro de un lapso de minutos a horas, la DA suprime la actividad de la enzima adenilato ciclasa, disminuye los niveles de AMPc y afecta la activación de PKA, inhibiendo la expresión del gen de PRL. Luego de varios días la DA reduce el tamaño y la tasa de proliferación de los lactotopos (Nira Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

Receptores de quininas: B1R y B2R

En mamíferos los genes que codifican para los receptores de las quininas B2R y B1R denominados *BDKRB2* y *BDKRB1*, respectivamente, se encuentran en tándem el mismo *locus* (Leeb-Lundberg, Marceau, Müller-Esterl, et al., 2005).

Las acciones de B2R y B1R están mediadas principalmente por Gαq y Gαi (Leeb-Lundberg, Marceau, Müller-Esterl, et al., 2005). Sin embargo, dependiendo del tipo celular estudiado los receptores de quininas pueden estar acoplados a distintas proteínas Gα. Se sabe que B2R puede activar a proteínas Gαi y Gα_{12/13}, así como interactuar directamente con NOS endotelial, ACE, JAK y STAT (revisado en (Blaukat, 2003)). Sumado a las diversas proteínas G que se acoplan a los receptores, se han descrito hetero-dimerizaciones entre B1R y B2R que modifican la cascada de señalización y complejizan aún más el estudio de los efectos de las quininas sobre determinados tejidos.

Una vez activado el B2R tanto las GRKs como PKC fosforilan los residuos ser/tre en el extremo carboxilo-terminal que reclutan a las β-arrestinas y comienza así el proceso de internalización (Marceau et al., 2020). Este proceso se ha estudiado en numerosos sistemas que incluyen células NG108-15, células mesangiales de rata, células endoteliales, músculo liso de la vasculatura y líneas celulares transfectadas con B2R (Leeb-Lundberg, Marceau, Müller-Esterl, et al., 2005).

Por otro lado, el mecanismo de desensibilización del B1R difiere del de B2R. El extremo carboxilo-terminal del B1R no posee residuos susceptibles de fosforilación, es más, si se comparan los dominios intracelulares de B1R y B2R se puede observar que el extremo C-terminal del B1R está truncado respecto del de B2R y estando ausente el dominio que posee residuos serina y treonina. En 2001 Leeb-Lundberg y colaboradores demostraron que si se reemplaza el extremo C-terminal del B1R por el del B2R, se reducen drásticamente los efectos desencadenados por B1R (Leeb-Lundberg et al., 2001). Más aún, si en la cola terminal del receptor quimera se reemplazan las serinas y treoninas por alaninas (se pierde el sitio susceptible a fosforilación) se recupera parcialmente la actividad de B1R (Leeb-Lundberg et al., 2001). Estos resultados sugieren una actividad constitutiva de B1R por falta de internalización del receptor. Más recientemente, Sabourin y colaboradores describieron, en dos líneas celulares (COS-1 y HEK), que la unión del ligando a B1R no promueve la fosforilación ni la translocación de las β-arrestinas a la membrana

plasmática. En cambio, genera la condensación del complejo ligando-receptor en estructuras que quedan cerca de la membrana plasmática (Sabourin, Bastien, et al., 2002).

Las diferencias en los mecanismos de desensibilización que existen entre B2R y B1R pueden contribuir a los distintos patrones de señalización observados frente a efectores comunes en los distintos tipos celulares.

Se ha demostrado que B2R puede formar homodímeros o heterodímeros con receptores de angiotensina AT1, B1R y D2R (AbdAlla et al., 2001; Quitterer et al., 2004).

Heterodimerización B2R-D2R

Es sabido que: 1- β -arrestina regula la función de ambos receptores (D2R y B2R), su tráfico y mantenimiento en membrana plasmática; 2- ambos receptores comparten muchos componentes en su señalización; y 3- existe una modulación alostérica de estos receptores al formar dímeros (Beaulieu et al., 2015; Sharma, 2014). Estas observaciones, entre otras, proveen evidencias de un posible *cross-talk* entre D2R y B2R, que podría contribuir a la regulación de diversos procesos celulares. Las primeras evidencias de una posible interacción entre la señalización de ambos receptores surgieron en 2004 cuando se observó un antagonismo de dopamina sobre la liberación de calcio intracelular inducido por bradiquinina en una línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) (Hong et al., 2004).

Más recientemente ha sido demostrado la co-localización constitutiva de ambos receptores en membrana plasmática de células HEK293 transitoriamente transfectadas con vectores plasmídicos que codifican para D2R y B2R fusionados a proteínas fluorescentes. En este trabajo los autores demostraron que: *i*- esta colocación en membrana es regulada por la presencia de alguno de los agonistas (DA o BK); *ii*- la dimerización suprime la liberación de calcio inducida por BK, y *iii*- la co-activación de D2R y B2R suprime la inhibición de AMPc inducida por D2R (Niewiarowska-Sendo, Polit, Piwowar, et al., 2017b). Los mismos autores demuestran posteriormente que en las células endoteliales, que endógenamente expresan B2R y D2R, se modifican sus propiedades de adhesión frente a un co-tratamiento con los respectivos agonistas (Niewiarowska-Sendo, Polit, Labeledz-

Maslowska, et al., 2017). Es más, la cooperación entre ambos receptores modula procesos involucrados en estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis en células endoteliales. Un agonista dopaminérgico disminuye las acciones proinflamatorias y pro-oxidativas inducidas por BK (Niewiarowska-Sendo et al., 2018).

B2R y D2R en prolactinomas resistentes a drogas dopaminérgicas

La resistencia a los tratamientos actuales con agonistas dopaminérgicos es una preocupación entre los endocrinólogos. Si bien su etiología es variable, en general no es debida a la falta de expresión del D2R o a mutaciones en el receptor, aunque se han reportado algunos pacientes con una menor expresión del D2R (Molitch, 2014) y alteraciones en la señalización intracelular.

En el 2008 se publicó un análisis detallado de la expresión diferencial de proteínas entre hipófisis normales humanas y adenomas hipofisarios. Los autores encontraron principalmente cuatro proteínas expresadas diferencialmente con potencial implicancia en la tumorigénesis hipofisaria. Entre ellas, describen que el B2R se encuentra sobre-expresado en prolactinomas humanos (aproximadamente unas 20 veces) respecto a hipófisis normales (A. J. Ribeiro-Oliveira et al., 2008). Es desconocido aún el impacto que puede generar la alta expresión del B2R sobre la fisio-patología del prolactinoma.

Por otro lado, se ha observado experimentalmente que el B2R, frente a la presencia de su agonista, puede formar un dímero funcional con el D2R, y esta asociación anula la señalización mediada por la activación del D2R (Niewiarowska-Sendo et al. 2017). Esto fue demostrado en células HEK293, co-transfectadas con ambos GPCRs.

Objetivos capítulo 3

Tomando en cuenta todos los antecedentes descriptos, y sabiendo que:

- los lactotopos expresan endógenamente ambos receptores D2R y B2R;
- en prolactinomas humanos B2R se encontró sobre-expresado (aproximadamente 20 veces), respecto de las hipófisis normales;
- en células HEK293 transfectadas con ambos receptores, la activación de B2R forma un dímero funcional con el D2R, que anula la señalización mediada por la D2R;
- entre un 15 y un 20% de los prolactinomas son resistentes a agonistas dopaminérgicos, y para estos pacientes aún no existe una terapia farmacológica alternativa;

postulamos que la sobreexpresión del B2R en prolactinomas altera la señalización intracelular del D2R contribuyendo a la resistencia a los agonistas dopaminérgicos.

Objetivos específicos

- ⇒ Demostrar la interacción entre B2R y D2R por ensayos de NanoBiT.
- ⇒ Estudiar si la señalización de B2R y/o D2R se encuentra alterada en el heterodímero.
- ⇒ Estudiar si B2R y D2R interactúan en adenomas hipofisarios humanos.

Células HEK293

Las células HEK293, establecidas en 1973 por Frank Graham, derivan de células renales de embrión humano. Para el cultivo de HEK293 (ATCC® CRL-1573) en el laboratorio, se utilizó medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con 5 % v/v de suero fetal bovino, 1 % v/v glutamina, 1 % v/v aminoácidos esenciales (MEM) y 1 % v/v Penicilina/Estreptomicina, ajustado a un pH=7.4.

Clonado molecular

Las secuencias codificantes para D2R y B2R humanos fueron amplificadas por PCR y clonadas en los vectores NanoBiT® (Promega). Brevemente, los extremos C-terminal de los receptores fueron fusionados a la subunidad pequeña (small: Sm) de NanoLuciferasa (1kDa, SmBiT) o la subunidad grande (18kDa, long: LgBiT). Se realizaron 2 combinaciones de constructos (D2R-SmBiT-B2R-LgBiT y D2R-LgBiT-B2R-SmBiT). Se explicará en detalle ésta tecnología más abajo.

A continuación, se detalla el protocolo utilizado para clonar B2R en LgBiT a modo de ejemplo.

1- PCR de clonado molecular

Se colocaron los sitios de restricción de BamHI y NotI flanqueando la secuencia de ADN codificante de B2R (humano). La secuencia fue amplificada con primers diseñados específicamente para generar el constructo 5' – BamHI-B2R-NotI – 3'.

Se utilizó como *primer forward* el sitio de restricción para BamHI seguido de la secuencia inicial de B2R sin el codón *start* (5'-ACAGCGGGATCCCTCAATGTCACCTTGCAAGGGC-3') y como *primer reverse* el sitio de restricción de NotI seguido de la secuencia final de B2R sin el codón *stop* (5'-ACAGCGGCGGCCGCTGTCTGCTCCCTGCCC-3'). Luego los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 1% y se corroboró que el peso molecular del producto amplificado coincidiera con el peso molecular estimado. Una vez validado el producto de PCR, se purificó el ADN con el kit K3100-01/02 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

2- Digestión

Se digirieron por separado el constructo 5' – BamHI-B2R-NotI – 3' y el plásmido aceptor pIRES NEO LgBiT® con las enzimas de restricción correspondientes (BamHI y NotI) durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, los productos de digestión fueron corridos en un gel de agarosa 1% para confirmar si el plásmido aceptor y el inserto (5' – BamHI-B2R-NotI – 3') fueron digeridos correctamente (**figura 3.1**).

Luego, se purificó el ADN a partir del gel de agarosa con el kit K2100-12/15 (Invitrogen) y al finalizar se midió la concentración de ADN en un nanodrop (Clariostar).

3- Ligación

Se fusionó el inserto 5' – BamHI-B2R-NotI – 3' en el plásmido aceptor con una enzima ligasa de ADN (**figura 3.1**). Dado que la ligación depende de la concentración de ADN y de los pares de bases del inserto y el plásmido, la reacción se llevó a cabo según las siguientes ecuaciones:

$$(1) \quad ul\ inserto = \left(\frac{3}{1}\right) 100ng\ vector \left(\frac{kb\ inserto}{kb\ vector}\right) \left(\frac{1}{ng\ inserto}\right)$$

$$(2) \quad ul\ plásmido = 100ng\ vector \frac{1\ ul}{ng\ vector}$$

Se colocaron los ul de inserto y plásmido (vector) calculado, 1 ul de T4 ligasa, 1ul de buffer de la enzima y agua libre de ADNAsas hasta llegar a un volumen final de 10ul. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche en un baño de hielo y agua con el objetivo de generar una rampa de temperatura de 0°C a 15°C para optimizar la reacción de ligación.

4- Transformación en *E.coli* competente

30ul de *E.coli* competentes (HB101, L201A) y 5ul del producto de ligación se incubaron durante 15 minutos en hielo. Luego, se realizó un *shock* térmico a 42°C durante 45 segundos con el objetivo de formar poros en la pared de las bacterias que

permitan el ingreso del ADN foráneo. A continuación, se colocaron las bacterias en hielo y se esperó 5 minutos para que las bacterias se estabilicen (**figura 3.2**).

En condiciones de esterilidad, se agregó 1ml de LB a las bacterias y se incubó durante 1h 30min a 37°C y en agitación (550 rpm) para evitar que las bacterias precipiten. Luego, las bacterias fueron centrifugadas a 3000g y el pellet se resuspendió en 100ul de LB estéril. Se plaquearon las bacterias en LB-agar-ampicilina y se incubaron durante la noche en una estufa a 37°C para seleccionar las bacterias que incorporaron el producto de ligación (**figura 3.3**).

Al día siguiente se picaron las colonias y se resuspendieron en 10ul de agua libre de ADNasas. A 5ul de las colonias resuspendidas se le añadieron 100ul de LB y se guardaron en heladera hasta validar la incorporación del ADN en cada clon.

La correcta incorporación del ADN exógeno a las bacterias se validó por PCR. La reacción se llevó a cabo con los 5ul restantes de cada colonia resuspendida, 12,5ul de Green Taq y *primers* diseñados específicamente para hibridizar en el extremo 5' con la secuencia de B2R y en el extremo 3' con la porción final de LgBiT.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1% para determinar la presencia del constructo de interés en cada una de las colonias. Asimismo, se corroboró que peso molecular de los productos amplificados coincida con el peso molecular teórico estimado (**figura 3.3**).

5- Miniprep – secuenciación – maxiprep

Se tomaron los 100ul de bacterias transformadas y se incubaron durante toda la noche en 6ml de LB-ampicilina a 37°C en agitación.

Al día siguiente, se purificó el ADN plasmático de las bacterias con un kit comercial (PureLink K210011, Invitrogen). El ADN extraído se preparó para secuenciación. Se utilizó el *primer forward* T7 que hibridiza con el péptido señal presente en el plásmido aceptor, y el *primer reverse* que hibridiza con el final de la secuencia de LgBiT.

Los resultados de secuenciación se analizaron con SnapGene. Se verificó que los picos de secuenciación fueran finos y altos. Para determinar la presencia de B2R se realizó un Blast entre los resultados de secuenciación y la secuencia de B2R humano. Además, se realizó un Blast entre los resultados de secuenciación y la secuencia de

LgBiT. Finalmente se buscaron los codones de inicio y fin de la traducción y se corroboró que las secuencias de B2R y LgBiT estuvieran dentro del marco de lectura.

Luego del análisis de la secuencia se eligió un clon y se crecieron las bacterias en 200ml de LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizó una maxiprep con el kit PureLink K2100 (Invitrogen) para purificar el ADN a partir de bacterias. Luego, se midió la concentración de ADN y se realizó la dilución correspondiente para que quede una concentración final de 1ug/ul para su posterior uso en transfección celular.

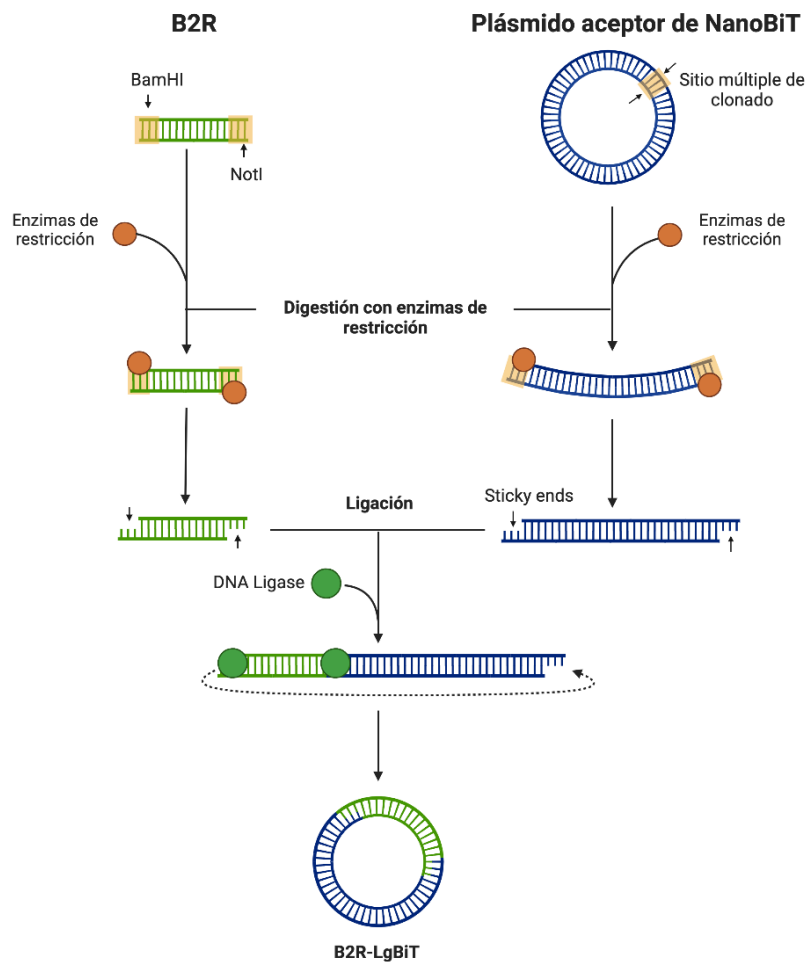


Figura 3.1. Esquema de la digestión y ligación de ADN para generar el plásmido B2R-LgBiT. Luego del clonado molecular, donde se añadieron los sitios de restricción para BamHI y NotI flanqueando la secuencia codificante de B2R humano, se digirió el inserto (BamHI-B2R-Not1, verde) y el plásmido aceptador (azul) con las enzimas de restricción correspondiente. A continuación, se realizó la ligación para obtener el plásmido deseado; B2R-LgBiT.

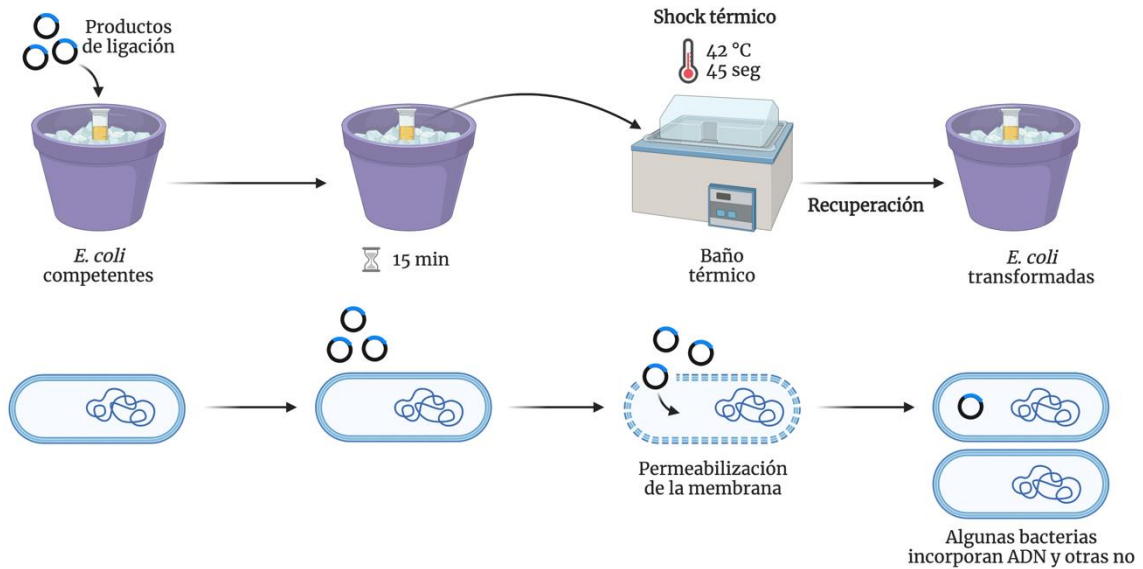


Figura 3.2. Esquema de la transformación en *E. coli* competente. Los productos de ligación fueron incubados durante 15 minutos con las bacterias competentes. Luego, se realizó un shock térmico con el fin de permeabilizar la membrana y que las bacterias incorporen el ADN foráneo.

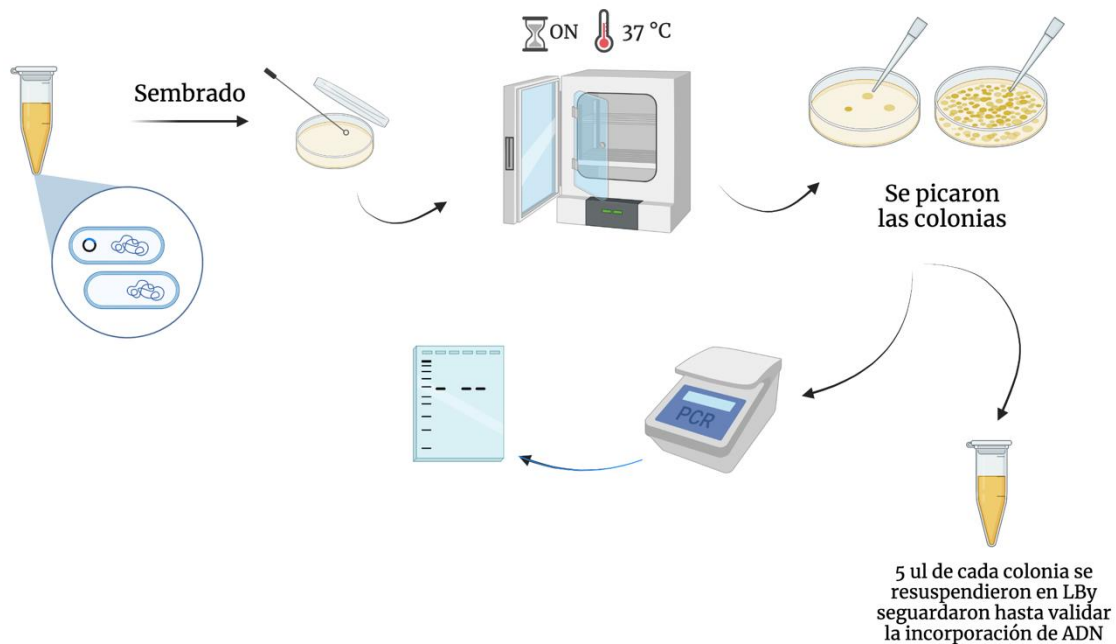


Figura 3.3. Esquema del protocolo realizado luego de la transformación bacteriana. Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en LB-Agar con antibiótico e incubadas durante la noche a 37°C. Al día siguiente se picaron las colonias y se resuspendieron en agua estéril. Sobre una alícuota se realizó una PCR para determinar qué colonias habían incorporado el plásmido de interés. Otra alícuota se resuspendió en LB y se guardó en heladera para posterior procesamiento para miniprep – secuenciación – maxiprep.

Transfección celular

Las células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente utilizando polietilenimina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) en un ratio 1:4,8 (ug ADN:ul PEI). Se sembraron las células para que alcancen un 70-80% de confluencia al momento de transfección. Se preparó la dilución ADN:PEI y se dejó durante 30 min a temperatura ambiente para que se formen los complejos. Durante este período la mezcla se mantuvo en agitación ya que el PEI precipita. Se agregó la dilución a las células y se incubó durante 4hs en estufa a 37°C con un flujo de 5% CO₂. Las células transfectadas transitoriamente se utilizaron entre 24 y 48hs post transfección.

Ensayos de Nano Binary Technology: NanoBiT®. Estudio de la interacción entre receptores

NanoBiT es un sistema reportero de complementación estructural compuesto por dos subunidades de la nanoluciferasa: una subunidad de BiT grande (18kDa, LgBiT) y un péptido pequeño complementario (1kDa, SmBiT). Las dos porciones de la nanoluciferasa por separado son inactivas, pero cuando están a una distancia menor o igual a 10nm se reensambla la proteína funcional. En presencia de su sustrato (Coelenterazina), la nanoluciferasa cataliza una reacción que emite luz a 475nm (**figura 3.4A**).

Los receptores B2R y D2R fueron fusionados a las porciones inactivas de la nanoluciferasa por clonado molecular (ver apartado clonado molecular). Dichos constructos fueron co-transfectados transitoriamente en células HEK293. 24hs post transfección se levantaron las células con tripsina y se resuspendieron en OptiMem. En una placa p96 se sembraron 90000 células/well y se agregaron 50ul a cada well de coelenterazina (CE) y se midió la luz emitida a 475nm cada 5 minutos. La luz emitida da señal de una nanoluciferasa funcional, y es una medida de la interacción entre los dos receptores estudiados en células vivas.

Ensayos de NanoBiT®: validación de la funcionalidad de los receptores

Para validar la funcionalidad de las proteínas quiméricas se estudió el reclutamiento de proteínas G α mediante ensayos de NanoBiT. La región codificante de cada una de las 4 proteínas G α fue amplificada por PCR y clonada en vectores NanoBiT.

Para evaluar el reclutamiento de proteínas G α , células HEK293 fueron co-transfectadas con B2R-LgBiT y G α -SmBiT y estimuladas con los respectivos agonistas. El reclutamiento de las proteínas G α se evaluó en función de la luz emitida luego del agregado de CE.

Los resultados de los ensayos de NanoBiT se expresaron como:

$$(3) \quad \Delta RLU = \frac{\text{luminiscencia pre ligando} - \text{luminiscencia post ligando}}{\text{luminiscencia pre ligando}}$$

Determinación de la movilización de calcio intracelular

La movilización de calcio intracelular en células HEK293 transfectadas transitoriamente con B2R y/o D2R wild type (wt) fue determinada con el kit comercial Fluo-4 NW (F36205, F36206, Molecular Probes™) según las instrucciones del fabricante.

Brevemente, 24-36hs post transfección las células fueron levantadas y resuspendidas en el buffer del ensayo (HBSS 1X, HEPES 20 mM). Luego, se sembraron 125000 células por *well* en una placa p96 y se dejó estabilizar durante 1 hora a 37°C. A continuación, se agregaron 45ul de la solución de tinte 2X (contiene probenecid 5mM) y se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Luego, la placa se incubó durante 30 minutos más a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incorporación del probenecid la placa se colocó en el lector clariostar que contiene unos inyectores que fueron cargados con las soluciones de agonistas correspondientes. Cada *well* fue excitado con un láser de 488nm y se registró la emisión a 516nm cada un segundo durante 60 seg, el agonista se añadió a los 10 segundos de comenzar la medición. Una vez finalizada la medición de la

fluorescencia de toda la placa, se cargaron 10ul de una solución de ionomicina (5uM concentración final en *well*) para liberar todo el calcio intracelular y se midió la fluorescencia emitida a 516nm. Este último paso se realizó para relativizar los resultados de cada *well* al máximo de fluorescencia posible. Se realizó 3 réplicas por condición y 3 experimentos independientes.

Los resultados se expresaron como:

$$(4) \quad \frac{\text{fluorescencia a 516nm} - \text{promedio de fluorescencia 1 a 10 seg}}{\text{fluorescencia post estímulo con ionomicina}}$$

Adenomas hipofisarios humanos

Los adenomas hipofisarios humanos fueron provistos por el Biobanco HUB-ICO-IDIBELL, Barcelona, España. Al momento de extracción del tumor, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -70°C hasta el momento de uso.

Procesamiento de las muestras para AlphaLISA

Las porciones obtenidas de las biopsias de los adenomas hipofisarios fueron homogenizados con un Polytron (3 períodos de 15 segundos cada uno) en un buffer de extracción (Tris-HCl 10mM pH 7.4, 1 mM EDTA, 300 mM KCl) con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche Molecular Systems, USA). Luego, el homogenato fue centrifugado a 1000g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 12000g durante 30 minutos a 4°C para extraer las membranas. El precipitado fue resuspendido en Tris-HCl 50mM (pH 7.4) y la concentración de proteínas fue determinada por BCA con un kit comercial (BCA Pierce™, Thermofisher). Se realizaron alícuotas de 40µg. A continuación, las alícuotas fueron centrifugadas a 12000g durante 30 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en el

buffer de AlphaLISA (AlphaLISA HiBlock Buffer, Perkin Elmer) a una concentración de 0.5 µg/µl.

AlphaLISA

El ensayo de AlphaLISA permite estudiar la interacción entre 2 proteínas en tejido nativo. En este caso el objetivo fue estudiar la interacción entre B2R y D2R en adenomas hipofisarios humanos (**figura 3.9A**). Brevemente, las membranas extraídas se incuban con anticuerpos primarios que reconocen a las proteínas de interés (B2R y D2R humanos), luego se incuban con anticuerpos secundarios conjugados a una bead donora (azul) y una aceptora (roja). Si los receptores estudiados están a una distancia menor a 200nm (**figura 3.9A**), la bead donora y la aceptora entran en proximidad. Cuando se excita la muestra con un láser a 680nm, la bead donora genera un singlete de oxígeno que desencadena una reacción química en la bead aceptora que resulta en un pico de emisión a 615nm.

Protocolo detallado: en una placa p384 se incubaron 5µg de muestra (membranas plasmáticas extraídas y resuspendidas en el buffer de AlphaLISA) con 10nM de anticuerpo primario anti-B2R (mouse, BD-610451) y 10nM de anticuerpo primario anti-D2R (rabbit, AF 960, Frontier Institute) durante toda la noche en cámara húmeda, en oscuridad y a 4°C. Al día siguiente, la placa se retiró de la heladera y se esperó 1h a que llegue a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 5µl de anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a la bead aceptora (concentración final: 20µg/ml, AlphaLISA anti-mouse IgG Acceptor beads AL164C, Perkin Elmer) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad. A continuación, se le agregaron 5µl de anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a la bead donora (concentración final 20µg/ml, Anti-Rabbit IgG AlphaLISA Donor beads AS105D, Perkin Elmer) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Luego, cada una hora, en un equipo ClarioStar, se irradió a cada well con un láser a 680nm y se midió la luz emitida a 615nm. La señal inespecífica (control negativo) se determinó incubando las muestras en ausencia del anticuerpo anti-B2R (aceptor). Se realizaron 3 réplicas de cada condición (muestra y control negativo) y 2 ensayos independientes de AlphaLISA.

Resultados capítulo 3

Validación de la interacción entre B2R y D2R medida por NanoBiT

Comenzamos el estudio validando la interacción de B2R y D2R mediante la técnica NanoBiT (**figura 3.4A**). Para ello, generamos las proteínas quiméricas por clonado molecular: el B2R humano fusionado al fragmento grande de la Nanoluciferasa (B2R-LgBiT) o al fragmento pequeño de la enzima (B2R-SmBiT) y D2R humano también fusionado a las porciones inactivas de Nanoluciferasa (D2R-SmBiT y D2R-LgBiT). Luego, las células HEK293 fueron transfectadas transientemente con distintas combinaciones complementarias de los constructos para realizar los ensayos de NanoBiT. Como controles negativos de la técnica se co-transfectaron los receptores fusionados a una de las porciones inactivas de NL junto con el plásmido complementario correspondiente vacío, es decir, la región codificante de SmBiT o LgBiT sin la secuencia codificante del receptor (SmBiT vacío y LgBiT vacío, **figura 3.4B**).

Por un lado, corroboramos la interacción entre los receptores y, por otro lado, encontramos que la mejor combinación fue B2R-LgBiT + D2R-SmBiT (**figura 3.4B**). Además, como puede observarse en la **figura 3.4C**, la interacción entre B2R y D2R fue estable en el tiempo durante los primeros 35 minutos. Luego, la luz emitida comienza a decaer por consumo del sustrato de la NanoLuciferasa: coelenterazina (CE).

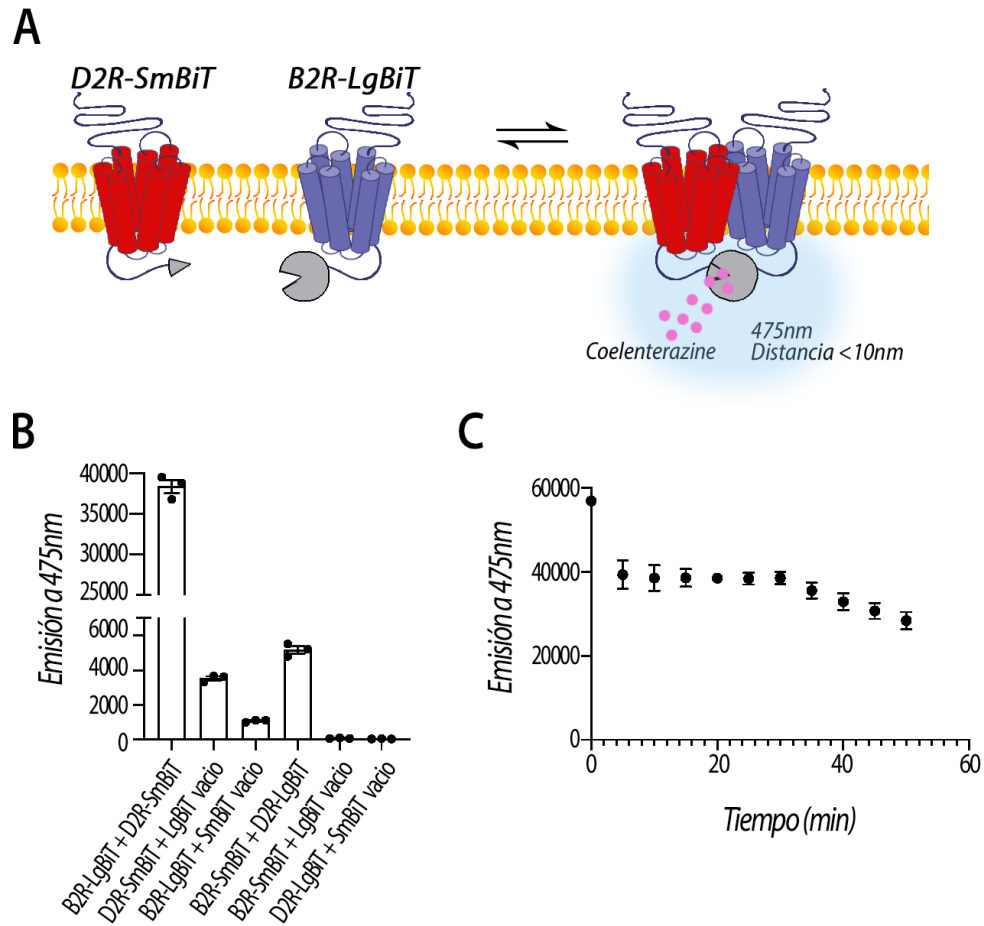


Figura 3.4. Interacción física entre B2R y D2R validada por ensayos de NanoBiT®. (A) Representación esquemática del ensayo de NanoBiT para evaluar la interacción entre GPCRs. Las células HEK293 fueron transfectadas transientemente con B2R y D2R humano fusionados a una de las porciones inactivas de la NanoLuciferasa (NL). Luego de la incubación con coelenterazina (CE), la actividad de la NL re-ensamblada fue medida a 475nm. (B) Interacción basal de B2R y D2R. Se analizaron dos combinaciones; B2R-LgBiT + D2R-SmBiT o B2R-SmBiT + D2R-LgBiT. Los controles negativos se realizaron con el vector aceptor sin la secuencia de B2R o D2R (LgVacío o SmVacío). (C) Interacción B2R/D2R en el tiempo.

Funcionalidad de B2R: capacidad de reclutar proteínas G α

Se ha reportado que las acciones de B2R podrían estar mediadas principalmente por G α_q y G α_i (Leeb-Lundberg, Marceau, Müller-Esterl, et al., 2005). Se sabe que además B2R puede activar a proteínas G α_s y G $\alpha_{12/13}$, así como interactuar directamente con NOS endotelial, ACE, JAK y STAT (revisado en (Blaukat, 2003)). Sumado a las diversas proteínas G que se acoplan a estos receptores, se han descrito hetero-dimerizaciones que modifican la cascada de señalización y complejizan aún más el estudio de los efectos de las quininas sobre determinados tejidos.

Dado que B2R puede acoplarse a distintas proteínas G α , evaluamos específicamente en nuestro sistema, el tipo de proteína G α reclutado por B2R mediante la técnica de NanoBiT. En primera instancia generamos las proteínas quiméricas por clonado molecular; B2R-LgBiT y las diferentes G α como G α -SmBiT. Dichos constructos fueron co-transfectados transientemente en células HEK293. 24hs post-transfección, las células fueron levantadas y sembradas en una placa p96 donde se les añadió el sustrato de la NL. Se esperó 20 minutos a que el sistema se estabilice y luego se estimuló con distintas concentraciones del agonista específico de B2R (10^{-5} M a 10^{-9} M). Encontramos que B2R recluta específicamente a G α_i y G α_q (**figura 3.5A y 3.5C**) de una forma dosis-dependiente (tiempo = 5 min, **figura 3.5B y 3.5D**), pero no se acopla a G α_s ni G $\alpha_{12/13}$ en nuestro sistema (**figura 3.5E-H**).

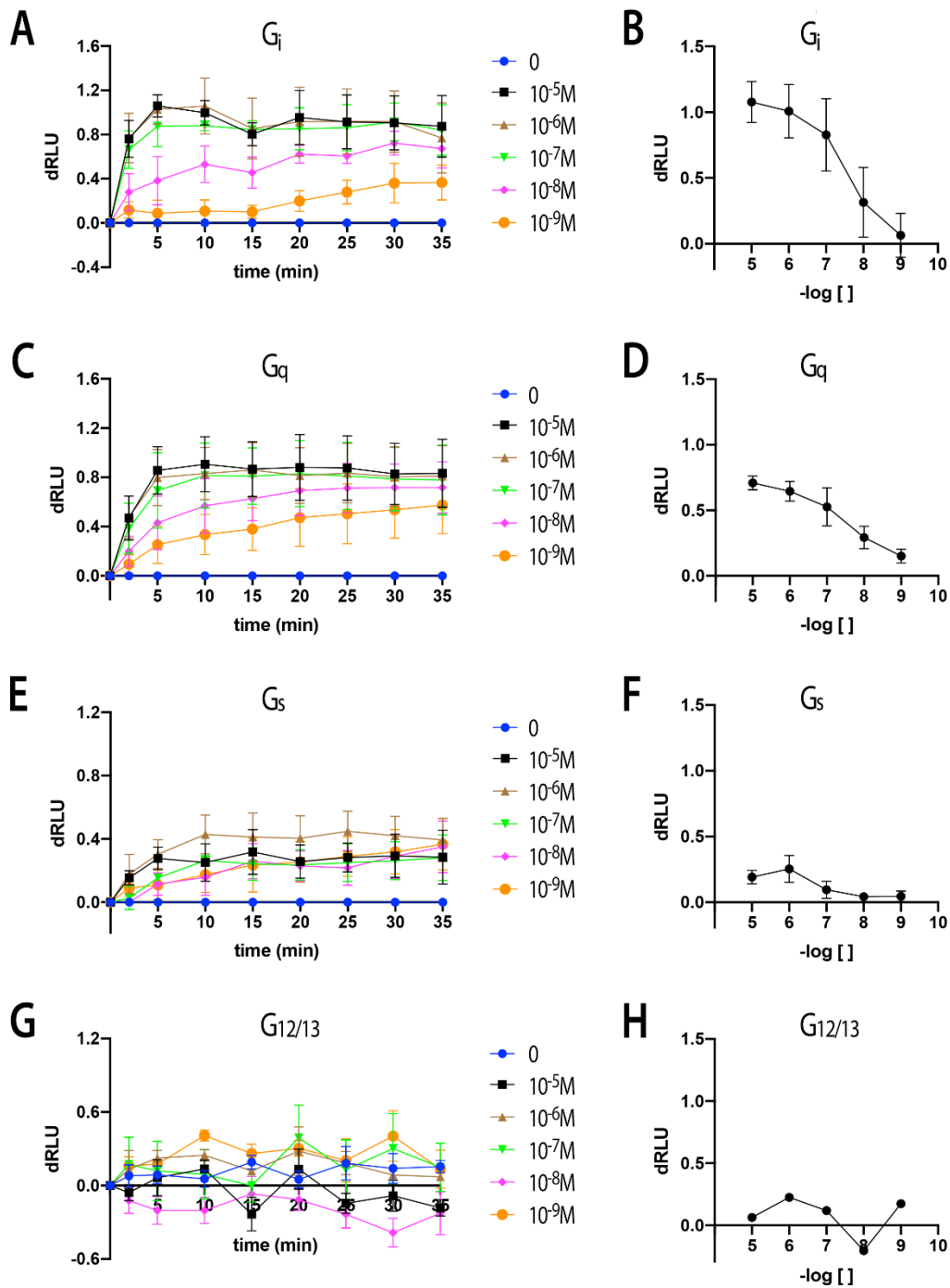


Figura 3.5. Funcionalidad de B2R validada por ensayos de NanoBiT®. Los constructos B2R-LgBiT y Ga-SmBiT fueron transfectados transientemente en células HEK293. Las células fueron incubadas primero con el sustrato de la NL, coelenterazina, y luego estimuladas con distintas concentraciones del agonista específico de B2R ($10^{-5}M$ a $10^{-9}M$). La actividad de NL fue medida a 475nm cada 5 minutos en un lector de placa ClarioStar. (A) y (B) G_{ai} . (C) y (D) G_{aq} . (E) y (F) G_{as} . (G) y (H) $G_{a12/13}$. N=3 réplicas de 3 experimentos independientes.

Sin embargo, cuando evaluamos la interacción basal (en ausencia del agonista del receptor) entre B2R y las diferentes proteínas G α , (**figura 3.6A**), pudimos observar que basalmente B2R interactúa más con G α_q que con G α_i (**figura 3.6B**), sugiriendo que en nuestro sistema B2R podría señalizar principalmente por la vía de G α_q .

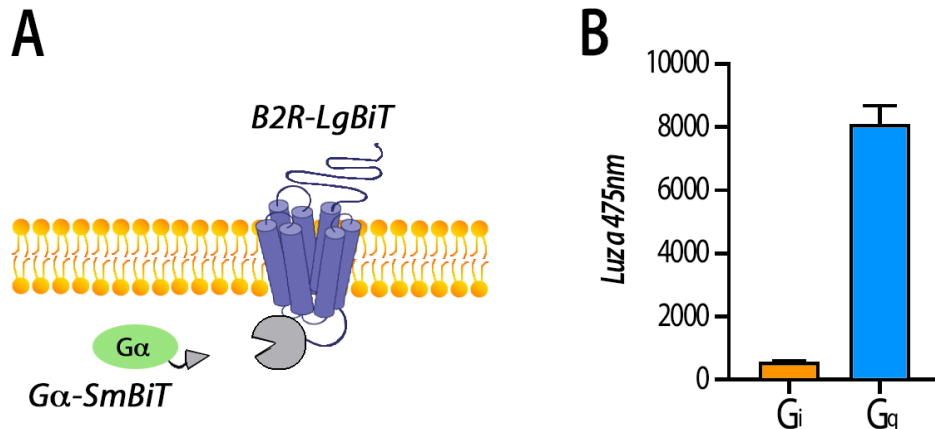


Figura 3.6. Interacción basal de B2R con G α_i y G α_q previo al agregado del agonista de B2R.

Es sabido que G α_q activa distintas isoformas β de la fosfolipasa C (PLC- β 1-4), las cuales clivan al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P $_2$) en inositol trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol anclado a la membrana (DAG). Ambos actúan como segundos mensajeros. Por un lado, la función principal del IP $_3$ es abrir los canales de Ca $^{2+}$ presentes en el retículo endoplasmático. Por otro lado, el DAG activa a la proteína-quinasa C (PKC) por unión directa a la región regulatoria de PKC. Al igual que PKA, PKC fosforila a distintas proteínas blanco en los residuos serina/treonina.

Dado que en nuestro sistema B2R recluta preferentemente a G α_q , para estudiar la señalización celular desencadenada evaluamos la movilización de calcio intracelular inducida por dicho receptor. Las células HEK293 fueron transfectadas transientemente con B2R humano salvaje (B2R-WT) (**figura 3.7A**). 32hs post-transfección las células fueron sembradas en una placa p96 e incubadas con el agonista específico de B2R (100nM o 30nM) en presencia y ausencia de su antagonista Icatibant (1 μ M). La medición de calcio intracelular se determinó con la sonda FLUO 4 NW (invitrogen) en un lector de fluorescencia ClarioStar.

Encontramos que la dosis 100nM del agonista de B2R promueve una movilización de calcio intracelular y una dosis menor del agonista (30nM) genera una respuesta menor (**figura 3.7B**, curva naranja y curva azul, respectivamente). La pre-incubación con Icatibant previene completamente la respuesta inducida por la dosis de 30nM del agonista (curva marrón), pero parcialmente la respuesta inducida por 100nM del agonista de B2R (curva verde).

A continuación, estudiamos la movilización de calcio intracelular inducida por B2R en presencia del D2R. Co-transfectamos transientemente a las células HEK293 con B2R y D2R WT humanos (**figura 3.8A**). Luego, las células fueron estimuladas con el agonista de B2R.

Como podemos observar en la **figura 3.8B**, la movilización de calcio intracelular no se vio afectada por la presencia del D2R, para las dosis de agonista de B2R estudiadas.

Otro grupo de células co-transfectadas fue incubado con 100nM del agonista de B2R en ausencia o presencia del antagonista de D2R (haloperidol 1uM) o del agonista de D2R (quimpirole 100nM). Como se observa en la **figura 3.8C**, ni haloperidol, ni quimpirole alteraron la movilización de calcio intracelular inducida por 100nM del agonista de B2R.

Estos resultados preliminares sugieren que ni la presencia del D2R, ni de sus ligandos (agonista o antagonista) interfieren la movilización de calcio dependiente de B2R.

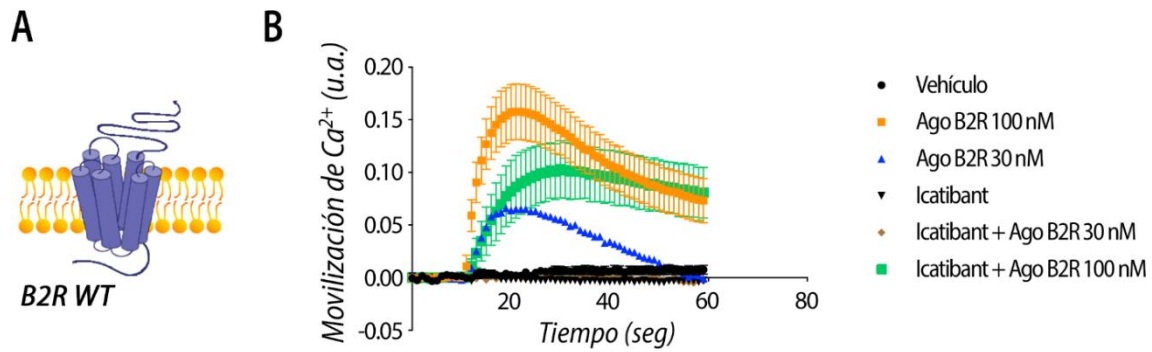


Figura 3.7. Funcionalidad de B2R determinada por la movilización intracelular de calcio con la sonda FLUO4-NW. (A) Las células HEK293 fueron transfectadas transientemente con B2R humano WT. (B) **Movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por estimulación del B2R.** Las células fueron incubadas con dos dosis del agonista de B2R (100nM y 30nM) en presencia o ausencia del antagonista de B2R, Icatibant (1uM). La movilización de calcio fue determinada con el kit FLUO 4 NW (Invitrogen).

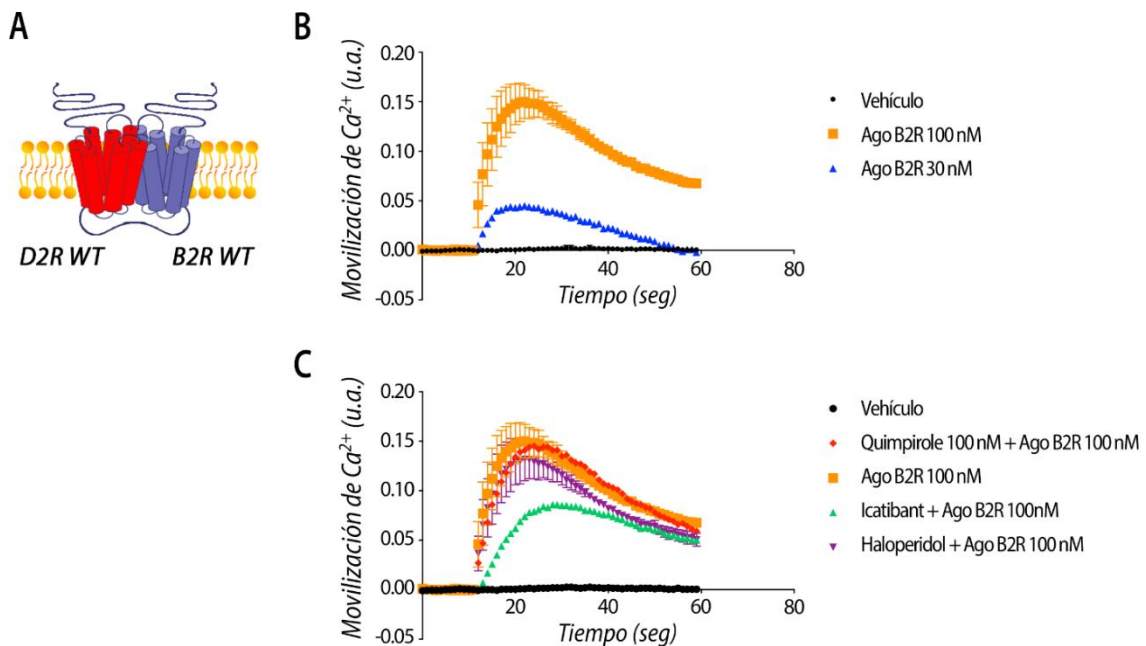


Figura 3.8. Funcionalidad de B2R en el heterodímero B2R-D2R. (A) Las células HEK293 fueron co-transfectadas transientemente con B2R y D2R humanos. (B) las células fueron incubadas con dos dosis del agonista de B2R (100nM y 30nM). (C) Otro grupo de células co-transfectadas fueron incubadas con 100nM del agonista de B2R en ausencia o presencia del antagonista del D2R (haloperidol 1uM) o el agonista (quimpirole 100nM). La movilización de calcio fue determinada con el kit FLUO 4 NW (Invitrogen).

Interacción entre B2R y D2R en adenomas hipofisarios humanos

Una vez validada la interacción entre los receptores en una línea celular, estudiamos si dicha interacción podía ocurrir en tejido nativo de adenomas hipofisarios humanos por la técnica de AlphaLiSA (**figura 3.9A**).

Las membranas de distintos adenomas hipofisarios fueron extraídas e incubadas con anticuerpos primarios que reconocen a B2R y D2R. Luego, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a beads, una aceptora y otra donora. Se estimuló al sistema con un láser a 680nm que excita a la bead donora. Ésta libera un singlete de oxígeno. Si los receptores están a una distancia menor a 200nm, por difusión, el singlete de oxígeno alcanza a la bead aceptora y desencadena una reacción química en la bead aceptora que resulta en un pico de emisión a 615nm (**figura 3.9A**). Por lo tanto, la fluorescencia detectada a esa longitud de onda representa una medida de la interacción entre los dos receptores en el tejido nativo. La señal inespecífica (control negativo) se determinó incubando las muestras en ausencia del anticuerpo anti-B2R (aceptor).

Medimos la interacción entre B2R y D2R en distintos tipos de adenomas hipofisarios; prolactinomas (**figura3.9B**), prolactinomas mixtos (secretores de PRL y GH) (**figura 3.9C**) y adenomas no funcionantes (**figura 3.9D**).

Encontramos que, efectivamente, en los prolactinomas existe una interacción significativa entre los dos receptores (**figura3.9B**), mientras que en los prolactinomas mixtos no se detectó dicha interacción (**figura3.9C**). Sorpresivamente, los adenomas no funcionantes también presentaron una interacción significativa entre B2R y D2R, incluso superior a la encontrada en prolactinomas (**figura3.9D**). Es importante remarcar que, aún hoy en día es un desafío el tratamiento de los adenomas hipofisarios no-funcionantes ya que actualmente no existen terapias para estos pacientes que, en la gran mayoría deben ir a cirugía.

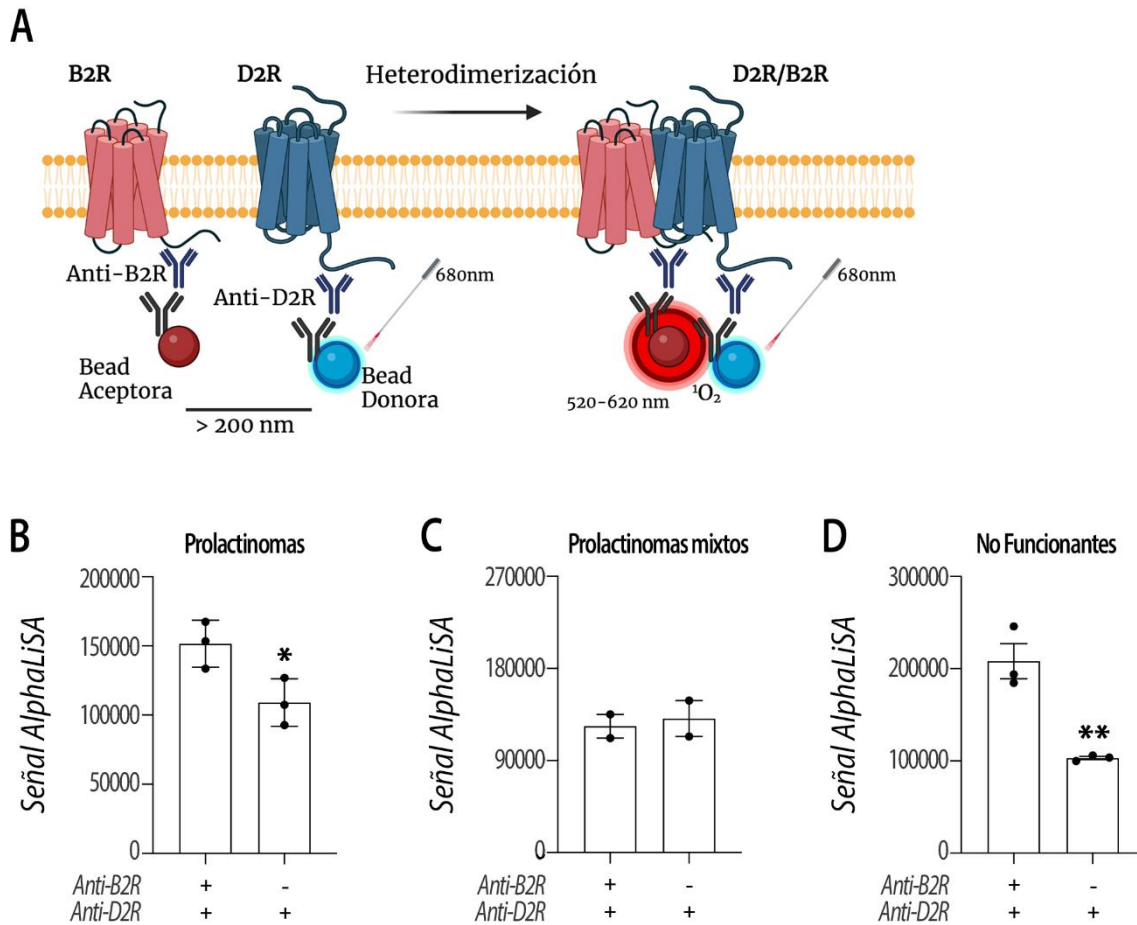


Figura 3.9. Interacción entre B2R y D2R en adenomas hipofisarios humanos medida por AlphaLiSA. (A) Representación esquemática del ensayo de AlphaLiSA para la determinación de la interacción entre dos proteínas en tejido nativo. Se extraen las membranas de la muestra de tejido nativo y se incuban con anticuerpos primarios que reconocen los GPCRs de interés (en este caso anti-B2R y anti-D2R). Luego, se incuban con anticuerpos secundarios conjugados a bead aceptora (roja) o donora (azul). Se irradia con un láser a 680nm que excita a la bead donora. Se genera una reacción química que libera un singlete de oxígeno (1O_2). Si la bead aceptora y donora se encuentran a una distancia menor a 200nm, el singlete difunde y excita a la bead aceptora (roja) desencadenando una reacción que emite entre 520-620nm. La señal inespecífica (control negativo) se determinó incubando las muestras en ausencia del anticuerpo anti-B2R (aceptor). **(B) Prolactinomas.** N=3. **(C) Prolactinomas mixtos (PRL+GH).** N=2. **(D) Adenomas no funcionantes.** N=3. Se promediaron 3 réplicas de 2 ensayos independientes.

Conclusiones capítulo 3

- ✎ B2R y D2R forman un heterodímero funcional en células HEK293.
- ✎ En ese sistema B2R recluta principalmente a Gαq y en menor medida Gαi.
- ✎ En células HEK293, la activación de B2R induce un aumento transitorio en los niveles de Ca²⁺ intracelular.
- ✎ En células HEK293 co-transfectadas con B2R y D2R WT humanos, la movilización de Ca²⁺ inducida por la activación de B2R no se ve alterada en el heterodímero B2R/D2R.
- ✎ La manipulación farmacológica del D2R con su agonista o antagonista no altera la respuesta intracelular desencadenada por la activación del B2R en células HEK293 co-transfectadas con ambos receptores.
- ✎ Validamos, por la técnica AlphaLiSA, que existe una interacción entre B2R y D2R en prolactinomas y en adenomas no funcionantes humanos.

Discusión capítulo 3

En este capítulo estudiamos la interacción entre el receptor de dopamina D2 y el receptor de quinina B2.

Comenzamos clonando las secuencias codificantes de B2R y D2R humanos en los vectores NanoBiT®. Luego, el ADN plasmídico fue incorporado exitosamente por bacterias *E.coli* competentes, amplificado y purificado. Luego de validar la secuencia del plásmido amplificado por secuenciación y el programa Blast, se realizaron transfecciones transiente en células HEK293 con los plásmidos contruidos para la técnica NanoBiT®.

Validamos la formación de heterodímeros B2R/D2R en células HEK293 transfectadas transitoriamente con la región codificante de ambos receptores humanos, en concordancia con lo reportado por Niewiarowska-Send y colaboradores en 2017 (Niewiarowska-Sendo, Polit, Piwowar, et al., 2017a). Sin embargo, en este trabajo, profundizamos aún más dicha interacción y su impacto sobre las señalizaciones evocadas, utilizando una técnica más novedosa; NanoBiT®, que actualmente se utiliza ampliamente para el estudio de la interacción entre dos proteínas de interés.

Ha sido descripto que, dependiendo del tipo celular estudiado los receptores de quininas pueden estar acoplados a distintas proteínas G α , como así también interactuar directamente con NOS endotelial, ACE, JAK y STAT (Blaukat, 2003).

Utilizando la técnica de NanoBiT, en el presente trabajo demostramos que el B2R humano, transfectado transientemente en células HEK293, recluta principalmente a G α_q y en menor medida a G α_i en condiciones basales, y también frente a un estímulo específico en forma dosis-dependiente. No observamos reclutamiento de proteínas G α_s , ni G $\alpha_{12/13}$.

La particularidad que posee el B2R de reclutar diferentes proteínas G α nos sugiere que el reclutamiento selectivo de distintas proteínas G – en un mismo tejido – podría ser dependiente del microambiente celular.

Al respecto, en el capítulo 2 de esta tesis observamos que la activación selectiva de B2R en explantes hipofisarios incubados *ex vivo* indujo una liberación de

prolactina dosis-dependiente en hipófisis provenientes de machos. Sin embargo, tuvo un efecto inverso en las hembras: la administración del agonista de B2R inhibió la secreción de prolactina en este sexo.

Se sabe que la vías G α i y G α q están involucradas en la inhibición y liberación de prolactina, respectivamente. Por lo tanto, el dimorfismo sexual encontrado en el control de la secreción de prolactina inducido por B2R podría relacionarse con un reclutamiento sexo-específico de proteínas G α , hecho que nos interesaría poder demostrar en un futuro próximo.

Dado que las proteínas G α q activan la fosfolipasa C, con generación de IP3, DAG y posterior movilización de calcio intracelular, continuamos evaluando la funcionalidad del B2R en nuestro sistema midiendo las concentraciones de Ca²⁺ luego de un estímulo específico.

Encontramos que la respuesta inducida por la activación de B2R genera una movilización de calcio dosis-dependiente en células HEK293 transfectadas con B2R WT. Posteriormente corroboramos que dicha respuesta no se modifica en el heterodímero B2R/D2R. Mas aún, la manipulación farmacológica del D2R con su agonista o antagonista, tampoco genera una alteración en la movilización de Ca²⁺ desencadenada por B2R. Es decir, nuestros resultados sugieren que el D2R no altera sustancialmente la afinidad del B2R por su agonista, ni la cascada de señalización desencadenada por éste.

Estos resultados son contrarios a los descriptos por Niewiarowska-Send y colaboradores (Niewiarowska-Sendo, Polit, Piwovar, et al., 2017a), quienes observaron que la presencia de agonistas D2R impacta sobre la respuesta generada por B2R en el sistema por ellos utilizado. Si bien ambos resultados se obtuvieron utilizando el mismo tipo celular (HEK293) cabe destacar que fueron obtenidos mediante diferentes tecnologías. La utilización de transfecciones transcientes en líneas celulares representa una herramienta importantísima para evaluar respuestas biológicas frente a determinados estímulos. Sin embargo, el cambio de condiciones experimentales, la utilización de distintos constructos, e incluso la utilización de otros ligandos de los receptores pueden generar respuestas diferentes. Esto nos demuestra una vez más la importancia de evaluar las interacciones de receptores y sus consecuencias funcionales en tejido nativo.

Sería de gran interés realizar estos ensayos funcionales en células hipofisarias; en líneas celulares de prolactinoma como GH3 o MMQ para estudiar el impacto de la dimerización en células lactotropas. No obstante, generar las condiciones experimentales necesarias para llevar a cabo los experimentos no es trivial. Nuestro estudio de la interacción entre B2R y D2R fue planificado originalmente para ser realizado en células GH3. Sin embargo, luego de realizar numerosas pruebas, la eficiencia de transfección obtenida en este tipo celular fue muy baja (aproximadamente 10%) y no fue posible realizar posteriormente los ensayos de NanoBiT y movilización de calcio.

A pesar de no haber podido realizar los experimentos en una línea celular lactotropa para poder evaluar el impacto de la dimerización de B2R y D2R sobre la secreción de prolactina, si pudimos evaluar la interacción en adenomas hipofisarios humanos. La interacción de B2R y D2R evaluada en tejido nativo de prolactinomas humanos sugiere un rol fisiológico de dicho dímero en hipófisis humanas.

Teniendo en cuenta que:

- el B2R recluta principalmente la proteína Gαq, induciendo la señalización característica que involucra la movilización de calcio intracelular;
- existe una interacción funcional entre los receptores, donde la presencia de agonistas o antagonistas de D2R no altera la señalización del B2R en el heterodímero;
- otros autores demostraron que, cuando ambos receptores dimerizan, la activación de B2R anula la disminución de los niveles de AMPc inducida por D2R;
- ha sido demostrada la sobre-expresión proteica de B2R en prolactinomas humanos;

planteamos que:

- la sobre-expresión proteica de B2R en prolactinomas humanos favorece la formación de un mayor número de complejos B2R/D2R;
- en el dímero, B2R genera una trans-inhibición del D2R;
- el heterodímero recluta principalmente Gαq.

Estos mecanismos actuando en conjunto podrían contribuir a la resistencia a drogas dopaminérgicas en pacientes con prolactinomas resistentes (DARPs).

Es interesante señalar que, a diferencia de los resultados observados en prolactinomas humanos puros, no encontramos interacción significativa de los receptores estudiados en los prolactinomas mixtos con GH.

Dentro de los adenomas hipofisarios mixtos (caracterizados por hiper-secretar más de una hormona hipofisaria), los adenomas GH+PRL son los tumores hipofisarios mixtos más frecuentes en la clínica (Kovacs et al., 1989; Thapar, 1993). Desde el punto de vista histológico pueden presentarse tres tipos de adenomas mixtos: *i- Adenoma mixto bicelular*: tienen dos tipos de células bien diferenciadas, unas secretan GH y las otras PRL; *ii- Adenoma mammosomatotrofo*: un único tipo celular maduro que co-secreta GH y PRL; y *iii- Adenoma acidófilo de stem cells*: en el cual un único tipo celular inmaduro co-secreta PRL y GH, siendo en general los menos diferenciados y por lo tanto los más agresivos.

Lamentablemente no pudimos acceder a la historia clínica ni a los detalles de los resultados histopatológicos de las 2 biopsias de tumores mixtos evaluadas para conocer a qué tipo de tumor mixto pertenecían estos tejidos.

Es interesante señalar aquí que, en el capítulo 1 de este trabajo observamos una población de células positivas para PRL que no expresa B2R. Se sabe que en la hipófisis existe una población de somato-lactotrofos, es decir, de células que co-expresan PRL y GH. Sería interesante realizar nuevos ensayos de inmunohistoquímica para evaluar si esa población que no expresa B2R, pero es positiva para PRL, también es positiva para GH. Esto validaría nuestra observación de falta de interacción B2R-D2R en adenomas humanos mixtos, pero por el momento, es sólo una deducción especulativa y se necesitan nuevos ensayos para poder dilucidarla.

Por otro lado, en el contexto de la dimerización de GPCRs, se ha demostrado que D2R también puede formar complejos con el receptor de somatostatina; SST2R. Más aún, se ha reportado que estos heterodímeros se expresan en tumores hipofisarios secretores de GH, y poseen una actividad exacerbada de la señalización a través de G α i, comparada con la actividad inducida por cada receptor por separado (Colao et al., 2007; Rocheville et al., 413 C.E.). En la actualidad, existen ligandos bivalentes

que tienen como blanco el heterodímero SST2R/D2R. Éstos inhiben la secreción de GH y PRL en adenomas hipofisarios secretores de GH de una manera más eficiente que el antagonista del receptor de somatostatina, octreotide (Jaquet, Gunz, Saveanu, Barlier, et al., 2005; Jaquet, Gunz, Saveanu, Dufour, et al., 2005).

Hipotetizamos que en los adenomas hipofisarios mixtos (PRL+GH), el D2R podría formar complejos preferentemente con SST2R y en menor medida con B2R. De este modo, los complejos B2R/D2R podrían no ser detectados, mediante la técnica utilizada, en este tipo de tumores hipofisarios.

Estudiamos además, la interacción en adenomas hipofisarios no funcionantes humanos. Sorpresivamente, encontramos que B2R y D2R también interactúan en este tipo de tumor. Más aún, se observó una señal mayor que indicaría que la formación del complejo B2R/D2R es mayor en los adenomas no funcionantes que en los prolactinomas humanos.

Los adenomas no funcionantes (NFPA, por sus siglas en inglés) son el segundo subtipo de adenoma hipofisario más frecuente (luego de los prolactinomas), representando entre un 14% y 43% aproximadamente (Banskota & Adamson, 2021b). Estos tumores se caracterizan por ser hormonalmente inactivos, por lo tanto las manifestaciones clínicas no están asociadas a una hiperactividad hormonal. La sintomatología asociada a NFPA surge principalmente del efecto de masa que puede originar la compresión local de la hipófisis y de tejidos adyacentes a la misma, como por ejemplo del hipotálamo y del nervio óptico (Jaffe, 2006). En estos casos, las manifestaciones clínicas secundarias al efecto de masa son problemas visuales, dolores de cabeza e hipogonadismo. En otros casos, su detección es accidental (*Pituitary Incidentaloma*, PI) (Freda et al., 2011). El subtipo más frecuente de NFPA es de origen gonadotrópico (75-80%), seguido de los de origen corticotrópico (15%) y del linaje POU1F1 (9%), cuyo origen puede ser de células somatotropas, lactotropas o tirotropas. Los NFPA que no poseen marca para ningún factor de transcripción de linaje hipofisario u hormonas son los menos frecuentes y representan aproximadamente un 2% (Yona Greenman & Bronstein, 2021).

Los tratamiento para NFPA incluyen la vigilancia activa del tumor, radioterapia y cirugía transepto esfenoidal (Esposito et al., 2019). Esta última representa la primera línea de terapia para pacientes con este tipo de tumores y síntomas

asociados al efecto de masa. En general, la radioterapia se reserva para los tratamientos post-operatorios, especialmente para pacientes con una remoción incompleta del tumor (Esposito et al., 2019).

Hasta la fecha NFPA es el único subtipo de adenoma hipofisario para el cual no ha sido aprobado ningún tratamiento farmacológico. La mayoría de los NFPA expresan receptores de dopamina D2 (Gabalec et al., 2012). Dado que los agonistas dopaminérgicos (DA) reducen la secreción de gonadotrofinas e inhiben la incorporación de timina *in vitro*, se ha propuesto a los DA como un posible blanco terapéutico para los NFPA (Kwekkeboom et al., 1990). Sin embargo, el tratamiento de los NFPA con las drogas dopaminérgicas sigue siendo un tema de debate entre los endocrinólogos.

Estudios realizados en pacientes con residuos tumorales de NFPA luego de la cirugía muestran que el tratamiento con DA post-operatorio redujo significativamente el requerimiento de terapias invasivas adicionales; solo el 13% de los pacientes que recibieron DA preventivamente luego de la primera cirugía, requirieron una cirugía adicional o radioterapia, comparado con el 42% de pacientes en el grupo control (Yona Greenman & Bronstein, 2021). Si bien en prolactinomas resistentes a DA, se ha asociado la baja expresión de la isoforma corta del D2R con la resistencia a agonistas dopaminérgicos, esta correlación no se halló en NFPA (Batista et al., 2019; Y. Greenman et al., 2016). Estos resultados sugieren la participación de otros mecanismos moleculares que alteran la respuesta de NFPA a las drogas dopaminérgicas.

Por el contrario, algunos investigadores ponen en duda la eficacia de los DA para contrarrestar crecimiento tumoral de NFPA y su reducción en el requerimiento de cirugías adicionales o radioterapia post-operatoria, ya que el estudio de la historia natural de los NFPA con análisis retrospectivos de numerosas cohortes de pacientes, muestra que aproximadamente el 11% de los NFPA no tratados ocurre una reducción espontánea del crecimiento tumoral. Quienes adoptan esta postura sostienen que hasta la fecha no hay evidencia suficiente para considerar a los DA como una opción para el tratamiento farmacológico de NFPA y se necesitan más estudios para determinar si la remisión tumoral observada en pacientes con NFPA ocurre espontáneamente o se debe al tratamiento con DA.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que B2R y D2R interactúan en los adenomas hipofisarios no funcionantes. Niewiarowska-Send y col. demostraron que el B2R altera la señalización de D2R en el heterodímero B2R/D2R (Niewiarowska-Sendo, Polit, Piwowar, et al., 2017a). Esos resultados, en conjunto con nuestras observaciones utilizando la técnica de AlphaLisa, sugieren que el B2R podría alterar la respuesta del D2R a agonistas dopaminérgicos, no solo en los prolactinomas, sino también en los NFPA, contribuyendo a la resistencia a las drogas dopaminérgicas.

Nuestros resultados aportan valiosa información que podría explicar la falta de respuesta a DA observada en muchos pacientes con prolactinomas resistentes y NFPA. El estudio de la interacción de B2R/D2R en las biopsias podría determinar la eficacia o no de un tratamiento con dopaminérgicos.

Finalmente, sería importante evaluar la interacción entre D2R y B2R en hipófisis humanas normales y determinar si en los prolactinomas y en los adenomas no funcionantes existe una interacción incrementada. Sin embargo, acceder a este tipo de muestras es difícil.

Discusión general

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más frecuentes en la clínica, representando entre un 40 y un 66% del total de adenomas hipofisarios detectados. Si bien los prolactinomas en general son neoplasias benignas, el excesivo incremento en los niveles séricos de PRL tiene como consecuencia alteraciones importantes a nivel reproductivo. Actualmente el único tratamiento farmacológico para pacientes con prolactinomas es con agonistas dopaminérgicos. En general, esta terapia es efectiva, pero entre un 15 y 20% de los pacientes son resistentes o crean resistencia a la terapia con el tiempo. Hasta la fecha los prolactinomas resistentes (DARPs) representan un desafío para los endocrinólogos ya que no existen terapias alternativas a los agonistas dopaminérgicos. Es indispensable encontrar nuevas terapias para estos pacientes.

La búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para pacientes con DARPs implica una investigación detallada de los mecanismos regulatorios de las funciones del lactotrofo. Conocer los factores que regulan directa o indirectamente la síntesis y secreción de prolactina, así como la proliferación de los lactotrofos, nos permite buscar mecanismos alternativos a la inhibición dopaminérgica.

Entre los factores inhibitorios intra-hipofisarios se encuentra el sistema TGF β 1. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la actividad de esta citoquina se encuentra reducida en prolactinomas de diferentes modelos animales, y que la recuperación local de la actividad de TGF β 1 contrarresta el crecimiento tumoral y la hiperprolactinemia. Es por ello que el estudio de los activadores fisiológicos de TGF β 1 resulta particularmente atractivo en la búsqueda de terapias alternativas para pacientes con DARPs.

En este contexto y por lo mencionado a lo largo de esta tesis, nuestra pregunta inicial fue si KLK1 es activador local de TGF β 1 en la glándula hipofisaria.

Dado que:

- en diferentes modelos animales de prolactinomas encontramos disminuidos los niveles de TGF β 1 y KLK1 respecto a los niveles observados en hipófisis controles;
- KLK1 mostró estar bajo un control por DA y estradiol similar al ejercido sobre TGF β 1 (E.Y. Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2011, 2013, 2016);
- KLK1 forma parte de un complejo sistema que involucra otras enzimas, y péptidos bioactivos que actuarán sobre sus receptores localmente en hipófisis;

nos propusimos evaluar si KLK1 ejerce una regulación negativa de las funciones del lactotrofo actuando a través de TGF β 1, con la intención de evaluar su potencial terapéutico para el tratamiento de DARPs.

Si KLK1 resultara ser un buen modulador de la actividad de TGF β 1, la manipulación farmacológica de dicha proteasa podría representar un posible mecanismo para incrementar los niveles de TGF β 1 activo, localmente en la hipófisis, y de este modo contrarrestar el desarrollo tumoral. Sin embargo, manipular los niveles locales de KLK1 podría afectar las funciones hipofisarias del sistema KLK1-quininas hipofisarios. Por ello, en una primera etapa caracterizamos el sistema en hipófisis normales vs tumorales utilizando dos modelos animales de prolactinomas, y sus diferencias sexuales (capítulo 1). Encontramos importantes alteraciones en la expresión de los componentes del sistema KLK1-quininas en prolactinomas experimentales, sugiriendo que las quininas y los BRs podrían estar involucrados en el desarrollo tumoral.

En una segunda etapa evaluamos el impacto de este sistema sobre las funciones del lactotrofo (capítulo 2). Encontramos que KLK1 impacta en la regulación lactotropa, a través de diferentes vías de acción y teniendo tanto efectos prolactino-liberadores, como efectos prolactino-inhibidores, dependiendo del sexo. Al profundizar el estudio del sistema en general, obtuvimos novedosos e interesantes resultados acerca de las funciones de los receptores de quininas hipofisarios.

Las marcadas diferencias sexuales halladas en la regulación de la secreción de PRL dependientes de los BRs, sugieren que dichos GPCRs podrían estar acoplados a distintas proteínas G α : en hembras los BRs podría reclutar principalmente a G α i, con la consecuente inhibición de la secreción de PRL, mientras que en machos, los BRs podrían reclutar preferentemente a G α q, promoviendo la movilización del calcio intracelular con la consecuente liberación de PRL.

Respecto de los BRs, los resultados mostrados en el capítulo 1 demostraron que el receptor principal del sistema KLK1-quininas hipofisario es el B2R. La baja expresión génica de B1R y su no detección a nivel proteico, sugieren una participación despreciable o nula de este receptor en la fisio-patología hipofisaria. Por el contrario, encontramos que la expresión de B2R se induce fuertemente en prolactinomas experimentales, al igual que lo descrito para prolactinomas

humanos, donde se lo ha encontrado sobre-expresado (aproximadamente 20 veces) respecto de hipófisis normales. Los niveles incrementados en la expresión de B2R sugieren una participación de este receptor en el desarrollo tumoral.

Por otro lado, se ha descrito al B2R como un GPCR que puede interactuar y formar homo y heterodímeros funcionales con otros GPCRs, entre ellos el D2R. Habiendo encontrado al B2R sobre-expresado en nuestros modelos animales de prolactinomas, en el capítulo 3 nos avocamos al estudio de la interacción entre B2R y D2R. Además de demostrar la formación de los complejos B2R/D2R *in vitro*, y las consecuencias funcionales de dicha interacción, demostramos por primera vez – mediante la técnica de AlphaLiSA – que B2R y D2R interactúan en tejido nativo de adenomas hipofisarios humanos. Específicamente medimos dicha interacción en prolactinomas y adenomas hipofisarios no funcionantes.

Teniendo en cuenta que;

- i-* existe una diferencia sexual en la liberación de prolactina inducida por B2R;
- ii-* D2R no altera la liberación de calcio producida por B2R;
- iii-* Niewiarowska-Send y col. Demostraron que el B2R altera la señalización de D2R en el heterodímero B2R/D2R;
- iv-* los receptores interactúan en prolactinomas humanos;

hipotetizamos que, en las hembras, B2R participa de la inhibición de la secreción de PRL en condiciones fisiológicas. Sin embargo, con el desarrollo tumoral (prolactinoma), aumenta la expresión de B2R y estos niveles incrementados favorecen una mayor formación de complejos con D2R. En el heterodímero B2R/D2R podría existir un *switch* en el reclutamiento de proteínas $G\alpha$: de $G\alpha_i$ a $G\alpha_q$.

Es decir, el desbalance en la expresión proteica de B2R en las hembras tumorales induce la formación de heterodímeros D2R/B2R acoplados principalmente $G\alpha_q$. De esta forma se anulan dos vías que inhiben la secreción de PRL; la vía del D2R y la vía del B2R, favoreciendo así el desarrollo tumoral.

Modificaciones en la cascada de señalización de heterodímeros en condiciones patológicas han sido previamente descriptas para otros GPCRs. Por ejemplo, en la fibrosis hepática inducida por la ingesta de alcohol aumenta la expresión de receptor de cannabinoide 1 (CB1) que heterodimeriza con AT1. En condiciones fisiológicas,

AT1 en el hígado está acoplado a Gαq, sin embargo, frente al desarrollo de la fibrosis y la heterodimerización AT1 – CB1, AT1 señala vía Gαi. Es más, estos nuevos efectos de AT1 pueden ser bloqueados por antagonistas específicos de CB1 (Rozenfeld et al., 2011). Estos antecedentes resaltan la importancia de estudiar de la formación de heterodímeros en diferentes tejidos, en condiciones patológicas, ya que representan un blanco terapéutico novel para el tratamiento de diversas patologías.

Por el contrario, en machos, B2R induce la liberación de PRL, sugiriendo el reclutamiento de Gαq en este sexo .

En humanos, los prolactinomas son más agresivos en los hombres respecto de las mujeres, sin embargo las razones por las cuales existe una marcada diferencia sexual en la incidencia y pronóstico de estos tumores son aún desconocidas (Colao, Sarno, et al., 2003; Gillam et al., 2006; Schaller, 2005) (Devuyst et al., 2020). Especulamos que la particular sensibilidad de los lactotrofos a la activación de los receptores de bradiquinina encontrada en machos podría estar involucrada.

Por otro lado, existe evidencia de que en los machos el control inhibitorio dopaminérgico sobre la población lactotropa no es tan importante como en las hembras. Una clara evidencia de esto es el hecho de que, en el modelo animal de ratones KO total para el receptor de dopamina D2 (utilizado en esta tesis) las hembras comienzan a desarrollar hiperprolactinemia e hiperplasia de lactotrofos a partir del segundo mes de vida, y, a los 8 meses de edad, presentan un peso hipofisario que duplica o triplica el tamaño de una hipófisis normal. Sin embargo, a la misma edad en los machos no se observa el desarrollo de un prolactinoma, pese a la ausencia total de inhibición dopaminérgica (Kelly et al., 1997).

Por resultados previos de nuestro laboratorio demostramos que, los machos, presentan mayor expresión de sistemas inhibitorios del lactotrofo intra-hipofisarios, que las hembras, como por ejemplo el sistema TGFβ1 (M. Victoria Recouvreux et al., 2013) y el sistema de activinas (E.Y. Faraoni et al., 2020). Hipotetizamos que en los machos, el control de la secreción de prolactina y de las funciones en general de los lactotrofos depende en mayor medida de mecanismos alternativos a la regulación dopaminérgica. De este modo, las alteraciones o interrupciones en la vía inhibitoria dopaminérgica no poseen un impacto sustancial en los lactotrofos en este sexo. En cambio, las alteraciones en los mecanismos regulatorios intra-hipofisarios, como por ejemplo el sistema TGFβ1 o el aumento de la expresión del B2R, podrían contribuir al desarrollo tumoral en machos a edades más tardías. Estas importantes diferencias

sexuales en el control de las funciones del lactotrofo podrían explicar las diferencias sexuales observadas en la clínica en cuanto a la incidencia y el comportamiento de los prolactinomas.

Finalmente, el estudio de la heterodimerización de diferentes GPCRs en un tejido abre las puertas al diseño de nuevas terapias. A medida que se fue describiendo en la literatura la importancia fisiológica y patológica de la dimerización de receptores, fue surgiendo la idea de terapias novedosas dirigidas a los heterodímeros. Es así como comenzaron a surgir los ligandos bivalentes. Éstos consisten en un compuesto doble, donde una porción se une selectivamente a uno de los 2 receptores del dímero, y, la otra porción del compuesto, se une al otro GPCR. Ambas porciones se encuentran unidas por un *link* o *spacer* (Berque-Bestel et al., 2008). Si bien en la actualidad existen pocos ligandos bivalentes específicos para determinados heterodímeros – como por ejemplo el ya mencionado ligando para el heterodímero D2R/SSTR2 – el diseño de este tipo de ligandos está adquiriendo mucha relevancia con el fin de manipular selectivamente la actividad de los dímeros.

El hallazgo de la interacción B2R/D2R en tejido humano es un resultado novel y de gran relevancia clínica, ya que este hecho podría estar implicado en la resistencia a agonistas dopaminérgicos observada en los pacientes con DARPs. Estos resultados también sugieren que con una adecuada manipulación farmacológica de este heterodímero, se podría recuperar la respuesta a dopaminérgicos, no sólo en prolactinomas resistentes, sino también en adenomas hipofisarios no funcionantes.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral, en su conjunto, demuestran un rol del sistema KLK1-quininas en el control de la secreción de PRL que es sexualmente dimórfico. Profundizar el estudio de esta regulación intra-hipofisaria complementa la fina regulación de las funciones del lactotrofo. Comprender en detalle dicha regulación permite abordar nuevas líneas de investigación que tengan como objetivo principal la búsqueda de terapias farmacológicas que sean alternativas a los agonistas dopaminérgicos. Este último punto es de suma importancia principalmente para pacientes con prolactinomas resistentes a las terapias convencionales.

Conclusiones generales

- ✍ Caracterizamos al sistema KLK1-quininas en hipófisis normales y en 2 modelos animales de prolactinoma.
- ✍ Observamos una marcada diferencia sexual en la expresión de los componentes de KKS.
- ✍ La expresión de los componentes del sistema se altera con el desarrollo de un prolactinoma, en los 2 modelos evaluados.
- ✍ Demostramos que el receptor que predomina en hipófisis es el B2R.
- ✍ Describimos un nuevo mecanismo intra-hipofisario que participa en la regulación de la secreción de PRL y es sexualmente dimórfico.
- ✍ Demostramos que B2R puede reclutar tanto a $G\alpha_q$ como a $G\alpha_i$. El reclutamiento sexo-específico de proteínas G podría explicar el dimorfismo sexual observado en la respuesta de B2R.
- ✍ B2R y D2R forman un heterodímero y la manipulación farmacológica del D2R no altera la cascada de señalización inducida por el B2R.
- ✍ B2R y D2R interactúan en adenomas hipofisarios no funcionantes y en prolactinomas humanos.

Referencias bibliográficas

- AbdAlla, S., Lothar, H., El Massiery, A., & Quitterer, U. (2001). Increased AT1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1003>
- Ahtiainen, P., Sharp, V., Rulli, S. B., Rivero-Muller, A., Mamaeva, V., Roytta, M., & Huhtaniemi, I. (2010). Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCGbeta-subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(3), 611–621. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0016>
- Akita, K., Okuno, M., Enya, M., Imai, S., Moriwaki, H., Kawada, N., Suzuki, Y., & Kojima, S. (2002). Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterology*, *123*(1), 352–364.
- Akmayev, I. G., & Popov, A. P. (1977). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*, *180*(2), 263–282.
- Albiero, C., Juarez-Allen, L., Longobardi, V., Danilowicz, K., Manavela, M. P., & Bruno, O. D. (2010). [Analysis of a pituitary adenoma registry]. *Medicina*, *70*(5), 415–420.
- Allen, M. R., Zhang, B. R., Hettinger, A. M., Goad, D. W., Malayer, J. R., & Geisert, R. D. (2002). Detection of bradykinin and bradykinin-beta(2) receptors in the porcine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, *66*(3), 574–579. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD66.3.574>
- Anderson, G. R., Cao, Y., Davidson, S., Truong, H. V., Pravetoni, M., Thomas, M. J., Wickman, K., Giesler, G. J., & Martemyanov, K. A. (2010). R7BP complexes with RGS9-2 and RGS7 in the striatum differentially control motor learning and locomotor responses to cocaine. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.212>
- Annes, J. P., Chen, Y., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2004). Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. *The Journal of Cell Biology*, *165*(5), 723–734. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312172>
- Arafah, B. M., & Nasrallah, M. P. (2001). Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocrine-Related Cancer*, *8*(4), 287–305.
- Araujo-Lopes, R., Crampton, J. R., Aquino, N. S. S., Miranda, R. M., Kokay, I. C., Reis, A. M., Franci, C. R., Grattan, D. R., & Szawka, R. E. (2014). Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. *Endocrinology*, *155*(3), 1010–1020. <https://doi.org/10.1210/EN.2013-1889>
- Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. (1991). Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA signal levels in central dopaminergic neurons: development of a gender difference in the arcuate nuclei. *Developmental Brain Research*, *63*(1–2). [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90075-T](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90075-T)
- Ardiles, L., Cardenas, A., Burgos, M. E., Droguett, A., Ehrenfeld, P., Carpio, D., Mezzano, S., & Figueroa, C. D. (2013). Antihypertensive and renoprotective

- effect of the kinin pathway activated by potassium in a model of salt sensitivity following overload proteinuria. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 304(12), F1399-410.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00604.2012>
- Asa, S L, Kelly, M. A., Grandy, D. K., & Low, M. J. (1999). Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 140(11), 5348–5355.
<https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7118>
- Asa, Sylvia L., & Ezzat, S. (2002). The pathogenesis of pituitary tumours. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 2, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrc926>
- Banerjee, S. K., De, A., & Sarkar, D. K. (1994). Colocalization of prolactin and proliferating cell nuclear antigen in the anterior pituitary during estrogen-induced pituitary tumors. *Cancer Letters*, 87(2), 139–144.
- Banerjee, S. K., Sarkar, D. K., Weston, A. P., De, A., & Campbell, D. R. (1997). Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis*, 18(6), 1155–1161.
- Banskota, S., & Adamson, D. C. (2021a). Pituitary adenomas: From diagnosis to therapeutics. *Biomedicines*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050494>
- Banskota, S., & Adamson, D. C. (2021b). Pituitary adenomas: From diagnosis to therapeutics. *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050494>
- Barcellos-Hoff, M. H., & Dix, T. A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology*, 10(9).
<https://doi.org/10.1210/mend.10.9.8885242>
- Batista, R. L., Musolino, N. R. C., Cescato, V. A. S., Da Silva, G. O., Medeiros, R. S. S., Herkenhoff, C. G. B., Trarbach, E. B., & Cunha-Neto, M. B. (2019). Cabergoline in the Management of Residual Nonfunctioning Pituitary Adenoma: A Single-Center, Open-Label, 2-Year Randomized Clinical Trial. *American Journal of Clinical Oncology*, 42(2), 221–227.
<https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000505>
- Beaulieu, J. M., Espinoza, S., & Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR review 13. *British Journal of Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1111/bph.12906>
- Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Thyssen, S. M., Diaz-Torga, G. S., & Libertun, C. (1994). Effects of LHRH and ANG II on prolactin stimulation are mediated by hypophysial AT1 receptor subtype. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 266(2 29-2).
- Ben-Jonathan, N. (2001). Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.22.6.724>
- Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*, 22(6), 724–763. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0451>
- Ben-Jonathan, Nira, & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. In *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0451>
- Bernichtein, S., Touraine, P., & Goffin, V. (2010). New concepts in prolactin biology. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 206, Issue 1).
<https://doi.org/10.1677/JOE-10-0069>
- Berque-Bestel, I., Lezoualc'h, F., & Jockers, R. (2008). Bivalent Ligands as Specific Pharmacological Tools for G Protein-Coupled Receptor Dimers. *Current Drug Discovery Technologies*. <https://doi.org/10.2174/157016308786733591>
- Berwaer, M., Peers, B., Nalda, A. M., Monget, P., Davis, J. R. E., Belayew, A., & Martial, J. A. (1993). Thyrotropin-releasing hormone and epidermal growth factor induce human prolactin expression via identical multiple cis elements.

- Molecular and Cellular Endocrinology*, 92(1). [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(93\)90068-U](https://doi.org/10.1016/0303-7207(93)90068-U)
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininases. In *Pharmacological Reviews*.
- Blaukat, A. (2003). Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia*. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00533.x>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Borrelli, E., Sawchenko, P. E., & Evans, R. M. (1992). Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2764–2768.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 274–286. <https://doi.org/10.1038/35067575>
- Burdman, J. A., Pauni, M., Heredia Sereno, C. M., & Bordón, A. E. (2008). Estrogen receptors in human pituitary tumors. *Hormone and Metabolic Research*, 40(8). <https://doi.org/10.1055/s-2008-1065338>
- Buvat, J. (2003). Hyperprolactinemia and sexual function in men: A short review. In *International Journal of Impotence Research* (Vol. 15, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901043>
- Cai, A., Hayes, J. D., Patel, N., & Hyde, J. F. (1999). Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia. *Endocrinology*, 140(11), 4955–4964. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7120>
- Camilletti, M. A., Abeledo-Machado, A., Faraoni, E. Y., Thomas, P., & Díaz-Torga, G. (2019). New insights into progesterone actions on prolactin secretion and prolactinoma development. *Steroids*, 152. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2019.108496>
- Camilletti, M. A. M. A., Abeledo-Machado, A., Ferraris, J., Pérez, P. A. P. A., Faraoni, E. Y. E. Y., Pisera, D., Gutierrez, S., & Díaz-Torga, G. (2019). Role of GPER in the anterior pituitary gland focusing on lactotroph function. *Journal of Endocrinology*, 240(2). <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0402>
- Campbell, D. J. (2000). Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 33(6), 665–677.
- Casanueva, F. F., Molitch, M. E., Schlechte, J. A., Abs, R., Bonert, V., Bronstein, M. D., Brue, T., Cappabianca, P., Colao, A., Fahlbusch, R., Fideleff, H., Hadani, M., Kelly, P., Kleinberg, D., Laws, E., Marek, J., Scanlon, M., Sobrinho, L. G., Wass, J. A. H., & Giustina, A. (2006). Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clinical Endocrinology*, 65(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02562.x>
- Chao, J., Miao, R. Q., Chen, V., Chen, L. M., & Chao, L. (2001). Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling. *Biological Chemistry*, 382(1), 15–21. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.003>
- Chao, J., Schmaier, A., Chen, L. M., Yang, Z., & Chao, L. (1996). Kallistatin, a novel human tissue kallikrein inhibitor: levels in body fluids, blood cells, and tissues in health and disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 127(6), 612–620.
- Chao, Julie, Bledsoe, G., & Chao, L. (2014). Kallikrein-kinin in stem cell therapy.

- World Journal of Stem Cells*, 6(4), 448–457.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.448>
- Clements, J. A. (1989). The glandular kallikrein family of enzymes: Tissue specific expression and hormonal regulation. *Endocrine Reviews*, 10(4), 393–419.
<https://doi.org/10.1210/edrv-10-4-393>
- Colao, A., Di Sarno, A., Cappabianca, P., Briganti, F., Pivonello, R., Di Somma, C., Faggiano, A., Biondi, B., & Lombardi, G. (2003). Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology*, 148(3).
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1480325>
- Colao, A., Filippella, M., Pivonello, R., Di Somma, C., Faggiano, A., & Lombardi, G. (2007). Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonists in the treatment of pituitary tumours. *European Journal of Endocrinology, Supplement*. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02348>
- Colao, A., Sarno, A. Di, Cappabianca, P., Briganti, F., Pivonello, R., Somma, C. Di, Faggiano, A., Biondi, B., & Lombardi, G. (2003). Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology*, 148(3), 325–331.
- Cristina, C., Garcia-Tornadu, I., Diaz-Torga, G., Rubinstein, M., Low, M. J., & Becu-Villalobos, D. (2006). Dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma. *Frontiers of Hormone Research*, 35, 50–63.
<https://doi.org/10.1159/000094308>
- da Costa, P. L. N., Sirois, P., Tannock, I. F., & Chammas, R. (2014). The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. *Cancer Letters*, 345(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.009>
- De Nicola, A. F., von Lawzewitsch, I., Kaplan, S. E., & Libertun, C. (1978). Biochemical and ultrastructural studies on estrogen-induced pituitary tumors in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 61(3), 753–763.
- De Paul, A. L., Pons, P., Aoki, A., & Torres, A. I. (1997). Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochemica*, 99(3), 277–289. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(97\)80022-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(97)80022-0)
- DeVito, W. J. (1988). Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 150(2).
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(88\)90435-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(88)90435-4)
- Devuyt, F., Kazakou, P., Balériaux, D., Alexopoulou, O., Burniat, A., Salenave, S., Chanson, P., Corvilain, B., & Maiter, D. (2020). Central diabetes insipidus and pituitary stalk thickening in adults: Distinction of neoplastic from non-neoplastic lesions. *European Journal of Endocrinology*, 183(1).
<https://doi.org/10.1530/EJE-20-0058>
- Di Sarno, A., Landi, M. L., Cappabianca, P., Di Salle, F., Rossi, F. W., Pivonello, R., Di Somma, C., Faggiano, A., Lombardi, G., & Colao, A. (2001). Resistance to cabergoline as compared with bromocriptine in hyperprolactinemia: prevalence, clinical definition, and therapeutic strategy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(11), 5256–5261.
<https://doi.org/10.1210/jcem.86.11.8054>
- Diamandis, E. P., & Yousef, G. M. (2002). Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clinical Chemistry*, 48(8), 1198–1205.
- Díaz-Torga, G., Feierstein, C., Libertun, C., Gelman, D., Kelly, M. A., Low, M. J., Rubinstein, M., & Becú-Villalobos, D. (2002). Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology*, 143(4). <https://doi.org/10.1210/en.143.4.1270>
- Díaz-Torga, G., Gonzalez Iglesias, A., Achaval-Zaia, R., Libertun, C., & Becu-

- Villalobos, D. (1998). Angiotensin II-induced Ca²⁺ mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *The American Journal of Physiology*, *274*(3 Pt 1), E534-40.
- Díaz-Torga, G. S., Becú-Villalobos, D., & Libertun, C. (1994). Ontogeny of angiotensin-II-induced prolactin release in vivo and in vitro in female and male rats. *Neuroendocrinology*, *59*(1). <https://doi.org/10.1159/000126638>
- Egli, M., Leeners, B., & Kruger, T. H. C. (2010). Prolactin secretion patterns: Basic mechanisms and clinical implications for reproduction. In *Reproduction* (Vol. 140, Issue 5). <https://doi.org/10.1530/REP-10-0033>
- Emami, N., & Diamandis, E. P. (2010a). Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGF beta 1 in semen. *Biological Chemistry*, *391*(1), 85–95. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.007>
- Emami, N., & Diamandis, E. P. (2010b). Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGF beta 1 in semen. *Biological Chemistry*, *391*(1), 85–95. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.007>
- Esposito, D., Olsson, D. S., Ragnarsson, O., Buchfelder, M., Skoglund, T., & Johannsson, G. (2019). Non-functioning pituitary adenomas: indications for pituitary surgery and post-surgical management. *Pituitary*, *22*(4), 422–434. <https://doi.org/10.1007/S11102-019-00960-0>
- Ewald, D. A., Iok-Hou, P., Sternweis, P. C., & Miller, R. J. (1989). Differential G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90185-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90185-2)
- Faraoni, E.Y., Abeledo Machado, A. I., Pérez, P. A., Marcial López, C. A., Camilletti, M. A., Peña-Zanoni, M., Rulli, S. B., Gutiérrez, S., & Díaz-Torga, G. (2020). Activin-inhibitory action on lactotrophs is decreased in lactotroph hyperplasia. *Journal of Endocrinology*, *244*(2). <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0326>
- Faraoni, E.Y., Camilletti, M. A., Abeledo-Machado, A., Ratner, L. D., de Fino, F., Ipo Huhtaniemi, I., Rulli, S. B., & Díaz-Torga, G. (2017). Sex differences in the development of prolactinoma in mice overexpressing hCGB: Role of TGFB1. *Journal of Endocrinology*, *232*(3). <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0371>
- Faraoni, Erika Y., Camilletti, M. A., Abeledo-Machado, A., Ratner, L. D., de Fino, F., Ipo Huhtaniemi, I., Rulli, S. B., & Díaz-Torga, G. (2017). Sex differences in the development of prolactinoma in mice overexpressing hCGB: Role of TGFB1. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0371>
- Farrell, W. E. (2006). Pituitary tumours: findings from whole genome analyses. *Endocrine-Related Cancer*, *13*(3), 707–716. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01131>
- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L. A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M. J., Milligan, G., Pin, J. P., & Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: Functional and pharmacological perspectives. In *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008052>
- Foucart, S., Grondin, L., Couture, R., & Nadeau, R. (1997). Modulation of noradrenaline release by B1 and B2 kinin receptors during metabolic anoxia in the rat isolated atria. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1139/cjpp-75-6-639>
- Freda, P. U., Beckers, A. M., Katznelson, L., Molitch, M. E., Montori, V. M., Post, K. D., & Lee Vance, M. (2011). Pituitary incidentaloma: an endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *96*(4), 894–904. <https://doi.org/10.1210/JC.2010-1048>

- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, *80*(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Gabalec, F., Beranek, M., Netuka, D., Masopust, V., Nahlovsky, J., Cesak, T., Marek, J., & Cap, J. (2012). Dopamine 2 receptor expression in various pathological types of clinically non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*, *15*(2), 222–226. <https://doi.org/10.1007/S11102-011-0316-1>
- Garcia-Tornadú, I., Perez-Millan, M. I., Recouvreux, V., Ramirez, M. C., Luque, G., Risso, G. S., Ornstein, A. M., Cristina, C., Diaz-Torga, G., & Becu-Villalobos, D. (2010). New insights into the endocrine and metabolic roles of dopamine D2 receptors gained from the *Drd2^{-/-}* mouse. *Neuroendocrinology*, *92*(4). <https://doi.org/10.1159/000321395>
- Gillam, M. P., Molitch, M. E., Lombardi, G., & Colao, A. (2006). Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine Reviews*, *27*(5), 485–534. <https://doi.org/10.1210/er.2005-9998>
- Girolami, J. P., Emond, C., & Bascands, J. L. (1992). Signal transduction pathways of BK2 receptor in the renal glomerulus and mesangial cells: A mini review. *Agents and Actions*.
- Goettig, P., Magdolen, V., & Brandstetter, H. (2010). Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). In *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.06.022>
- Goffin, V., Binart, N., Clement-Lacroix, P., Bouchard, B., Bole-Feysot, C., Ederly, M., Lucas, B. K., Touraine, P., Pezet, A., Maaskant, R., Pichard, C., Helloco, C., Baran, N., Favre, H., Bernichtein, S., Allamando, A., Ormandy, C., & Kelly, P. A. (1999). From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, *15*(3–5), 189–201.
- Gonzalez Pernas, M., Sosa, S., Manavela, M., Gonzalez Abbati, S., Bruno, O., & Danilowicz, K. (2019). SAT-455 Analysis of a Group of Prolactinomas Resistant to Treatment with Dopamine Agonists at a University Hospital in Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Endocrine Society*. <https://doi.org/10.1210/js.2019-sat-455>
- Goudreau, J. L., Lindley, S. E., Lookingland, K. J., & Moore, K. E. (1992). Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology*, *56*(1), 100–105. <https://doi.org/10.1159/000126214>
- Grattan, D. R. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *The Journal of Endocrinology*, *226*(2), T101–22. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0213>
- Greenman, Y., Cooper, O., Yaish, I., Robenshtok, E., Sagiv, N., Jonas-Kimchi, T., Yuan, X., Gertych, A., Shimon, I., Ram, Z., Melmed, S., & Stern, N. (2016). Treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists. *European Journal of Endocrinology*, *175*(1), 63–72. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0206>
- Greenman, Yona, & Bronstein, M. D. (2021). Cabergoline should be attempted in progressing non-functioning pituitary macroadenoma. *European Journal of Endocrinology*, *185*(4), D11–D20. <https://doi.org/10.1530/EJE-21-0344>
- Gudelsky, G. A., & Porter, J. C. (1981). Sex-related difference in the release of dopamine into hypophysial portal blood. *Endocrinology*, *109*(5), 1394–1398. <https://doi.org/10.1210/endo-109-5-1394>
- Guevara-Lora, I., Niewiarowska-Sendo, A., Polit, A., & Kozik, A. (2016). Hypothetical orchestrated cooperation between dopaminergic and kinin

- receptors for the regulation of common functions. In *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1366
- Hara, M., Kirita, A., Kondo, W., Matsuura, T., Nagatsuma, K., Dohmae, N., Ogawa, S., Imajoh-Ohmi, S., Friedman, S. L., Rifkin, D. B., & Kojima, S. (2014). LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF-beta activation in patients with hepatic fibrosis. *SpringerPlus*, *3*, 221. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-221>
- Hauser, A. S., Chavali, S., Masuho, I., Jahn, L. J., Martemyanov, K. A., Gloriam, D. E., & Babu, M. M. (2018). Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.033>
- Holzbauer, M., & Racke, K. (1985). The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Medical Biology*, *63*(3), 97–116.
- Hong, W., Nuwayhid, S. J., & Werling, L. L. (2004). Modulation of bradykinin-induced calcium changes in SH-SY5Y cells by neurosteroids and sigma receptor ligands via a shared mechanism. *Synapse*. <https://doi.org/10.1002/syn.20069>
- Horvath, E., & Kovacs, K. (2002). Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastructural Pathology*, *26*(4), 219–228. <https://doi.org/10.1080/01913120290104476>
- HUMMERICH, W., FELTKAMP, H., KONRADS, A., AHLMANN, P., & BORNHOFEN, H. (1979). Renin-activation by kallikrein: evidence for alkaline-activation of plasma renin. *European Journal of Clinical Investigation*, *9*(6), 447–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1979.tb00911.x>
- Iglesias, A. G., Diaz-Torga, G., Lux-Lantos, V., Libertun, C., & Becu-Villalobos, D. (1999). Calcium influx and intracellular stores in angiotensin II stimulation of normal and hyperplastic pituitary cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *277*(3 40-3).
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R. A., Rajda, K., & Guzik, T. J. (2012). Prolactin - Not only lactotrophin a “new” view of the “old” hormone. In *Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 63, Issue 5).
- Inomoto, C., Tahara, S., Oyama, · Kenichi, Kimura, · Midori, Akira Matsuno, · Teramoto, A., Robert, ·, & Osamura, Y. (2021). *Molecular, functional, and histopathological classification of the pituitary neuroendocrine neoplasms*. *38*, 183–188. <https://doi.org/10.1007/s10014-021-00410-5>
- Inoue, K., Couch, E. F., Takano, K., & Ogawa, S. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Archives of Histology and Cytology*, *62*(3), 205–218.
- Jaffe, C. A. (2006). Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary*, *9*(4), 317–321. <https://doi.org/10.1007/S11102-006-0412-9>
- Jaquet, P., Gunz, G., Saveanu, A., Barlier, A., Dufour, H., Taylor, J., Dong, J., Kim, S., Moreau, J. P., & Culler, M. D. (2005). BIM-23A760, a chimeric molecule directed towards somatostatin and dopamine receptors, vs universal somatostatin receptors ligands in GH-secreting pituitary adenomas partial responders to octreotide. *Journal of Endocrinological Investigation*.
- Jaquet, P., Gunz, G., Saveanu, A., Dufour, H., Taylor, J., Dong, J., Kim, S., Moreau, J. P., Enjalbert, A., & Culler, M. D. (2005). Efficacy of chimeric molecules directed towards multiple somatostatin and dopamine receptors on inhibition of GH and prolactin secretion from GH-secreting pituitary adenomas classified as partially responsive to somatostatin analog therapy. *European Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01950>

- Jones, T. H., Figueroa, C. D., & Bhoola, K. D. (1992). Bioregulatory role of the kallikrein-kinin system in the normal pituitary gland and its tumours. In *Acta Endocrinologica* (Vol. 127, Issue 6). <https://doi.org/10.1530/acta.0.1270481>
- Jones, T. H., Figueroa, C. D., Smith, C., Cullen, D. R., & Bhoola, K. D. (1990). Characterization of a tissue kallikrein in human prolactin-secreting adenomas. *The Journal of Endocrinology*, *124*(2), 327–331.
- Kelly, M. A., Rubinstein, M., Asa, S. L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J. R., Allen, R. G., Hnasko, R., Ben-Jonathan, N., Grandy, D. K., & Low, M. J. (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*, *19*(1), 103–113.
- Kleinau, G., Müller, A., & Biebermann, H. (2016). Oligomerization of GPCRs involved in endocrine regulation. In *Journal of Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0049>
- Klöppel G, Couvelard A, Hruban RH, et al. (2017). WHO classification of tumours of the endocrine organs. *WHO Press*.
- Knosp, E., Steiner, E., Kitz, K., & Matula, C. (1993). Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: A magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*, *33*(4). <https://doi.org/10.1227/00006123-199310000-00008>
- Kovacs, K., Horvath, E., Asa, S. L., Stefaneanu, L., & Sano, T. (1989). Pituitary cells producing more than one hormone human pituitary adenomas. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *1*(2), 104–107. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(89\)90012-X](https://doi.org/10.1016/1043-2760(89)90012-X)
- Kuan, S I, Judd, A. M., Jarvis, W. D., Login, I. S., & MacLeod, R. M. (1990). Physiological and biochemical effects of bradykinin and lys-bradykinin in pituitary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *72*(3), 239–246.
- Kuan, Son I., Login, I. S., Judd, A. M., & Macleod, R. M. (1990). A comparison of the concentration-dependent actions of thyrotropin-releasing hormone, angiotensin ii, bradykinin, and lys-bradykinin on cytosolic free calcium dynamics in rat anterior pituitary cells: Selective effects of dopamine. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo-127-4-1841>
- Kwekkeboom, D. J., Hofland, L. J., Van Koetsveld, P. M., Singh, R., Van Den Berge, J. H., & Lamberts, S. W. J. (1990). Bromocriptine increasingly suppresses the in vitro gonadotropin and alpha-subunit release from pituitary adenomas during long term culture. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *71*(3), 718–724. <https://doi.org/10.1210/JCEM-71-3-718>
- Lacerte, A., Lee, E. H., Reynaud, R., Canaff, L., De Guise, C., Devost, D., Ali, S., Hendy, G. N., & Lebrun, J. J. (2004). Activin inhibits pituitary prolactin expression and cell growth through Smads, Pit-1 and menin. *Molecular Endocrinology*, *18*(6), 1558–1569. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0470>
- Lebrun, J.-J. (2009). Activin, TGF-beta and menin in pituitary tumorigenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *668*, 69–78.
- Lechan, R. M., & Toni, R. (2000). *Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary* (L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, & A. Vinik (eds.)).
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Kang, D. S., Lamb, M. E., & Fathy, D. B. (2001). The human B1 bradykinin receptor exhibits high ligand-independent, constitutive activity: Roles of residues in the fourth intracellular and third transmembrane domains. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007396200>
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., &

- Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*, 57(1), 27–77.
<https://doi.org/10.1124/pr.57.1.2>
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D. J., & Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. In *Pharmacological Reviews*.
<https://doi.org/10.1124/pr.57.1.2>
- Lenkei, Z., Nuyt, A. M., Grouselle, D., Corvol, P., & Llorens-Cortès, C. (1999). Identification of endocrine cell populations expressing the AT(1B) subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology*.
<https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6397>
- Linder, M. E., Ewald, D. A., Miller, R. J., & Gilman, A. G. (1990). Purification and characterization of G(α) and three types of G($\beta\gamma$) after expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39064-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39064-7)
- Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, R. J. (2017). WHO classification of tumours of the endocrine organs. In *WHO Press*.
- Lyons, R. M., Gentry, L. E., Purchio, A. F., & Moses, H. L. (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *The Journal of Cell Biology*, 110(4), 1361–1367.
- Maggio, R., Vogel, Z., & Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.3103>
- Maheux, R., Jenicek, M., Cleroux, R., Beaugard, H., De Muylder, X., Gratton, N. M., & Van Campenhout, J. (1982). Oral contraceptives and prolactinomas: A case-control study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 143(2).
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(82\)90641-X](https://doi.org/10.1016/0002-9378(82)90641-X)
- Maneva-Radicheva, L., Amatya, C., Parker, C., Ellefson, J., Radichev, I., Raghavan, A., Charles, M. L., Williams, M. S., Robbins, M. S., & Savinov, A. Y. (2014). Autoimmune diabetes is suppressed by treatment with recombinant human tissue Kallikrein-1. *PLoS One*, 9(9), e107213.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107213>
- Marceau, F., Bachelard, H., Bouthillier, J., Fortin, J. P., Morissette, G., Bawolak, M. T., Charest-Morin, X., & Gera, L. (2020). Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. In *International Immunopharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106305>
- McAndrew, J., Paterson, A. J., Asa, S. L., McCarthy, K. J., & Kudlow, J. E. (1995). Targeting of transforming growth factor- α expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology*, 136(10), 4479–4488.
<https://doi.org/10.1210/endo.136.10.7664668>
- Melmed, S., Casanueva, F. F., Hoffman, A. R., Kleinberg, D. L., Montori, V. M., Schlechte, J. A., & Wass, J. A. H. (2011). Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: An endocrine society clinical practice guideline. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 96, Issue 2).
<https://doi.org/10.1210/jc.2010-1692>
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998).

- Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78(1), 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Molitch, M. E. (2014). Management of medically refractory prolactinoma. In *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1270-8>
- Moodley, R., Snyman, C., Odhav, B., & Bhoola, K. D. (2005). Visualisation of transforming growth factor-beta 1, tissue kallikrein, and kinin and transforming growth factor-beta receptors on human clear-cell renal carcinoma cells. *Biological Chemistry*, 386(4), 375–382. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.045>
- Moreau, M. E., Bawolak, M. T., Morissette, G., Adam, A., & Marceau, F. (2007). Role of nuclear factor- κ B and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.106.030684>
- Morgan-Boyd, R., Stewart, J. M., Vavrek, R. J., & Hassid, A. (1987). Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca²⁺ dynamics in endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.253.4.c588>
- Murone, C., Chai, S. Y., Müller-Esterl, W., Mendelsohn, F. A. O., & Clements, J. (1999). Localization of bradykinin B2 receptors in the endometrium and myometrium of rat uterus and the effects of estrogen and progesterone. *Endocrinology*, 140(7), 3372–3382. <https://doi.org/10.1210/ENDO.140.7.6871>
- Musolino, N. R. C., & Passos, V. Q. (2005). [Dopamine-agonist resistant prolactinomas: diagnosis and management]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 49(5), 641–650. <https://doi.org/S0004-27302005000500005>
- Niewiarowska-Sendo, A., Kozik, A., & Guevara-Lora, I. (2018). Influence of bradykinin B2 receptor and dopamine D2 receptor on the oxidative stress, inflammatory response, and apoptotic process in human endothelial cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206443>
- Niewiarowska-Sendo, A., Polit, A., Labeledz-Maslowska, A., Kozik, A., & Guevara-Lora, I. (2017). A cooperation between bradykinin B2 and dopamine D2 receptors regulates neutrophil adhesion to endothelial cells. *Atherosclerosis*. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.251>
- Niewiarowska-Sendo, A., Polit, A., Piwowar, M., Tworzydło, M., Kozik, A., & Guevara-Lora, I. (2017a). Bradykinin B2 and dopamine D2 receptors form a functional dimer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.012>
- Niewiarowska-Sendo, A., Polit, A., Piwowar, M., Tworzydło, M., Kozik, A., & Guevara-Lora, I. (2017b). Bradykinin B2 and dopamine D2 receptors form a functional dimer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.012>
- Nishiyama, A., & Kim-Mitsuyama, S. (2010). New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: Overview of regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system. In *Journal of Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1254/jphs.10R03FM>
- Oh, M. C., & Aghi, M. K. (2011). Dopamine agonist-resistant prolactinomas. *Journal of Neurosurgery*, 114(5), 1369–1379. <https://doi.org/10.3171/2010.11.JNS101369>
- Oreffo, R. O. C., Mundy, G. R., Seyedin, S. M., & Bonewald, L. F. (1989). Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158(3), 817–823. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)92795-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)92795-2)

- Pampalakis, G., & Sotiropoulou, G. (2007). Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.06.001>
- Pathak, M., Wong, S. S., Dreveny, I., & Emsley, J. (2013). Structure of plasma and tissue kallikreins. *Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1160/TH12-11-0840>
- Peters, L. L., Hoefler, M. T., & Ben-Jonathan, N. (1981). The posterior pituitary: regulation of anterior pituitary prolactin secretion. *Science (New York, N.Y.)*, *213*(4508), 659–661.
- Peterson, S. M., Pack, T. F., Wilkins, A. D., Urs, N. M., Urban, D. J., Bass, C. E., Lichtarge, O., & Caron, M. G. (2015). Elucidation of G-protein and β -arrestin functional selectivity at the dopamine D2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502742112>
- Phelps, C., & Hymer, W. C. (1983). Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the Fischer 344 rat. *Neuroendocrinology*, *37*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1159/000123511>
- Piroli, G. G., Grillo, C. A., Ferrini, M. G., Lux-Lantos, V., & De Nicola, A. F. (1996). Antagonism by Progesterone of Diethylstilbestrol-Induced Pituitary Tumorigenesis in Fischer 344 Rats: Effects on Sex Steroid Receptors and Tyrosine Hydroxylase mRNA. *Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1159/000127082>
- Piroli, G., Lima, A. E., Diaz-Torga, G., & De Nicola, A. F. (1994). Biochemical parameters in the anterior pituitary during the course of tumorigenesis induced by diethylstilbestrol treatment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *51*(3–4), 183–189.
- Powers, C. A., & Nasjletti, A. (1983). A kininogenase resembling glandular kallikrein in the rat pituitary pars intermedia. *Endocrinology*, *112*(4), 1194–1200. <https://doi.org/10.1210/endo-112-4-1194>
- Powers, C. A., & Nasjletti, A. (1984). A major sex difference in kallikrein-like activity in the rat anterior pituitary. *Endocrinology*, *114*(5), 1841–1844. <https://doi.org/10.1210/endo-114-5-1841>
- Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., & Diamandis, E. P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(3), 183–202. <https://doi.org/10.1038/nrd4534>
- Quitterer, U., Lothar, H., & Abdalla, S. (2004). AT1 Receptor Heterodimers and Angiotensin II Responsiveness in Preeclampsia. *Seminars in Nephrology*. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2003.11.007>
- Raut, S., Deshpande, S., & Balasinar, N. H. (2019). Unveiling the Role of Prolactin and its Receptor in Male Reproduction. In *Hormone and Metabolic Research* (Vol. 51, Issue 4). <https://doi.org/10.1055/a-0859-1144>
- Recouvreux, M. Victoria, Guida, M. C., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Díaz-Torga, G. (2011). Active and total transforming growth factor- β 1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1464>
- Recouvreux, M. Victoria, Lapyckyj, L., Camilletti, M. A., Guida, M. C., Ornstein, A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Díaz-Torga, G. (2013). Sex differences in the pituitary transforming growth factor- β 1 system: Studies in a model of resistant prolactinomas. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1433>
- Recouvreux, M.V., Camilletti, M. A., Rifkin, D. B., & Díaz-Torga, G. (2016). The pituitary TGF β 1 system as a novel target for the treatment of resistant prolactinomas. *Journal of Endocrinology*, *228*(3). <https://doi.org/10.1530/JOE->

- 15-0451
- Recouvreux, M.V., Faraoni, E. Y., Camilletti, M. A., Ratner, L., Abeledo-Machado, A., Rulli, S. B., & Díaz-Torga, G. (2017). Sex differences in the pituitary TGFβ1 system: The role of TGFβ1 in prolactinoma development. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.10.003>
- Recouvreux, M.V., Faraoni, E. Y., Camilletti, M. A., Ratner, L., Abeledo-Machado, A., Rulli, S. B., & Díaz-Torga, G. (2018). Sex differences in the pituitary TGFβ1 system: The role of TGFβ1 in prolactinoma development. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.10.003>
- Recouvreux, M.V., Guida, M. C., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Díaz-Torga, G. (2011). Active and total transforming growth factor-β1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology*, 152(7). <https://doi.org/10.1210/en.2010-1464>
- Recouvreux, M.V., Lapyckyj, L., Camilletti, M. A., Guida, M. C., Ornstein, A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Díaz-Torga, G. (2013). Sex differences in the pituitary transforming growth factor-β1 system: Studies in a model of resistant prolactinomas. *Endocrinology*, 154(11). <https://doi.org/10.1210/en.2013-1433>
- Recouvreux, M Victoria, Camilletti, M. A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Diaz-Torga, G. (2012). Thrombospondin-1 (TSP-1) analogs ABT-510 and ABT-898 inhibit prolactinoma growth and recover active pituitary transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1). *Endocrinology*, 153(8), 3861–3871. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1007>
- Recouvreux, M Victoria, Guida, M. C., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Diaz-Torga, G. (2011). Active and total transforming growth factor-beta1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology*, 152(7), 2722–2730. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1464>
- Recouvreux, M Victoria, Lapyckyj, L., Camilletti, M. A., Guida, M. C., Ornstein, A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Diaz-Torga, G. (2013). Sex differences in the pituitary transforming growth factor-beta1 system: studies in a model of resistant prolactinomas. *Endocrinology*, 154(11), 4192–4205. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1433>
- Regoli, D., Rhaleb, N. E., Drapeau, G., Dion, S., Tousignant, C., D'Orléans-Juste, P., & Devillier, P. (1989). Basic pharmacology of kinins: pharmacologic receptors and other mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9543-4_61
- Renner, U., Paez-Pereda, M., Arzt, E., & Stalla, G. K. (2004). Growth factors and cytokines: Function and molecular regulation in pituitary adenomas. *Frontiers of Hormone Research*. <https://doi.org/10.1159/000079039>
- Ribeiro-Oliveira, A., Franchi, G., Kola, B., Dalino, P., Pinheiro, S. V. B., Salahuddin, N., Musat, M., Góth, M. I., Czirják, S., Hanzély, Z., da Silva, D. A., Paulino, E., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2008). Protein western array analysis in human pituitary tumours: Insights and limitations. *Endocrine-Related Cancer*. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0003>
- Ribeiro-Oliveira, A. J., Franchi, G., Kola, B., Dalino, P., Pinheiro, S. V. B., Salahuddin, N., Musat, M., Goth, M. I., Czirjak, S., Hanzely, Z., da Silva, D. A., Paulino, E. J., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2008). Protein western array analysis in human pituitary tumours: insights and limitations. *Endocrine-Related Cancer*, 15(4), 1099–1114. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0003>
- Rocheville, M., FAU, L. D. C., Kumar U FAU - Patel S.C., FAU, P. S. C., FAU, P. R. C., & Patel, Y. C. (413 C.E.). Receptors for dopamine and somatostatin:

- formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science (New York, N.Y.) JID - 0404511*.
- Romijn, J. A. (2014). Hyperprolactinemia and prolactinoma. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 124). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59602-4.00013-7>
- Ross, M., & Pawlina, W. (1966). Histologia. Texto y atlas color con Biología celular y molecular. In *The British Journal of Psychiatry* (Vol. 112, Issue 483).
- Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M. P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., & Devi, L. A. (2011). AT1R-CB1 R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.139>
- Rulli, S. B., Kuorelahti, A., Karaer, O., Pelliniemi, L. J., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2002). Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, *143*(10), 4084–4095. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220490>
- Sabourin, T., Bastien, L., Bachvarov, D. R., & Marceau, F. (2002). Agonist-induced translocation of the kinin B1 receptor to caveolae-related rafts. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.61.3.546>
- Sabourin, T., Morissette, G., Bouthillier, J., Levesque, L., & Marceau, F. (2002). Expression of kinin B1 receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: Role of NF- κ B. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00978.2001>
- Saint-Andre, J. P., Rohmer, V., Alhenc-Gelas, F., Menard, J., Bigorgne, J. C., & Corvol, P. (1986). Presence of renin, angiotensinogen, and converting enzyme in human pituitary lactotroph cells and prolactin adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem-63-1-231>
- Sarkar, D. K., Chaturvedi, K., Oomizu, S., Boyadjieva, N. I., & Chen, C. P. (2005). Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)- β 1, and TGF- β type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0430>
- Sarkar, D K, Pastorcic, M., De, A., Engel, M., Moses, H., & Ghasemzadeh, M. B. (1998). Role of transforming growth factor (TGF)-beta Type I and TGF-beta type II receptors in the TGF-beta1-regulated gene expression in pituitary prolactin-secreting lactotropes. *Endocrinology*, *139*(8), 3620–3628. <https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6135>
- Sarkar, Dipak K., Kim, K. H., & Minami, S. (1992). Transforming growth factor- β 1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: Its action on prolactin secretion and lactotropic growth. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/mend.6.11.1480172>
- Schaller, B. (2005). Gender-related differences in prolactinomas. A clinicopathological study. *Neuroendocrinology Letters*.
- Schanstra, J. P., Bataillé, E., Marin Castaño, M. E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J. B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J. P., & Bascands, J. L. (1998). The B1-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI1359>
- Schmaier, A. H. (2003). The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. In *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2002>

- Schremmer-Danninger, E., Öffner, A., Siebeck, M., & Roscher, A. A. (1998). B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7999>
- Schultz-Cherry, S., Ribeiro, S., Gentry, L., & Murphy-Ullrich, J. E. (1994). Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor- β in a chemically defined system. *Journal of Biological Chemistry*.
- Sharma, J. N. (2014). Basic and clinical aspects of bradykinin receptor antagonists. *Progress in Drug Research*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06683-7_1
- Shaw, J. L. V., & Diamandis, E. P. (2007). Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clinical Chemistry*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.088104>
- Singh, P., Krishna, A., & Sridaran, R. (2011). Changes in bradykinin and bradykinin B2-receptor during estrous cycle of mouse. *Acta Histochemica*, 113(4), 436. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2010.03.008>
- Sotiropoulou, G., & Pampalakis, G. (2012). Targeting the kallikrein-related peptidases for drug development. In *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.005>
- Souteiro, P., & Karavitaki, N. (2019). Dopamine agonist resistant prolactinomas: any alternative medical treatment? *Pituitary*. <https://doi.org/10.1007/s11102-019-00987-3>
- Sriram, K., & Insel, P. A. (2018). G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: How many targets and how many drugs? *Molecular Pharmacology*, 93(4), 251–258. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>
- Su, J. B. (2014). Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. In *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. <https://doi.org/10.1177/1470320312474854>
- Suarez, C., Díaz-Torga, G., González-Iglesias, A., Cristina, C., & Becu-Villalobos, D. (2004). Upregulation of angiotensin II type 2 receptor expression in estrogen-induced pituitary hyperplasia. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 286(5 49-5). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00477.2003>
- Swedberg, J. E., De Veer, S. J., & Harris, J. M. (2010). Natural and engineered kallikrein inhibitors: An emerging pharmacopoeia. *Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.037>
- Takeuchi, Y., Liu, J.-Q., Matsumoto, Y., Miki, T., Ohta, K., Warita, K., Suzuki, S., & Tamai, M. (2013). Secretion-related structures of hypothalamo-hypophysial terminals in the rat posterior pituitary. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 90(3), 69–76.
- Tang, C., Sun, R., Wen, G., Zhong, C., Yang, J., Zhu, J., Cong, Z., Luo, X., & Ma, C. (2019). Bromocriptine and cabergoline induce cell death in prolactinoma cells via the ERK/EGR1 and AKT/mTOR pathway respectively. *Cell Death and Disease*, 10(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1526-0>
- Thapar, K. (1993). *III III III Plurihormonal Pituitary Tumors: Beyond The One Ceil-One Hormone Theory*.
- Trabold, F., Pons, S., Hagege, A. A., Bloch-Faure, M., Alhenc-Gelas, F., Giudicelli, J. F., Richer-Giudicelli, C., & Meneton, P. (2002). Cardiovascular phenotypes of kinin B2 receptor- and tissue kallikrein-deficient mice. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000021747.43346.95>
- Tyson, J. E., Hwang, P., Guyda, H., & Friesen, H. G. (1972). Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*,

- 113(1), 14–20. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(72\)90446-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90446-2)
- Van der Graaf, F., Tans, G., Bouma, B. N., & Griffin, J. H. (1982). Isolation and functional properties of the heavy and light chains of human plasma kallikrein. *Journal of Biological Chemistry*.
- Vasilev, V., Daly, A. F., Vroonen, L., Zacharieva, S., & Beckers, A. (2011). Resistant prolactinomas. *Journal of Endocrinological Investigation*, 34(4), 312–316. <https://doi.org/10.1007/BF03347092>
- Verhelst, J., Abs, R., Maiter, D., Van Den Bruel, A., Vandeweghe, M., Velkeniers, B., Mockel, J., Lamberigts, G., Petrossians, P., Coremans, P., Mahler, C., Stevenaert, A., Verlooy, J., Raftopoulos, C., & Beckers, A. (1999). Cabergoline in the treatment of hyperprolactinemia: A study in 455 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(7). <https://doi.org/10.1210/jcem.84.7.5810>
- Vroonen, L., Daly, A. F., & Beckers, A. (2019). Epidemiology and Management Challenges in Prolactinomas. *Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1159/000497746>
- Wang, X., Ma, L., Ding, Q. Y., Zhang, W. Y., Chen, Y. G., Wu, J. H., Zhang, H. F., & Guo, X. L. (2021). Microglial NLRP3 inflammasome activation-mediated inflammation promotes prolactinoma development. *Endocrine-Related Cancer*. <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0137>
- Wildemberg, L. E., Fialho, C., & Gadelha, M. R. (2021). Prolactinomas. *La Presse Médicale*, 50(4), 104080. <https://doi.org/10.1016/J.LPM.2021.104080>
- Wong, A., Eloy, J. A., Couldwell, W. T., & Liu, J. K. (2015). Update on prolactinomas. Part 2: Treatment and management strategies. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 22(10), 1568–1574. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.03.059>
- Wong, M. K. S. (2016). Kininogen. In *Handbook of Hormones*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801028-0.00180-x>
- Xia, C.-F., Bledsoe, G., Chao, L., & Chao, J. (2005). Kallikrein gene transfer reduces renal fibrosis, hypertrophy, and proliferation in DOCA-salt hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(3), F622-31. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00427.2004>
- Yin, H., Chao, L., & Chao, J. (2008). Nitric oxide mediates cardiac protection of tissue kallikrein by reducing inflammation and ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion. *Life Sciences*, 82(3–4), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.10.021>
- Yiu, W. H., Wong, D. W. L., Wu, H. J., Li, R. X., Yam, I., Chan, L. Y. Y., Leung, J. C. K., Lan, H. Y., Lai, K. N., & Tang, S. C. W. (2016). Kallistatin protects against diabetic nephropathy in db/db mice by suppressing AGE-RAGE-induced oxidative stress. *Kidney International*, 89(2), 386–398. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.331>
- Yoon, H., Blaber, S. I., Debela, M., Goettig, P., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2009). A completed KLK activome profile: Investigation of activation profiles of KLK9, 10, and 15. *Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.026>
- Yoon, H., Laxmikanthan, G., Lee, J., Blaber, S. I., Rodriguez, A., Kogot, J. M., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2007). Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705190200>
- Yousef, G. M., Chang, A., Scorilas, A., & Diamandis, E. P. (2000). Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3448>