

Universidad nacional del noroeste de la provincia de Buenos Aires

TESIS DOCTORAL

**“PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN EL DESARROLLO
Y PROGRESIÓN DE LOS TUMORES HIPOFISARIOS. NUEVOS
BLANCOS TERAPÉUTICOS: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN WNT/BETA-
CATENINA”**

Autor: GIANINA DEMARCHI

Director de Tesis: CAROLINA CRISTINA

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultar de Medicina, Universidad Nacional de Rosario (UNR).

Año de presentación: 2020

Departamento Centro o Instituto en donde se realizó: Laboratorio de Fisiopatología de la Hipófisis. Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA-UNNOBA). Centro de Investigación y Transferencia del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (CITNOBA-UNNOBA-UNSADA-CONICET).

Título del Trabajo: PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE LOS TUMORES HIPOFISARIOS. NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN WNT/BETA-CATENINA

Nombre del autor: GIANINA DEMARCHI

Nombre del Director de Tesis: CAROLINA CRISTINA

Año de presentación: 2020

Contenido

1. RESUMEN:	5
2. INTRODUCCIÓN	6
GLÁNDULA HIPÓFISIS	6
ADENOHIPÓFISIS	7
TUMORES O ADENOMAS HIPOFISARIOS	8
CLASIFICACIÓN	9
o Tumores de corticotropos secretores de la hormona adenocorticotrofa (ACTH) y otros péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC)	10
o Adenomas hipofisarios secretores de hormona de crecimiento (GH) o Somatotropinomas.....	10
o Adenomas de tirotropos	10
o Adenomas no funcionantes y adenomas secretores de gonadotrofinas (LH y FSH).	11
o Prolactinomas	11
MECANISMOS PATOGENICOS EN ADENOMAS HIPOFISARIOS	13
PROLACTINOMAS. CARACTERÍSTICAS RELEVANTES Y TRATAMIENTOS VIGENTES	14
Tratamiento médico	16
Tratamiento quirúrgico	18
Radioterapia	18
POSIBLES MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS EN LOS LACTOTROPOS	19
VÍA DE WNT Y SU ROL EN CÁNCER	21
ESTÍMULO ESTROGÉNICO Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE WNT EN CÁNCER. WNT EN TUMORES DE HIPÓFISIS	25
TUMORES HIPOFISARIOS AGRESIVOS: NUEVOS TRATAMIENTOS QUIMIOTERÁPICOS Y VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/β-CATENINA	27
Temozolomida	27
TMZ y vías de señalización: Rol de la vía canónica de Wnt/ β-Catenina	30
ROL DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES EN EL TEJIDO HIPOFISARIO Y LA RESISTENCIA TUMORAL	30
Células madre en tumores hipofisarios resistentes	32
HIPÓTESIS:	34

OBJETIVO GENERAL:	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	34
3. DESARROLLO:	36
MATERIALES Y MÉTODOS:	36
Muestras de tumores hipofisarios de pacientes.....	36
Líneas celulares y condiciones de cultivo:	37
Animales	38
Inmunohistoquímica:	40
Extracción de RNA y RT-PCR:	41
Real Time PCR:.....	42
Western Blot	44
Citometría de flujo.....	45
Radioinmunoensayo	45
Determinación de VEGF por ELISA.....	46
Viabilidad celular.....	46
Análisis de apoptosis celular.....	47
Análisis del ciclo celular	47
Ensayo de migración o cierre de la herida	48
Ensayo de formación de esferas	48
Inmunocitoquímica	49
Análisis estadístico.....	49
Muestras y modelos experimentales utilizados en el presente trabajo de tesis:	51
RESULTADOS:	52
Expresión de β -Catenina en hipófisis humanas normales y tumorales, su activación en prolactinomas y su relación con la proliferación del tumor.....	52
β-CATENINA EN LACTOTROPOS NORMALES Y ROL DE LA VÍA CANÓNICA DE WNT EN LACTOTROPOS ESTIMULADOS	56
Expresión basal de β -Catenina en hipófisis murinas normales y su relación con la producción hormonal.	56
Activación de la vía Wnt en hipófisis estimuladas farmacológicamente <i>in vivo</i>	57

Respuesta de la vía Wnt en lactotrofos estimulados farmacológicamente con Estradiol <i>in vitro</i>	62
Expresión de la vía Wnt en lactotrofos tumorales MMQ y efecto del estímulo con Estradiol	64
Efecto de la activación específica de la vía de Wnt en los lactotrofos tumorales MMQ.....	65
SEÑALIZACIÓN WNT/β-CATENINA Y TRATAMIENTO DE PROLACTINOMAS.....	71
Respuesta de prolactinomas experimentales al tratamiento con TMZ.....	71
Correlación de componentes de la vía de Wnt y prolactina, y efecto del tratamiento quimioterápico sobre la vía en los prolactinomas.....	75
TMZ no afecta al proceso de angiogénesis en los prolactinomas <i>in vivo</i>	77
TMZ inhibe la viabilidad celular e induce apoptosis y arresto de ciclo celular en las MMQ <i>in vitro</i> ..	78
Inhibición de β -CATENINA en las células de prolactinoma MMQ por TMZ.....	80
TMZ inhibe la secreción de VEGF de los lactotrofos tumorales <i>in vitro</i>	82
VIA CANONICA DE WNT EN CORTICOTROPINOMAS Y EN MODELOS EXPERIMENTALES.....	83
Respuesta de corticotropinomas experimentales al tratamiento con TMZ.....	84
Transformación de un corticotropinoma silente a agresivo: Activación de β -CATENINA, transformación de la vasculatura tumoral y efecto del tratamiento con TMZ.....	85
Estudio secuencial de la expresión del marcador angiogénico α -SMA y de β -CATENINA en los tejidos tumorales del corticotropinoma con transformación maligna	89
Vía canónica de Wnt en la resistencia de tumores hipofisarios a TMZ: rol de las Células madre tumorales.....	92
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:.....	98
5. BIBLIOGRAFÍA.....	117

1. RESUMEN:

Los mecanismos moleculares que desarrollan o mantienen a los tumores hipofisarios conocidos al momento no terminan de explicar su compleja patogénesis. Asimismo, aquellos que conducen a la efectividad o resistencia a los tratamientos no son aún concluyentes. Se demostró en varias patologías la influencia de la desregulación de la vía Wnt/ β -Catenina en los procesos de malignidad y quimiorresistencia, pero la información sobre los mecanismos por los que ésta influye en la tumorigénesis hipofisaria son escasos. En este trabajo determinamos expresión de β -Catenina en tumores hipofisarios de pacientes, destacándose los prolactinomas por mayor activación de β -Catenina e índice de proliferación asociado. Demostramos en modelos murinos de lactotopos estimulados *in vivo* e *in vitro* y en líneas celulares tumorales la activación de Wnt/ β -Catenina en el mantenimiento de la función de los lactotopos y los procesos protumorales. Demostramos también la efectividad de Temozolomida, agente quimioterápico promisorio para tumores hipofisarios agresivos, en modelos de prolactinomas y corticotropinomas y su relación con la vía. Finalmente demostramos en corticotropinomas, la participación de β -Catenina en un caso agresivo y la posible relación de las células madre con la quimiorresistencia. Nuestros resultados apoyan una respuesta activa de Wnt/ β -Catenina en la tumorigénesis y la quimioterapia en los tumores hipofisarios.

2. INTRODUCCIÓN

GLÁNDULA HIPÓFISIS.

La hipófisis o glándula pituitaria es una glándula endócrina que produce hormonas encargadas de regular el funcionamiento de otras glándulas y la homeostasis del organismo. Se ubica en una fosa que deja el hueso esfenoides (silla turca) en la base del cerebro con el cual se conecta a través del tallo hipofisario. Esta glándula consta de tres partes: **Lóbulo anterior o adenohipófisis**, responsable de la secreción de numerosas hormonas y de interés central en el presente trabajo de tesis; hipófisis intermedia o pars intermedia y lóbulo posterior o neurohipófisis (Figura 1).

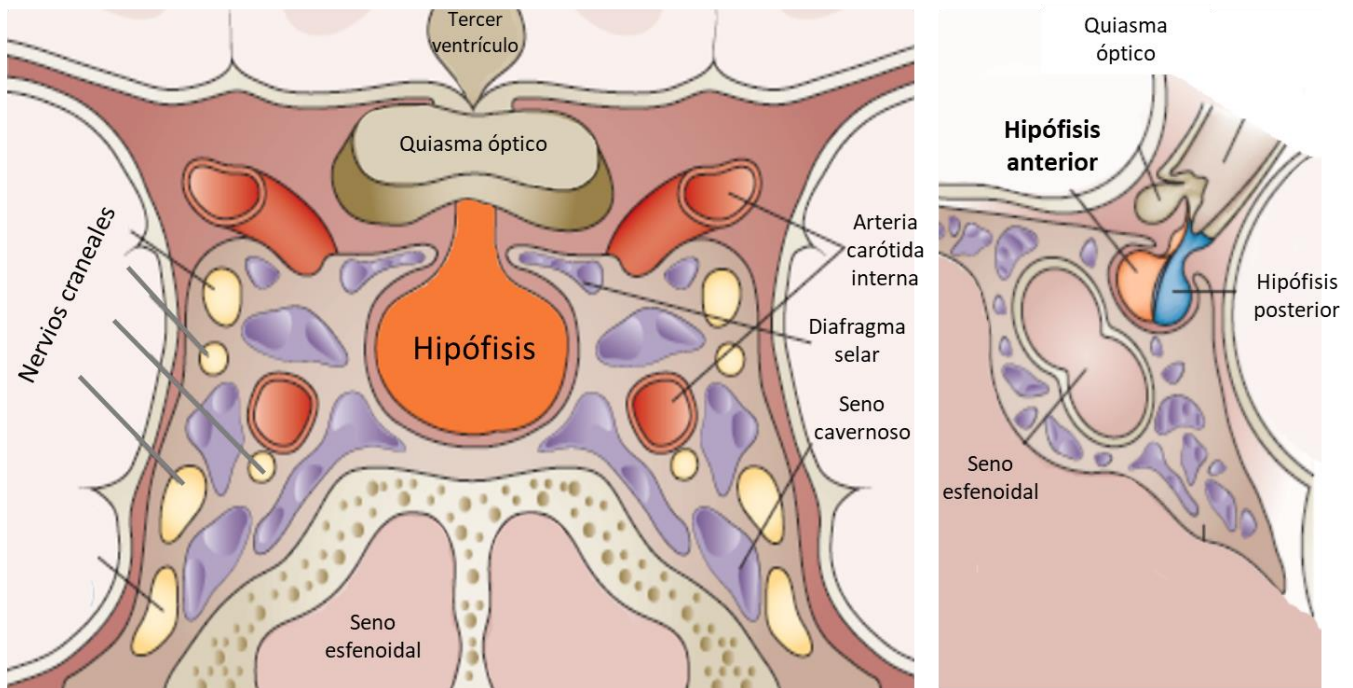


Figura 1: Esquema de la anatomía de la región selar y pareselar que rodea a la hipófisis humana normal. a) vista frontal y b) vista lateral. Tomado de Di Leva *et. al* 2014 [1].

ADENOHIPÓFISIS

Las células de la adenohipófisis producen hormonas tróficas que regulan el funcionamiento de otras glándulas endócrinas del organismo. Estas hormonas son secretadas por 5 tipos de células diferentes:

- **Lactotropos**, producen Prolactina o **PRL**. La PRL estimula el desarrollo de los acinos mamarios y la producción de las proteínas de la leche.
- **Corticotropos**, producen adrenocorticotrofina o **ACTH**. La ACTH estimula la producción de hormonas por parte de las glándulas suprarrenales
- **Somatotropos**, producen hormona de crecimiento o **GH**.
- **Gonadotropos**, producen gonadotrofinas: **LH y FSH**.
- **Tirotropos**, producen tirotrófina o **TSH**.

La adenohipófisis presenta un estroma reticular que contiene a los distintos subtipos celulares productores de hormonas, rodeados de una densa vasculatura y contenidos por las fibras reticulares [2].

La hipófisis en los mamíferos es uno de los tejidos más vascularizados. Recibe oxígeno y nutrientes a partir de las arterias hipofisarias superior e inferior que son ramas directas de la arteria carótida interna, pero en la glándula existe también un sistema de sangre venosa formado por los vasos portales hipofisarios. Estos proveen un medio de comunicación entre el hipotálamo y la adenohipófisis llevando neurotransmisores y otros péptidos hipotalámicos estimuladores e inhibidores de la secreción y proliferación de las células de la hipófisis anterior (vasos portales largos). Por su parte, la secreción adenohipofisaria alcanza el lóbulo posterior

a través de los vasos portales cortos. Los capilares del sistema porta hipofisario son fenestrados lo que favorece el intercambio de sustancias con las células endócrinas de la glándula.

Cuando uno o más eventos de desregulación o malignidad ocurren en la glándula hipofísis, puede generarse un **tumor hipofisario** (Figura 2).

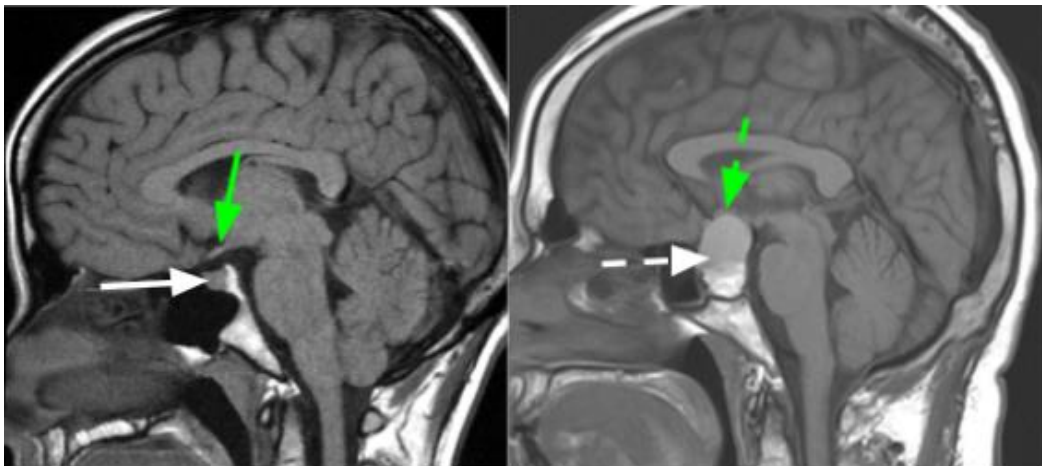


Figura 2: En las imágenes de resonancia magnética se pueden apreciar la glándula hipofisaria normal (izquierda, flecha blanca continua) y un tumor hipofisario (derecha, flecha blanca discontinua). Las flechas verdes indican la localización del quiasma óptico en condiciones normales (izquierda, flecha continua) y oprimido por el tumor de hipofísis (derecha, flecha discontinua). Tomado de la web page de “The North American Neuro-Ophthalmology Society” (www.nanosweb.org).

TUMORES O ADENOMAS HIPOFISARIOS

El presente trabajo de tesis se basa en el estudio de procesos moleculares que acompañan el desarrollo y progresión de los adenomas hipofisarios humanos, principalmente a los prolactinomas.

Los tumores o adenomas hipofisarios son los neoplasmas intracraneales primarios más frecuentes. Representan un grupo de lesiones complejas de tratar que expresan características histológicas, morfológicas y patológicas variables [3]. Corresponden aproximadamente al 15% de todos los tumores del cerebro y del sistema nervioso central (SNC) con un pico de incidencia más temprano en mujeres (20-45 años) que en hombres (35-60 años). No es frecuente el desarrollo de estos tumores durante la niñez.

La mayoría de los tumores hipofisarios crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos porque metastatizan en menos del 1% de los casos y permanecen dentro de la silla turca, aunque también pueden crecer en forma expansiva hacia los tejidos vecinos. De acuerdo con la última clasificación de 2017 para tumores de órganos endocrinos de la Organización mundial de la salud (OMS) [4-6] se definen como verdaderos carcinomas sólo cuando hay presencia de metástasis craneoespinal y/o sistémica. En general estos carcinomas son en su mayoría hormonalmente activos, los más comunes son los secretores de prolactina seguidos por los secretores de adrenocorticotropina. Mientras el carcinoma permanece dentro de la silla turca es muy difícil diagnosticarlo de manera diferencial de otros tumores hipofisarios no invasivos [3, 7].

CLASIFICACIÓN

Los tumores hipofisarios se clasifican según su tamaño en microadenomas (< 10mm) y macroadenomas (> 10mm). Los pacientes con macroadenomas recurren a la consulta médica debido a efectos de compresión como dolores de cabeza y/o falla visual progresiva mientras

que los casos de microadenomas son identificados generalmente durante la investigación de síndromes clínicos endócrinos o en forma incidental durante diagnóstico por imagen del cerebro por otras causas. Además, en un 10 a un 25% de las autopsias se descubren pequeños adenomas subclínicos [8].

Los tumores hipofisarios se clasifican además según la hormona que producen (Tabla 1) y se describen como funcionantes si sobreproducen alguna hormona de la hipófisis anterior, o no funcionantes, si no existe síndrome clínico (endócrino) aparente.

Dentro de esta clasificación podemos encontrar:

- Tumores de corticotropos secretores de la hormona adenocorticotrofa (ACTH) y otros péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC)
Causan el síndrome clínico de la enfermedad de Cushing, con hiperplasia de adrenales dependiente de ACTH y altos niveles circulantes de glucocorticoides.
- Adenomas hipofisarios secretores de hormona de crecimiento (GH) o Somatotropinomas.
Corresponden aproximadamente al 10-20 % de los tumores hipofisarios y son los causantes del síndrome clínico de acromegalia.
- Adenomas de tirotropos
Son raros, representan el 0.5-2% de los neoplasmas de hipófisis y más del 70% de éstos son macroadenomas [7].

- Adenomas no funcionantes y adenomas secretores de gonadotrofinas (LH y FSH).
Son el segundo tipo más común de tumores hipofisarios (alrededor del 30 % de los adenomas) y además el subtipo más común de macroadenomas. Producen LH y FSH activas, otros son en verdad no funcionantes y se los llama adenomas de células nulas.
- Prolactinomas
Son tumores hipofisarios secretores de PRL y los más frecuentes de la patología a pesar de que en muestras quirúrgicas este subtipo de adenoma es mucho menos prevalente debido al exitoso tratamiento primario de éstos con agonistas dopaminérgicos. Sus características más relevantes serán profundizadas más adelante dado que este tipo de tumor es de principal interés para el presente trabajo de tesis.

Table 2 The 2017 WHO pathological classification of pituitary adenomas

Adenoma types	Morphological variants	Pituitary hormones by immunohistochemistry	Transcription factors and other co-factors
Somatotroph adenomas			
	Densely granulated somatotroph adenoma	GH, α -subunit	Pit-1
	Sparsely granulated somatotroph adenoma	GH	Pit-1
	Mammotroph adenoma	GH + PRL (in same cells) \pm α -subunit	Pit-1, ER α
	Mixed somatotroph-lactotroph adenoma	GH + PRL (in different cells) \pm α -subunit	Pit-1, ER α
Lactotroph adenomas			
	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	Pit-1, ER α
	Densely granulated lactotroph adenoma	PRL	Pit-1, ER α
	Acidophil stem cell adenoma	PRL, GH (focal and variable)	Pit-1, ER α
Thyrotroph adenoma			
		β -TSH, α -subunit	Pit-1, GATA2
Corticotroph adenomas			
	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	Tpit
	Sparsely granulated corticotroph adenoma	ACTH	Tpit
	Crooke's cell adenoma	ACTH	Tpit
Gonadotroph adenoma			
		β -FSH, β -LH, α -subunit (various combinations)	SF-1, GATA2, ER α
Null cell adenoma			
		None	None
Plurihormonal adenomas			
	Pit-1-positive plurihormonal adenoma (previously termed Silent subtype 3 adenoma)	GH, PRL, β -TSH \pm α -subunit	Pit-1
	Adenomas with unusual immunohistochemical combinations	Various combinations	

Tabla 1: Tumores generados en la glándula hipófisis y nueva clasificación de la OMS. Fuente: Tomado de Mete y Lopes, 2017 [3].

Con el paso del tiempo, nuevas clasificaciones para los tumores hipofisarios han surgido en base a las diversas características que éstos presentan. Términos tales como típicos y atípicos (de acuerdo a la clasificación previa de la OMS de 2014, según presenten características patológicas como la expresión de Ki67 menor o mayor a 3% respectivamente, y la tinción nuclear extensa para p53); invasivo y no invasivo (según hallazgos radiológicos, quirúrgicos y morfológicos), y agresivos y no agresivos (de acuerdo al comportamiento clínico del tumor) han conllevado a diversas interpretaciones. Desde 2017, la OMS sugiere no utilizar el término “atípico” para clasificar a los tumores de hipófisis dado que no ha sido probado que éstas características definan un comportamiento clínico particular [9]. La OMS alienta desde entonces a una nueva clasificación basada en el perfil de expresión de los factores de transcripción específicos de linaje además de las características secretoras o no de los tumores (Tabla 1). Así, la expresión del factor de transcripción Pit-1 define tumores de células que expresan GH, PRL y TSH mientras que la presencia de Tpit define células que expresan ACTH. Además, la expresión de receptores de Estrógenos α (ER α) es detectada en todos los casos de adenomas de células productoras de PRL como de gonadotropos [10, 11]. Esta nueva clasificación es particularmente importante a la hora de determinar el origen monoclonal en los adenomas plurihormonales. El estudio del porcentaje de células Ki67 positivas también es altamente recomendado a la hora de clasificar a los tumores hipofisarios [1, 9].

Si bien estos tumores neuroendocrinos de la hipófisis se clasifican en general como adenomas benignos con bajas tasas de crecimiento [12], su biología puede variar ampliamente entre ellos. En el otro gran extremo existe un subgrupo de estos tumores que muestra comportamiento agresivo, con un crecimiento rápido que los vuelve localmente invasivos, resistentes a los

tratamientos y desarrollo de recurrencia [13]. En muy raros casos estos tumores son capaces de metastatizar [14] y, en general, expresan un índice de Ki67 mayor o igual al 3% [1].

Esta gran diversidad pone de manifiesto la necesidad de nuevas opciones de tratamiento, muchos actualmente en estudio clínico, que requieren del soporte de la evidencia científica. El presente trabajo de tesis busca contribuir en el conocimiento de nuevos posibles blancos de terapias, o en aquellos de uso clínico que hasta hoy son emergentes para los tumores de hipófisis.

MECANISMOS PATOGENICOS EN ADENOMAS HIPOFISARIOS

La glándula hipofisaria responde a complejos mecanismos regulatorios para mantener la homeostasis del tejido. Las mutaciones en genes tempranos del desarrollo o específicos de cada linaje celular de la glándula, así como la adquisición de señales centrales y periféricas puede provocar respuestas de crecimiento que derivan en la formación de hipoplasia, hiperplasia o adenoma [15].

Los factores que influyen en el funcionamiento de las células hipofisarias, incluyendo hormonas hipotalámicas, estrógenos y factores de crecimiento, probablemente estén facilitando cambios en el microambiente, potenciando la inestabilidad genética, la mutación de células y la expansión clonal.

Entre ellos el estrógeno en altas dosis es mitogénico para los lactotopos, promoviendo tanto su proliferación como su actividad, y el receptor de Estrógenos (ER) como se mencionó anteriormente, se encuentra presente en el 70-100% de los prolactinomas [10, 11]. Altas dosis

de Estrógenos en ratas inducen el desarrollo de hiperplasia y posteriormente la generación de adenomas [16, 17]. Adicionalmente, los estrógenos estimulan el promotor de prolactina, y activan genes tales como PTTG, FGF, receptores FGF y TGF β , todos implicados en la tumorigénesis hipofisaria [15].

PROLACTINOMAS. CARACTERÍSTICAS RELEVANTES Y TRATAMIENTOS VIGENTES

Estos adenomas hipofisarios productores de PRL son los más frecuentes dentro de los adenomas secretantes [5, 18], sus manifestaciones clínicas dependientes de la hiperprolactinemia favorecen una detección temprana e inequívoca del tipo de tumor y, como el resto de los adenomas hipofisarios, tienen también un origen monoclonal [19].

Recientemente, la prevalencia de los casos de este tipo de lesión ha aumentado bien por mejoras en las metodologías de detección o bien por mayor concientización. Algunos estudios epidemiológicos realizados en los últimos seis años en varios países incluida la Argentina, muestran que en todos los países los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más prevalentes. En general, la prevalencia de éstos en estos últimos estudios, según el criterio de la OMS de 2000, varió de 25/100,000 habitantes a 63/100,000 habitantes. En nuestro país, el estudio retrospectivo llevado a cabo por miembros del Hospital Italiano, en un grupo de 150,000 personas del área urbana y suburbana de Buenos Aires afiliados a un programa de medicina prepaga, tanto el índice de incidencia como el de prevalencia fue mayor en los prolactinomas (5.41 y 56.29 respectivamente) seguidos por acromegalia y adenomas no funcionantes [18, 20].

Los prolactinomas muestran en general diversas presentaciones iniciales en cuanto a apariencia radiológica y comportamiento [21]. Por lo general los microprolactinomas cursan con niveles de PRL sérica moderadamente elevados, encontrándose entre 50 y 300 ng/ml, y los macroprolactinomas con más de 200 ng/ml. La mayoría de los trabajos sugieren que los niveles de prolactina correlacionan con el tamaño tumoral y niveles altos preoperatorios de esta hormona indican la presencia de un prolactinoma invasivo [21]. Otros tumores como los adenomas no funcionantes y los craneofaringiomas pueden tener también una hiperprolactinemia asociada, pero ésta raramente excede los 100 ng/ml.

En mujeres, la edad promedio de diagnóstico de los prolactinomas es de 30 años, y el 88% son microadenomas. Se ha reportado que entre el 30 y el 50% de los tumores hipofisarios en mujeres producen PRL y que un 6% producen PRL junto con otra hormona hipofisaria. La secreción excesiva de PRL causa oligomenorrea o amenorrea, y galactorrea, y éstos son los síntomas generales por los que los prolactinomas son detectados precozmente en las mujeres. En los hombres en cambio, el diagnóstico se realiza a partir de los 50 años y el 80% son macroadenomas. La galactorrea es rara y los síntomas de hipogonadismo tales como impotencia y falta de libido llevan a la consulta médica en forma bastante tardía [22].

El riesgo existente para la progresión de micro a macroadenoma secretor de prolactina se estima en un 4-7%, hecho que sugiere que los macroprolactinomas deben ser una entidad diferente respecto a los microprolactinomas [23].

Los prolactinomas pueden llegar a ser localmente invasivos, pero sólo se los considera carcinomas (0.1 a 0.2% de los casos) cuando existe metástasis cerebrosplinales, de meninges o sistémica distante [18, 24].

Tratamiento médico

La dopamina es, desde los setenta, el principal factor inhibitorio de la síntesis y secreción de prolactina, así como de la proliferación de lactotopos [18, 25]. Los receptores D2 son los principales receptores dopaminérgicos en la hipófisis y a través de éstos la dopamina ejerce sus efectos inhibitorios sobre los lactotopos. La mayoría de los prolactinomas son particulares en el sentido de que conservan la capacidad de respuesta a la acción inhibitoria de la dopamina, por lo que los agonistas dopaminérgicos provocan en general rápida reducción del tamaño tumoral con liberación de los síntomas de compresión [26].

Las principales drogas utilizadas son la Bromocriptina, Cabergolina y Quinagolida, que actúan directamente sobre el receptor de dopamina D2 determinando la reducción de la prolactina sérica y el tamaño tumoral [27]. En general tienen muy buena tolerancia, entre los efectos colaterales se describen náuseas y vómitos, síntomas gastrointestinales, mareos y dolor de cabeza entre otros. Las dosis se ajustan de acuerdo a las características clínicas de la lesión y a las necesidades de cada paciente, comenzando con dosis bajas (0.25 a 0.5 mg 1 o 2 veces a la semana) y la dosis se escala en períodos de 1 a 3 meses según los niveles de PRL sérica y reducción del tamaño tumoral [18]. Pacientes con macroprolactinomas pueden requerir dosis mayores. Una vez que los niveles séricos de PRL se hayan normalizado y el volumen tumoral haya disminuido, el tratamiento debe continuarse por lo menos durante 2 años más o debe reducirse progresivamente la dosis hasta alcanzar la dosis mínima que siga manteniendo los niveles normales [28].

Prolactinomas resistentes.

Existe un subgrupo de prolactinomas denominados “resistentes” dado que no responden a los tratamientos con agonistas de la dopamina evaluados como disminución de la hiperprolactinemia y reducción del tamaño tumoral en al menos un 50% con dosis de hasta 3mg/semana. Algunos, incluso, pueden presentar características más agresivas como invasión de estructuras lindantes, crecimiento recurrente luego de las cirugías o los tratamientos vigentes e incluso, en el caso de los verdaderos carcinomas, invadir sistémicamente [3, 29, 30].

La prevalencia de estos casos aun no es del todo clara y, si bien muchas veces presentan un índice de Ki67 mayor o igual al 3%, mitosis incrementadas y/o expresión de p53, tampoco lo está la definición clínica del caso. Dado que este tipo de tumores se encuentra asociado a una mayor morbilidad y mortalidad, es necesaria su detección temprana, aunque no es una tarea sencilla y no se encuentran, al momento, marcadores patológicos para identificarlos [30]. El tratamiento en estos casos resistentes y/o agresivos se torna un desafío constante.

A partir de 2006, comenzaron a publicarse cada vez más casos sobre el uso de nuevas drogas tales como **Temozolomida (TMZ)** en tumores hipofisarios agresivos incluidos los prolactinomas mostrando un panorama alentador [13, 31] y, recientemente, en su trabajo “Clinical Practice Guidelines for the Management of Aggressive Pituitary Tumours and Carcinomas”, Gerald Raverot recomienda su uso como tratamiento de primera línea para los adenomas hipofisarios agresivos [13, 30]. Los antecedentes en torno a TMZ en la patogénesis hipofisaria y su relación con la vía de Wnt se describirán en detalle más adelante por ser uno de los objetivos del presente trabajo de tesis.

Tratamiento quirúrgico

Si bien el tratamiento médico con agonistas de la dopamina sigue siendo la primera línea, los casos en los que la cirugía hipofisaria transeptoefenoidal se indica como tratamiento han incrementado dadas las mejoras en el diagnóstico por imágenes y el desarrollo de las técnicas quirúrgicas de los últimos años [32]. Este desarrollo ha incidido positivamente en la extirpación selectiva de los adenomas hipofisarios con conservación de la hipófisis normal y con baja incidencia de complicaciones [33]. Una cirugía exitosa normaliza la función endócrina con frecuente preservación y hasta mejoría del resto de los ejes hipofisarios luego de la descompresión tumoral y la reducción o eliminación del efecto de masa en los macroprolactinomas expansivos. Asimismo, la cirugía transeptoefenoidal es de suma utilidad en los casos de intolerancia persistente o resistencia a los agonistas dopaminérgicos con crecimiento tumoral o pérdida visual durante el tratamiento médico. La vía transcraneana es solamente utilizada para tumores de localización extraselar y con expansión fuera de la línea media [34].

Radioterapia.

Sólo se reserva para los casos de grandes prolactinomas que no responden a las terapias convencionales, que recurren o progresan luego de las cirugías y son muy agresivos o malignos, aunque no es un método de lo más efectivo para controlar la secreción de prolactina y conlleva a ciertos riesgos asociados a la irradiación de la glándula normal [18]. Es por ello que, para estos casos resistentes es necesaria la búsqueda y el entendimiento de nuevas terapias tales como la TMZ

POSIBLES MECANISMOS DE TUMOROGÉNESIS EN LOS LACTOTROPOS

Son múltiples los factores que pueden participar en la tumorigénesis de lactotopos, y el fenotipo final del tumor dependerá de la relación entre dichos factores. Entre ellos, podemos citar:

1) Receptor de Dopamina: Los lactotopos, a diferencia de los otros tipos celulares endócrinos de la hipófisis, presentan una alta actividad espontánea de secreción de prolactina. Por este motivo, la secreción de prolactina está bajo un control tónico predominantemente inhibitorio cuyo principal factor es la dopamina. Se ha observado una alta concentración de dopamina en la eminencia media y en la sangre portal hipofisaria. Existen dos familias de receptores dopaminérgicos, los D1 (que comprenden al D1 y D5), estimuladores de la adenilato ciclasa, y los D2 (D2, D3 y D4), que inhiben a dicha enzima. Todos son miembros de la familia de receptores de dopamina con siete pasos transmembrana [35]. El principal receptor en hipófisis es el D2 (RD2) [36].

No se han identificado mutaciones en el RD2 en adenomas hipofisarios humanos de lactotopos y somatotopos. Sin embargo, en prolactinomas resistentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos habría una disfunción en los RD2 [36].

2) Prolactina: La PRL ejerce un control negativo sobre su propia secreción vía el receptor de PRL (PRLR) a nivel hipotalámico e hipofisario. En el hipotálamo altera la expresión y actividad de la enzima tirosina hidroxilasa, limitante de la velocidad en la síntesis de Dopamina [37]. En la hipófisis la PRL tiene acciones directas inhibitorias sobre la proliferación de los lactotopos y/o podría limitar los efectos de los factores de crecimiento producidos por células vecinas que

en forma parácrina influyen sobre el crecimiento de los lactotopos. Estudios en ratones knockout (KO) para el PRLR muestran que esta hormona inhibe su propia liberación actuando no solamente a nivel de las neuronas secretoras de dopamina, sino también a nivel de la hipófisis en forma independiente de dopamina. Estos animales desarrollan prolactinomas más grandes que los ratones KO para el RD2 y los ratones doble KO para PRLR y RD2 tienen prolactinomas aún mayores [38].

3) Estrógenos: Actúan a través del receptor de estrógenos y se consideran los factores liberadores de PRL más importantes. Son potentes estimuladores de las funciones del lactotopo. A nivel hipofisario, aumentan la mitosis de lactotopos y favorecen la transformación de somatomatotropos a lactotopos puros. Dado que el elemento de respuesta a estrógenos se localiza en el promotor del gen de prolactina, los estrógenos aumentan la síntesis de prolactina por activación génica directa, provocan hipertrofia de este tipo celular, aumentan los receptores hipofisarios de diferentes factores liberadores hipotalámicos como TRH y disminuyen la expresión de los receptores de dopamina hipofisarios [39, 40].

Los niveles estrogénicos elevados son responsables de los aumentos transitorios de PRL sérica y de la hiperplasia de lactotopos durante el embarazo.

4) Otros factores: también se ha descrito que participan en la generación de prolactinomas experimentales el factor de crecimiento neural [41], galanina [42], factor de crecimiento transformante (TGF α y β) [43], los factores de crecimiento fibroblástico (FGF2 y 4) [44] y el oncogen transformante tumoral hipofisario (*Pttg*) [12].

VÍA DE WNT Y SU ROL EN CÁNCER.

Los Wnts (Wingless) son una familia de glicoproteínas secretadas que están evolutivamente conservadas. Estas son importantes para el desarrollo normal de vertebrados e invertebrados. La señalización de Wnt se encuentra en un equilibrio cuidadosamente orquestado entre varios ligandos Wnt y sus receptores (receptores Frizzled), los co-receptores (LRP5/6, Ror1/2), y una serie de factores inhibitorios incluyendo las familias de receptores secretados relacionados con Frizzled (SFRP) y Dickkopf (DKK) [45].

Hay 19 genes Wnt conocidos en los mamíferos, normalmente asociados con la llamada vía canónica (Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3a, etc) y los relacionados con las vías no canónicas (Wnt5A, Wnt5b, Wnt11, etc) [46], aunque estos pueden influenciar tanto la vía canónica como las no canónicas, dependiendo del contexto, del tejido en cuestión y del receptor al que se una [47]. Un gran número de genes diana de las vías han sido identificados, muchos de los cuales se cree que son específicos de tejido, e incluyen genes implicados en la proliferación como c-Myc, Ciclina D1 (CCND1), p21, y PITX2 [45, 48].

Tres vías importantes de señalización a través de Wnt han sido descritas: la vía Wnt/ β -Catenina o vía canónica de principal interés en el presente trabajo de tesis, la vía Wnt / quinasa Jun N-terminal (JNK) y la vía Wnt-calcio [49].

Dentro de éstas, la vía Wnt/ β -Catenina es la más estudiada. Ha sido caracterizada como marcador de células madre, ya que les confiere características de automantenimiento y totipotencialidad. β -Catenina es el producto proteico del gen CTNNB1 y actúa como principal efector de la vía canónica de Wnt, pertenece a la familia “armadillo” y consta de 728

aminoácidos (92 kDa). Posee un dominio central de 42 aminoácidos repetidos, llamados “repeticiones armadillo”, usado tanto para la unión a cadherinas, como para la unión con el complejo “lymphocyte enhancer factor” (Lef)/ “T-cell factor” (TCF) en el núcleo o con los inhibidores Axin/APC (adenomatosis polyposis coli) en el citoplasma. Estas proteínas participan en la regulación de la actividad de β -Catenina promoviendo su fosforilación y posterior degradación. Lindante a estos, se encuentra el extremo amino terminal (N-terminal) de 149 aminoácidos, que contiene los sitios de unión para α -Catenina, así como los sitios donde ocurre la fosforilación por parte de la glucógeno sintasa quinasa-3 o GSK3 (Figura 3).

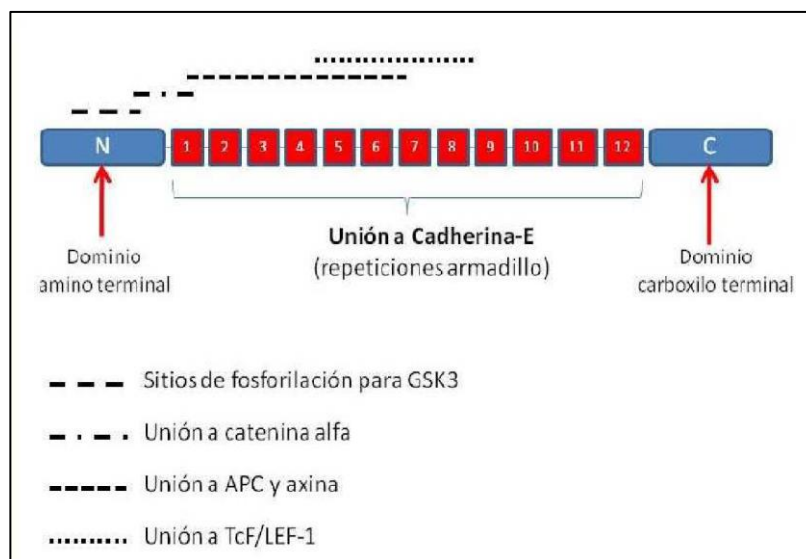


Figura 3. Características estructurales y funcionales de β -Catenina (modificado de Trejo Córdoba A *et al*, 2010 [50])

Para realizar su función de transcripción génica, β -Catenina debe translocarse al núcleo, lo cual depende de los niveles de la proteína no asociada a E-cadherina, que se encuentra libre en el citosol. Posteriormente se ha reportado que los “pools” de β -CATENINA de membrana y

citoplasmática pueden relacionarse tras la activación de la vía de Wnt, por lo que una disminución de la proteína en membrana se traduciría en la activación de la vía Wnt [51].

La proteína β -Catenina citoplasmática se encuentra formando un complejo con GSK3 y APC. Bajo estas condiciones, GSK3 fosforila 3 residuos del extremo amino terminal de β -catenina (serina 33, 37, y treonina 41), previa fosforilación de serina 45 por CKI, lo que da por resultado su ubiquitinación y su rápida degradación por el proteosoma. El control de los niveles citosólicos de β -Catenina está estrictamente regulado. Principalmente, la vía Wnt induce su estabilización en el citoplasma inhibiendo la actividad del complejo GSK3/APC, evitando así su degradación. De esta manera, cuando Wnt interacciona con el receptor Frizzled y el correceptor LRP5/6, se produce la activación del intermediario Dishevelled (Dsh), lo que resulta en el desensamble del complejo de degradación y β -Catenina permanece desfosforilada. Cuando la vía Wnt está inactiva, β -Catenina es capturada y fosforilada a través del complejo de destrucción GSK3/APC [50].

Por otro lado, β -Catenina es un componente central del complejo de adhesión y unión celular cadherina/catenina esencial para que se lleve a cabo la unión con los filamentos de actina a través de α -catenina (Figura 4) [52].

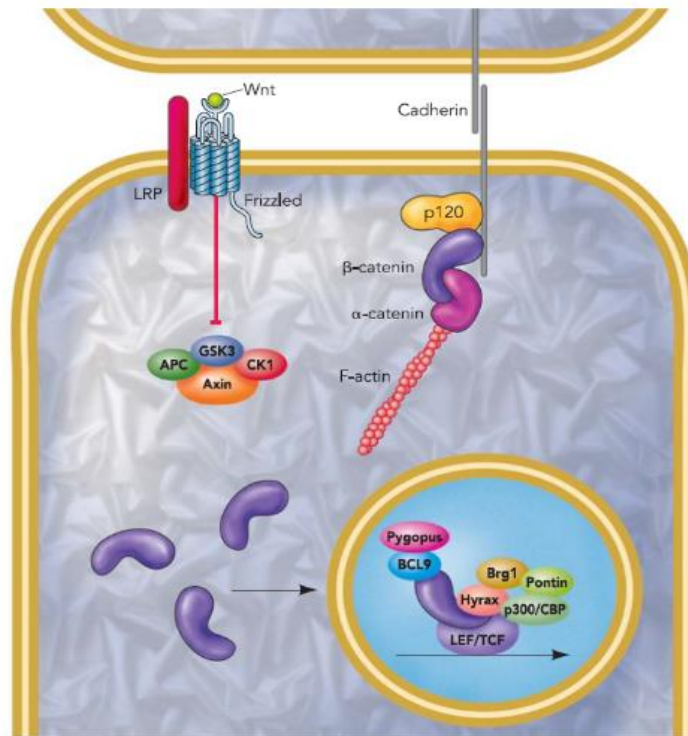


Figura 4. Vía de señalización canónica de Wnt y rol de β -Catenina en la unión celular. Tomado de [53].

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

Debido a esta doble función, β -Catenina ha sido propuesta como un factor integrador de la adhesión celular y la transcripción génica [50].

La vía Wnt/ β -Catenina ha sido implicada en la patogénesis de una serie de tumores humanos. Evidencias de esto han sido reportadas en distintos tipos de cáncer, siendo el cáncer de colon aquel sobre el cual más estudios fueron llevados a cabo [54]. En los craneofaringiomas

adamantinomatosos, tumores raros de la región selar, las mutaciones de β -Catenina tienen implicancias en la tumorigenesis [55].

Para el caso de los tumores de hipófisis, la evidencia científica no es totalmente exhaustiva o concluyente a la fecha. Se ha reportado la acumulación nuclear de la proteína asociada a tumores hipofisarios de alto índice de proliferación celular [56, 57]. El rol de la vía de Wnt en la tumorigenesis hipofisaria se detallará más abajo.

ESTÍMULO ESTROGÉNICO Y SU RELACIÓN CON LA VÍA DE WNT EN CÁNCER. WNT EN TUMORES DE HIPÓFISIS.

Ha sido reportado que en células cancerígenas de próstata (PC3), el estrógeno jugaría un rol en la proliferación celular independiente de andrógenos, a través de un nuevo mecanismo que involucraría la activación de β -Catenina a través del $Er\beta$ [58]. Por otro lado, en células de neuroblastoma se determinó que β -Catenina forma complejos con GSK3 y con los receptores de estrógenos $ER\alpha$ y $Er\beta$, y que el Estradiol estabiliza a β -Catenina por inhibición de GSK3, de la misma manera que sucede en la activación de la vía de Wnt [59, 60].

Para el caso de los prolactinomas generados por administración crónica de estrógenos en ratas, la administración *in vivo* de antiestrógenos desencadena una respuesta antitumoral similar a la del agonista de la dopamina Bromocriptina tales como disminución del tamaño tumoral y secreción de prolactina. De manera interesante, en este modelo de prolactinoma, el antiestrógeno Fulvestrant inhibió la expresión del gen de β -Catenina y estimuló la del inhibidor

de la vía WIF1, confirmando la influencia de la vía Wnt en el desarrollo tumoral y su interrelación con la vía del Estradiol en la hipófisis [16].

Es sabido que mutaciones que estabilizan a β -Catenina (p.ej. Ko Exón 3, sitio de unión de la proteína y diana de fosforilación por GSK3) pueden ser responsables de distintos tipos de cáncer. Esta β -Catenina mutante tiene un rol sobre la etiología de los craneofaringeomas humanos [55] y en ratones mutantes en células progenitoras de la hipófisis [61]. Estos tumores murinos se asemejan a los humanos. Mutaciones en CTNNB1 pueden afectar sobre todo a un pequeño número de células con características fenotípicas de células madre / progenitoras hipofisarias [61]. En tumores hipofisarios humanos comparados con hipófisis normales y en modelos experimentales a diferencia de su contraparte normal, fueron descritos niveles de proteína y ARNm elevados de β -Catenina y de otros componentes de la vía de Wnt tales como TCF4, Ciclina D1 y c-Myc [54, 62]. También se observó una reducción en la expresión del ARNm de los ligandos *Wnt5a*, *Wnt3* y *Wnt10b* y de los inhibidores de la vía canónica tales como *WIF1*, *sFRP2* y *sRFP4* en los distintos subtipos de tumores hipofisarios [54, 63]. Estudios de proteómica y transcriptómica en tumores no funcionantes demuestran una fuerte vinculación de las vías de señalización Wnt/ β -Catenina y mTOR con la patología, y una elevada expresión de β -CATENINA en los tumores comparados con el tejido normal [64]. A pesar de ello, cuando se estudia la localización subcelular de β -CATENINA en el tejido de los tumores de hipófisis la evidencia es poco clara, encontrando en los cortes histológicos acumulación subcelular (principalmente en membrana y núcleo) muchas veces opuestas [56, 57, 65]. Adicionalmente, se han publicado trabajos en donde no han detectado expresión de β -

CATENINA ni en los tipos de tumores hipofisarios analizados ni en tejido normal, y tampoco en la expresión génica de componentes de la vía canónica de Wnt [66].

En conjunto, estos trabajos previos demuestran que si bien varios autores se han abocado al estudio del rol de la vía de Wnt/ β -Catenina en la tumorigénesis hipofisaria, la evidencia disponible aún es poco concluyente, mostrando resultados controversiales entre los distintos tipos tumorales y entre los distintos modelos estudiados.

TUMORES HIPOFISARIOS AGRESIVOS: NUEVOS TRATAMIENTOS QUIMIOTERÁPICOS Y VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA.

Como se mencionó anteriormente, los tumores hipofisarios a pesar de que raramente metastatizan, pueden volverse localmente invasivos, agresivos, con un alto grado de recurrencia y resistencia a las terapias convencionales [67, 68]. Para estas entidades clínicas tan complejas, son necesarias nuevas estrategias terapéuticas y en este sentido, nuevos tratamientos de uso clínico en otros tipos de tumores están siendo investigados.

Temozolomida.

Temozolomida (TMZ), un agente alquilante que pertenece al grupo triazeno de agentes alquilantes no clásicos. Es un profármaco terapéutico lipofílico de bajo peso molecular (194 Daltons), de administración oral, estable a niveles de pH ácido del estómago y reactivo a niveles de pH superiores a 7,0. Una vez que se hidroliza en sus compuestos activos MTIC (5-(3-monomethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide) primero y luego AIC (5-aminoimidazole-4-carboxamide), metila al ADN generando los productos N7-MeG (60–80%), N3-MeA (10–20%)

y O6-MeG (5–10%), resultado de la reacción de adición. La presencia de estos compuestos en el ADN provocará que, durante el siguiente ciclo de replicación del material genético, los mecanismos de reparación de estos eventos resulten en la detención del ciclo celular lo que conducirá a la muerte celular o apoptosis de la célula que los incorporó. La actividad de TMZ es mayor a medida que aumenta su acumulación en los tumores. Se ha demostrado que los tumores cerebrales tienen un pH más alcalino que los tejidos sanos, lo que puede favorecer la activación de TMZ [9]. Así, esta quimioterapia es efectivamente utilizada en el tratamiento de gliomas malignos y también en cáncer colorectal y melanoma metastásico [69-71].

Desde 2006, TMZ ha sido implementado como terapia de rescate en los adenomas hipofisarios agresivos y carcinomas, generalmente refractarios a tratamientos de uso convencional [68, 72]. Dentro de los tumores hipofisarios, los adenomas funcionantes han demostrado ser más respondedores a TMZ con respecto a los no funcionantes. Así, prolactinomas y corticotropinomas parecerían ser los que más y mejor responden [73]. Las dosis de administración óptimas de TMZ cuando se usa como monoterapia en el tratamiento de los tumores hipofisarios aún quedan por definirse, aunque recientemente Raverot ha recomendado el programa de administración más común para este tratamiento en los adenomas hipofisarios: 150 a 200 mg/m² durante 5 días consecutivos cada 28 días, en ciclos que se repitan según avance del paciente [30, 74]. En general, la terapia es bien tolerada, las toxicidades hematológicas inmediatas de la TMZ suelen ser de corta duración y pueden regularizarse ajustando las dosis. Otros efectos secundarios comunes son náuseas, estreñimiento y fatiga, y son relativamente leves en comparación con otras quimioterapias [74]. Hasta la fecha, se han publicado cerca de 160 casos de tumores hipofisarios tratados con TMZ, la mayoría sobre casos

clínicos o revisiones sistemáticas sobre la experiencia del uso de TMZ que asocian la reducción del volumen tumoral (Figura 5) y de la secreción hormonal a la respuesta frente al agente quimioterápico [75-77].

Algunos autores reportaron cambios histopatológicos y morfológicos en tumores hipofisarios agresivos tratados con TMZ cuando fueron de re-operados, con ablandamiento de la masa tumoral facilitando la nueva exéresis [29].

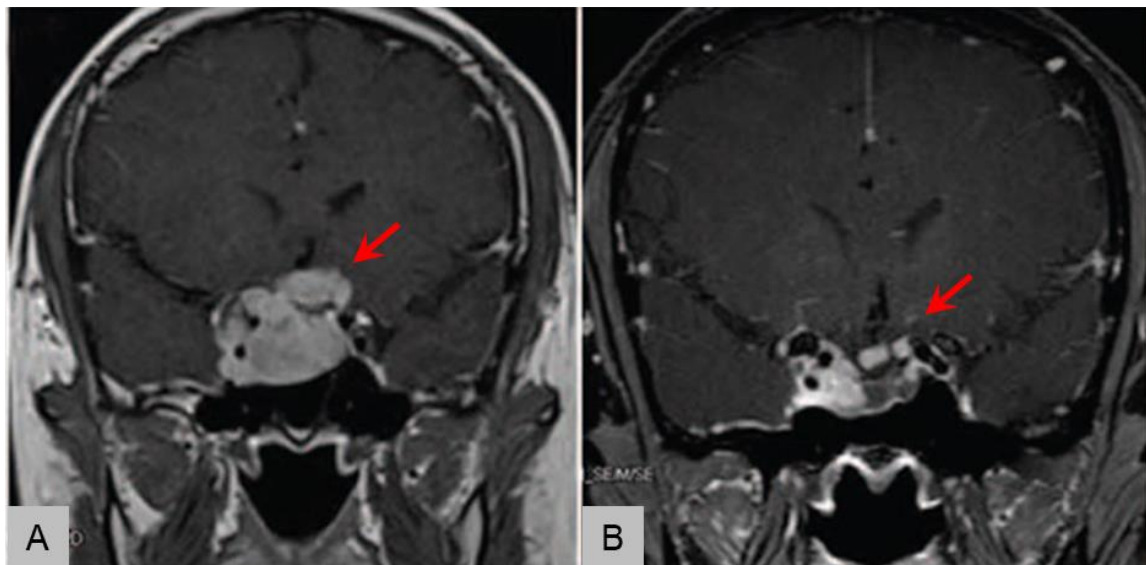


Figura 5. Imagen representativa de una MRI de un prolactinoma agresivo, resistente a terapias convencionales y localmente invasivo (A) exitosamente tratado con Temozolomida (B). Las flechas rojas indican el cambio en el tamaño e invasividad del tumor luego del tratamiento. Tomado y adaptado de Chen *et. al*, 2017 [31].

Se documentó que bajos niveles de expresión de la O6-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT), que neutraliza el efecto del agente alquilante, correlaciona con una respuesta a TMZ favorable en algunos casos pero no en otros [76, 78-80]. Sin embargo, la literatura referida a

los mecanismos moleculares que median la sensibilidad o la resistencia a esta nueva quimioterapia en los tumores de hipófisis es escasa. Por todo esto, se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo* para comprender los mecanismos moleculares que coexisten o que desencadena la acción alquilante de TMZ.

TMZ y vías de señalización: Rol de la vía canónica de Wnt/ β -Catenina

En la búsqueda del entendimiento de mecanismos asociados a la acción de la droga en las lesiones neoplásicas, se ha asociado la activación de varias vías de señalización celular tales como ERK y mTOR con la quimioresistencia en gliomas y en menor medida en los adenomas hipofisarios [81-83]. Sugestivamente, la inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -Catenina ha sido propuesta como adjuvante en el tratamiento con TMZ en líneas celulares de carcinoma de colon, glioblastoma, meduloblastoma y neuroblastoma dado su capacidad de aumentar la citotoxicidad de la droga quimioterápica [84]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen al tratamiento con TMZ en los tumores hipofisarios agresivos y la relación con la vía de Wnt no han sido estudiados en detalle, y la bibliografía en este aspecto es escasa.

ROL DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES EN EL TEJIDO HIPOFISARIO Y LA RESISTENCIA TUMORAL

Varios autores han hipotetizado y confirmado que parte de la quimiorresistencia de los tumores está dada por las células madre presentes en el tejido maligno [85]. En este sentido, se han aislado células madre tumorales en distintos tipos de cáncer: leucemias [86], mieloma múltiple

y también en tumores sólidos como el cáncer de mama [87], de pulmón y tumores cerebrales [88]. Estas células madre tumorales son células dentro del tumor que poseen la capacidad de autorrenovación y de originar los linajes heterogéneos de células cancerosas que conforman la masa tumoral (Figura 6).

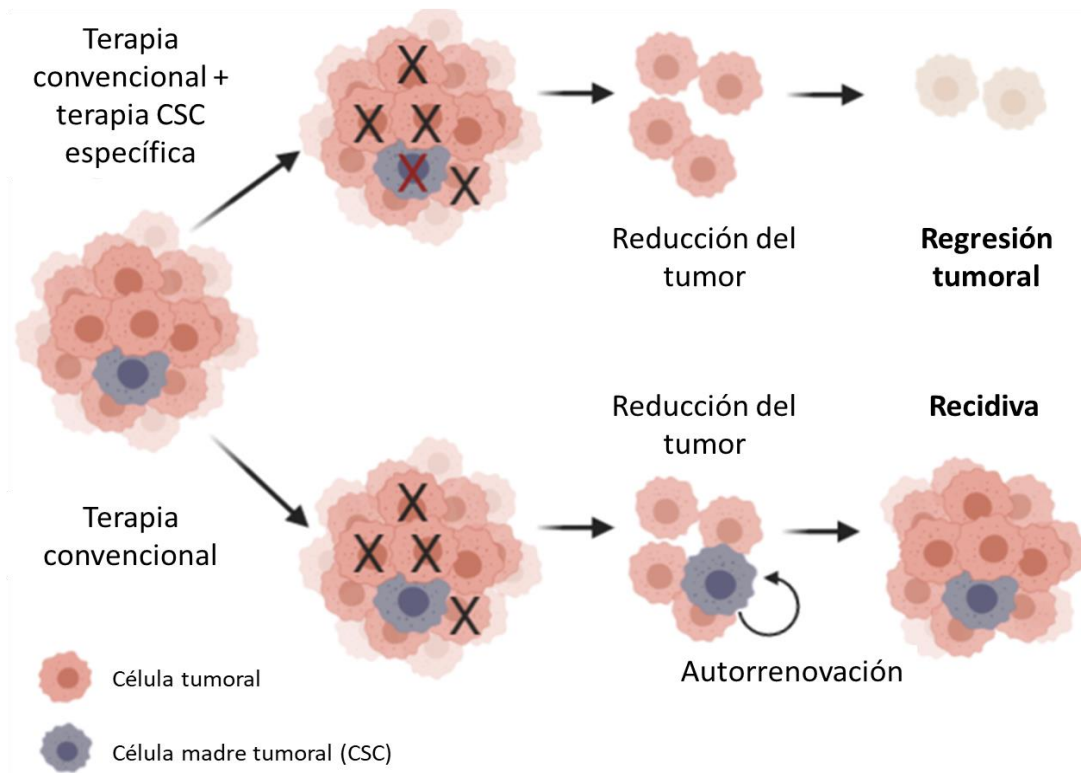


Figura 6: Teoría de las células madre tumorales presentes en el tumor y la respuesta a distintas estrategias de tratamientos. Creado con Biorender (www.app.biorender.com).

Las células madre de un tumor pueden evolucionar con el cambio de las señales en su microambiente, incluyendo infiltración de células inmunes y la activación de respuesta inflamatoria. Muchos genes y vías de señalización incluyendo Shh, Notch y Wnt/ β -Catenina han sido relevantes ya que cumplen una importante función regulatoria en muchas células madre [85, 89]. Puesto que el destino de las células madre está bajo estricto control de factores tanto

intrínsecos (mutaciones genéticas) como extrínsecos (microambiente), la pérdida de este control se ha postulado como un paso clave en el proceso de carcinogénesis [90] y a la resistencia tumoral [91].

En la literatura, varias subpoblaciones celulares con características de células madre han sido identificadas y caracterizadas en la hipófisis adulta, aunque la mayoría de los estudios se realizaron en modelos murinos. Utilizando purificación de células por citometría de flujo (FACS) y la extrusión del colorante fluorescente Hoechst 33342, Vankelecom y colaboradores aislaron del tejido hipofisario de ratón adulto una subpoblación enriquecida en células con características de células madre, la población marginal o “Side population” (SP). Ésta subpoblación expresa marcadores de las vías de Notch, Wnt y Shh de células madre, y S100 característico de células foliculoestrelladas presentes en la hipófisis, tiene la capacidad de replicarse clonalmente como esferas no-adherentes, conformando una subpoblación con fenotipo de células progenitoras en la hipófisis anterior adulta, carente de marcadores de células diferenciadas que sí están presentes en la población principal (MP) [4, 92].

Más tarde se demostró la existencia de células madre en hipófisis de ratones adultos mediante la generación de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo elementos regulatorios del gen de nestina, gen expresado en células madre de distintos tejidos adultos [93].

Células madre en tumores hipofisarios resistentes

Diferentes evidencias sobre la existencia de células madre en los tumores hipofisarios han sido planteadas, entre ellas el hecho de que una fracción de los tumores hipofisarios de origen

monoclonal produce más de un tipo de hormona y posee más de un tipo celular [15, 44]. Más aún, la población celular tumoral llega a ser heterogénea respecto a sus características de proliferación y diferenciación. Pero, si bien muchos autores suponen la participación de células madre en la génesis y la quimiorresistencia de los tumores de hipófisis [94, 95], no existen al respecto datos consistentes en la literatura.

El estudio de células madre en adenomas hipofisarios resulta interesante al momento de comprender los mecanismos de generación de este tipo de tumores y la falta de respuesta a drogas convencionales en ciertos casos, que podrían explicarse por la existencia de células madre causantes del crecimiento de la masa tumoral. En este sentido, el entendimiento de los mecanismos moleculares que mantienen a las células madre, entre ellos la vía de Wnt/ β -Catenina y su respuesta en el desarrollo y mantenimiento de los tumores hipofisarios, su relación con las características tumorales, su estado de activación y su respuesta ante estímulos externos o tratamientos quimioterápicos, podría proporcionar nuevas herramientas a la búsqueda constante de nuevas terapias para los casos agresivos o resistentes.

HIPÓTESIS:

Establecemos como hipótesis de trabajo que la vía de Wnt/ β -Catenina participa en el desarrollo, el mantenimiento y la respuesta al tratamiento de los adenomas hipofisarios, encontrándose en estado activo e involucrada en diversos procesos celulares determinantes del comportamiento tumoral.

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la vía Wnt/ β -Catenina de células madre, su activación y regulación en adenomas hipofisarios humanos obtenidos de cirugía y en modelos murinos de estos tumores, y dilucidar su importancia en la patogénesis hipofisaria y la respuesta a los tratamientos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

En los adenomas hipofisarios obtenidos de cirugía de pacientes nos proponemos:

- I. Estudiar la expresión y localización de β -CATENINA en cortes histológicos de los adenomas
- II. Relacionar la localización sub-celular de esta proteína con el índice de proliferación y las características clínicas de cada subtipo tumoral
- III. Evaluar la implicancia de la señal en estudio sobre la agresividad tumoral, la secreción hormonal y la capacidad de recidivar de los tumores

En los modelos murinos *in vivo*:

- I. Estudiar el estado de activación de β -Catenina y demás componentes de la señalización Wnt y su efecto funcional en hipófisis controles y en procesos protumorales en lactotropos estimulados
- II. Evaluar en modelos de tumores hipofisarios *in vivo* bajo tratamiento quimioterápico, la influencia de la vía Wnt/ β -Catenina en la respuesta a la droga

En los modelos *in vitro*:

- I. Estudiar el estado de activación de β -Catenina y componentes de Wnt en líneas celulares tumorales de prolactinomas y corticotropinomas, bajo estímulos estrogénicos o específicos de la señalización Wnt
- II. Determinar la respuesta de las células madre tumorales al tratamiento quimioterápico en las líneas tumorales hipofisarias

3. DESARROLLO:

MATERIALES Y MÉTODOS:

Las muestras y modelos experimentales utilizados en el presente trabajo de tesis se resumen en la Figura 7.

Muestras de tumores hipofisarios de pacientes.

Las muestras provenientes de 15 pacientes diagnosticados con adenomas hipofisarios que recurrieron a cirugía en la Clínica Santa Isabel, el Hospital Santa Lucía y el instituto Fleni de Buenos Aires, y la Clínica la pequeña Familia de la ciudad de Junín, fueron previamente clasificados de acuerdo al criterio clínico y a la clasificación de la WHO según su secreción hormonal en el caso de los funcionantes en somatotropinomas, prolactinomas, adenomas secretores de ACTH; y en adenomas no funcionantes aquellos que no lo hacían. De los 15 pacientes, 9 eran de sexo femenino, 6 masculinos y tenían, al momento de la cirugía, entre 26 y 65 años de edad (media: 47,25). Posteriormente a la cirugía transesfenoidal, el exceso del tejido tumoral restante de los estudios patológicos de rutina se reservó en formalina para estudios de inmunohistoquímica (IHQ). Tanto las características de tamaño y localización como el dato del índice de proliferación de los tumores evaluados a través de la expresión de Ki67 (%) fueron provistos por los respectivos departamentos de patología de los nosocomios. Las características de la cohorte anteriormente mencionadas se resumen en la Tabla 3 que se muestra en la sección de resultados. En todos los casos, el paciente fue informado por el cirujano interviniente de los estudios que se realizarían con la muestra y firmó el respectivo consentimiento aprobado por el comité de ética de las distintas instituciones intervinientes. La

privacidad del paciente fue siempre preservada. Para el caso de los tejidos hipofisarios normales utilizados en el presente trabajo de tesis, todos fueron de origen comercial (Biochain).

Líneas celulares y condiciones de cultivo:

La línea de células de prolactinoma de rata MMQ fueron donadas por el Dr. Rodolfo Goya de INIBIOLP, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Las células fueron cultivadas en suspensión en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero de caballo (Microvet SRL, Argentina), 5% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de glutamina y 1% penicilina/estreptomicina, y mantenidas a 37°C y 5% CO₂. Para su tratamiento con las distintas drogas, las células fueron plaqueadas a una densidad apropiada en DMEM con % de sueros reducidos. E2 10⁻⁸ M (Sigma); 0.25 o 1ng/ml Wnt3a (R&D); 200µM Temozolomida (TMZ, PubChem CID 5394; Raffo Laboratories) o los respectivos controles fueron agregados al medio de cultivo por 2, 12, 24, 48 o 72 horas según correspondiese. Durante cada experimento la morfología de las células, su crecimiento característico (en suspensión, como agregados celulares) y la producción de prolactina fueron siempre chequeados.

La línea de corticotropos tumorales AtT20 fueron donadas por el Dr. Hugo Vankelecom, Laboratorio de plasticidad celular, Universidad Katólica de Leuven, Bélgica. Los experimentos *in vivo* se realizaron en Argentina mientras que los *in vitro* fueron realizados en Bélgica, en un intercambio realizado en el marco de la colaboración de ambos laboratorios. Las células fueron cultivadas en adherencia en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bobino (Gibco) y 1% penicilina/estreptomicina, y mantenidas a 37°C y 5% CO₂. Para su tratamiento

con 20; 50; 100 o 200 μ M TMZ (Sigma) o controles (Medio de cultivo o DMSO), las drogas fueron agregadas al medio de cultivo por 24, 48 o 72 hs según correspondiese. Durante cada experimento la morfología de las células, su crecimiento característico (en adherencia) y la producción hormonal fueron siempre chequeados. Los pasajes de las líneas celulares en cultivo fueron controlados rutinariamente en nuestro laboratorio (no se utilizaron en los experimentos células con más de 5-10 pasajes). Adicionalmente, se descartó la presencia de micoplasma por PCR periódicamente.

Animales

Los animales utilizados en este trabajo de tesis se mantuvieron entre 4 y 5 por jaula en las siguientes condiciones ambientales: temperatura entre 18 y 22°C, un fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad, y ventilación permanente. Se les permitió libre acceso al agua y alimento en forma de pellets en condiciones asépticas. Los procedimientos experimentales en los animales fueron aprobados por el comité institucional de uso y cuidado de animales experimentales de la UNNOBA.

Para los experimentos de activación de lactotopos *in vivo*, se utilizaron ratones hembra de la cepa BalbC de dos meses de edad. Estos ratones estuvieron divididos en 2 lotes de 20 ratones que fueron criados en el bioterio del Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la UNNOBA. A estos animales se les administró de manera subcutánea Cipionato de Estradiol (0,22mg/kg) dos veces por semana durante 3 semanas o el antagonista dopaminérgico de larga

duración Decanoato de Haloperidol (30mg/kg) una vez por semana durante 3 semanas. El grupo control se inyectó con vehículo (aceite de ricino).

Toma de muestras

Obtención de hipófisis: Los ratones tratados fueron sacrificados por decapitación rápida. Un grupo de hipófisis completas se almacenó en Formol al 4% para el procesamiento por inmunohistoquímica. Otros dos grupos fueron desprovistos de la neurohipófisis, y las adenohipófisis resultantes fueron almacenadas en Trizol para la extracción de RNA y posterior PCR en tiempo real, o disgregadas enzimáticamente para su posterior tratamiento *in vitro* (protocolo descrito por nosotros en [96] o marcación y lectura por citometría de flujo (descrito más adelante).

Para los experimentos de xenografts *in vivo*, se utilizaron animales hembras de las cepa N:NIH Nu/Nu de 4 semanas de edad. 500,000 células MMQ (para la generación de prolactinomas) o AtT20 (para el desarrollo de corticotropinomas) fueron administradas subcutáneamente. Los tumores comenzaron a ser visibles luego de 20 días, momento en el cual se les administró a los animales 15 o 20 mg/kg de las drogas respectivamente, o DMSO en caso de los controles, 5 veces a la semana durante 2 semanas de manera oral, con un período de descanso entre semanas de 2 a 3 días entre semanas. El tamaño tumoral fue registrado con calibre cada dos días y el volumen de los tumores se calculó con la siguiente fórmula: $\text{alto del tumor} \times (\text{ancho})^2 \times 0.52$. El peso de los animales fue registrado periódicamente, y se tomaron muestras de sangre para determinación de hormona sérica a lo largo del tratamiento.

Al final del esquema de tratamiento los animales fueron sacrificados siguiendo protocolos aceptados por el comité de ética de la UNNOBA, los tumores fueron extraídos, medidos, pesados y almacenados en distintos buffers para su posterior estudio génico y proteico.

Inmunohistoquímica:

Esta técnica se llevó a cabo en cortes histológicos de hipófisis humanas normales comerciales o de muestras de tumores de pacientes; de muestras de hipófisis murinas o de xenografts embebidos en parafina. Técnica descrita por nosotros en [97-99]. Los anticuerpos que se utilizaron en el presente trabajo de tesis fueron: anti- β -Catenina total de Millipore #06-734, anti Ki-67 (1/50, ab16667, Abcam), rabbit polyclonal anti-PRL (1/300, A1618 Neobiolab), rabbit polyclonal anti-cleaved (activa) Caspase-3 (1/100, #229, Biocare Medical) and rabbit monoclonal anti α -SMA (1/100, #19245, Cell Signaling). Como control negativo se reemplazó el anticuerpo primario con PBS. El anticuerpo secundario conjugado a biotina correspondiente fue utilizado en una dilución 1/200 y adquirido en Santa Cruz Biotechnology Inc. El análisis de las inmunohistoquímicas se realizó con un microscopio Carl Zeiss con cámara AxioCam, en aumentos de 400 a 1000X totales.

Para determinar porcentajes de células β -CATENINA positivas tanto en tejidos hipofisarios humanos como en xenografts de animales, se contabilizaron las células positivas para la proteína en membrana, citoplasma y núcleo y se las relativizó al total de núcleos de la imagen. Un mínimo de 3 imágenes de 3 experimentos distintos fue contabilizado para cada caso.

Para las determinaciones del porcentaje de células Ki67 positivas en los tejidos, se contaron núcleos positivos sobre un total de 2000 núcleos totales por animal. Para la determinación de

α -SMA, se analizaron entre 25-100 imágenes por muestra. Para cada marcador, se analizaron al menos 3 experimentos separados utilizando el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Detalladamente, a través de la tinción con α -SMA calculamos el área vascular, la microdensidad vascular (MVD) y el tamaño de los vasos de la siguiente manera: el área vascular se calculó cuantificando el área del tejido ocupado por vasos α -SMA + en relación al área total (área α -SMA + área/área total). La MVD se determine contando el número de vasos α -SMA + por milímetro², y el tamaño de los vasos se midió cómo el promedio del tamaño de todos los vasos presentes en el corte.

Extracción de RNA y RT-PCR:

El ARN total fue extraído de las células y los tejidos procesados en Trizol (molecular Research Center, Inc) según describimos en [17]. Para ello, las hipófisis enteras o las células dispersas serán lisadas en TRizol Reagent. La cuantificación del ARN se realizó sobre la base de su absorbancia a 260nm en espectrofotómetro de Luz UV (Picodrop). La pureza de la muestra fue determinada por la relación de absorbancia 260/280nm (se consideró como apropiado una relación ~2.0, de no cumplirlo la muestra fue descartada). La retrotranscripción de 2ug de ARN a ADN complementario (cDNA) se realizó en presencia de MgCl₂ (3 mM), Tris·HCl (50 mM pH 8.3), KCl (75 mM), deoxy-NTPs (1 mM), DTT (0,01 mM), oligo(dT)₁₅₋₁₈ primer (1 pM, Biodynamics, Buenos Aires, Argentina), y 10 U de retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen, CA, USA) en termociclador Bioer en un volumen final de 20ul de reacción. Los controles negativos de la reacción fueron preparados omitiendo enzima o muestra.

Real Time PCR:

Descrito por nosotros en [100]. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con la herramienta “Primer Blast” del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y obtenidos de Biodinamics SRL. Las secuencias de los mismos y las temperaturas de hibridación (“annealing”) correspondientes se detallan en la Tabla 2. La mezcla de reacción fue preparada con FastStart SYBR Green Master Mix (7.5ul, 04673492001, Roche Laboratories) cDNA (2-150ng dependiendo del gen de interés) y cebadores (“primers”) específicos en un volumen final de 15ul. Luego de la desnaturalización a 95°C durante 15 minutos, el cDNA fue amplificado durante 40 ciclos (20 segundos a 95°C, 60 segundos a 53,5–59°C dependiendo del par de primers, y 40 segundos a 72°C). Los resultados fueron monitoreados, registrados por el programa LineGene 9640 y analizados a través del método del delta CT (diferencia de umbral de fluorescencia alcanzado entre el gen de interés y el gen de expresión permanente o Houskeeping). En nuestro caso se utilizó como Houskeeping al gen de la *Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH)* o el de *Actina* según correspondiera. La pureza del producto de la reacción fue siempre corroborada a través de la curva de Melting obtenida en el programa.

Gen	Referencia NCBI	Secuencia de los primers	Temperatura de Annealing
Primers para secuencias de ratón			
<i>mPrl</i>	NM_011164.2	Fo: 5'-AGAGCTGTTTGACCGTGTGG-3' Re: 5'-ACTTCCGGAGGGACTTTCAG-3'	60°C
<i>β-Catenina</i>	NM_007614.3	Fo: 5'-AGCTCGTGCCTGTGAAGC-3' Re: 5'-CAGGTCAGCTTGAGTAGCCAT-3'	60°C
<i>Ciclina D1</i>	NM_007631.2	Fo: 5'-CGCGTACCCTGACACCAAT-3' Re: 5'-GGAAGACCTCCTCTTCGCAC-3'	60°C
<i>Tcf4</i>	NM_013685.2	Fo: 5'-GTGAGACACTAAGTTCTTGCAG-3' Re: 5'-GGCGAAAACATCGCACTGAA-3'	58°C
<i>Fzd8</i>	NM_008058.2	Fo: 5'-CCTGCTTCACCTCGACTTC-3' Re: 5'-AGTCCCACAAGGTAGCAGTTGTC-3'	60°C
<i>G3pdh</i>	NM_008082.4	Fo: 5'-GGCAAATCAACGGCACAGT-3' Re: 5'-GTCTCGCTCCTGGAAGATGG-3'	60°C
Primers para secuencias de rata			
<i>rPrl</i>	NM_012629.1	Fo: 5'-ACCGTGTGGTCATGCTTTCT-3' Re: 5'-AACTCCGGAGGGACTTTCTG-3'	57°C
<i>β-Catenina</i>	NM_053357.2	Fo: 5'-GAGCACATCAGGACACCCAG-3' Re: 5'-TTGTGAACATCCCGAGCGAG-3'	57°C
<i>Ciclina D1</i>	NM_171992.4	Fo: 5'-TCAAGTGTGACCCGGACTG-3' Re: 5'-GGATCGATGTTCTGCTGGGC-3'	57°C
<i>c-Myc</i>	NM_012603.2	Fo: 5'-GAGGTGGAAAACCCGACAGT-3' Re: 5'-TGAAATAGGGCTGCACCGAG-3'	57,4°C
<i>Pitx2</i>	NM_001042505.1	Fo: 5'-GAAGAAATCGCCGTGTGGAC-3' Re: 5'-GCCCGAAGCCATTCTTACAC-3'	57°C
<i>Vegf A</i>	NM_001287114.1	Fo: 5'-GTGCACTGGACCCTGGCTTTA-3' Re: 5'-GGTCTCAATCGGACGGCAGTA-3'	59°C
<i>Fgf2</i>	NM_008006.2	Fo: 5'-GATGGCGTCCGCGAGAA-3' Re: 5'-TAACACACTTAGAAGCCAGCA-3'	53,5°C
<i>β-Actina</i>	NM_031144.3	Fo: 5'-GCGAGTACAACCTTCTTGCAG-3' Re: 5'-ATCGTCATCCATGGCGAACTG-3'	57°C
<i>G3pdh</i>	NM_017008.4	Fo: 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3' Re: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	61°C

Tabla 2: Detalle de los oligonucleótidos cebadores utilizados en el presente trabajo de tesis.

Western Blot

La técnica fue previamente descrita por nosotros en [101]. Los homogenatos de tejido o de células fueron preparados con un homogenizador en 80, 100 o 300 μ L de buffer de lisis según el material de partida: HEPES (50 mM, pH 7.4), NaCl (140 mM), glicerol (10%), EDTA (1 mM), ortovanadato de sodio (1 mM), pirofosfato de sodio (10 mM), fluoruro de sodio (NaF, 100 mM), Triton X-100 1% (10 μ g/mL) y PMSF (1 mM). Los inhibidores de proteasas se agregaron justo antes de usar (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). El homogenato se centrifugó durante 30 minutos a 12.000 rpm a 4°C. Las proteínas extraídas fueron cuantificadas por el método de Bradford.

Entre 30 y 50ug de proteínas se sembraron en geles de poliacrilamida 15% y se corrieron a 120 V constantes. Terminada la corrida las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 400mA constantes durante 1 hora 40 minutos, y luego incubadas toda la noche con el correspondiente anticuerpo primario: Rabbit anti- β -CATENINA total [1:1000, #06-734 Millipore], mouse anti- β -CATENINA activa (1:1000 8E7 #05-665 Millipore), rabbit anti-CICLINA D1 (1:1000, A1301), rabbit anti-C-MYC (1:1000, A1309) y rabbit anti-PRL (1:10000, A1618) de Neobiolab; mouse anti-PCNA (1/1000, sc-56), mouse anti-JNK (1/1000, sc-7345), goat anti-pGsK3 β (1/1000, sc-11758) y goat anti-CD31 (1/1000, sc-1506) de Santa Cruz Biotechnology; y rabbit anti-pERK (1/50000, Cell Signaling). Se utilizó rabbit anti-G3PDH (1/1500, AC001, Neobiolab) o anti-ACTINA (sc-7210, Santa Cruz Biotech), según correspondiera como control interno para normalizar la cantidad de proteína sembrada. Posteriormente las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario asociado a HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc), y la presencia de complejos proteínas de

interés-anticuerpos fue revelada con la reacción de luminol, ácido p-cumárico y peróxido de hidrógeno en el equipo ImageQuant LAS 4000 Mini (G&E). La intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Citometría de flujo

La expresión de β -Catenina activa y de prolactina se evaluó por citometría de flujo en los lactotopos tumorales MMQ y/o en células de adenohipófisis dispersas. Brevemente, las células, una vez culminados los tratamientos correspondientes, se fijaron con PFA 4% por 20 minutos en hielo, luego se lavaron y se permeabilizaron con saponina 0.5% en PBS- SFB10% durante 15 minutos. Se incubaron luego con los respectivos anticuerpos primarios (1 μ g cada 1×10^6 células; 8E7, #05-665 Millipore o anti-PRL A1618, Neobliolab) por 30 minutos en hielo. Luego, el anticuerpo primario se detectó con el secundario correspondiente (1 μ g cada 1×10^6 células; anti-mouse FITC o anti rabbit-FITC, Biolegend). El control de isotipo fue siempre utilizado. Los eventos (50.000) fueron adquiridos en el citómetro FACSCantoll, BD Biosciences y analizados con el programa FlowJo. β -CATENINA activa y los niveles de prolactina se determinaron a través de la fluorescencia media (MFI) y del porcentaje de células teñidas.

Radioinmunoensayo

Los niveles de prolactina serica en los animales con xenografts de MMQ fueron medidos por RIA utilizando un kit commercial obtenido de National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases [NIDDK; Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (NHPP),

Torrance, CA]. El ensayo fue llevado a cabo según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 10ul de suero por duplicado. Los resultados se expresaron en términos de referencia RP3 PRL standard. El límite de detección del ensayo fue 0.02 ng/ml y el coeficiente de variación intra-ensayo del 8.1%.

Determinación de VEGF por ELISA

Se utilizó para tal fin el kit VEGF DuoSet ELISA Development kit (R&DSystems), evaluando 50ul de una dilución apropiada de los sobrenadantes de cultivo de las MMQ bajo los distintos tratamientos. Para la determinación del VEGF intratumoral de los prolactinomas, se evaluaron 60ug de proteínas en un volumen total de 50ul. Las determinaciones se hicieron por duplicado según instrucciones del fabricante. Inmediatamente después de agregar la solución de Stop, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA (BioRad) y se calcularon los pg/ml o pg/ug de VEGF presentes en la muestra según una curva patrón.

Viabilidad celular

La viabilidad de los lactotropos tumorales MMQ y de los corticotropos tumorales AtT20 bajo los distintos tratamientos se determinó colorimétricamente con el kit CellTiter 96 AQueous non radioactive cell proliferation assay, Promega. Se sembraron 5×10^3 células en placas p96 y finalizados los respectivos tratamientos se agregó MTS durante 4hs, se lo solubilizó según instrucciones del fabricante y se leyó la absorbancia de los wells a 595 (menos lectura de fondo a 655 nm) en un lector de microplacas de ELISA (BioRad). La viabilidad de las células AtT20

también se determinó a través del porcentaje de células que eliminaron el colorante Trypan Blue (0.4% Sigma-Aldrich).

Análisis de apoptosis celular

Con el objetivo de determinar el grado de apoptosis en las células de los tejidos de los xenografts *in vivo* bajo la influencia de los distintos tratamientos, se llevó a cabo inmunohistoquímica con caspasa-3 activa (1/100) como se describió anteriormente. Se contó la cantidad de células positivas por campo en al menos 3 experimentos separados, utilizando el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El efecto de TMZ *in vitro* sobre las células en cultivo se determinó por citometría de flujo con marcación para Anexina V APC (#31490016, Immunotools) e yoduro de propidio (PI-Sigma) con el objetivo de discriminar células necróticas. Los eventos fueron adquiridos con el citómetro (FACSCantoll, BD Biosciences) y analizados con el programa FlowJo.

Análisis del ciclo celular

Las células MMQ se plaquearon en p24 en una densidad de $1,8 \times 10^5$ cells/well, y sincronizadas en G0 por 24 h en 500 ul de DMEM sin suero (1% glutamina y 1% P/S). Luego se cosechó el control de sincronización y se lo fijó con etanol 70%. El resto de las células fueron cultivadas en medio de estímulo (Suero de caballo 5%, SFB 2,5%, Glutamina 1% y P/S 1%), y se administraron los tratamientos a evaluar. Las células se levantaron finalizados los tratamientos y fijaron en etanol 70% durante la noche. Posteriormente el etanol fue eliminado, las células

rehidratadas, resuspendidas en buffer de tinción (Tris 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, NP40 0.1%, RNAsa A 60 ug/ml (GE101-01-Transgene Biotech) y con yoduro de propidio 10 ug/ml (PI-Sigma) por 30 minutos en oscuridad y analizadas en citómetro (FACSCantoll, BD Biosciences). El análisis se realizó con la herramienta Cell Cycle del programa FlowJol, determinando el porcentaje de células presentes en cada fase de acuerdo al modelo Dean-Jett-Fox.

Ensayo de migración o cierre de la herida

A través de este ensayo determinamos las capacidades pro-angiogénicas de las células MMQ luego del tratamiento de las mismas con TMZ o con Wnt3a, a través de la habilidad de los sobrenadantes de las células tratadas para promover la migración y posterior el cierre de la herida de células endoteliales (HMEC). 2,5 x 10⁵ HMEC se plaquearon en p24 (DMEM High Glucose + SFB 10% + P/S 1% + Glutamina 1%) hasta 90% de confluencia. Luego las células se privaron de suero por 24hs y se realizó 2 heridas paralelas por well. Se adicionó seguidamente medio condicionado (sobrenadantes de MMQ tratadas) o medio control y se tomaron fotos de la misma posición luego de 0, 4, 8 y 24 h post-estimulo con una cámara acoplada a microscopio invertido. El área libre de migración se cuantificó con Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los controles con las drogas, pero sin células MMQ se realizaron siempre.

Ensayo de formación de esferas

Para determinar el porcentaje de células madre tumorales presentes en la línea AtT20 antes y después del tratamiento con 100µM de TMZ durante 24 o 72 h, 100.000 células fueron cultivadas luego de ese período de tiempo en medio de formación de esferas, compuesto por medio SFDM enriquecido con FGF y B27 durante 6 días con 1% CO₂ a 37°C. El medio fue renovado a los 3 días. El porcentaje de esferas formadas fue calculado contando la cantidad de esferas y relativizando al total de células sembradas.

Inmunocitoquímica

La expresión del marcador de proliferación Ki67 (rabbit anti-Ki67; Thermo Scientific, Fremont, CA) en las tumoroesferas provenientes del cultivo de la línea AtT20, previamente fijadas con PFA 4%, fue evaluada por Inmunofluorescencia según protocolo del laboratorio del Dr. Vankelecom, descrito en [4]. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-rabbit conjugado con AlexaFluor-488 y los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (0.5µg/ml, Vectashield). Para el caso de los controles, se reemplazó el anticuerpo secundario con PBS. Los resultados fueron examinados con microscopio confocal Zeiss LSM 510 laser-scanning (Zeiss, Zaventem, Bélgica) y las imágenes fueron tomadas con la herramienta de Zeiss LSM y procesadas con Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Análisis estadístico

En todos los casos, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias. En los experimentos dónde se compararon dos medias, se determinó el grado de significancia con el test de Student. Se utilizó el test de Kruskal Wallis cuando se analizaron medianas dada la distribución no paramétrica de los datos. Cuando se analizó tamaño tumoral, hormona secretada y peso de animales se hizo a través de un ANOVA de medidas repetidas seguido del post test de Bonferroni. Los análisis de correlaciones se realizaron con el test de Pearson. Cuando se compararon más de dos grupos, se aplicó ANOVA seguido de LSD de Fisher para evaluar la significancia de las diferencias halladas. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (E.E) o caso contrario se indica en las leyendas. $p < 0.05$ se consideró significativo ($*p < 0.05$), ($**p < 0.01$), ($***p < 0.001$). Cuando las diferencias no alcanzaron la significancia ($p > 0.05$) se las determinó como "NS". El número de unidades experimentales o repeticiones de cada experimento (N) se encuentra detallado en cada figura.

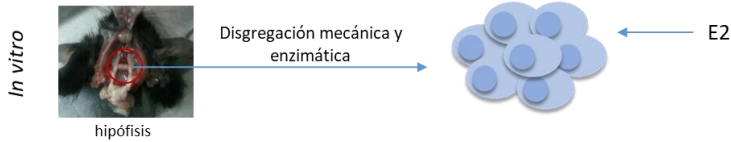
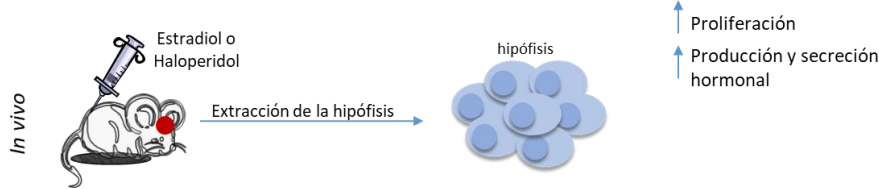
Muestras y modelos experimentales utilizados en el presente trabajo de tesis:

Muestras de tumores de pacientes o hipófisis normales



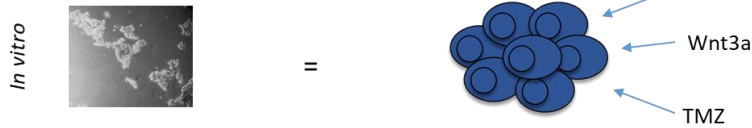
Estímulo a lactotropos

Modelos murinos estimulados con E2



Modelos tumorales

Línea de lactotropos tumorales MMQ



Línea de corticotropos tumorales AtT20



Modelo xenografts MMQ y AtT20



Estudiamos:

- ✓ Características y funcionalidad del tumor o modelo
- ✓ Expresión de β -Catenina/ activación Wnt
- ✓ Respuesta a tratamientos

Figura 7: Esquema de las muestras, modelos experimentales, tratamientos y objetivos de estudio empleados en el presente trabajo de tesis.

RESULTADOS:

Expresión de β -Catenina en hipófisis humanas normales y tumorales, su activación en prolactinomas y su relación con la proliferación del tumor.

La expresión de la proteína principal de la vía de Wnt, β -Catenina, ha sido asociada al desarrollo de muchos tipos de tumores, principalmente en su translocación desde la membrana al núcleo celular y/o acumulación en este último, necesaria para su activación. En tumores hipofisarios los datos publicados arrojan resultados controversiales mostrando algunos una elevada expresión de β -CATENINA en núcleo [56] mientras que otros, en cambio, sólo detectan a la proteína de membrana a pesar de determinar la expresión nuclear de los genes diana de la vía [102]. En una cohorte de 15 tumores hipofisarios humanos incluidos adenomas no funcionantes y secretores de GH, ACTH y prolactinomas resistentes de pacientes que recurrieron a cirugía (Tabla 3), así como en tejido hipofisario normal, detectamos por IHQ expresión de la proteína β -CATENINA en membrana, citoplasma y núcleo (Figura 8a-e). Al analizar la distribución de esta proteína en las distintas muestras observamos que, dependiendo del caso, β -CATENINA puede encontrarse agrupada en “clusters” de células o estar distribuida más uniformemente a lo largo del tejido normal o tumoral. Las células con marca para β -CATENINA en las distintas sublocalizaciones celulares fueron cuantificadas y relativizadas al total de células del tejido normal o tumoral. De manera interesante, fueron los prolactinomas los que expresaron los menores niveles de β -CATENINA en membrana con respecto a las hipófisis normales, mientras que ningún otro tipo tumoral mostró diferencias significativas con respecto al tejido normal o entre los grupos tumorales (Figura 8f). A su vez, este subtipo particular de adenoma hipofisario representó además la mayoría del grupo de los tumores de altos niveles de proliferación celular ($Ki67 > 3\%$) (Figura 8g). Con respecto a la localización de la proteína en citoplasma y núcleo no

encontramos diferencias entre los subtipos de tumores ni con respecto a las hipófisis normales (Figura 8h).

Dado que el cociente entre los porcentajes de β -CATENINA nuclear y de membrana podría considerarse indicador del grado de activación de la proteína, decidimos evaluar en esta cohorte de tumores de hipófisis la relación entre β -CATENINA nuclear/membrana con el índice de proliferación de los mismos determinado a través del porcentaje de células con expresión de Ki67. Encontramos que los tumores con un índice de Ki67 mayor a 3% y por lo tanto con mayor grado de agresividad, relocalizan a β -CATENINA desde la membrana al núcleo en mayor proporción, indicando un mayor grado de activación de la proteína (Figura 8i).

Los resultados hallados en el presente trabajo sugieren una mayor activación de β -CATENINA en los prolactinomas resistentes de la cohorte estudiada con respecto al resto de los tumores hipofisarios, lo que a su vez podría promover de manera directa o indirecta las características de agresividad de este subtipo de adenomas, surgiendo como un interesante objeto de estudio la activación de la vía de Wnt/ β -Catenina y su relación con la tumorigénesis hipofisaria.

Paciente	Sexo	Edad	Subtipo tumoral	Tamaño/localización	Ki67 (%)
1	F	57	NF	Selar and supraselar	<1
2	F	58	GH	Microadenoma	0,5
3	F	N/A	ACTH	N/A	N/A
4	F	50	PRL	Supraselar	12
5	M	26	GH	Selar	3,5
6	M	50	PRL	Macroadenoma. Selar y supraselar. Compromiso del quiasma óptico	22
7	F	46	ACTH	N/A	<1
8	F	35	NF	N/A	1,7
9	M	51	PRL	Microadenoma. Selar	2,5
10	F	44	GH	N/A	N/A
11	M	43	GH	N/A	<1
12	F	42	PRL	Macroadenoma. Supraselar	6,5
13	M	N/A	NF	N/A	<1
14	F	65	ACTH	N/A	4
15	M	N/A	PRL	N/A	12

Tabla 3. Características de la cohorte de tumores hipofisarios utilizados en el presente trabajo de tesis. En esta tabla se detalla el sexo y la edad de los pacientes portadores de los tumores, el subtipo de tumor según sus características secretoras y sus particularidades de tamaño, localización y de proliferación evaluada a través del índice de Ki67 (%).

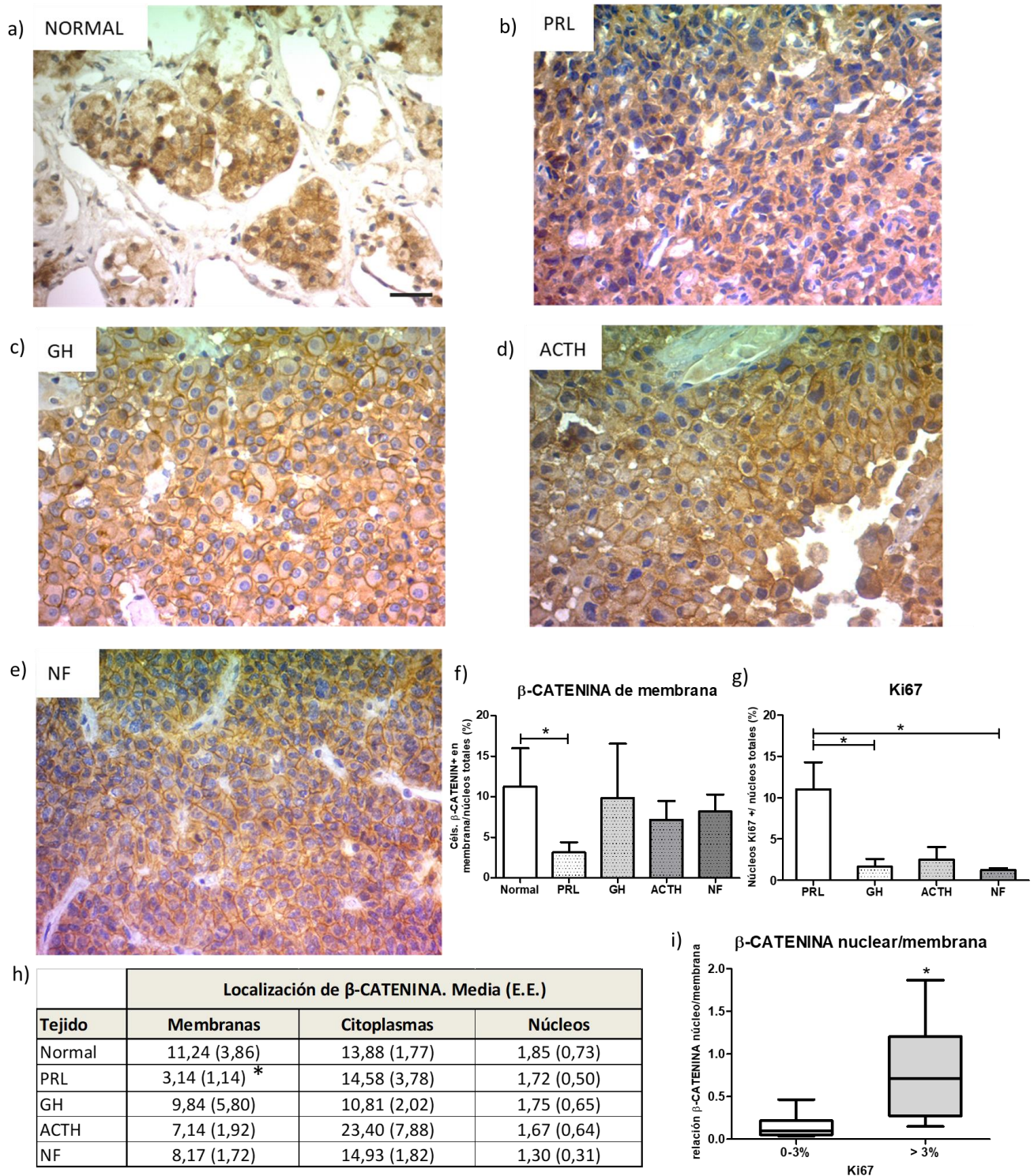


Figura 8. La localización subcelular de la proteína β -CATENINA fue estudiada a través de la tinción específica de la misma por IHQ en cortes histológicos de hipófisis normales (a) y de tumores hipofisarios humanos secretores de prolactina (PRL; b), de hormona de crecimiento (GH; c), de hormona corticotropa (ACTH; d), y en no funcionantes (NF; e). Se muestran imágenes representativas de la localización y distribución de la proteína obtenidas por inmunohistoquímica en los cortes histológicos.

La localización subcelular de la proteína β -CATENINA en Núcleos, Membranas y Citoplasmas fue cuantificada, las células positivas para cada localización fueron relativizadas al total de células del tejido y se la expresó como porcentaje (h; E.E: Error estándar). f) Promedios de células positivas para β -CATENINA de membrana (%) en los distintos subtipos de tumores hipofisarios y en hipófisis normales (N= 3; 5; 4; 3; 3 para Normal, PRL, GH, ACTH y NF respectivamente, *p= 0,047 vs Normal). g) Promedio de los índices de proliferación evaluados a través de la expresión de Ki67 en cada subtipo tumoral (N=5; 3; 2; 3 para PRL, GH, ACTH y NF respectivamente, *p=0.018). i) Asociación entre el índice de proliferación (clasificados como 0-3% menos agresivo; >3% más agresivo) y la relación de β -CATENINA activa (núcleos/membranas); (N=7 y 6 para 0-3% y >3% respectivamente, *p=0.014).

β -CATENINA EN LACTOTROPOS NORMALES Y ROL DE LA VÍA CANÓNICA DE WNT EN LACTOTROPOS ESTIMULADOS

Seguidamente, y habiendo surgido la activación de la vía Wnt en prolactinomas como un interesante blanco de estudio dado el estado activo de β -CATENINA en este subtipo tumoral, nos propusimos investigar su activación y la de componentes de la señal canónica Wnt, la relación con prolactina y con otros procesos celulares en hipófisis murinas normales y en distintos modelos experimentales.

Entre ellos, trabajamos con hipófisis de ratón estimuladas tanto *in vivo* como *in vitro* para promover la actividad de los lactotopos, con lactotopos tumorales de rata estimulados *in vitro* y en un modelo *in vivo* de prolactinoma murino generado por inyección subcutánea de esta línea celular, en el que evaluamos además el comportamiento de la vía Wnt/ β -Catenina frente a un nuevo tratamiento quimioterápico promisorio.

Expresión basal de β -Catenina en hipófisis murinas normales y su relación con la producción hormonal.

Como primer paso, en las hipófisis de los ratones controles de la cepa BalbC utilizada en este estudio, evaluamos la existencia de una posible relación entre la producción hormonal de los lactotropos y la expresión de β -Catenina. Encontramos que la expresión de los genes de *prolactina* murina (*mPRL*) y de *β -Catenina* correlaciona fuertemente, demostrando la existencia de una relación positiva entre este componente clave de la vía canónica de Wnt y la producción hormonal de los lactotropos en condiciones basales (Figura 9).

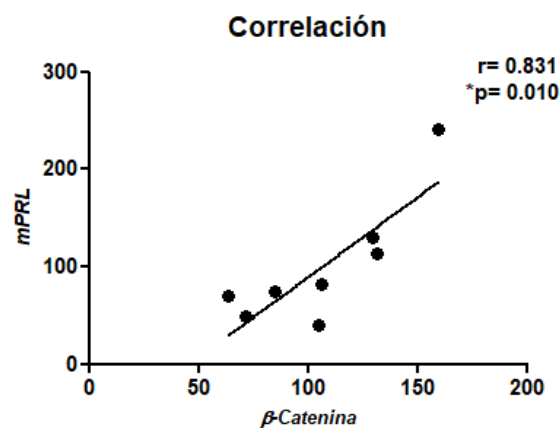


Figura 9. Correlación entre la expresión del ARNm del gen de *Prolactina* de ratón (*mPRL*) y de *β -Catenina* en hipófisis de ratones controles de la cepa BalbC. El coeficiente de Pearson y el grado de significancia se muestran en el gráfico (N=8).

Activación de la vía Wnt en hipófisis estimuladas farmacológicamente *in vivo*.

Ha sido ampliamente reportado que la administración de Estradiol tiene un efecto mitogénico y activador de los lactotropos hipofisarios, surgiendo como un interesante método de estudio a fin de conocer los procesos fisiológicos y moleculares que ocurren en el contexto de la activación de estas células [40].

Dados nuestros hallazgos previos en las muestras de tumores hipofisarios humanos y la relación de β -Catenina con la producción hormonal en hipófisis normales murinas, continuamos

con el estudio de la vía Wnt/ β -Catenina en respuesta a la activación del lactotrofo tras el estímulo estrogénico *in vivo*.

La activación de los lactotrofos con el tratamiento crónico con Estradiol *in vivo* se corroboró a través del aumento en la expresión del ARNm de prolactina (*mPRL*) en comparación con los controles (Figura 10a). Este aumento fue validado a nivel proteico por citometría de flujo de PRL en células de adenohipófisis disgregadas luego del tratamiento *in vivo* con E2 (Figura 10b).

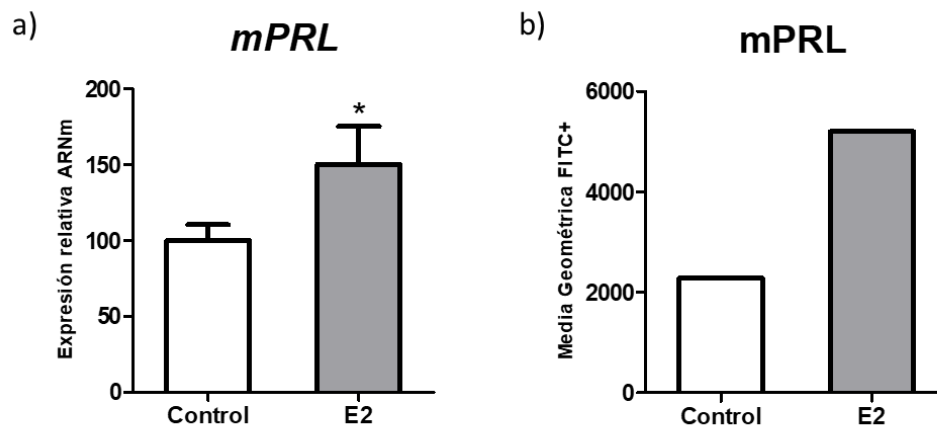


Figura 10. a) Expresión relativa del ARNm del gen de *Prolactina* evaluado por RT-qPCR. Los niveles de expresión del gen fueron relativizados a la expresión de *G3PDH* (N=13 Control, N=11 E2. $p=0.05$). b) El aumento en la producción hormonal luego de la administración de Estradiol *in vivo* fue confirmado por Citometría de flujo (CF) a través del análisis de la media geométrica de células FITC+ (50.000 eventos).

De manera similar a lo que observamos en resultados previos del laboratorio en la cepa C57, el tratamiento con Estradiol provocó un aumento en la acumulación nuclear de β -CATENINA, determinado por IHQ, indicio de activación de la vía Wnt cuando los lactotrofos son estimulados (Figura 11a). El incremento de β -CATENINA activa fue confirmado por citometría de flujo con un anticuerpo específico para la proteína activa en homogenatos de las hipófisis de animales

tratados *in vivo* con Estradiol en comparación con hipófisis de animales controles (Figura 11b). En cuanto a la localización de la proteína en membrana y citoplasma en los cortes histológicos de las hipófisis de los animales, en este modelo bajo estímulo estrogénico no hallamos diferencias significativas luego del tratamiento (Figura 11a).

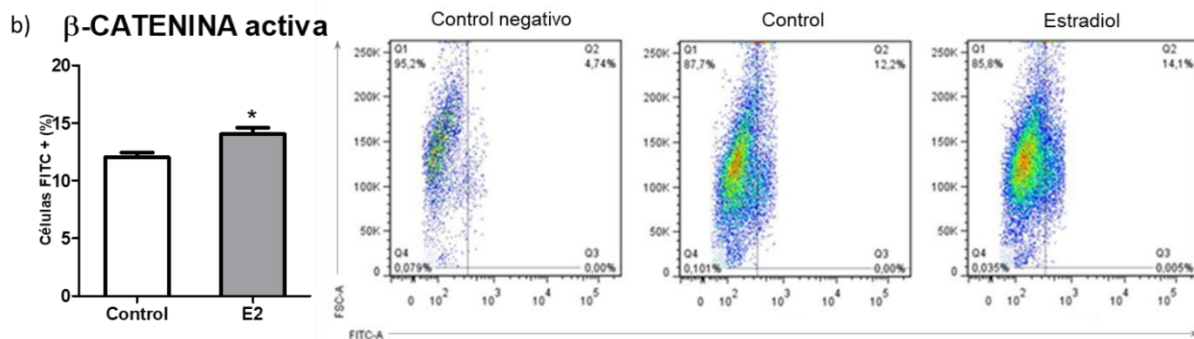
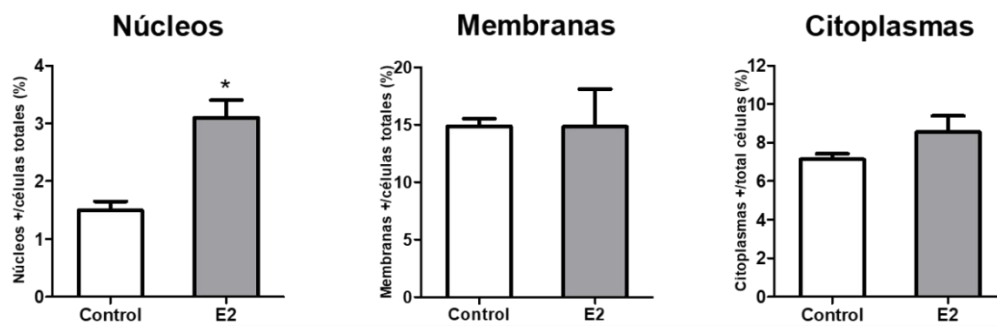
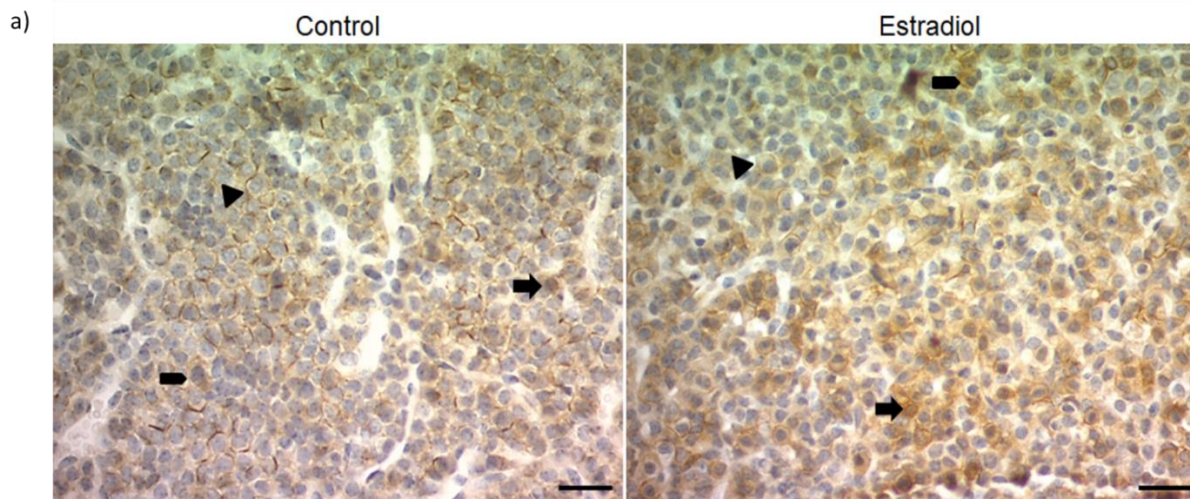


Figura 11. a) La expresión de β -CATENINA en las distintas sublocalizaciones celulares (\rightarrow núcleos, \blacktriangleright membranas y \blacksquare citoplasmas respectivamente) fue estudiada por IHQ en tejido de adenohipófisis de ratones tratados *in vivo* con Estradiol y controles. Se muestran imágenes representativas de las IHQ para Control y Estradiol respectivamente (Fotos: 40X, Escala: 30 micrones). El número de células que expresaron β -CATENINA en cada una de las sublocalizaciones celulares fue relativizado al total de células del tejido y expresadas como porcentajes (N=3 Control y N=2 Estradiol. *p=0.01 para núcleos). b) El aumento de β -CATENINA activa determinado por IHQ (nuclear) luego del tratamiento con Estradiol fue confirmado por citometría de flujo para β -CATENINA activa a través del porcentaje de células positivas para FITC (N=3 Control y Estradiol, *p=0.04). Imágenes representativas de los dot-plot para Control negativo (autofluorescencia), Control y Estradiol respectivamente.

Dado que β -Catenina es un efector fundamental de una de las vías de señalización de los ligandos Wnt, denominada vía canónica de Wnt o Wnt/ β -Catenina como se detalló anteriormente, analizamos la expresión del ARNm de β -Catenina y de componentes de la vía de Wnt por RT-qPCR en este modelo. Observamos que los niveles del ARNm y de β -Catenina luego del estímulo estrogénico tendieron a incrementarse aunque sin significancia estadística y la expresión del ARNm del cofactor nuclear de β -Catenina, *TCF4* también demostró un discreto aumento luego del estímulo con Estradiol. Por su parte, la expresión de los genes diana de la vía, *Ciclina D1* (Figura 12) y *c-Myc* (no mostrado) no se vio afectada luego del tratamiento con Estradiol.

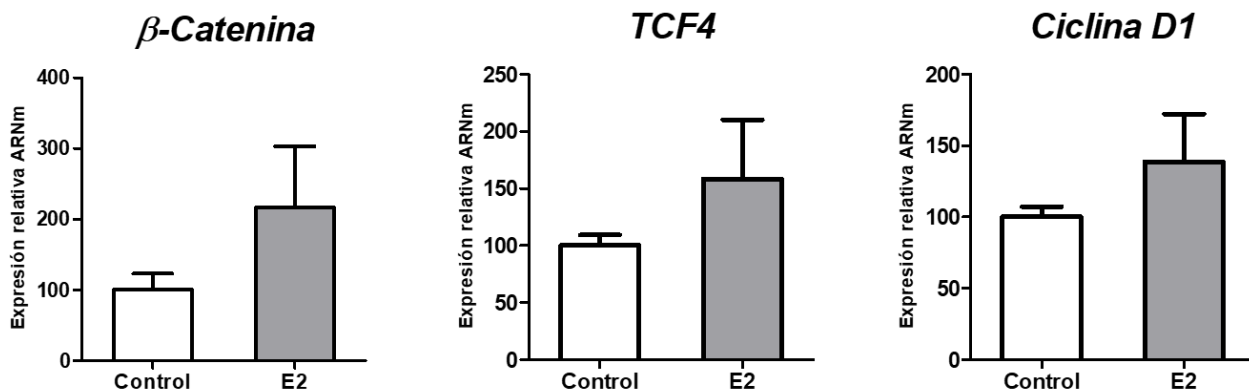


Figura 12. La expresión relativa del ARNm de los componentes de la vía Wnt: β -Catenina (N=8 Control y N=5 Estradiol, NS p=0.17), *TCF4* (N=11 Control y N=8 Estradiol, NS) y *Ciclina D1* (N=11 Control y N=9 Estradiol, NS) fueron evaluados por RT-

qPCR. El nivel de expresión de cada gen de interés fue relativizado al de *G3PDH* y los resultados se muestran como porcentajes del control.

Adicionalmente, y con el fin de corroborar la respuesta de la vía de Wnt ante la activación de los lactotropos independientemente del tratamiento utilizado, en este trabajo de tesis se empleó otro modelo de activación de lactotropos *in vivo* a través de la administración crónica y subcutánea de Haloperidol, antagonista de la dopamina, que actúa bloqueando los receptores D2 presentes en los lactotropos.

De manera similar a lo encontrado para E2, el tratamiento con Haloperidol también aumentó los niveles de β -CATENINA en núcleo y citoplasma al mismo tiempo que tendió a disminuir en membrana cuando se estudió su localización por IHQ (Figura 13a).

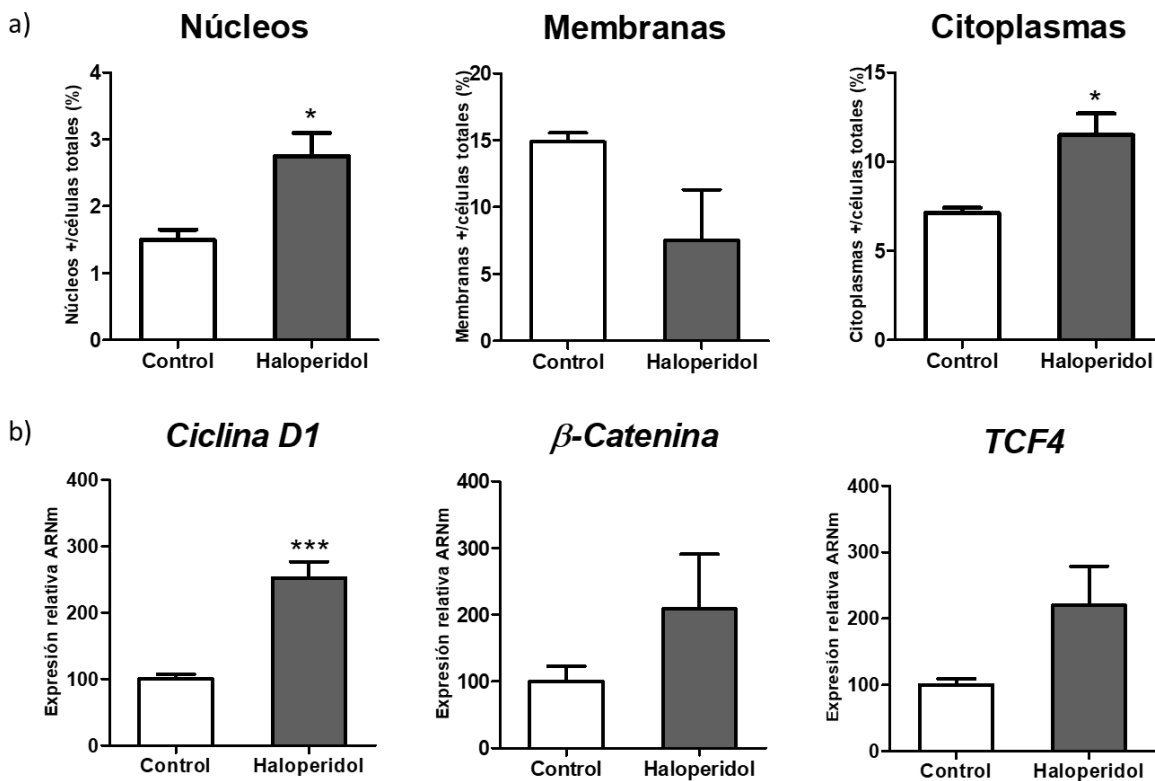


Figura 13. a) La expresión de β -CATENINA en las distintas sublocalizaciones celulares (núcleos, membranas y citoplasmas respectivamente) fue estudiada por IHQ en tejido de adenohipófisis de ratones tratados *in vivo* con Haloperidol y controles. El número de células que expresaron β -CATENINA en cada una de las sublocalizaciones celulares fue relativizado al total de células del tejido y expresadas como porcentajes (N=3 y 2 para Control y Haloperidol respectivamente, * $p=0.03$ para núcleos y * $p=0.02$ para citoplasmas). Figura 10. La expresión relativa del ARNm de los componentes de la vía Wnt: *Ciclina D1* (N=11 Control y N=4 Haloperidol, *** $p=0.0003$), β -*Catenina* (N=8 Control y N=4 Haloperidol, NS $p=0.14$) y *TCF4* (N=11 Control y N=4 Haloperidol, NS $p=0.17$) fueron evaluados por RT-qPCR. El nivel de expresión de cada gen de interés fue relativizado al de *G3PDH*.

En el tejido de las hipófisis tratadas y controles, analizamos también la expresión de componentes de la vía de Wnt por RT-qPCR y observamos que la expresión del gen diana de la vía, *Ciclina D1*, se incrementa significativamente luego de la administración de Haloperidol, apoyando la posible influencia de la vía canónica de Wnt en la activación de los lactotrofos hipofisarios. Por su parte, β -*Catenina* tiendio a incrementarse luego del estímulo con haloperidol. De la misma manera a lo observado con el tratamiento estrogénico, la expresión del mRNA del cofactor nuclear de β -Catenina, *TCF4* también mostró un discreto aumento luego del estímulo con Haloperidol (Figura 13b).

Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación de la vía de Wnt en la activación del lactotrofo, lo que podría ser causa o consecuencia de su actividad desregulada, pudiendo derivar en el desarrollo del tumor hipofisario.

Respuesta de la vía Wnt en lactotrofos estimulados farmacológicamente con Estradiol *in vitro*

Seguidamente, corroboramos la modulación de la expresión de componentes de la vía de Wnt *in vivo* por el tratamiento activador del Estradiol, en un modelo *in vitro*. En este modelo,

evaluamos el efecto de la estimulación con Estradiol directamente sobre las células de las hipófisis. Las glándulas hipofisarias de los ratones fueron extraídas, disgregadas mecánicamente y enzimáticamente, cultivadas en adherencia y estimuladas con Estradiol *in vitro*. En este contexto, componentes de la vía de Wnt tales como β -Catenina, el receptor *Fzd8* y el gen diana *Ciclina D1* tienden a aumentar su expresión como respuesta a la activación directa por Estradiol (Figura 14).

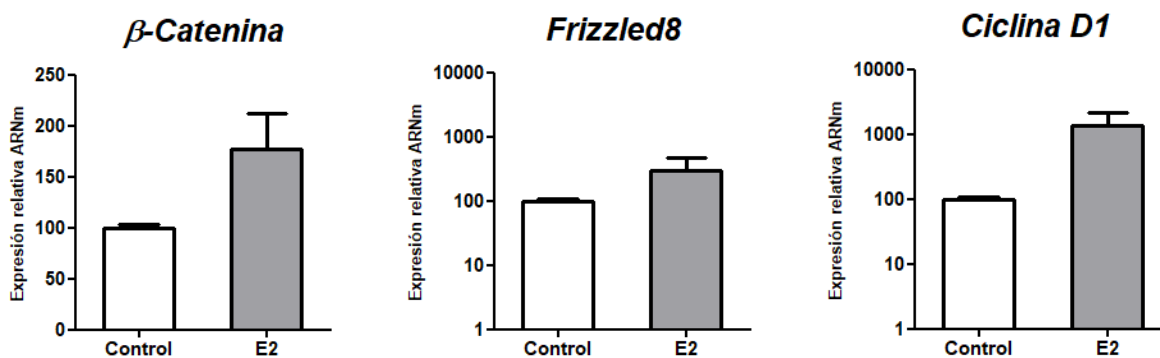


Figura 14. La expresión del mRNA de los componentes de la vía de Wnt β -Catenina (N=3, p=0.19), *Frizzled8* (N=2, NS) y *Ciclina D1* (N=3, NS) fue evaluada por RT-qPCR en células de hipófisis dispersas cultivadas en adherencia luego del tratamiento con E2 *in vitro*. El nivel de expresión de cada gen de interés fue relativizado al de *G3PDH* y se muestra como porcentaje de los controles.

De esta manera, nuestros resultados de activación de lactotrofos *in vivo* e *in vitro* muestran una respuesta en torno a la activación de la vía Wnt lo que sugeriría su participación en el proceso tumoral.

Expresión de la vía Wnt en lactotropos tumorales MMQ y efecto del estímulo con Estradiol

Los resultados anteriores llevados a cabo en los modelos experimentales están enmarcados en el contexto de hipófisis normal completa, en donde la activación de los lactotropos fue promovida farmacológicamente tanto *in vivo* como *in vitro*, y muestran la respuesta activa de la vía de Wnt como efecto del estímulo hipofisario en cada contexto. Dada la relevancia de la vía de Wnt en el desarrollo de distintos tumores incluidos los tumores de hipófisis y nuestros resultados *in vivo* e *in vitro*, estudiamos a continuación el efecto del Estradiol en un modelo de lactotropos tumorales.

La línea celular MMQ es una línea de lactotropos tumorales provenientes de un tumor hipofisario de rata. En estos lactotropos tumorales, estudiamos el efecto de la estimulación con 10^{-8} M de Estradiol *in vitro* y observamos que dicho tratamiento no fue suficiente para incrementar de manera significativa la expresión del gen de *Prolactina* (Figura 15a). Sin embargo, en este modelo, el tratamiento promovió la activación de la vía de Wnt a través de un incremento en los niveles de la proteína β -CATENINA activa medida por citometría de flujo luego de 24hs de estímulo. La expresión del mRNA de β -*Catenina* no se modificó luego del tratamiento. En concordancia con el aumento de β -CATENINA activa, el estímulo estrogénico promovió también un aumento en la expresión del gen diana *Ciclina D1* en los lactotropos tumorales (Figura 15b). Por otro lado, en este modelo el tratamiento con Estradiol no fue suficiente para aumentar la viabilidad o disminuir la apoptosis de los lactotropos tumorales (Figura 15c). La secreción del factor angiogénico VEGF, tampoco se modificó luego del tratamiento en estas células (Figura 15d).

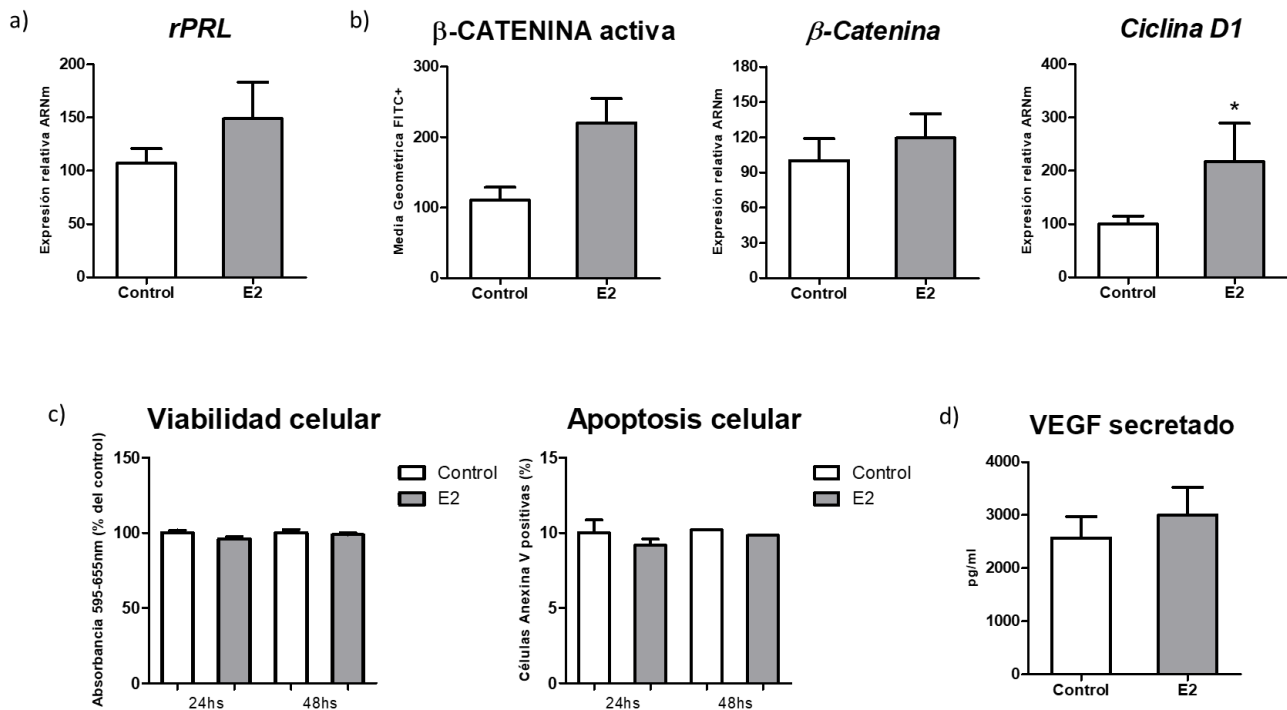


Figura 15. a) Los niveles de expresión del mRNA de *Prolactina* se determinaron a través RT-qPCR. Su expresión fue relativizada a la del mRNA de *G3PDH* y expresada como porcentaje de los controles (24hs, N=3 Control y Estradiol, p=0.15). b) Los niveles de β -CATENINA activa se determinaron a través del análisis de la media geométrica de las células APC+ por citometría de flujo en la línea MMQ luego del estímulo con Estradiol (24hs, N=2 Control y Estradiol, p=0.1872). La expresión del ARNm de β -Catenina (24hs, N=3 Control y Estradiol, NS) y Ciclina D1 (24hs, N=3 Control y Estradiol, *p=0.044) luego del estímulo con Estradiol en la línea MMQ se evaluó por RT-qPCR. La expresión de cada gen de interés fue relativizada a la del mRNA de *G3PDH* y expresada como porcentaje de los controles. c) La viabilidad de las células de la línea se determinó con el ensayo de viabilidad MTS, los resultados de la absorbancia (595-655nm) son mostrados como porcentaje de los controles (24 y 48hs, N=2 Control y Estradiol, NS). El porcentaje de células apoptóticas (Anexina V positivas) fue determinado en la línea MMQ por Citometría de flujo luego del tratamiento con Estradiol (24 y 48hs, N2 y 1 respectivamente, NS). d) La secreción de VEGF al medio de cultivo (ng/ml) por las MMQ fue cuantificada por ELISA luego del tratamiento (24 y 48hs, N=2 Control y Estradiol, NS).

Efecto de la activación específica de la vía de Wnt en los lactotopos tumorales MMQ.

Evaluado el estado de la vía canónica de Wnt en los lactotopos tumorales luego del estímulo estrogénico, nos propusimos estudiar el impacto de su activación con el ligando específico de

la vía canónica de Wnt (Wnt3a) en la respuesta de los lactotropos tumorales MMQ. Confirmamos que tanto 0.25 ng/ml como 1 ng/ml de Wnt3a promueven un aumento en la expresión de la proteína β -CATENINA de manera dosis dependiente en los lactotropos tumorales evaluado por WB (Figura 16a), en tanto que la proteína β -CATENINA activa mostró una tendencia a un aumento de su expresión a las 12 horas de estímulo con Wnt3a determinado por Citometría de flujo (Figura 16b). A nivel del ARNm no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *β -Catenina* o en los genes diana *Ciclina D1* ni *c-Myc* (no mostrado). Sin embargo, la activación de β -CATENINA correlacionó positiva y significativamente con la expresión de la proteína C-MYC en lactotropos en cultivo y esta activación derivó además en el aumento (no significativo) de la expresión del gen diana de la vía de Wnt CICLINA D1 a nivel proteico (Figura 16c). Estos resultados dan cuenta de la rápida respuesta y participación activa de la vía de Wnt en el mantenimiento de los lactotropos tumorales.

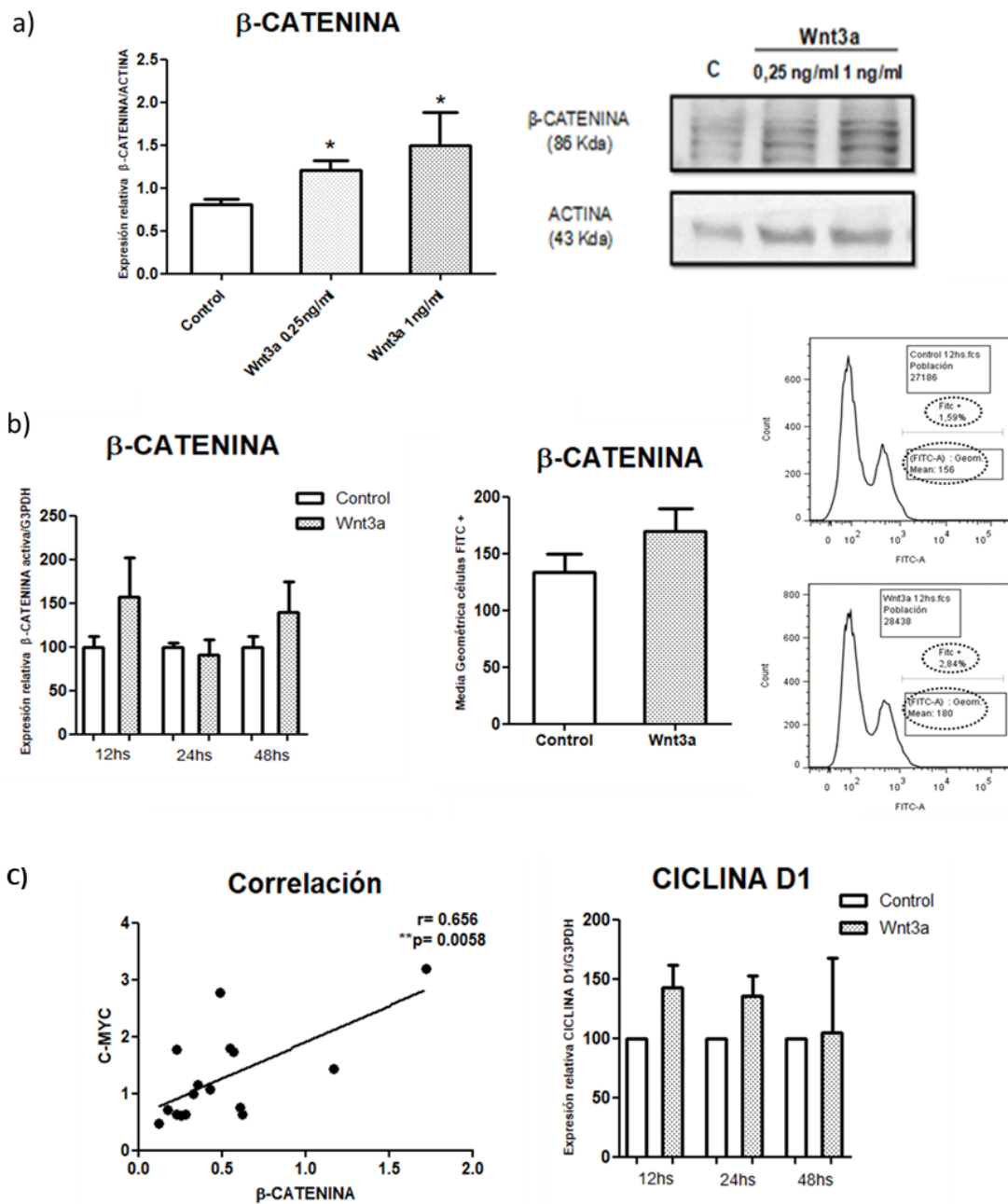


Figura 16. a) Los niveles de β -CATENINA se determinaron por WB en la línea MMQ luego del estímulo Wnt3a 1ng/ml o 10ng/ml. La expresión de la proteína fue relativizada a la de ACTINA (2hs, N=4; 3 y 4 Control, Wnt3a 1ng/ml y Wnt3a 10ng/ml respectivamente. *p=0.01 y 0.05). Se muestra una imagen representativa del WB (C=Control). b) Los niveles de β -CATENINA activa se determinaron por WB (relativizados a la expresión de G3PDH) y a través del análisis de la media geométrica de las células FITC+ por CF en la línea MMQ luego del estímulo Wnt3a 1ng/ml (WB N=5-2, NS. CF 12hs N=3 y 3 Control y Wnt3a respectivamente. p=0,195). Se muestran histogramas representativos. c) Los niveles de C-MYC se determinaron por WB en la línea MMQ luego del estímulo Wnt3a 1ng/ml, su expresión se relativizó a la de ACTINA y fue correlacionada con la de β -

CATENINA (N=16, r de Pearson y grado de significancia se muestran en el gráfico). La expresión de CICLINA D1 se determinó por WB en la línea MMQ luego del estímulo Wnt3a 1ng/ml, su expresión se relativizó a la de ACTINA (N=2 Control y Wnt3a, NS).

Seguidamente, evaluamos el impacto de esta activación en procesos fundamentales para el desarrollo del prolactinoma como son la viabilidad celular, la producción hormonal y la angiogénesis.

La activación mediante el estímulo con Wnt3a promovió un incremento en la expresión del gen de *Prolactina* (Figura 17a) a posteriori de la activación de β -CATENINA (Figura 16a-b), y un aumento moderado, aunque no significativo, en la secreción de la hormona (Figura 17a) en conjunto con la activación de β -CATENINA (Figura 16b), apoyando una vez más la posible relación de esta vía y la actividad de los lactotopos tumorales en este caso. La bibliografía respecto al rol de la vía de Wnt y su efecto en el arresto del ciclo celular es escasa. En este modelo, no encontramos diferencias significativas en la viabilidad celular dada por el estímulo de Wnt3a (Figura 17b) y en concordancia con esto tampoco en el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular luego de la estimulación en estas condiciones de cultivo. Determinamos además que en este modelo de lactotopos tumorales el aumento de β -CATENINA activa luego de 12hs de estímulo con Wnt3a estaría acompañado por una aparente disminución de la apoptosis de las MMQ (Figura 17b).

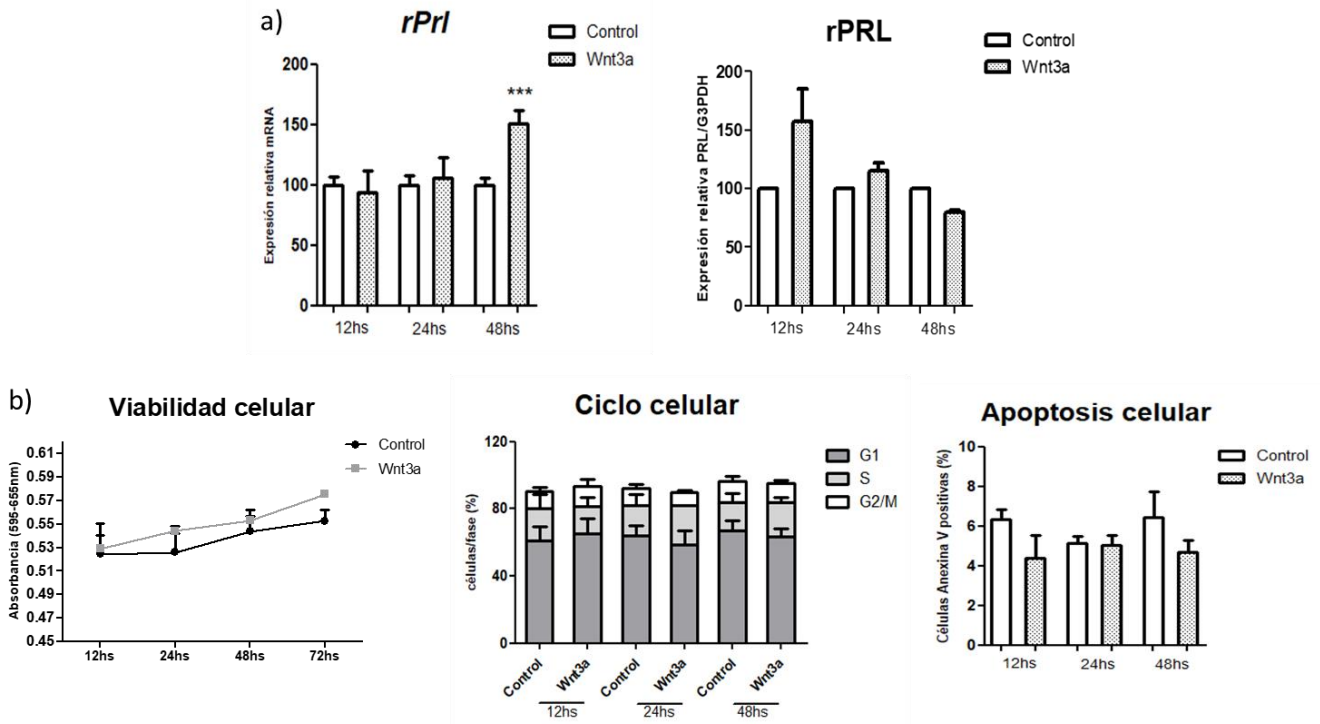


Figura 17. a) La expresión del ARNm de *rPrI* (N= 4 Control y 3 Wnt3a 1ng/ml, ***p=0.0007) en la línea MMQ se evaluó por RT-qPCR y fue relativizada a la del mRNA de *G3PDH* y expresada como porcentaje de los controles. Los niveles de rPRL secretados al sobrenadante se determinaron por WB en la línea MMQ luego del estímulo Wnt3a 1ng/ml (N=7-4, NS). b) La viabilidad de las células MMQ luego del estímulo con Wnt3a se determinó con el ensayo de MTS (N=4, NS). El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular fue evaluado por Citometría de flujo luego del estímulo con Wnt3a 1ng/ml. (N=5-2, NS). El porcentaje de células apoptóticas (Anexina V positivas) fue determinado en la línea MMQ por Citometría de flujo luego del tratamiento con Wnt3a 1ng/ml (N=6-2; p=0.09 12hs).

En cuanto al rol de la activación de Wnt sobre la angiogénesis en los lactotiros tumorales, si bien la activación de β -CATENINA y consecuentemente de la vía canónica de Wnt promueve el aumento en la expresión del mRNA de *Vegf* luego de 48hs en las células, hasta este tiempo de estímulo la secreción de VEGF no se ve afectada. Esto se evidencia además en la capacidad angiogénica reducida de los sobrenadantes de los lactotiros tumorales estimulados con Wnt3a cuando se los evalúa en un ensayo de migración sobre células endoteliales. En este

modelo de lactotopos tumorales, la angiogénesis no estaría siendo promovida por la activación con Wnt3a (Figura 18).

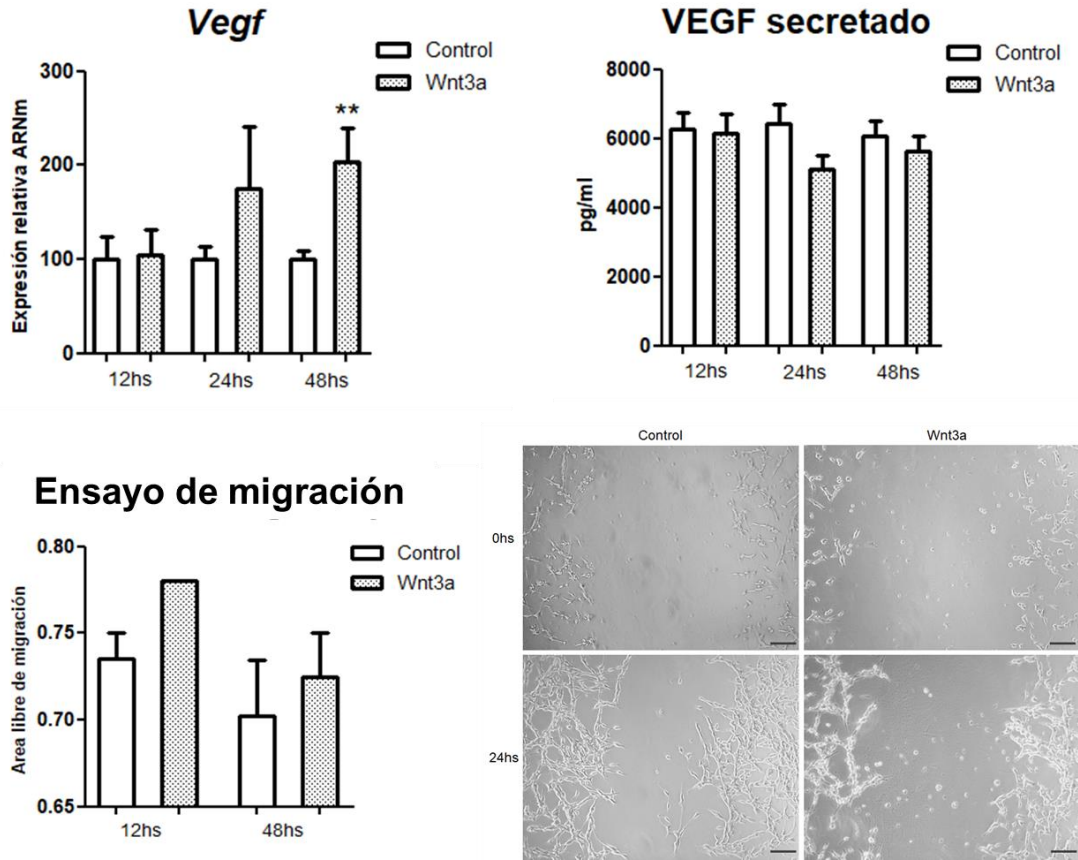


Figura 18. La expresión del ARNm de *Vegf* (48hs; N= 4 y 3 Control y Wnt3a 1ng/ml; **p=0.003) en la línea MMQ se evaluó por RT-qPCR y fue relativizada a la del mRNA de *G3PDH* y expresada como porcentaje de los controles. La secreción de VEGF al sobrenadante de cultivo por las MMQ luego del tratamiento fue evaluado por ELISA (N=8 Control y Wnt3a 1ng/ml, NS). La capacidad angiogénica de los sobrenadantes de las MMQ tratadas con Wnt3a o controles se evaluó en un ensayo de cierre de la herida sobre células endoteliales HMEC (N=3 y 1 Control y Wnt3a 1ng/ml, NS). Se muestran imágenes representativas del ensayo luego de 24hs de cultivo con sobrenadantes de MMQ tratadas con Wnt3a1ng/ml durante 48hs (fotos 40X, escala: 30 micrones).

Como conclusiones en este modelo de lactotopos tumorales, y considerando la respuesta de la vía de Wnt tras la activación de los lactotopos normales por Estradiol estudiada

anteriormente, podemos inferir que la activación específica de la vía de Wnt genera una respuesta en la producción hormonal de los lactotrofos, mientras que 1ng/ml de Wnt3a tendría un moderado impacto en la apoptosis de los mismos y no promovería angiogénesis.

Seguidamente nos preguntamos qué papel tendría y cómo respondería la vía de Wnt/ β -Catenina al tratamiento quimioterapéutico en este modelo *in vitro* de lactotrofos tumorales y en el desarrollo del prolactinoma *in vivo*, con el fin de entender el rol que estaría teniendo ésta vía en la respuesta o resistencia a nuevos tratamientos quimioterápicos para casos resistentes.

SEÑALIZACIÓN WNT/ β -CATENINA Y TRATAMIENTO DE PROLACTINOMAS.

Respuesta de prolactinomas experimentales al tratamiento con TMZ.

Para investigar el rol de la vía Wnt/ β -catenina en el desarrollo de prolactinomas experimentales y en respuesta al tratamiento, como primera medida los lactotrofos tumorales MMQ fueron inyectados en forma subcutánea en ratones inmunodeficientes con el fin de generar prolactinomas (Figura 19a). Seguidamente, se administró TMZ de manera oral a los animales durante 2 semanas (con un período de descanso entre semanas de dos días) y la respuesta a este tratamiento fue determinada a nivel sérico e histológico. En cuanto a la producción hormonal, determinamos que el tejido de estos tumores mostró una alta inmunoreactividad para prolactina evidenciando la presencia de lactotrofos activos (Figura 19b) y que, en los homogenatos de los prolactinomas, TMZ disminuyó en un 60% la síntesis del mRNA de *Prl* comparado con los controles al mismo tiempo que disminuyó también la producción de la proteína PRL de manera significativa (Figura 19c), remarcando la efectividad de TMZ en el

tratamiento de los prolactinomas. Adicionalmente, los niveles de la proteína sérica mostraron una discreta normalización hacia el final del tratamiento (Figura 19d, $p=0,058$).

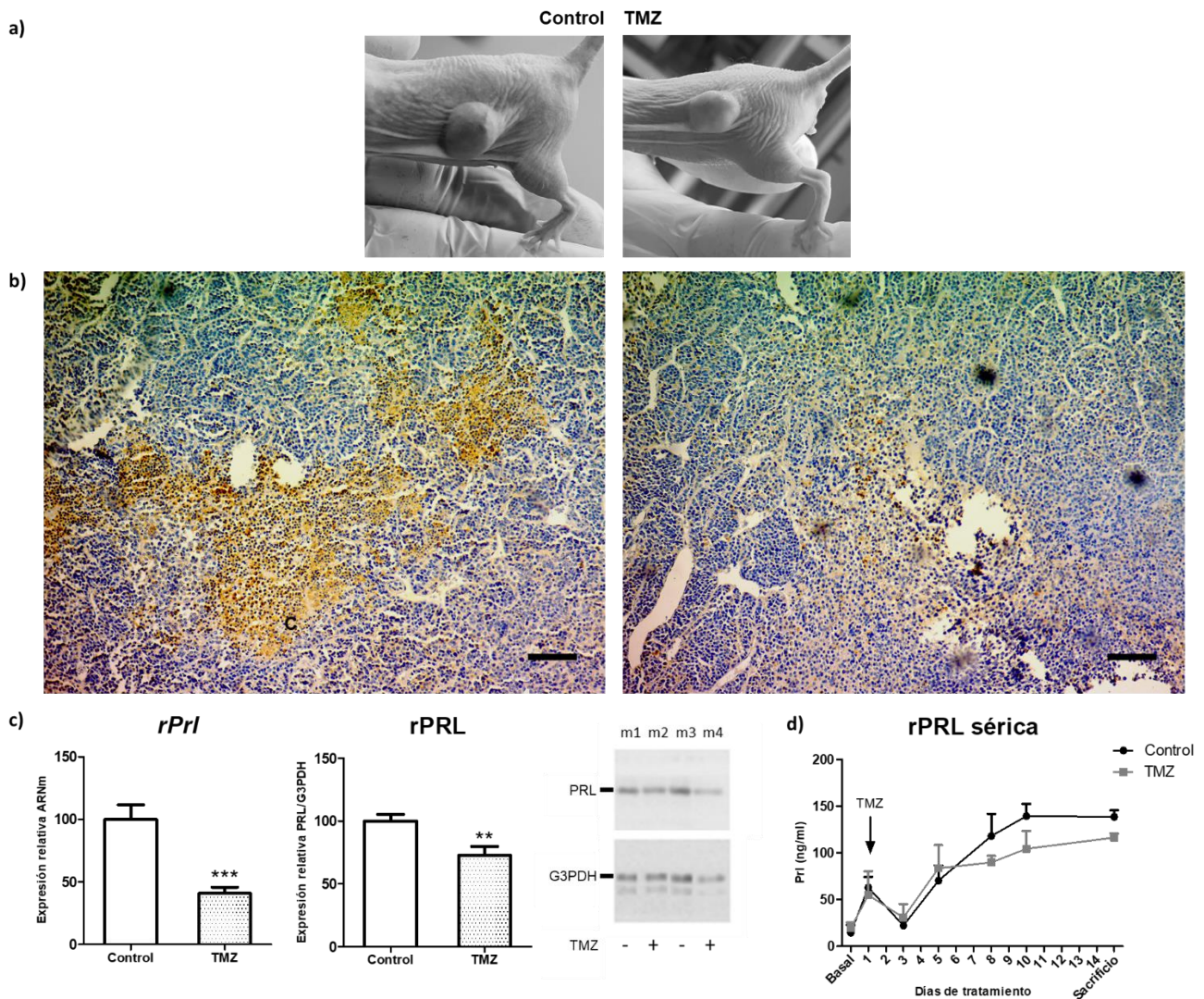


Figura 19. a) Imágenes representativas de prolactinomas subcutáneos desarrollados luego de la inoculación con células MMQ y del tratamiento con TMZ. Izquierda: Animal control; Derecha: Animal tratado con TMZ. Las imágenes fueron tomadas al final del tratamiento. b) IHQ de prolactina en prolactinomas control y tratados. Izquierda: Animal control; Derecha: Animal tratado con TMZ. Las imágenes fueron tomadas al final del tratamiento (10x, escala: 100 micrones). c) Síntesis de prolactina en los homogenatos de los prolactinomas controles y tratados. La expresión del ARNm de *Prl* se estudió por RT-qPCR, los niveles de ARNm se normalizaron a la expresión del gen constitutivo *Actina* y se muestran como porcentajes de control (N=9 y 8 Control y TMZ respectivamente, *** $p=0,0001$). Los niveles de la proteína PRL se analizaron mediante WB, se normalizaron a los niveles de G3PDH y los resultados se muestran como porcentajes de controles. Se muestra una imagen representativa del WB (N=10 Control y TMZ, ** $p=0,0066$). †m1, m2, m3, m4 indican animales diferentes. d) La PRL secretada al suero de los animales durante el esquema del tratamiento se analizó mediante RIA y se expresa en ng/ml (N=4 Control y TMZ, $p=0,058$).

En relación a los niveles de apoptosis celular, observamos que con TMZ se incrementó el número de células positivas para Caspasa-3 activa en el tejido de los prolactinomas de los animales tratados con respecto a los controles determinado por IHQ (Figura 20a). A pesar de ello, el tamaño tumoral de los animales no mostró diferencias significativas a lo largo de los dos ciclos de TMZ administrados, si bien siempre se encontró por debajo de los controles (Figura 20b). El índice de proliferación intratumoral medido por Ki-67, la expresión de PCNA o de proteínas asociadas a la proliferación (pERK o JNK) no se vieron modificados por el tratamiento (Figura 20c).

Por su parte, la tolerancia a la droga quedó demostrada en el peso corporal de los ratones tratados, el cual permaneció inalterable a lo largo del esquema de administración en comparación con los controles (Figura 20d).

En síntesis, los animales desarrollaron prolactinomas activos luego de la inyección subcutánea de los lactotropos MMQ, y TMZ tuvo una clara influencia inhibitoria sobre la producción hormonal de éstos y sobre la viabilidad de las células de los tumores, demostrando su carácter antitumoral en el modelo.

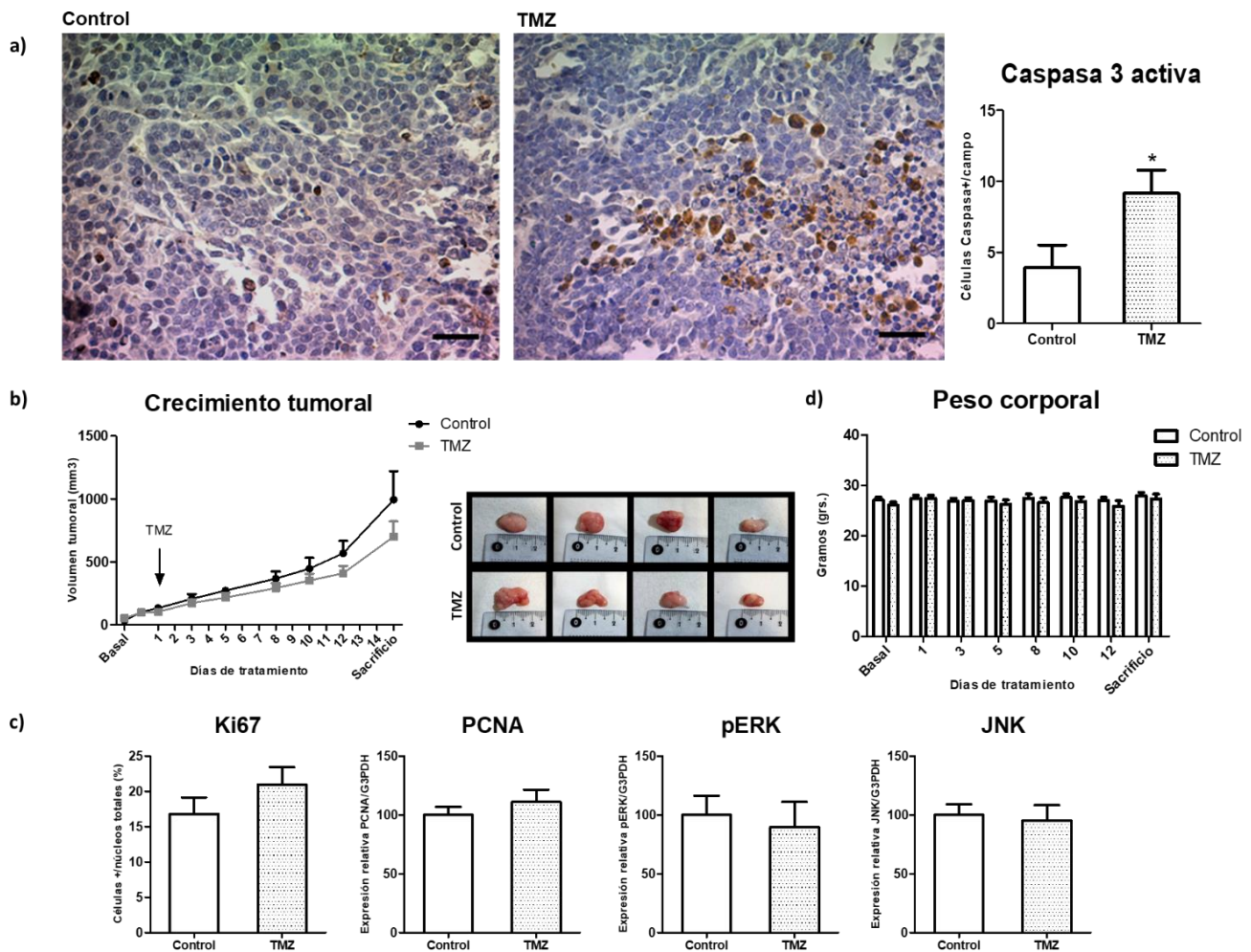


Figura 20. a) La tasa apoptótica de las células de los tumores antes y después del tratamiento fue analizada por IHQ para Caspasa 3 activa en secciones de tejido de los prolactinomas. Las células Caspasa 3 positivas se contaron en toda la sección de tejido y los resultados se expresaron como células positivas por campo 40x (N=7 y 6 Control y TMZ respectivamente, *p=0,03). Se muestran imágenes representativas de la IHQ para la Caspasa 3 en cortes de prolactinomas controles y tratados (40x, escala: 30 micrones). b) El volumen tumoral de los ratones control y tratados con TMZ se registró a lo largo del tratamiento utilizando un calibre y se expresó como mm³ (N=10 Control y TMZ, NS). Se muestran imágenes representativas de los tumores extraídos al final del tratamiento. c) Proteínas asociadas al crecimiento tumoral y a la proliferación celular medidas por WB en los homogenatos de los prolactinomas antes y después del tratamiento. La expresión de las proteínas fue relativizada a la de G3PDH y expresadas como porcentaje de los controles. d) El peso (grs.) de los animales durante el esquema de administración de la droga fue monitoreado y los resultados se muestran en el gráfico como promedio más error estándar de cada grupo.

Correlación de componentes de la vía de Wnt y prolactina, y efecto del tratamiento quimioterápico sobre la vía en los prolactinomas.

En el modelo de prolactinomas *in vivo*, investigamos también la relación entre prolactina y componentes de la vía de Wnt. De manera interesante y como ya habíamos descrito con anterioridad para las hipófisis normales *in vivo* (Figura 9), en este modelo tumoral también encontramos una fuerte correlación positiva entre β -Catenina y Prolactina tanto a nivel del mRNA como a nivel proteico (Figura 21a). A su vez, β -Catenina correlacionó con la síntesis de *Ciclina D1* (Figura 21b) reforzando la asociación de la activación de la vía de Wnt con la producción hormonal en los tumores secretores de prolactina, mientras que, entre los genes diana de la vía de Wnt evaluados, *Ciclina D1* correlacionó con *Prolactina*, pero no lo hicieron *c-Myc* ni *Pitx2* (Figura 21c). Adicionalmente, el tratamiento quimioterápico disminuyó significativamente tanto los niveles del mRNA de β -Catenina como los de *Ciclina D1*. Sin embargo, la expresión de la proteína β -CATENINA si bien mostró una tendencia a la reducción no alcanzó diferencias significativas luego del tratamiento con TMZ (Figura 21d). En línea con lo hallado anteriormente, los datos de la correlación mostraron que los prolactinomas de los animales tratados con TMZ expresaban menores niveles de estos componentes que los controles (puntos negros en Figura 21a-c).

Por otro lado, ni la expresión de los genes diana *c-Myc*, *Pitx2* ni la forma activa de la proteína GSK3 β (p-GSK3 β) componente del complejo de destrucción de β -Catenina, se vieron afectados por TMZ (Figura 21e).

En conjunto, nuestros resultados sugieren la participación de la vía de señalización Wnt/ β -Catenina en el desarrollo de los prolactinomas, puntualmente en la producción hormonal, y también como respuesta en la efectividad de TMZ en el control de estos tumores.

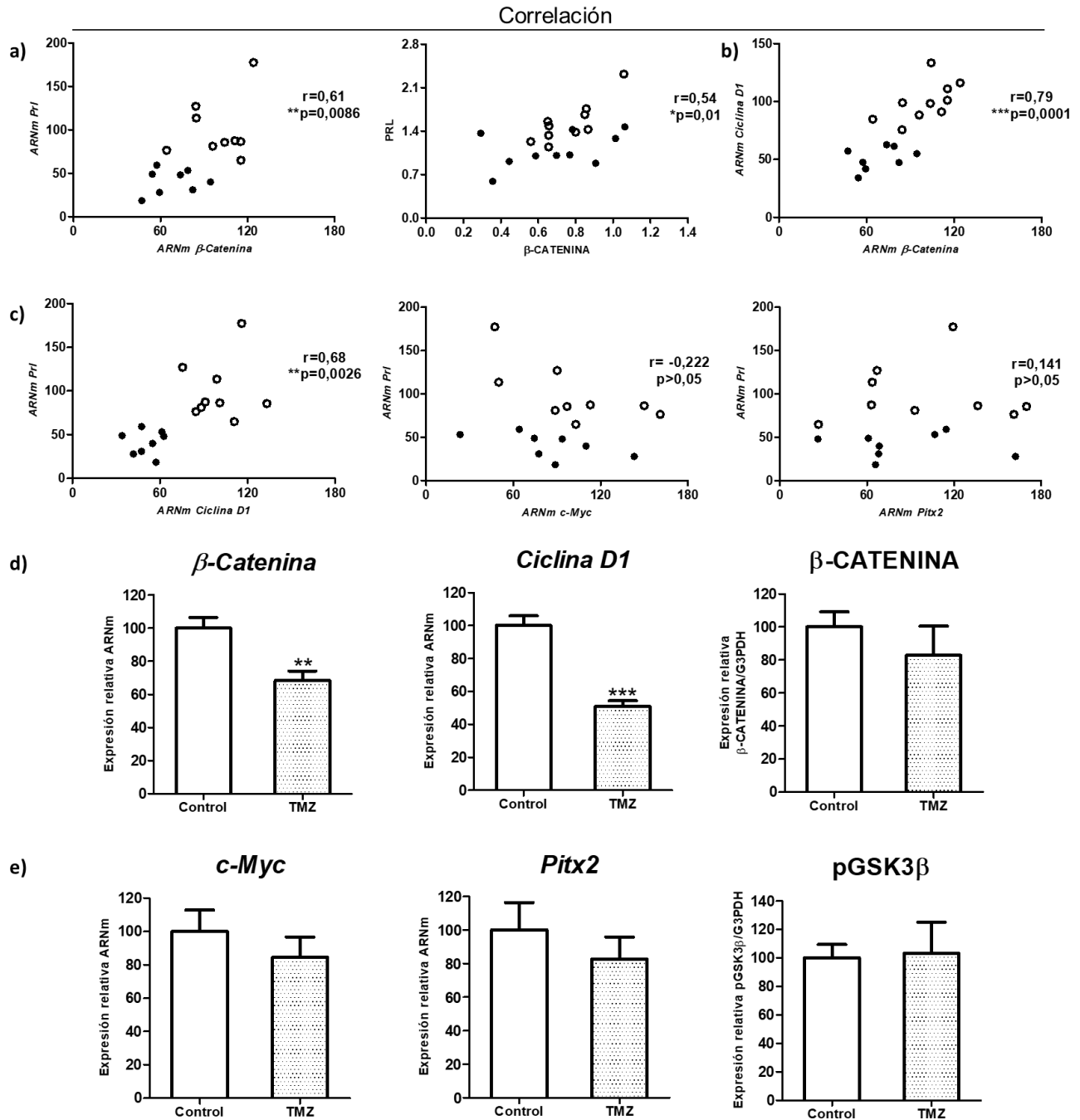


Figura 21: Se muestran en a) la correlación entre *Prolactina* y β -*Catenina* a nivel del ARNm (izquierda, N= 9 y 8 Control y TMZ respectivamente) y proteína (derecha, N=10 Control y TMZ), en b) la correlación de β -*Catenina* con *Ciclina D1* a nivel de ARNm (N=9 y 8 Control y TMZ respectivamente) y en c) la correlación entre los ARNm de *Prolactina* y los genes diana de la vía de Wnt: *Ciclina D1*, *c-Myc* y *Pitx2* (N=10 y 8 Control y TMZ, respectivamente para los tres genes). Los coeficientes de correlación de Pearson y el grado de significancia se encuentran indicados en los gráficos ($p \leq 0,05$ indica correlación significativa y $p > 0,05$ no significativa). d) Niveles de expresión del ARNm de β -*Catenina* y del gen diana *Ciclina D1* luego del tratamiento (N=9 y 8 Control y TMZ, ** $p=0,0025$ y *** $p=0,0001$ respectivamente). Los niveles de proteína de β -CATENINA no se modificaron después del tratamiento con TMZ (N=10 Control y TMZ, NS). e) La expresión de los genes diana *c-Myc* (N=9 y 8 Control y TMZ respectivamente, NS) y *Pitx2* (N=9 Control y TMZ respectivamente, NS) se cuantificaron por RT-qPCR, y los niveles de proteína pGSK3- β se analizaron por WB (N=6 Control y TMZ, NS). En todos los casos, la expresión de los genes de interés a nivel del ARNm se normalizaron a la expresión del gen constitutivo *Actina*. La expresión de proteínas fue estudiada por WB y se normalizaron a los niveles de G3PDH. Los datos se muestran como porcentajes de los controles.

TMZ no afecta al proceso de angiogénesis en los prolactinomas *in vivo*

La angiogénesis fue evaluada luego de la administración de TMZ en el modelo de prolactinomas *in vivo*. Ni los niveles intratumorales del mRNA o de la proteína de VEGF se modificaron por la administración de TMZ al compararlos con los controles (Figura 22a). *Fgf2*, otro factor angiogénico importante también se mantuvo sin alteraciones en su expresión en el tejido de los prolactinomas tratados con TMZ respecto a los no tratados (Figura 22b). Se determinó además, a través de la inmunomarcación para α -SMA, que el tratamiento quimioterapéutico no modifica el área vascular, la densidad microvascular o el tamaño de vasos sanguíneos de los tejidos de los prolactinomas comparados con los controles (Figura 22c). Adicionalmente, no determinamos diferencias en la expresión de la proteína CD31 presente en los prolactinomas tratados y controles analizada por WB luego del tratamiento (Figura 22d). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que TMZ no estaría modulando la respuesta angiogénica en este modelo *in vivo*.

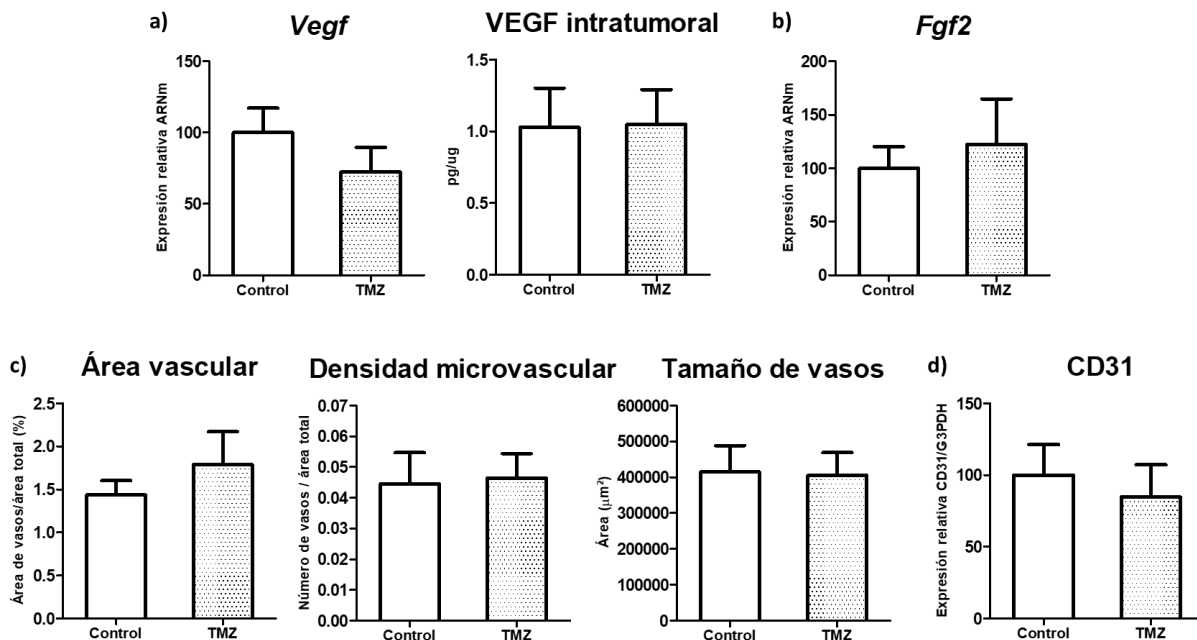


Figura 22. a) El VEGF intratumoral se analizó tanto a nivel del ARNm (N=9 y 8 Control y TMZ respectivamente, NS) como de proteína (N=10 Control y TMZ, NS) por RT-qPCR y ELISA (datos mostrados como pg/μg), respectivamente. b) La expresión de *Fgf2* también fue evaluada por RT-qPCR (N= 9 y 8 Control y TMZ respectivamente, NS). Los niveles de ARNm se normalizaron a la expresión del gen constitutivo *Actina*. c) El área vascular, la densidad microvascular y el tamaño de los vasos sanguíneos se estudiaron mediante la inmunotinción de α-sma en tumores xenotópicos después del tratamiento con TMZ (N= 6 y 9 Control y TMZ, NS). d) La expresión de CD31 se cuantificó por WB (N=7 Control y TMZ, NS). Los niveles de proteína se normalizaron a la expresión de G3PDH. Los datos se muestran como porcentajes de los controles.

TMZ inhibe la viabilidad celular e induce apoptosis y arresto de ciclo celular en las MMQ *in vitro*

Dada la fuerte asociación de la vía de Wnt y la producción hormonal que determinamos en los prolactinomas experimentales y el efecto antitumoral de TMZ a través del aumento de la apoptosis y la inhibición de la hiperprolactinemia y la vía de Wnt *in vivo*, el siguiente paso fue determinar el efecto directo de TMZ sobre los lactotopos tumorales MMQ *in vitro*. Se evaluó en primera instancia la viabilidad de las células MMQ por el ensayo de MTS luego de la administración de 200μM de TMZ. En este modelo encontramos que la viabilidad celular

disminuye luego de 72 h de tratamiento con TMZ (Figura 23a). En concordancia con esto, TMZ incrementó la tasa de apoptosis celular de las células tumorales evaluada por citometría de flujo cuando se las comparó con los controles (Figura 23b) de la misma manera que observamos con el tratamiento *in vivo* (Figura 20a). Estos efectos podrían estar causados por un arresto en fase G2/M del ciclo celular causado por TMZ luego de 24 h de tratamiento (Figura 23c. $p=0,09$; $*p= 0,013$ and $p=0,07$ para 12; 24 y 72 h respectivamente). Estos resultados demuestran que el agente alquilante ejerce su efecto antitumoral en forma directa sobre la proliferación de las células tumorales y su supervivencia. Por otro lado, en este modelo *in vitro* no detectamos cambios en los niveles de la proteína PRL como producto del tratamiento con TMZ como habíamos observado *in vivo*. Contrariamente, la síntesis del mRNA de *Prolactina* se incrementó luego de 48hs de tratamiento con TMZ, probablemente de manera compensatoria.

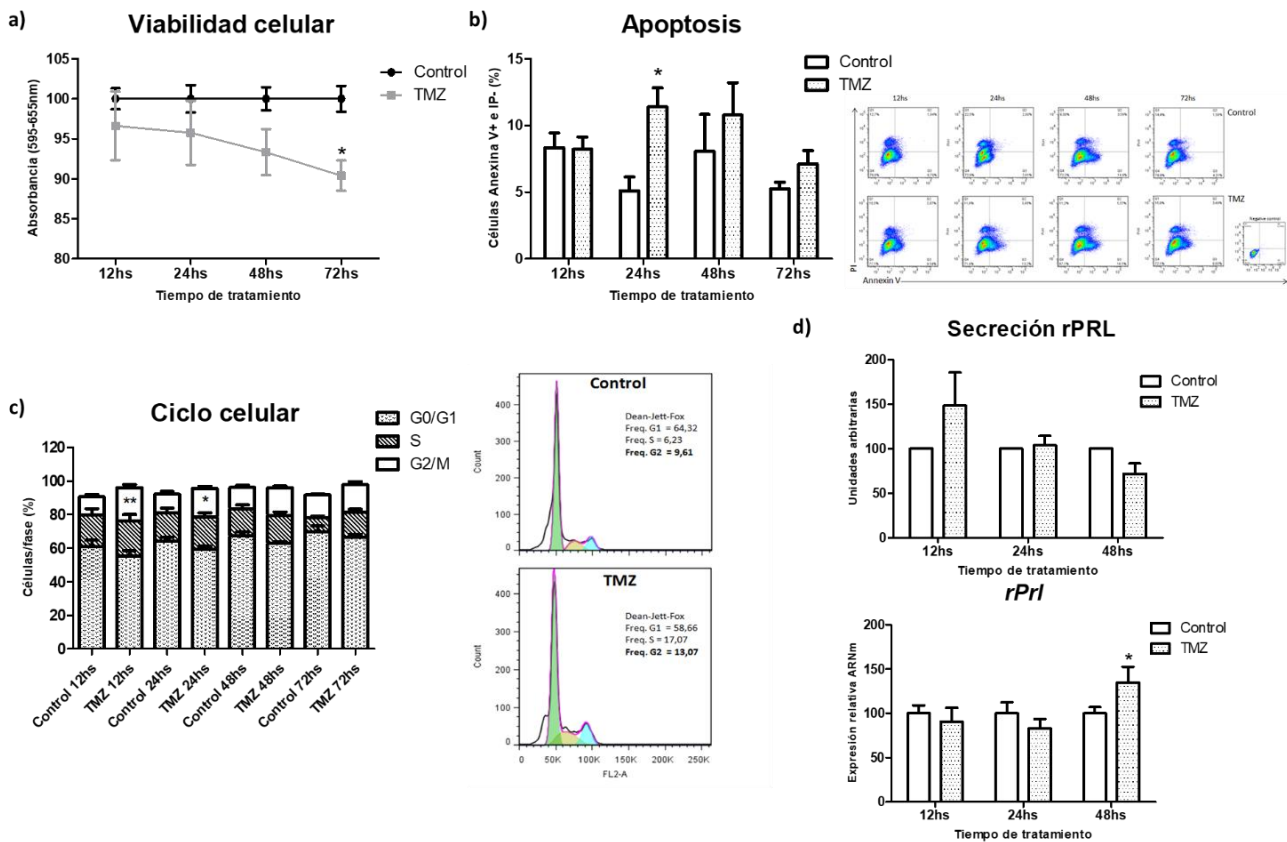


Figura 23. a) Se agregó TMZ directamente al cultivo de células MMQ durante 12, 24, 48 o 72 hs y se determinó la viabilidad celular mediante ensayo MTS. Los datos se muestran como porcentaje de los controles (N=5-7, *p=0,005). b) Se analizaron las células apoptóticas, (apoptosis temprana) luego del tratamiento con TMZ mediante Citometría de Flujo determinando la expresión de Anexina V y la tinción negativa para IP. Se muestran dot-plots representativos (N=4, *p=0,042). c) Se evaluaron los porcentajes de células control y tratadas con TMZ en diferentes fases del ciclo celular por CF y se analizaron de acuerdo al modelo Dean-Jett-Fox (N=6-3, *p=0,013 para 24 hs). Se muestran histogramas representativos del arresto del ciclo celular luego de 24hs de tratamiento con TMZ. d) Los niveles de expresión de Prolactina se determinaron mediante WB y RT-qPCR en células control y tratadas con TMZ. Los datos se muestran como porcentaje de los controles. Los niveles de PROLACTINA secretada se expresan en unidades arbitrarias. Los niveles de *rPRL* se relativizaron a la expresión del ARNm de *Actina* (N=4, NS y N=4 *p=0,027, respectivamente).

Inhibición de β -CATENINA en las células de prolactinoma MMQ por TMZ

Seguidamente y habiendo comprobado el efecto directo de TMZ sobre los lactotrofos tumorales, estudiamos su implicancia en la regulación de la vía de Wnt *in vitro*. El tratamiento

con TMZ redujo significativamente la activación de β -CATENINA luego de 48hs de tratamiento como determinamos por WB y Citometría de Flujo (Figura 24a) al mismo tiempo que tendió a disminuir los niveles del mRNA de β -Catenina previamente (Figura 24b), confirmando la influencia del tratamiento antitumoral sobre la actividad de este componente esencial de la vía de Wnt. Por otro lado, la expresión de *Ciclina D1* y de *c-Myc* no mostraron diferencias luego de tratamiento como había sido determinado en el modelo *in vivo*, mientras que los niveles del mRNA de *Pitx2* se incrementaron luego del tratamiento con TMZ (Figura 24c).

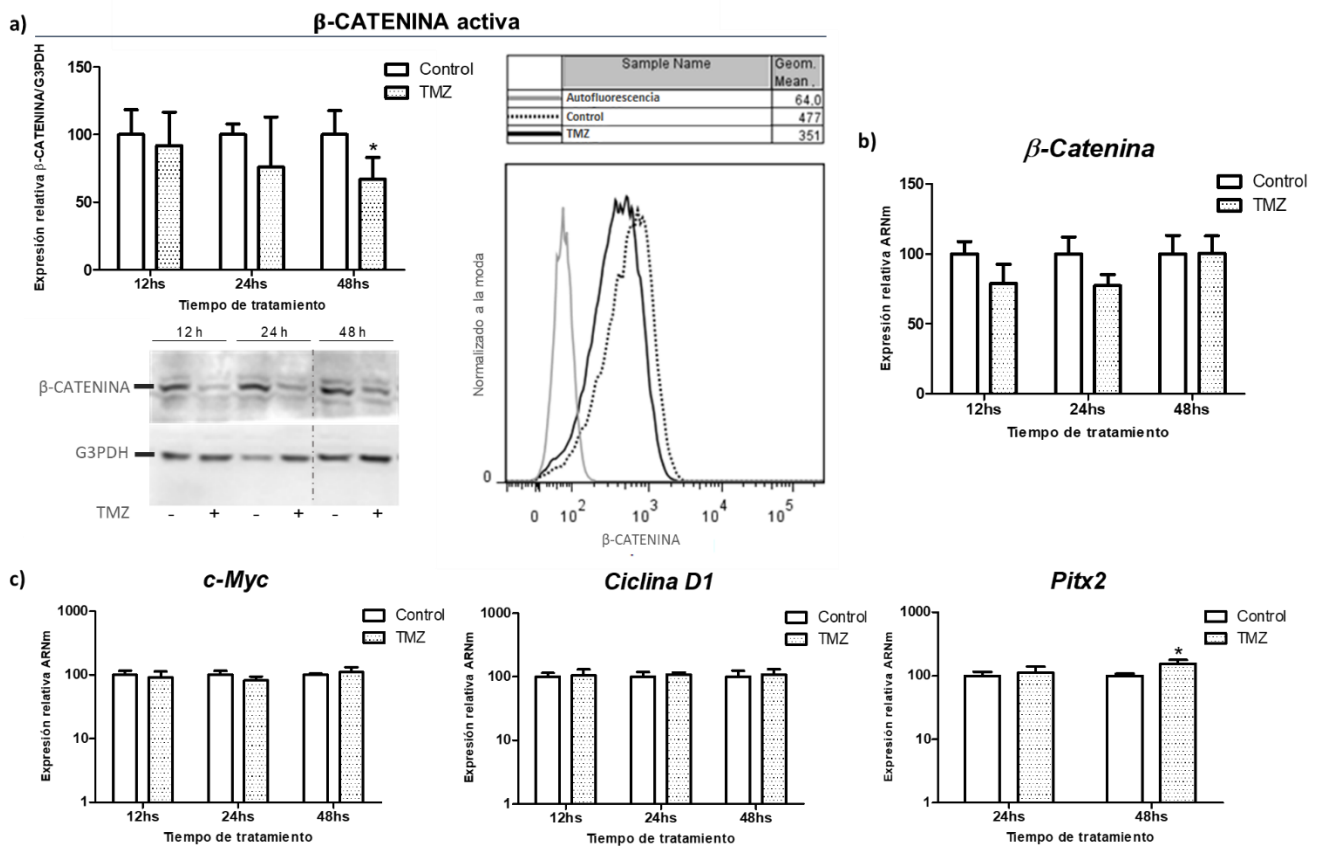


Figura 24. Se estudió la expresión y activación de componentes de la vía de señalización de Wnt en lactotropos tumorales luego del tratamiento *in vitro* con TMZ durante 12, 24 y 48hs. a) El estado de activación de β -CATENINA se analizó mediante WB (izquierda, N=4-5, *p=0,048) y CF (derecha, N=4-6, NS). Se muestran imágenes representativas de la expresión de β -CATENINA en células de prolactinoma control y tratadas con TMZ. La línea divisoria muestra el punto en el cual se unieron las dos partes del gel. Los histogramas de MIF (Intensidad de fluorescencia media) muestran la expresión de β -CATENINA en

el tratamiento con TMZ (negro) o Control (línea de puntos o discontinua). El control autofluorescencia también se representa en el gráfico (gris). b) Se cuantificó mediante RT-qPCR el efecto de TMZ en la expresión del ARNm de β -*catenina* (N=3, NS). c) Los niveles de ARNm de los genes diana de Wnt, *c-Myc* (N=3, NS), *Ciclina D1* (N=2, NS) y *Pitx2* (N=3, *p=0,009) se determinaron por RT-qPCR. En todos los casos, los niveles de ARNm se normalizaron a la expresión del gen de referencia *Actina* y se muestran como porcentaje de los controles. Los niveles de proteína evaluados por WB se normalizaron a la expresión de G3PDH y también se calibraron a los controles.

TMZ inhibe la secreción de VEGF de los lactotropos tumorales *in vitro*

A diferencia de lo hallado en el modelo *in vivo* (Figura 22) donde no detectamos cambios en los niveles de *Vegf* ni en los parámetros angiogénicos luego del tratamiento con TMZ, en las células MMQ *in vitro* determinamos una inhibición estadísticamente significativa de los niveles de VEGF secretados demostrando una regulación directa de TMZ sobre la respuesta angiogénica de las mismas (Figura 25a). Además, cuando evaluamos la capacidad angiogénica de los sobrenadantes de las células MMQ tratadas con respecto a los controles en un ensayo funcional sobre un cultivo de células endoteliales, encontramos que estas células mostraron una migración mucho más moderada que la de los controles denotando capacidades angiogénicas reducidas luego del tratamiento quimioterápico (Figura 25b). Por otro lado, no determinamos diferencias en la síntesis del mRNA de *Vegf* o *Fgf2* luego del tratamiento de las MMQ con TMZ, comparado con los controles (Figura 25c).

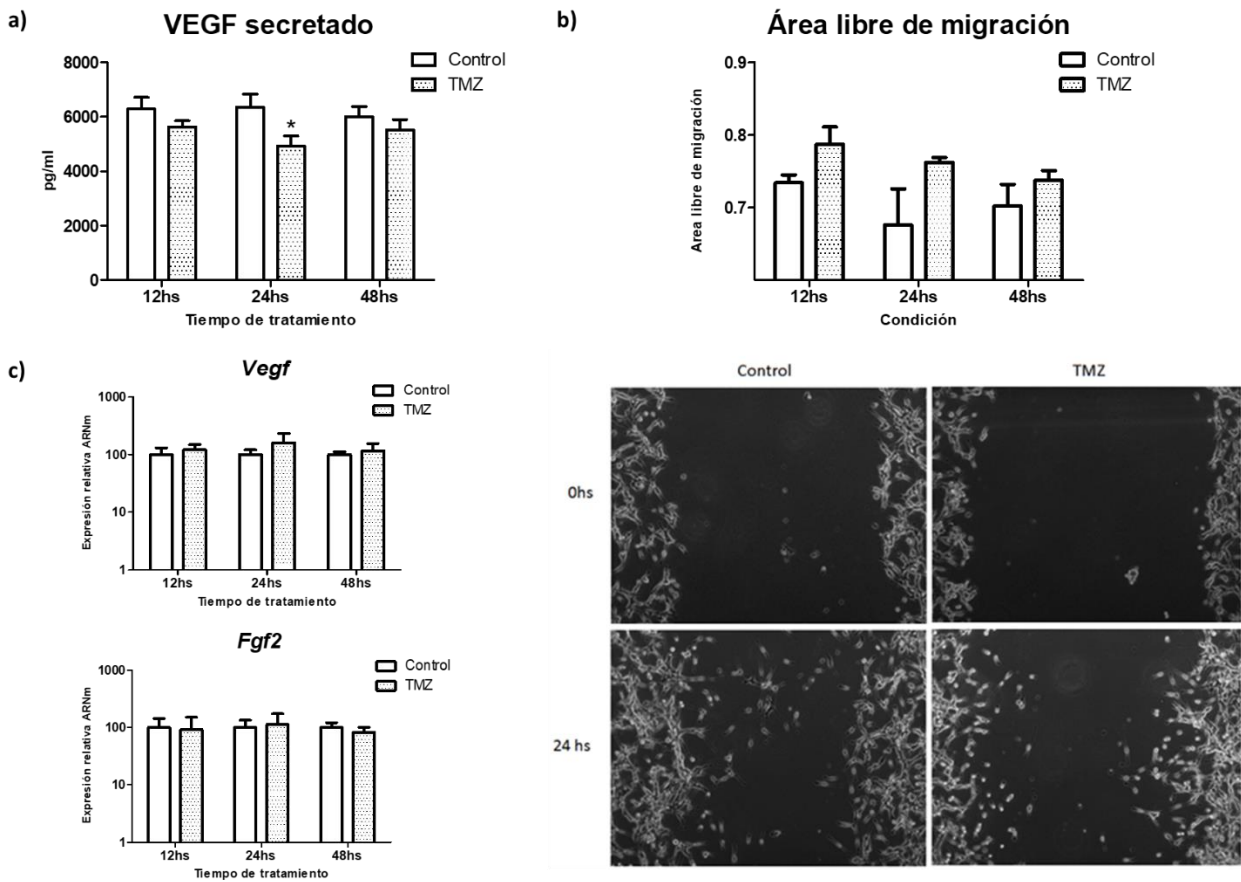


Figura 25. a) El VEGF liberado al sobrenadante de cultivo celular en respuesta a TMZ se determinó por ELISA (N=9, *p=0,04). Los datos se muestran en pg/ml. b) La capacidad angiogénica de los sobrenadantes del cultivo de MMQ controles y tratadas con TMZ se estudiaron a través de la migración de células endoteliales por el ensayo de cierre de herida. Se graficó el área libre de migración luego de 24 hs de cultivo de células endoteliales con los sobrenadantes de las células MMQ (tratadas o no con TMZ por 12, 24 y 48hs, N=2-5, NS). Se muestran imágenes representativas del ensayo de cierre de herida luego de 24hs de cultivo con medio condicionado (abajo). c) Se determinó la expresión del ARNm de *Vegf* (N=4, NS) y *Fgf2* (N=2-3, NS) por RT-qPCR luego del tratamiento con TMZ. Los niveles de ARNm se normalizaron a la expresión del gen de referencia *Actina* y se muestran como porcentaje de los controles.

VIA CANONICA DE WNT EN CORTICOTROPINOMAS Y EN MODELOS EXPERIMENTALES.

Respuesta de corticotropinomas experimentales al tratamiento con TMZ.

A raíz de los resultados de la expresión de β -CATENINA en el tejido de los adenomas hipofisarios de la cohorte de pacientes empleada (Figura 8) dónde, en contraoición a lo hallado en los prolactinomas, los corticotropinomas expresaron mayor β -CATENINA de membrana (Figura 8f) y menor índice de proliferación (Figura 8g), nos planteamos evaluar el estado de activación y la respuesta de la vía de Wnt/ β -Catenina frente al desarrollo y tratamiento de este tipo de adenomas hipofisarios secretores de ACTH.

Nuestros resultados en un modelo de corticotropinomas *in vivo* generado a través de la administración subcutánea de la línea de corticotropos tumorales de ratón AtT20 son preliminares hasta el momento pero de trascendencia para el trabajo. Cuando los corticotropinomas subcutáneos comenzaron a ser palpables, evaluamos el efecto de la administración oral de TMZ (20mg/kg) sobre el crecimiento tumoral durante el esquema de tratamiento y sobre el peso de los tumores al momento del sacrificio. Encontramos que en este modelo TMZ reduce modestamente el tamaño tumoral (Figura 26a) como así también el peso de lo corticotropinomas al final del esquema de tratamiento (Figura 26b), demostrando su posible efecto antitumoral en los adenomas experimentales. En este modelo determinamos también que la administración de TMZ promueve una moderada disminución del ARNm de *Ciclina D1* y de la proteína pGSK3 β , componentes de la vía de Wnt (Figura 26c), mientras que la expresión de la proteína β -CATENINA no fue detectada en este modelo. Adicionalmente, los resultados obtenidos con otras proteínas relacionadas a la proliferación celular (JNK) y a la angiogénesis (CD31) indican que estas también podrían ser blanco del tratamiento con TMZ en los corticotropinomas experimentales *in vivo* (Figura 26d).

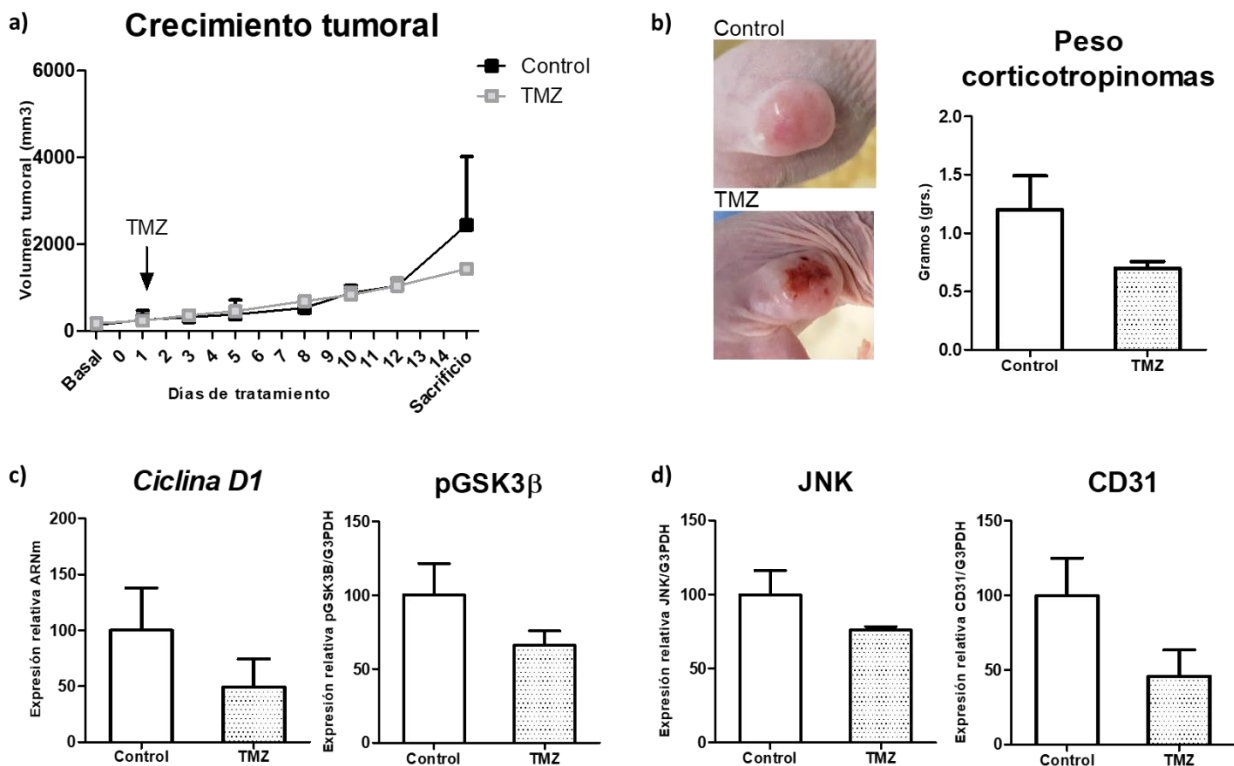


Figura 26. a) El crecimiento tumoral en animales con corticotropinomas subcutáneos a lo largo del tratamiento con TMZ fue registrado con calibre y expresado como la mediana del volumen tumoral más error (mm^3) (N=4 y 3 Control y TMZ respectivamente, NS). b) Se muestran imágenes representativas de los corticotropinomas generados por inyección subcutánea de las células AtT20 al final del esquema de tratamiento. El peso de los tumores (grs.) al momento del sacrificio de los animales fue registrado con balanza de precisión y graficado como promedio más error (N=4 y 3 Control y TMZ respectivamente, NS). c) La expresión del ARNm de *Ciclina D1* y la proteína pGSK3 β , componentes de la vía Wnt, y de proteínas asociadas a la proliferación y a la angiogénesis (d, JNK y CD31) fue evaluada por RT-qPCR y WB (N=4 y 3 Control y TMZ respectivamente, NS). La expresión de *Ciclina D1* fue relativizada al ARNm de *G3pdh* y la de las proteínas evaluadas por WB a la proteína G3PDH. En todos los casos los resultados se muestran como porcentaje de los controles.

Transformación de un corticotropinoma silente a agresivo: Activación de β -CATENINA, transformación de la vasculatura tumoral y efecto del tratamiento con TMZ.

Nuestros resultados en el modelo de corticotropinoma de ratón y la bibliografía demuestran efectos interesantes del tratamiento de este subtipo de tumor hipofisario con el agente quimioterápico TMZ. No obstante ello, los reportes no profundizan en los mecanismos

moleculares involucrados en este tratamiento. En este sentido y como parte del presente trabajo de tesis, evaluamos en un caso excepcional de un paciente con corticotropinoma silente que evolucionó a tumor agresivo secretor de ACTH, los cambios en parámetros angiogénicos y la expresión y localización de β -CATENINA en los tejidos tumorales obtenidos de las tres sucesivas cirugías de esta paciente con tumor hipofisario recurrente.

El caso se trata de una paciente femenina de 65 años quien, en 2008, consulta por alteraciones visuales, hemianopsia bitemporal y dolor de cabeza. La resonancia magnética pre-operatoria demuestra la presencia de una lesión selar y supraselar con compromiso del quiasma óptico, compatible con adenoma hipofisario (Figura 27).

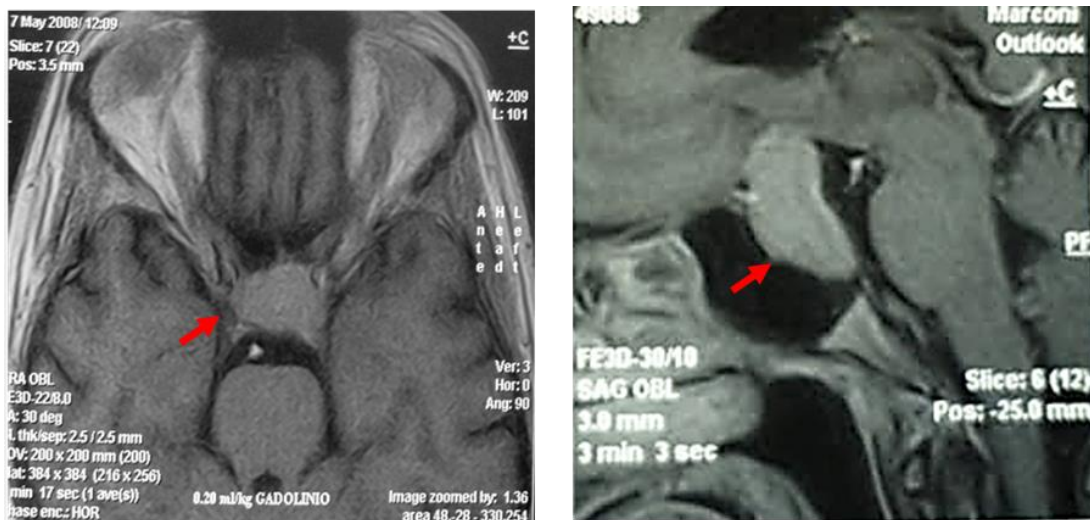


Figura 27. Imágenes representativas de la resonancia magnética axial (izquierda) y sagital (derecha) del tumor hipofisario silente con lesión selar y supraselar, y compromiso del quiasma óptico diagnosticado en la paciente en el año 2008. Las flechas rojas indican localización de la masa tumoral e invasión de regiones lindantes.

Se realiza cirugía transesfenoidal con resección total de la lesión. Los análisis anatomopatológicos posquirúrgicos determinan células de adenoma hipofisario sin signos de

necrosis y con un índice de proliferación determinado por la expresión de Ki67 menor al 1%, con inmunorreactividad positiva para ACTH y negativa para el resto de las hormonas hipofisarias. Dado este resultado, con ausencia ACTH y con Cortisol plasmático elevado, se lo diagnostica como corticotropinoma silente (Tabla 4). Los controles sucesivos demuestran mejoría de la agudeza y el campo visual con perfil hormonal normal. Luego del periodo habitual en el que los pacientes operados requieren de sustitución hormonal, esta paciente solo requirió administración de hormonas tiroideas. La paciente abandona los controles después del año de seguimiento.

En el año 2014 la paciente retorna a consulta médica mostrando aumento de peso, hipertensión arterial y diabetes. Al examen clínico se encuentra obesidad centripeta con estigma de enfermedad de Cushing. Se solicita análisis endocrino que muestra aumento del cortisol y ACTH plasmáticos y del cortisol libre urinario (patrón de enfermedad de Cushing, Tabla 4).

La RMN muestra un tumor gigante de la región selar con invasión de la región nasal, comprometiendo ambos senos cavernosos y extendiéndose alrededor de las carótidas. Se realiza una nueva exéresis con resección parcial dadas las características rígidas de la masa tumoral y el compromiso de las estructuras circundantes. El tejido proveniente de esta nueva cirugía denotó un adenoma cromóforo que sorprendentemente no inmunomarcó para ACTH a pesar de las claras características de enfermedad de Cushing. La inmunomarcación para Ki67 arrojó un índice del 9% y sumado a la reactividad de las células a p53 se clasificó al tumor como altamente agresivo. Los estudios endócrinos subsecuentes reportaron ACTH y cortisol en sangre elevados (Tabla 4). Se decide entonces realizar tratamiento con Ketoconazol y TMZ durante 6 meses (175mg/m²/día durante 5 días consecutivos al mes y descanso el resto de los

días). En el año 2015 aparece una nueva recidiva constatada por resonancia magnética. Se realiza una tercera cirugía y el tumor extirpado muestra inmunomarcación positiva para ACTH y una reducción en los valores de Ki67 de 9% a 4% sugiriendo que el tratamiento con TMZ en combinación con Ketoconazol logró reducir la proliferación celular tumoral sin alterar la secreción hormonal ni el tamaño tumoral.

Parámetro	Año		
	2008	2014	2015
Valores séricos pre-quirúrgicos			
ACTH (VN: hasta 46 pg/ml)	ND	175 pg/ml	132 pg/ml
PRL, TSH, GH, IGF	Normal	Normal	Normal
Cortisol plasmático (VN:5 - 25 ug/dl)	Normal	36 ug/dl	16.7 ug/dl
Cortisol libre Urinario (VN: 20 – 90 ug/24hs)	ND	436.8 ug/24hs	<u>91.2 ug/24hs</u>
RMN	Macroadenoma con compromiso visual	Tumor gigante con compromiso de senos cavernosos	Tumor recidivante
Diagnóstico	Corticotropinoma silente	Adenoma hipofisario agresivo secretor de ACTH	Adenoma hipofisario secretor de ACTH
Determinaciones pos-quirúrgicas			
ACTH	+	-	+++
Prolactina	-	ND	-
STH	-	-	-
LH y FSH	ND	-	-
Ki67	<1%	9%	4%
p53	ND	+	<1%
Necrosis	Ausente	Focos necróticos	ND

Tabla 4. Parámetros pre y post-quirúrgicos y diagnósticos del caso de adenoma hipofisario en estudio a lo largo de su transformación clínica. VN=Valor Normal. ND=No determinado.

Figura 28. a) Imágenes representativas de la inmunomarcación para α -SMA en muestras de los tejidos del corticotropinoma proveniente de las cirugías de 2008, 2014 y 2015 (10x, escala: 50 μ m). b) El área vascular (área de vasos/área total), el tamaño de los vasos (μ m²) y la microdensidad vascular (n° vasos/ μ m²) determinados a través de la expresión de α -SMA se muestra en la tabla como media de dos inmunohistoquímicas independientes más error estándar.

Seguidamente, determinamos por IHQ la expresión y localización de β -CATENINA en el tejido de los tumores de las tres cirugías a lo largo de su transformación de adenoma silente a corticotropinoma agresivo y luego de la normalización de los parámetros evaluados en 2015. La proteína localizó en membranas celulares, citoplasma y núcleo (Figura 29a) señalando un posible rol de Wnt/ β -Catenina en el desarrollo y evolución de los corticotropinomas agresivos. En las muestras provenientes de las cirugías de 2014 y 2015, a diferencia del tumor extirpado en 2008, fue posible la cuantificación de la proteína β -CATENINA. Determinamos en nuestro laboratorio una reducción en el porcentaje de células positivas para β -CATENINA de membrana desde 2014 a 2015, mientras que el porcentaje de células con β -CATENINA en citoplasma aumentó (Figura 29b). Estos resultados sugieren que la relocalización de β -CATENINA durante la expansión tumoral, probablemente asociada a la activación de la vía de Wnt, estaría acompañando al proceso de transformación al mismo tiempo que podría contribuir a la resistencia al tratamiento combinado administrado. El efecto observado en esta paciente en el contexto del tratamiento estaría afectando a la proliferación del tumor pero no a la secreción hormonal, lo cual al menos en parte, podría estar asociado con la expresión, activación y persistencia de β -CATENINA en el tumor.

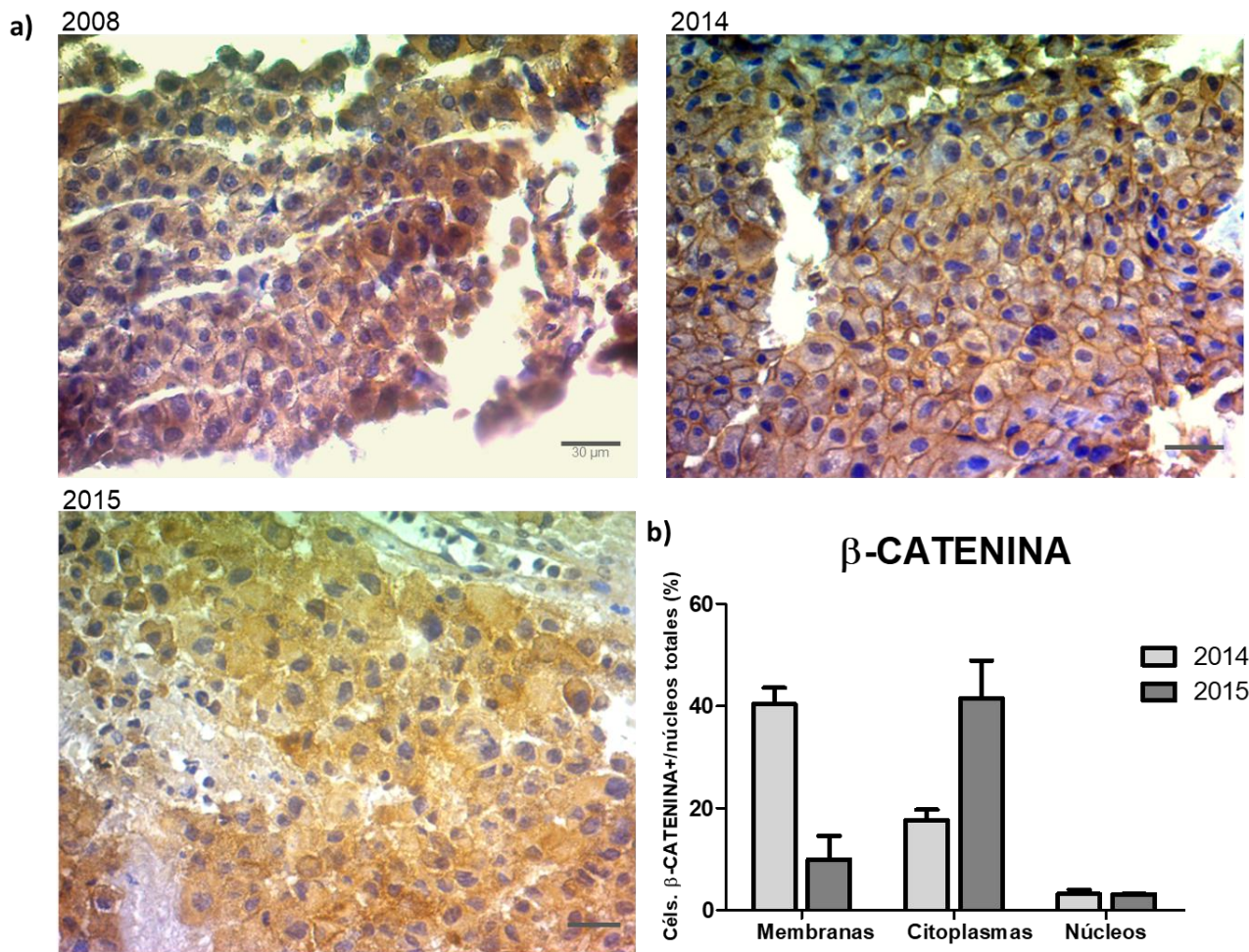


Figura 29. a) Imágenes representativas de la inmunomarcación para β -CATENINA en muestras de los tejidos del corticotropinoma proveniente de las cirugías de 2008, 2014 y 2015 (40x, escala: 30 μ m). b) Las células positivas para β -CATENINA en membrana, citoplasma y núcleo en los cortes histológicos de los adenomas de las cirugías de 2014 y 2015 fueron contadas, relativizadas al total de núcleos del campo y expresadas como porcentaje del total (los resultados se muestran como media y error estándar de dos experimentos independientes).

Estos resultados se encontraron en línea con los hallados con anterioridad en nuestros modelos experimentales, y nos llevaron a preguntarnos si la persistencia de β -CATENINA, se encuentra relacionada con la resistencia de los tumores hipofisarios agresivos. Esto nos motivó a evaluar si este componente de la vía de señalización canónica de Wnt asociada a células madre,

ampliamente involucradas en la generación de tumor, podrían ser causantes de la resistencia a las terapias de uso clínico en hipófisis.

Vía canónica de Wnt en la resistencia de tumores hipofisarios a TMZ: rol de las Células madre tumorales

Dado que muchos genes y vías de señalización incluyendo Shh, Notch y Wnt/ β -Catenina han sido relevantes por tener un rol regulatorio en células madre [89] y que se han aislado células madre tumorales en distintos tipos de cáncer [86] el siguiente paso fue estudiar el rol de las células madre tumorales en la tumorigénesis hipofisaria, particularmente en un modelo de corticotropos tumorales *in vitro*, y el efecto de TMZ en relación a esta población celular.

Como parte del trabajo de la presente tesis y en colaboración con el laboratorio del Dr. Vankelecom, en el marco del Subsidio Jorge Oster 2018 de perfeccionamiento en oncología financiado por la Fundación Bunge & Born, determinamos en la línea celular de corticotropos tumorales AtT20, que de las dosis de TMZ testeadas (20-200 μ M), la dosis de 100 μ M redujo significativamente la viabilidad de estas células tumorales luego de 24 o 72hs de tratamiento, demostrando su efecto antitumoral en este modelo *in vitro* de manera similar a lo hallado previamente en el modelo *in vivo* (Figura 30).

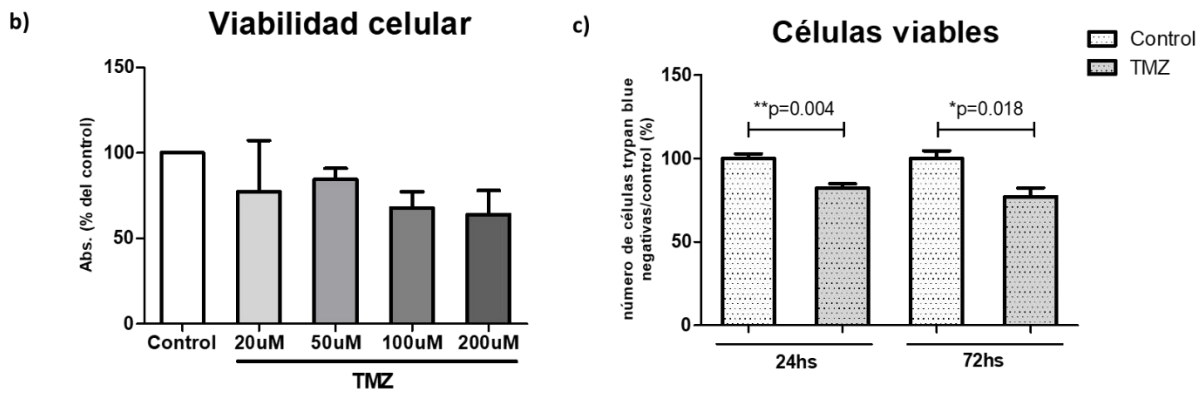
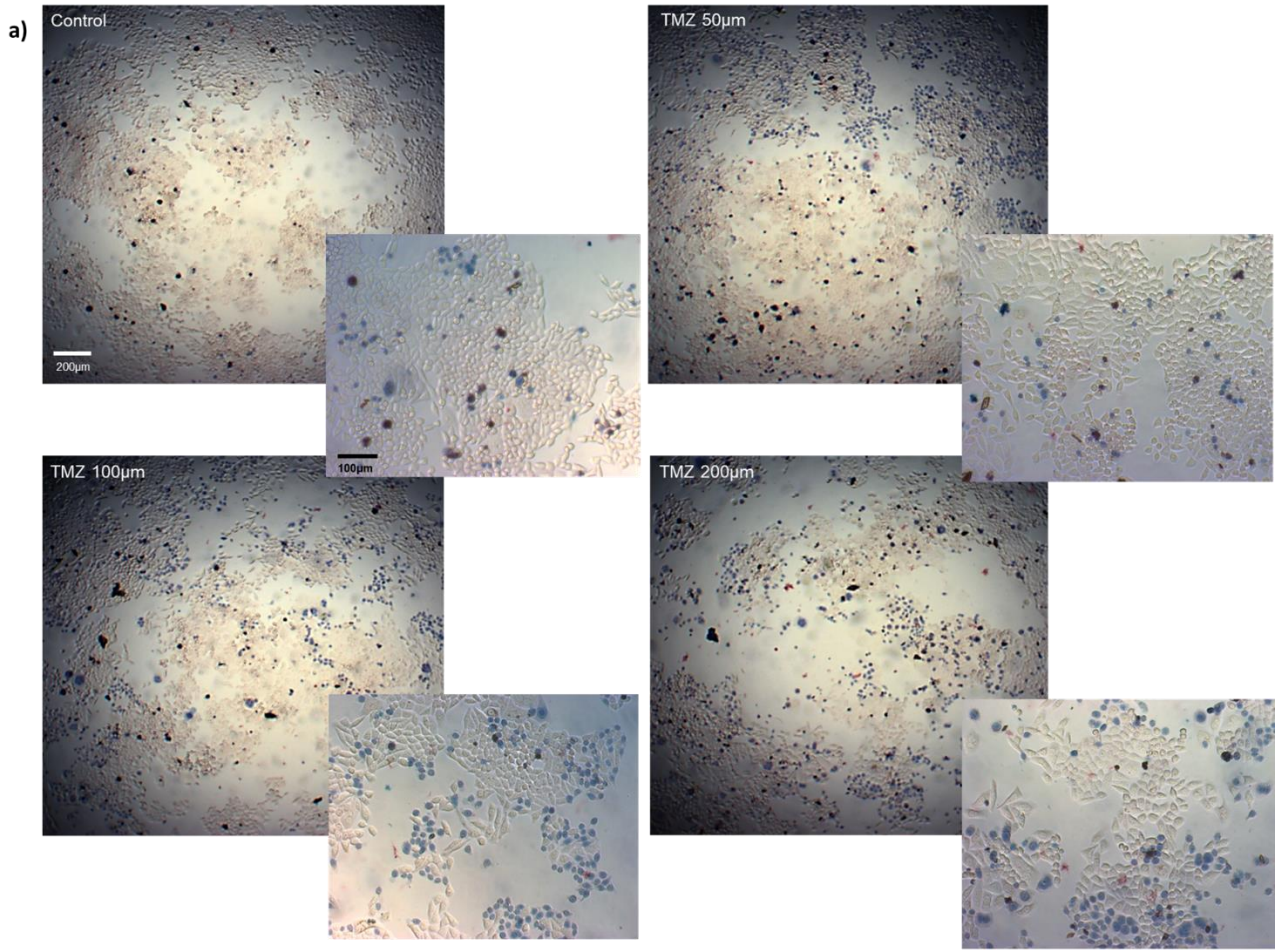


Figura 30. a) Se muestran imágenes representativas de las células AtT20 plaqueadas y tratadas con Trypan blue luego del tratamiento durante 72hs con la respectiva dosis de TMZ indicada en cada imagen (fotos 10x y 40x, Escalas=100μm y 200μm respectivamente). b) La viabilidad de las células AtT20 en cultivo bajo tratamiento con TMZ se determinó con el ensayo de MTS y se indica como porcentaje de los controles (24hs, Abs=595-655nm. N=3 Control y TMZ 20-200μM, p=0.06 para 100μM). La viabilidad de las células también se estudió por la cuantificación de células libres de Trypan blue relativo a la cantidad de

células totales, luego del tratamiento por 24 o 72hs con TMZ 100 μ M (b, N=3 Control y TMZ, **p=0.004 y *p=0.018 para 24 y 72hs respectivamente).

Como el grupo del Dr. Vankelecom ha reportado previamente [4], en la línea celular de corticotropos tumorales AtT20 existe una subpoblación de células que expresan marcadores de células stem o células progenitoras (células madre tumorales). La proporción de estas células puede estudiarse por el porcentaje de tumoroesferas que derivan de éstas cuando se cultiva a la línea celular en un medio específico para tal fin. Como parte del proyecto de colaboración con este grupo, evaluamos el efecto que ejerce TMZ sobre las células con fenotipo de célula madre tumoral presentes en la línea AtT20 a través del ensayo de formación de esferas. Luego de que las AtT20 fueran tratadas con 100 μ M TMZ (o con Medio o DMSO en caso de los controles), se sembraron en condiciones que favorecen el crecimiento de tumoroesferas. Determinamos que las esferas formadas se encontraban en proliferación activa determinada por la expresión de Ki67 por ICQ (Figura 31a), y que el porcentaje de éstas se encontraba en línea con los hallazgos previos realizados por el grupo del Dr. Vankelecom, dado que en las células controles se evidenció entre un 0,8 y 1,4% de esferas formadas que derivaron de las células madre presentes en la línea. De esta manera confirmamos la naturaleza stem de las mismas y la validez del ensayo para evaluar el efecto del agente antitumoral sobre las células madres tumorales.

Posteriormente, determinamos que el tratamiento con TMZ durante 24hs en los corticotropos tumorales promovió un aumento significativo en el número de tumoroesferas formadas a partir de ellas, indicando que TMZ es efectiva sobre la población celular susceptible no-stem, mientras que serían las células stem las que resisten al tratamiento generando un mayor número de

esferas que las células sin tratar, dado que se seleccionan en mayor proporción por haber resistido al tratamiento (Figura 31b). Seguidamente y para confirmar esta hipótesis, analizamos el efecto directo de TMZ sobre las esferas formadas a partir de AtT20 controles, sin tratamiento previo con TMZ. En este caso, no se encontraron diferencias significativas en el número de esferas formadas luego del tratamiento, apoyando la hipótesis de que las células madre que la originan son la población resistente al tratamiento quimioterápico (Figura 31c).

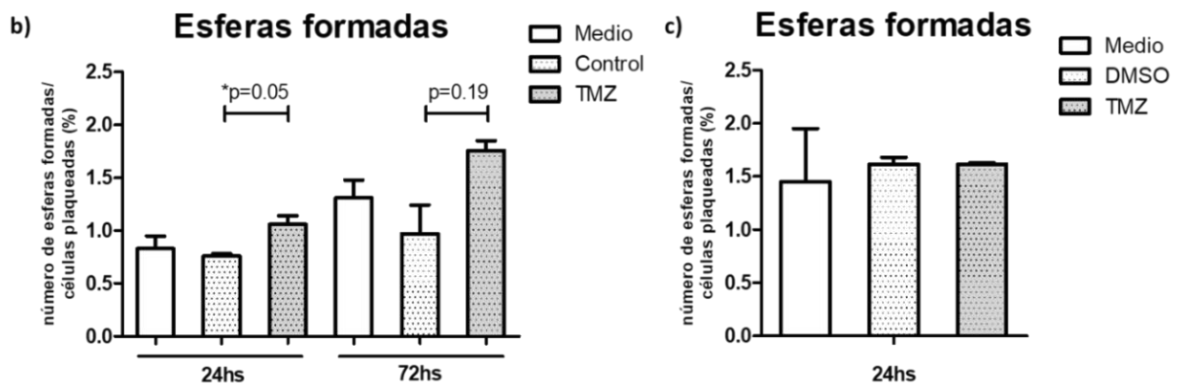
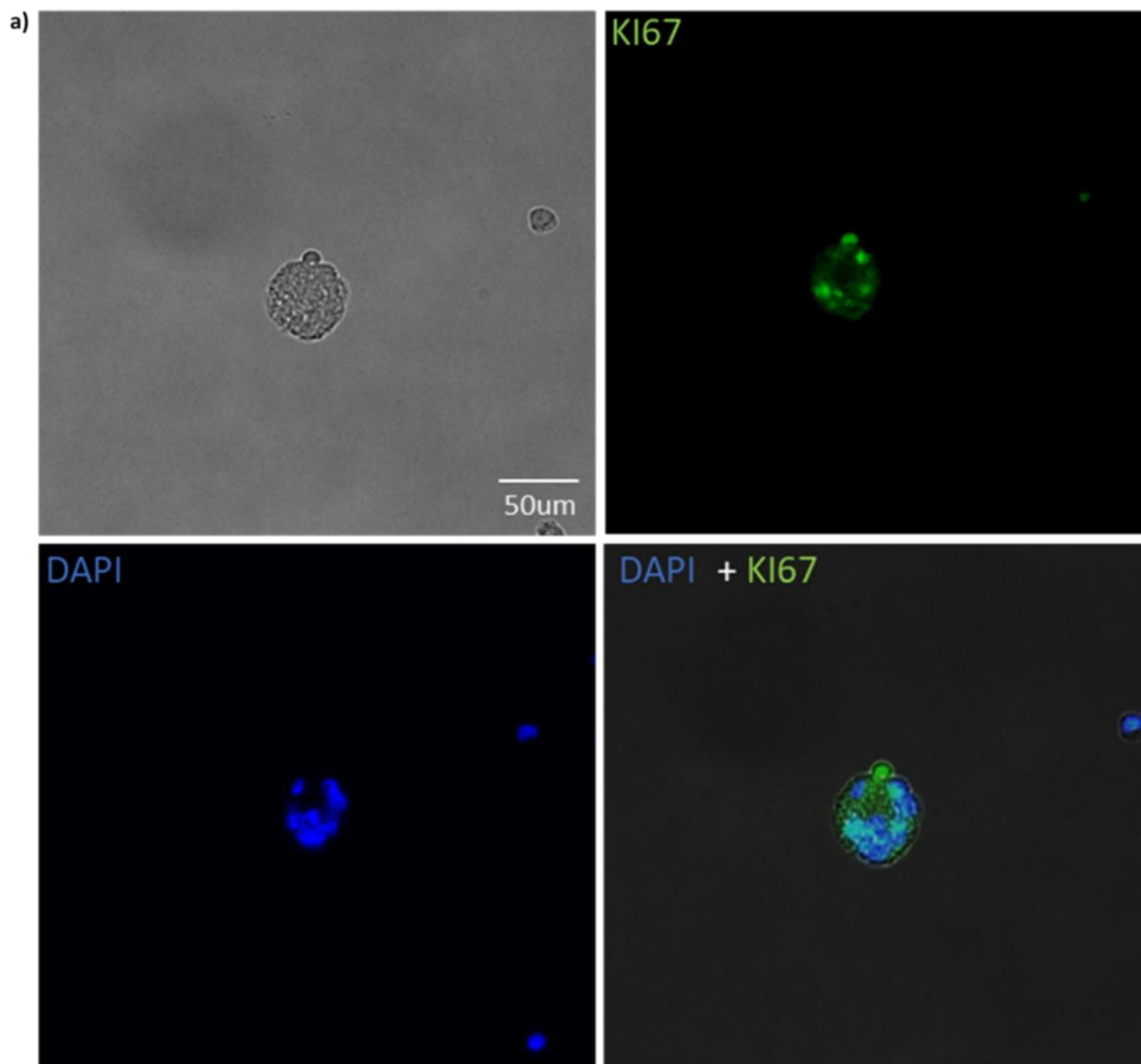


Figura 31: a) Imagen representativa de una tumoresfera formada a partir de los corticotropos tumorales. Pueden visualizarse los núcleos positivos para Ki67 en color verde y contrateñidos con DAPI en color azul (foto 20x, escala 50µm). b) Porcentajes

de tumoroesferas formadas a partir de los cultivos de AtT20 crecidas en Medio de cultivo o con DMSO (controles) o con 100 μ M de TMZ durante 24hs o 72hs (N=3, el grado de significancia se muestra en el gráfico). c) Porcentajes de tumoroesferas formadas a partir de los cultivos de AtT20 previamente crecidas en Medio. Una vez formadas las tumoroesferas se les administró Medio, DMSO o 100 μ M de TMZ y 24hs después fueron contadas (N=2, NS). En ambos casos los resultados se expresan como porcentaje del total de células sembradas para la formación de las esferas.

De esta manera, podemos inferir que una de las causas de quimiorresistencia y falta de respuesta a TMZ podría ser las células madre tumorales presentes en los tejidos neoplásicos incluido el hipofisario, y que la persistencia vista en la expresión de β -Catenina luego de los tratamientos en nuestra cohorte de tumores hipofisarios podría estar asociada a la existencia de estas células y a la resistencia tumoral. Estos resultados, si bien distan aún de poder asegurar la influencia de las células madre y más aun de la vía Wnt en la quimiorresistencia de los adenomas hipofisarios, sientan un primer antecedente sobre la influencia de TMZ en los lactotropos tumorales y la posible vinculación de las células madre y la resistencia tumoral. El estudio exhaustivo de la vía de Wnt en la respuesta de las AtT20 y de las tumoroesferas derivadas de éstas luego del tratamiento con TMZ aportará evidencia específica que complementará los resultados expuestos en el presente trabajo de tesis.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

Los tumores o adenomas hipofisarios son los tumores intracraneales más frecuentes que expresan características histológicas, morfológicas y patológicas variables [3], en general son benignos y responden bien a los tratamientos convencionales que van desde medicación oral hasta cirugía transesfenoidal o radioterapia [3, 7]. Sin embargo, un grupo de estos tumores presenta características más invasivas, agresivas y de resistencia a drogas convencionales y se convierten en entidades muy complejas de manejar [3, 29]. En este aspecto, Temozolomida (TMZ), un agente ampliamente utilizado en el tratamiento de gliomas malignos, comenzó a mostrar resultados prometedores en el tratamiento de tumores hipofisarios agresivos conduciendo a una reducción de tamaño del tumor y de la secreción hormonal en algunos casos, aun cuando los mecanismos celulares con los cuales interacciona para este fin, son desconocidos [9, 13, 73]. La vía Wnt/ β -Catenina asociada al mantenimiento de células madre, ha sido implicada en la patogénesis de una serie de tumores humanos [54, 103, 104], y en lo que respecta a la tumorigénesis hipofisaria, muchos autores han reportado su activación en los distintos subtipos tumorales [54, 62, 63] mientras otros no encontraron tal asociación [66]. En la búsqueda del entendimiento de mecanismos de la acción de TMZ en las lesiones neoplásicas, se ha asociado la activación de vías de señalización celular tales como ERK y mTOR con la quimioresistencia en gliomas y en menor medida en los adenomas hipofisarios [81-83]. Por su parte, ha sido publicado la inhibición de la vía de Wnt/ β -Catenina aumenta la toxicidad de TMZ en líneas celulares de carcinoma de colon, glioblastoma, meduloblastoma y neuroblastoma [84, 105]. Sin embargo, en los tumores hipofisarios, esta relación aún se desconoce y requiere de estudios.

La importancia de estudiar el rol que cumple la vía de Wnt en tumores hipofisarios humanos y en modelos experimentales radica en la búsqueda de nuevo conocimiento que permita expandir los blancos terapéuticos para el tratamiento de los adenomas hipofisarios resistentes a las terapias convencionales. En este trabajo de tesis, estudiamos la expresión de β -CATENINA y el estado de activación de la vía Wnt a través de sus diferentes componentes, en adenomas hipofisarios humanos obtenidos de cirugía, en lactotrofos activados farmacológicamente y en modelos murinos de prolactinomas y corticotropinomas con el fin de dilucidar su importancia en la patogénesis hipofisaria.

En primer lugar, nos abocamos al estudio de las características de expresión y localización de β -CATENINA en el tejido tumoral hipofisario de una cohorte de 15 pacientes diagnosticados con tumores secretores de PRL, GH, ACTH y no funcionantes, y lo comparamos con la expresión en el tejido hipofisario normal. Determinamos la presencia de la proteína principal de la vía de Wnt, β -CATENINA, en todos los casos de tumores estudiados y en el tejido hipofisario normal. Particularmente se destacaron los prolactinomas por ser el subtipo de tumor hipofisario con menor expresión significativa de la proteína en membrana comparado con la hipófisis normal. Como ha sido reportado por Kam *et. al* [51], la disminución de la proteína β -CATENINA en la membrana podría dar cuenta de la activación de la vía de Wnt, y en este caso, en este caso particular de adenomas. La localización de la proteína en el tejido de los adenomas hipofisarios ha sido siempre un tema controversial. Algunos autores no hallaron cambios en la localización de β -CATENINA, encontrándola siempre expresada en membrana tanto en tumores hipofisarios como en hipófisis normales, a pesar de encontrar aumentada en los tumores la expresión de c-MYC, diana de la vía canónica de Wnt [102]. Sin embargo, Semba y colaboradores reportaron

una localización diferencial de β -CATENINA en el 57% de los tumores hipofisarios que analizaron, encontrando a β -CATENINA en núcleo y citoplasma. Contrariamente, en las hipófisis normales sólo encontraron a esta proteína expresada en la membrana [56]. De acuerdo con ello, en otros trabajos reportaron localización de β -CATENINA en núcleo en tumores no funcionantes y secretores [57]. A su vez, Lui *et. al* determinaron la expresión de β -Catenina y c-Myc en un 80% de los casos de NFAs analizados [106]. Otros autores, en cambio no encontraron localización nuclear de β -CATENINA en tumores [54, 65] o relación de la proteína con indicadores de agresividad tumoral (recaídas) en pacientes con prolactinomas invasivos [107]. En cuanto a la expresión génica de componentes de la vía, en muestras de prolactinomas humanos resistentes a Bromocriptina, la expresión del mRNA de *β -Catenina* no mostró diferencias mientras que el del inhibidor de la vía de Wnt, *Wif1*, resultó disminuido con respecto a hipófisis normales. En estos tejidos, además, el ARNm del receptor de estrógenos se encontró aumentado [108].

Otro aspecto a resaltar fueron las características de alta proliferación que presentaron los prolactinomas de la cohorte empleada en este trabajo de tesis, evidenciado por altos niveles de expresión de Ki67. Adicionalmente, hallamos que, en esta cohorte de tumores hipofisarios, la activación de β -CATENINA se relacionó íntimamente con las características de mayor agresividad de los tumores. En la literatura, la expresión diferencial de β -CATENINA y los inhibidores de la vía Wnt, WIF1 y sFRP4, se relacionó con la invasividad en un grupo de 52 somatotropinomas, dónde se describió que cuanto más invasivo era el tumor, mayor expresión de β -CATENINA y menor de los inhibidores presentaba [109].

Dado que, de nuestros resultados en tumores de pacientes resaltó el protagonismo de la activación de la vía Wnt/ β -Catenina en los prolactinomas y su relación con la agresividad tumoral, profundizamos el estudio de esta relación en modelos murinos. Nuestros resultados en tejido hipofisario de ratones controles de la cepa BalbC indicaron la fuerte correlación positiva entre β -Catenina y el gen de *Prl*, sugiriendo a la vía de Wnt como posible promotora de la producción hormonal del lactotrofo. Nuestro objetivo siguiente fue evaluar la respuesta de esta vía frente a la estimulación de los lactotrofos de manera farmacológica a través de la administración crónica de Estradiol *in vivo*. El Estradiol juega un papel importante en el desarrollo y progresión de los tumores hipofisarios murinos [110]. Este afecta directamente la secreción de prolactina mediante varios mecanismos, entre ellos la estimulación de la transcripción del gen de esta hormona y la modificación de la respuesta de los lactotrofos a factores tanto estimulatorios como inhibitorios [111]. Consecuentemente, la administración periódica de estrógenos en ratones conlleva a una hiperplasia hipofisaria de lactotrofos, hiperprolactinemia y aumento del tamaño hipofisario [112]. En el tejido hipofisario de los animales tratados, confirmamos la activación de los lactotrofos como respuesta al estímulo estrogénico a través del aumento en la expresión de la transcripción y la síntesis de prolactina, como también determinamos activación de β -CATENINA en respuesta a la estimulación. Dichos hallazgos se encuentran en línea con lo observado en trabajos previos de nuestro laboratorio en ratones de la cepa C57 estimulados con Estradiol [113].

En relación a la influencia del Estradiol en la acumulación nuclear de β -CATENINA y consecuente activación de la vía de Wnt, Xiaonan *et al.* describieron resultados similares en tejido uterino de animales tratados *in vivo* con Estradiol por 6 horas y este proceso se llevó a

cabo de manera ER independiente. Esta acumulación nuclear de β -CATENINA resultó persistente luego de 24hs y no ocurrió en los animales controles [114].

En el caso de hipófisis murinas *in vivo*, la influencia de la vía del Estradiol sobre la expresión de β -Catenina tanto a nivel génico como proteico fue descrita a través de la inhibición por Fulvestrand, antagonista del receptor de E2, en prolactinomas generados con E2 en ratas F344. Fulvestrand indujo, de acuerdo a lo reportado por estos autores, la expresión del inhibidor de la vía de Wnt, WIF1 [16].

En el modelo *in vivo* también encontramos una discreta regulación positiva de β -Catenina, *Ciclina D1* y el factor de transcripción *Tcf4* como respuesta a la estimulación de los lactotropos. Confirmamos estos hallazgos sobre la modulación de los componentes de Wnt al activar a los lactotropos con Haloperidol *in vivo*, en donde la respuesta fue incluso más evidente. El Haloperidol es un antagonista dopaminérgico que provoca un aumento de la proliferación y de la actividad de los lactotropos, generando hiperplasia e hiperprolactinemia. *Sutton et. al* reportaron que el Haloperidol también estimula la vía canónica de Wnt a través de la modulación de componentes tales como WNT5A, DSH3, Axina, GSK-3 y β -CATENINA en la corteza prefrontal y en líneas celulares de feocromocitomas y neuroblastomas de ratas. Este efecto del Haloperidol sobre la vía de Wnt/ β -catenina estaba vinculado a la actividad del receptor de dopamina RD2 [115].

El efecto directo sobre las células adenohipofisarias aisladas a partir de hipófisis estimuladas *in vivo* evidenció indicios de la activación de Wnt descrita más arriba, indicando un efecto directo del estímulo estrogénico sobre las células hipofisarias en relación a la activación de Wnt. En

concordancia con nuestro trabajo, Hou *et al.* también describieron la modulación positiva de genes de la vía de Wnt tales como *Wnt4*, *Wnt5* y *Fzd2* luego del estímulo *in vivo* con Estradiol en útero de ratones, mientras que otros genes permanecieron inalterados o incluso disminuyeron (*Wnt1*, *Wnt3*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Fzd4*, *Fzd6*, y *Fzd7*) [116].

A diferencia de nuestro trabajo, otros autores si bien describieron el aumento del mRNA de *Wnt4* en hipófisis de ratas Fischer tratadas con Estradiol y en la línea de somatolactotopos GH3, no detectaron activación de la vía canónica de Wnt en estas células, ni tinción nuclear para β -CATENINA, lo que podría dar cuenta de que el efecto del tratamiento estaría dirigido por la vía no canónica de Wnt en estos modelos experimentales de rata [117]. Otras publicaciones en la línea MtT/S de somatotropos tumorales tratados con estrógenos reportan que *Wnt4*, está involucrado tanto en la vía canónica como no canónica, y que en estas células actuaría a través del receptor FZD6 [118]. Sumado a la influencia en sistemas de estudio normales *in vivo*, estos y otros autores describen además que el Estradiol aumenta la proliferación de las células somatolactotropas tumorales GH3 *in vitro* [119, 120].

Por otra parte, en el modelo de lactotopos tumorales MMQ, la búsqueda bibliográfica arroja muy pocos trabajos publicados sobre el efecto del tratamiento con Estradiol sobre la línea. Particularmente, sólo unos pocos trabajos indican la relación a través de la inhibición del receptor de Estrógenos y no sobre la estimulación directa con Estradiol. Leng y colaboradores describieron, por ejemplo, que la administración de antagonistas del receptor de estrógenos disminuye la viabilidad y la secreción de prolactina en las células MMQ [121]. El mismo efecto sobre la viabilidad celular y la secreción hormonal fue descrito para el antagonista del Estradiol en la línea tumoral hipofisaria GH3 [108]. Destacamos que, en el modelo *in vitro* de lactotopos

tumorales MMQ, el estímulo con E2 aumenta los niveles de la proteína β -CATENINA activa y como consecuencia, los del mRNA del gen diana de la vía *Ciclina D1*, indicando la activación de la vía de Wnt en este modelo.

En la literatura, el antiestrógeno Fulvestrant promueve el aumento del mRNA de *Wif1* mientras que disminuye los niveles del ARNm de β -Catenina de manera dosis dependiente en células MMQ y en GH3. Posteriormente este grupo confirma que los efectos antitumorales del Fulvestrant en las MMQ y en las GH3 estarían dirigidos por la vía de Wnt/ β -Catenina [108].

Contrariamente a lo anteriormente citado, nuestros resultados sobre la viabilidad, la apoptosis celular y la expresión del factor angiogénico VEGF en las MMQ luego del Estradiol no se vieron modificadas con el tratamiento. En cambio, en la literatura se describió un efecto antiapoptótico del Estradiol sobre las células GH3, a través de la supresión de la actividad de las caspasas 8 y 9 [120]. A su vez se vio que el Resveratrol, un fitoestrógeno con efecto anti-estrogénico, induce la apoptosis celular al mismo tiempo que disminuye la producción hormonal en éstas células [122].

El efecto activador de 10^{-8} M de Estradiol sobre la vía de Wnt en este modelo sin compromiso aparente sobre la producción hormonal y la viabilidad celular, opuestamente a lo observado en los lactotopos normales estimulados, nos lleva a interpretar que en el lactotopo tumoral o bien estaría dissociada la respuesta funcional con la de la vía de Wnt, o bien que en este modelo, dadas sus características de crecimiento y producción hormonal excesivas y desreguladas, no sea suficiente o incluso no sea posible provocar un efecto notorio sobre éstos parámetros.

En resumen, observamos que β -CATENINA se encuentra activa en prolactinomas humanos y estaría asociada a la agresividad tumoral, y a su vez esta proteína está íntimamente ligada a la producción de prolactina de acuerdo a lo determinado en los lactotropos estimulados. A diferencia de esta condición de estímulo farmacológico *in vivo*, el efecto del compuesto estrogénico en la línea tumoral de prolactinoma MMQ es más efectivo en la respuesta de la vía de Wnt que en la funcionalidad de las células tumorales. Nuestros resultados aportan nueva evidencia al mecanismo molecular por el que esta señal podría contribuir a la tumorigénesis hipofisaria. La inhibición de la secreción de PRL es un blanco clave en el tratamiento de los prolactinomas y nuestro hallazgo la vincula a la expresión de β -Catenina, nexo interesante al momento del diseño de terapias combinadas en los prolactinomas resistentes a los agonistas dopaminérgicos.

Describimos que en las células MMQ, Wnt3a desencadena efectivamente la respuesta de la vía canónica de Wnt a través de β -Catenina y Ciclina D1. A su vez la activación de β -CATENINA correlaciona positiva y significativamente con los niveles de C-MYC presentes en los lactotropos tumorales controles, apoyando la existencia y capacidad de activación de la vía en este modelo. De manera interesante, la expresión de β -CATENINA y C-MYC fue reportada en adenomas hipofisarios no funcionantes de pacientes donde la expresión de ambos componentes correlacionó positivamente con la agresividad de los mismos, y β -CATENINA lo hizo además con la recurrencia [106]. Por su parte, en cáncer de colon, ambos componentes se encontraron asociados a la ocurrencia de cáncer de crecimiento lateral [123].

En línea con lo anteriormente observado sobre la estrecha relación de β -Catenina y prolactina, Wnt3a promueve un aumento en la regulación del gen de la hormona y una tendencia a

incrementar su secreción en conjunto con el aumento en los niveles de β -CATENINA activa. En contraposición al efecto dissociado del Estradiol sobre la regulación de β -Catenina y prolactina que observamos en las MMQ, estos resultados de la activación directa de la vía refuerzan dicha relación. No encontramos diferencias en cuanto al efecto de la activación por 1ng/ml de Wnt3a en la viabilidad celular. De la misma manera, Tang *et al.* reportaron en la línea de gonadotropos tumorales humanos HP75 que la estimulación por distintas dosis de Wnt3a en el tiempo o la sobreexpresión de β -CATENINA, si bien también aumentan los niveles de esta proteína en las células, no es suficiente por sí sola para aumentar la proliferación. Para lograr este fenómeno en las células HP75, es necesario el crosstalk con la vía de señalización de Shh a través de SOX2 [124]. En cáncer de próstata, en cambio, ha sido demostrado que la inhibición de la vía canónica de Wnt por miR-129-5p inhibe también la proliferación, la migración y la invasión celular evidenciando la influencia de la vía Wnt en el crecimiento de este tipo de tumor [125].

En concordancia con los resultados descritos en la proliferación celular, no observamos diferencias en el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. No hallamos, al momento, datos en la bibliografía en torno a la influencia de Wnt en el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en lo que respecta a tumores hipofisarios. En lugar de ello, fue reportado que un ARN no codificante (lncSNHG1) que se encuentra aumentado en tumores hipofisarios invasivos, activa la vía de Wnt a través de la expresión de β -Catenina, Ciclina D1 y c-Myc al mismo tiempo que provoca un aumento en la velocidad del ciclo celular cuando se lo sobreexpresa en células GH1 y RC-4B/C [126]. En modelos de cáncer colorectal, por su parte, fue publicado que la vía de señalización de Wnt/ β -Catenina está posiblemente implicada en el

desarrollo de la patología a través de la regulación del ciclo celular y proteínas reguladoras del mismo [127].

Observamos además, que la activación por Wnt3a en los lactotropos tumorales genera una aparente disminución de la apoptosis de los mismos indicando que la vía podría estar contribuyendo a la supervivencia de las células en el contexto tumoral. En relación a esto, en las células de la línea tumoral hipofisaria HP75, la vía Wnt/ β -Catenina inhibe la apoptosis [128]. De manera análoga, se ha reportado que en células de tumor de hígado y en cáncer de próstata, el silenciamiento de β -Catenina incrementa los niveles de apoptosis celular [125, 129].

La angiogénesis es otro de los procesos de importancia en la progresión tumoral y la malignidad, y un mecanismo fuertemente estudiado desde hace años por nuestro laboratorio y también por otros autores [98, 99, 130-132], sin embargo, la influencia de la vía de Wnt en la angiogénesis de los tumores de hipófisis no ha sido exhaustivamente evaluada. En el caso de gliomas, se ha demostrado que la activación de esta vía promueve el aumento de HIF1 α el cual a su vez tendría un efecto retroestimulador sobre genes diana de la vía Wnt tales como c-Myc y Ciclina D1. El aumento de HIF1 α sumado a los niveles de lactato elevados promovidos también por Wnt inducen un incremento de VEGF [133]. En cáncer de próstata, la inhibición de β -Catenina por miR-129-5p disminuye la angiogénesis a través de la disminución de VEGF y CD31 como así también la migración celular y la invasión mientras que incrementa la apoptosis [125]. Contrariamente, Reis *et al.* publicaron en modelos de gliomas *in vivo*, que la inducción de la vía de Wnt endotelial a través de la expresión de Wnt1 o de la sobreexpresión de β -Catenina normaliza los vasos sanguíneos e inhibe la angiogénesis a través de la expresión de PDGF [134]. Nuestros resultados en el modelo de lactotropos tumorales indican, sin embargo, que si

bien la activación de la vía canónica de Wnt promueve un aumento en la transcripción de *Vegf*, la secreción del factor al sobrenadante de cultivo de los lactotropos tumorales no se ve afectada. Por el contrario, estos sobrenadantes parecerían tener capacidades angiogénicas reducidas con respecto a la contraparte control. Nuestros resultados no descartan la participación de Wnt/ β -Catenina en la neovascularización de los tumores hipofisarios secretores de PRL; estudios más exhaustivos en tumores de pacientes, tratados con Avastin, podrían contribuir en el esclarecimiento de este punto.

Como se detalló en la introducción de este trabajo de tesis, la OMS ha sugerido considerar a un subgrupo de tumores de hipófisis como potencialmente malignos, definiendo malignidad como resistencia a tratamientos, invasión local y recurrencia [14]. Esto promueve el uso de nuevas alternativas terapéuticas en algunos casos de tumores agresivos y de fallas de terapias convencionales [77], entre ellos la TMZ. Esta terapia ha mostrado ser una opción efectiva para el tratamiento de tumores agresivos y carcinomas de la hipófisis [9, 76, 78]. Este tratamiento ha demostrado inhibición de la secreción de prolactina y reducción del tamaño tumoral en pacientes con prolactinomas refractarios a terapias convencionales, mejorando su condición clínica [31, 135]. Sin embargo, a la fecha, los mecanismos moleculares de la respuesta a TMZ no han sido profundamente estudiados, por lo que en este trabajo de tesis buscamos interpretar la respuesta que media la efectividad del tratamiento con TMZ primero en prolactinomas y luego en corticotropinomas experimentales *in vivo* e *in vitro*. Asimismo se estudió, a través del material obtenido de cirugías sucesivas, un caso de un paciente con un corticotropinoma recidivante que se transformó de silente a agresivo presentando síntomas compatibles con enfermedad de Cushing.

Encontramos que, para los prolactinomas *in vivo*, la administración oral de TMZ tiene un importante efecto inhibitorio sobre la síntesis del ARNm de *Prolactina* (reducción del 60%) y de la proteína PRL intratumoral, mientras que evita que los tumores tratados alcancen los volúmenes de los controles acompañado con un incremento de la apoptosis tumoral apoyando la efectividad de TMZ sobre las células del prolactinoma *in vivo*. Nuestros resultados se encuentran en línea con los datos clínicos publicados donde regresiones parciales y no totales de la masa tumoral fueron halladas en tumores localmente invasivos y en carcinomas hipofisarios tratados con TMZ [79]. Estos mismos autores mencionan en su trabajo el caso de un paciente donde el tratamiento con TMZ redujo los niveles de prolactina en un 71% mientras que no modificó el volumen tumoral. Por su parte, Kovacks *et al.* encontraron en prolactinomas de pacientes una reducción del índice de Ki-67 del 40-60% al 5% cuando compararon el tejido tumoral antes y después del tratamiento [136].

En los prolactinomas experimentales *in vivo* la expresión del marcador de proliferación Ki-67 no mostró diferencias después del tratamiento. Otros autores mostraron una disminución moderada no significativa del marcador en tumores de somatolactotropos GH3 *in vivo* luego del tratamiento con TMZ [81]. La literatura junto a los resultados de la presente tesis indicarían que la respuesta tumoral al agente quimioterápico estaría dependiendo del caso particular de cada paciente y del microambiente tumoral. Este hecho podría estar dado por señales desreguladas intratumorales y por el contexto tumoral que favorezcan la respuesta o la resistencia a TMZ. En glioblastomas, un importante mecanismo de quimiorresistencia a TMZ es la activación incrementada de la vía de señalización MAPK/ERK o el estado de activación de AKT, ambas señales asociadas a la proliferación celular [82]. Nosotros en cambio, no determinamos

diferencias en la expresión de pERK ni de JNK dadas por el tratamiento con TMZ, en concordancia con nuestros resultados de Ki67. No obstante, en este modelo de prolactinoma *in vivo* determinamos una importante correlación positiva y significativa entre la expresión de *Prolactina* y de los componentes de la vía Wnt/ β -Catenina y *Ciclina D1* sumado a la correlación en el mismo sentido de ambos componentes de la vía Wnt entre sí, evidenciando la relevancia de esta señal en el desarrollo de los tumores hipofisarios experimentales. Mientras que la vía de Wnt se asoció a una efectividad de TMZ reducida en la literatura [83], Riganti *et al.* reportaron que TMZ disminuye la expresión de Wnt3a y la consecuente disrupción de la vía Wnt en células madre de glioblastoma humano, sensibilizando a éstas a otros tratamientos quimioterapéuticos [137]. Nuestros resultados muestran que TMZ inhibe a la vía canónica de Wnt mediante la disminución de β -Catenina y *Ciclina D1* en el modelo *in vivo*. Como hemos mencionado con anterioridad, en muestras de tumores no funcionantes agresivos la expresión de β -Catenina y de c-Myc se encuentra sobreexpresada y ambos componentes correlacionan positivamente con la agresividad de los tumores aunque sólo β -Catenina lo hace con la recurrencia [106].

En nuestro trabajo describimos, por primera vez, un efecto directo de la TMZ de reducción de la activación de la proteína β -CATENINA como consecuencia del tratamiento *in vitro* con TMZ en la línea de lactotropos tumorales MMQ. Además, en este modelo *in vitro*, la viabilidad celular de los lactotropos tumorales se redujo luego de 72 h de tratamiento con 200 μ M de TMZ de la misma manera que describieron Dai C *et al.* con la misma dosis y tiempo de tratamiento [81, 138]. En cambio, Sheehan *et al.* publicaron una inhibición de la proliferación *in vitro* de células MMQ y GH3 más temprana ocasionada por TMZ, probablemente causado por las dosis mayores utilizadas en su trabajo (250 and 500 μ M) [139]. Adicionalmente, en este trabajo de

tesis encontramos que las células MMQ tratadas con TMZ incrementaron su apoptosis sumado al mayor porcentaje de células arrestadas en fase G2/M del ciclo celular corroborando la citotoxicidad de TMZ en este modelo [9]. Este efecto había sido descrito en células de gonadotropos tumorales bajo tratamiento con TMZ [140]. En su conjunto, nuestros resultados *in vivo* e *in vitro* sugieren que el microambiente tumoral podría estar teniendo un rol protector o compensatorio evitando la reducción tumoral *in vivo*, representando de algún modo lo que ocurre en los pacientes donde a pesar de diagnosticarse tumores localmente invasivos, presentan bajos índices de proliferación y ausencia de metástasis. Estos aspectos requieren de más investigación tanto en modelos animales como en casos de pacientes. En este sentido nuestros trabajos previos sobre el proceso de angiogénesis en el modelo de prolactinomas en ratones KO para el receptor de dopamina D2 y en tumores hipofisarios humanos indican que la matriz celular tumoral sería responsable de conferirles las particularidades angiogénicas que estos prolactinomas poseen [99, 130, 138, 141]. En este trabajo de tesis no determinamos efectos de TMZ sobre la angiogénesis en el modelo *in vivo*, mientras que la secreción de VEGF disminuyó en las MMQ tratadas con TMZ *in vitro*, apoyando una vez más el rol del contexto tumoral en esta regulación.

No se encuentran muchos estudios en la literatura que describan los mecanismos moleculares asociados al efecto inhibitorio de TMZ ni el momento apropiado para administrar el tratamiento en los tumores de la hipófisis. La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR y el factor angiogénico Hif1 α han sido postulados como responsables de la quimiorresistencia de los tumores hipofisarios a TMZ *in vivo*. Según entendemos, este es el único grupo que trabajó con xenografts de tumores de hipófisis con tratamiento de TMZ *in vivo* [81, 138]. Nuestros resultados presentan

por primera vez evidencia de activación de la vía de Wnt y su participación en modelos de tumores hipofisarios bajo tratamiento con TMZ *in vivo* e *in vitro*, y destacan una importante asociación con β -Catenina, Ciclina D1 y Prolactina.

De manera similar a lo expuesto en los prolactinomas, algunos casos de corticotropinomas también han mostrado una buena respuesta a TMZ como terapia alternativa para los casos que no responden a cirugía o radioterapia de manera favorable [73, 142], desconociendo el porqué de este efecto. Además, y en contraposición a lo hallado en los prolactinomas, en el presente trabajo de tesis los corticotropinomas de la cohorte en estudio expresaron mayor β -CATENINA de membrana ubicándose en el subgrupo de tumores de menor índice de proliferación. Es por ello que nos planteamos evaluar el estado de activación y la respuesta de la vía de Wnt/ β -Catenina primero en un modelo *in vivo* de corticotropinomas generado por administración subcutánea de la línea de corticotropos tumorales de ratón AtT20 y luego en la evolución de una paciente con corticotropinoma silente con posterior transformación a agresivo. Nuestros resultados preliminares en el modelo *in vivo* mostraron que la administración oral de TMZ (20mg/kg) reduce modestamente el tamaño tumoral y el peso de los corticotropinomas al final del esquema de tratamiento. En línea con lo hallado en nuestro trabajo en prolactinomas y con lo publicado en la bibliografía, observamos que TMZ promueve una moderada disminución de componentes de la vía de Wnt como *Ciclina D1* y de la proteína pGSK3 β y de otras proteínas relacionadas a la proliferación celular (JNK) y a la angiogénesis (CD31). Por su parte, Jie Ren *et. al* describieron que la sobreexpresión del inhibidor de la vía de Wnt, SFPR2, promueve la disminución de β -Catenina en citoplasma y núcleo en células AtT20 con la consecuente disminución en la proliferación y secreción hormonal [143]. Adicionalmente, otro grupo demostró

que al inhibir la vía de Wnt/ β -Catenina en las AtT20, disminuye la expresión de Ciclina D1 y de MGMT en estas células [144]. Como primera apreciación, nuestros resultados preliminares en conjunto con la evidencia bibliográfica indicarían que en corticotropinomas, la vía de Wnt también podría ser blanco de TMZ, y que la inhibición de esta señalización colaboraría con el tratamiento en los casos de corticotropinoma agresivos.

En el presente trabajo de tesis, mostramos, en el contexto de la búsqueda de conocimiento en relación a la vía de Wnt y la agresividad tumoral, un raro caso de una paciente diagnosticada con corticotropinoma silente que se transformó en agresivo e invasivo. Pocos casos de este tipo de transformación han sido previamente reportados y en ninguno se ha analizado la relación con la vía de Wnt [145-147]. En relación a lo anteriormente descrito en el modelo *in vivo*, en el caso de la paciente con corticotropinoma agresivo que presentamos en este trabajo de tesis, en los tejidos de las 3 cirugías a lo largo de la transformación de la lesión hacia una de características más agresivas, el tratamiento con TMZ en combinación con Ketoconazol logró reducir los valores del índice de proliferación celular dado por Ki67 (de 9% a 4%) sin normalizar la secreción hormonal ni el tamaño tumoral. Este efecto sobre Ki67 pero no sobre el tamaño tumoral o la evolución del caso luego de la administración de TMZ también fue reportado en un paciente con corticotropinoma que se transformó en carcinoma [147].

Adicionalmente, en nuestro caso de estudio, la expresión del marcador angiogénico α -SMA dio cuenta de que la vasculatura sufrió alteraciones a medida que el tumor iba aumentando sus características agresivas, encontrando vasos sanguíneos más chicos, en menor cantidad y menor densidad microvascular en sus fases de mayor agresividad. En la bibliografía, en un grupo de tumores hipofisarios que incluye corticotropinomas, también determinan una

disminución de la microdensidad vascular, en ese caso en comparación con tejido hipofisario normal, y que este parámetro se relacionó solo con las características invasivas de los tumores. A pesar de estas diferencias, el factor VEGF no se modificó entre los casos estudiados con respecto a la hipófisis normal [148]. El tratamiento combinado no tendría efecto sobre el proceso angiogénico dado que los parámetros evaluados permanecieron inalterables entre 2014 y 2015. En relación a esto, en el modelo murino de corticotropinomas *in vivo* tampoco observamos diferencias significativas en la expresión de CD31 al momento luego de la administración oral de TMZ, mientras que en los modelos de prolactinomas *in vivo* e *in vitro* de nuestro trabajo la respuesta angiogénica difiere según el contexto. A diferencia de la vía de Wnt, la angiogénesis podría ser un proceso mucho más contexto y caso dependiente.

Finalmente, las características de agresividad y la remodelación de la vasculatura podrían estar, al menos en parte, influidas por la vía de Wnt, dado que detectamos la expresión de β -CATENINA en los tejidos de las tres cirugías a lo largo de la transformación. Principalmente, la disminución de β -CATENINA de membrana entre la cirugía de 2014 y la de 2015, coincidente con el tratamiento, demostraría una mayor activación de Wnt en el contexto de la agresividad, comparablemente a lo observado en la cohorte de prolactinomas humanos. En ambos casos, una disminución de la proteína principal de la vía de Wnt en la membrana denotó mayor actividad que se asoció con un índice de Ki67 > 3%, mostrando una vez más la estrecha relación con la agresividad tumoral. En concordancia con nuestros hallazgos, fue publicado que el inhibidor de la vía de Wnt/ β -Catenina, SFPR2, se encuentra disminuido en corticotropinomas comparado con hipófisis normales, y que existe asociación entre los bajos niveles de expresión del inhibidor con las características de agresividad de los corticotropinomas, incluidos el tamaño

tumoral y la invasividad de los mismos [143]. Más aún, un grupo de publicaciones demuestra mutaciones frecuentes de β -Catenina en corticotropinomas que llevan a la activación constitutiva de la vía en los tumores, y relocalización de la proteína encontrándola en citoplasma y núcleo en el 54% de los casos analizados [149-151], ambos puntos interesantes y factibles de estudiar a futuro en el caso de estudio analizado en la presente tesis.

En la búsqueda de posibles explicaciones causantes de quimiorresistencia en los adenomas hipofisarios asociadas a la vía de Wnt, y conociendo por bibliografía el rol de las células madre tumorales en el desarrollo de varias patologías neoplásicas [4, 152, 153], investigamos la respuesta de este tipo de células en el tratamiento de los corticotropinomas. Determinamos que el tratamiento con TMZ 100 μ M en el modelo de corticotropos tumorales AtT20, es efectivo a la hora de disminuir la viabilidad de células susceptibles, como ha sido demostrado en este tipo de tumores [80, 139]. Sin embargo, un porcentaje de las células resisten al tratamiento. Esta población resistente presenta características de células madre tumorales, hallazgo evidenciado en este trabajo de tesis por un aumento en el número de tumoroesferas luego del tratamiento con TMZ. Este porcentaje de células madre presentes en la línea AtT20 había sido previamente confirmado por el grupo de Vankelecom *et al.* por citometría de flujo y aislamiento de la población marginal [4]. Estos resultados nos alientan a profundizar el estudio de esta vía y su relación con otros marcadores de células madre luego del tratamiento con TMZ para abrir otras posibilidades de tratamiento para los casos resistentes a las terapias más convencionales.

Podemos concluir que nuestros hallazgos en el presente trabajo de tesis demuestran la vinculación de la vía Wnt/ β -Catenina con el desarrollo y progresión de los tumores hipofisarios, y la quimiorresistencia a agentes quimioterápicos como TMZ. De esta manera nuestros

resultados aportan nuevo conocimiento en las señales celulares clave que condicionan el crecimiento de los tumores de la hipófisis como así también en la búsqueda de terapias alternativas para el manejo terapéutico de los pacientes con tumores resistentes a los tratamientos establecidos.

5. BIBLIOGRAFÍA.

1. Di Ieva, A., F. Rotondo, L.V. Syro, M.D. Cusimano, and K. Kovacs. Aggressive pituitary adenomas-- diagnosis and emerging treatments, *Nat Rev Endocrinol* 10, 423-35. 2014
2. Ceausu, R.A., B. Balinisteanu, A.M. Cimpean, P.N. Gaje, C. Capatina, M. Gheorghiu, V. Ciubotaru, M. Coculescu, and M. Raica. RETICULAR FIBERS NETWORK PARTIALLY DISCRIMINATES BETWEEN NORMAL HYPOPHYSIS AND PITUITARY ADENOMAS, *Acta Endocrinologica (Buc)* 6, 335-341. 2010
3. Mete, O. and M.B. Lopes. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors, *Endocr Pathol* 28, 228-243. 2017
4. Mertens, F., L. Gremeaux, J. Chen, Q. Fu, C. Willems, H. Roose, O. Govaere, T. Roskams, C. Cristina, D. Becu-Villalobos, M. Jorissen, V.V. Poorten, M. Bex, J. van Loon, and H. Vankelecom. Pituitary tumors contain a side population with tumor stem cell-associated characteristics, *Endocr Relat Cancer* 22, 481-504. 2015
5. Kovacs, K. and E. Horvath. Pathology of pituitary tumors, *Endocrinol Metab Clin North Am* 16, 529-51. 1987
6. Trouillas, J., P. Roy, N. Sturm, E. Dantony, C. Cortet-Rudelli, G. Viennet, J.F. Bonneville, R. Assaker, C. Auger, T. Brue, A. Cornelius, H. Dufour, E. Jouanneau, P. Francois, F. Galland, F. Mougel, F. Chapuis, L. Villeneuve, C.A. Maurage, D. Figarella-Branger, G. Raverot, H. members of, A. Barlier, M. Bernier, F. Bonnet, F. Borson-Chazot, G. Brassier, S. Caulet-Maugendre, O. Chabre, P. Chanson, J.F. Cottier, B. Delemer, E. Delgrange, L. Di Tommaso, S. Eimer, S. Gaillard, M. Jan, J.J. Girard, V. Lapras, H. Loiseau, J.G. Passagia, M. Patey, A. Penfornis, J.Y. Poirier, G. Perrin, and A. Tabarin. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up, *Acta Neuropathol* 126, 123-35. 2013
7. Seilicovich, A., D. Pisera, S.A. Sciascia, M. Candolfi, M. Puntel, W. Xiong, G. Jaita, and M.G. Castro. Gene therapy for pituitary tumors, *Curr Gene Ther* 5, 559-72. 2005
8. Buurman, H. and W. Saeger. Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data, *Eur J Endocrinol* 154, 753-8. 2006
9. Syro, L.V., F. Rotondo, M. Camargo, L.D. Ortiz, C.A. Serna, and K. Kovacs. Temozolomide and Pituitary Tumors: Current Understanding, Unresolved Issues, and Future Directions, *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 318. 2018
10. Gomez-Hernandez, K., S. Ezzat, S.L. Asa, and O. Mete. Clinical Implications of Accurate Subtyping of Pituitary Adenomas: Perspectives from the Treating Physician, *Turk Patoloji Derg* 31 Suppl 1, 4-17. 2015
11. Nishioka, H., N. Inoshita, O. Mete, S.L. Asa, K. Hayashi, A. Takeshita, N. Fukuhara, M. Yamaguchi-Okada, Y. Takeuchi, and S. Yamada. The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas, *Endocr Pathol* 26, 349-55. 2015
12. Yu, R. and S. Melmed. Pituitary tumor transforming gene: an update, *Front Horm Res* 32, 175-85. 2004
13. Ilie, M.D., H. Lasolle, and G. Raverot. Emerging and Novel Treatments for Pituitary Tumors, *J Clin Med* 8. 2019
14. Asa, S.L., O. Casar-Borota, P. Chanson, E. Delgrange, P. Earls, S. Ezzat, A. Grossman, H. Ikeda, N. Inoshita, N. Karavitaki, M. Korbonits, E.R. Laws, Jr., M.B. Lopes, N. Maartens, I.E. McCutcheon, O. Mete, H. Nishioka, G. Raverot, F. Roncaroli, W. Saeger, L.V. Syro, A. Vasiljevic, C. Villa, A. Wierinckx, J. Trouillas,

and A.F.N. attendees of 14th Meeting of the International Pituitary Pathology Club. From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal, *Endocr Relat Cancer* 24, C5-C8. 2017

15. Melmed, S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary, *J Clin Invest* 112, 1603-18. 2003
16. Cao, L., H. Gao, S. Gui, G. Bai, R. Lu, F. Wang, and Y. Zhang. Effects of the estrogen receptor antagonist fulvestrant on F344 rat prolactinoma models, *J Neurooncol* 116, 523-31. 2014
17. Suarez, C., G. Diaz-Torga, A. Gonzalez-Iglesias, C. Cristina, and D. Becu-Villalobos. Upregulation of angiotensin II type 2 receptor expression in estrogen-induced pituitary hyperplasia, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E786-94. 2004
18. Chanson, P. and D. Maiter. The epidemiology, diagnosis and treatment of Prolactinomas: The old and the new, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 33, 101290. 2019
19. Herman, V., J. Fagin, R. Gonsky, K. Kovacs, and S. Melmed. Clonal Origin of Pituitary Adenomas, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 71, 1427-1433. 1990
20. Day, P.F., M.G. Loto, M. Glerean, M.F. Picasso, S. Lovazzano, and D.H. Giunta. Incidence and prevalence of clinically relevant pituitary adenomas: retrospective cohort study in a Health Management Organization in Buenos Aires, Argentina, *Arch Endocrinol Metab* 60, 554-561. 2016
21. Gurlek, A., N. Karavitaki, O. Ansorge, and J.A.H. Wass. What are the markers of aggressiveness in prolactinomas? Changes in cell biology, extracellular matrix components, angiogenesis and genetics, *Eur J Endocrinol* 156, 143-153. 2007
22. Oh, M.C. and M.K. Aghi. Dopamine agonist-resistant prolactinomas, 114, 1369. 2011
23. Schlechte, J., K. Dolan, B. Sherman, F. Chapler, and A. Luciano. The Natural History of Untreated Hyperprolactinemia: A Prospective Analysis, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 68, 412-418. 1989
24. Fernandez, A., N. Karavitaki, and J.A. Wass. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK), *Clin Endocrinol (Oxf)* 72, 377-82. 2010
25. Ben-Jonathan, N. and R. Hnasko. Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor, *Endocr Rev* 22, 724-763. 2001
26. Bevan, J.S., J. Webster, C.W. Burke, and M.F. Scanlon. Dopamine Agonists and Pituitary Tumor Shrinkage, *Endocr Rev* 13, 220-240. 1992
27. Pinzone, J.J., L. Katznelson, D.C. Danila, D.K. Pauler, C.S. Miller, and A. Klibanski. Primary medical therapy of micro- and macroprolactinomas in men, *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3053-7. 2000
28. Melmed, S., F.F. Casanueva, A.R. Hoffman, D.L. Kleinberg, V.M. Montori, J.A. Schlechte, J.A. Wass, and S. Endocrine. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline, *J Clin Endocrinol Metab* 96, 273-88. 2011
29. Chatzellis, E., K.I. Alexandraki, Androulakis, II, and G. Kaltsas. Aggressive pituitary tumors, *Neuroendocrinology* 101, 87-104. 2015
30. Raverot, G., P. Burman, A. McCormack, A. Heaney, S. Petersenn, V. Popovic, J. Trouillas, O.M. Dekkers, and E. European Society of. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas, *Eur J Endocrinol* 178, G1-G24. 2018
31. Chen, C., S. Yin, S. Zhang, M. Wang, Y. Hu, P. Zhou, and S. Jiang. Treatment of aggressive prolactinoma with temozolomide: A case report and review of literature up to date, *Medicine (Baltimore)* 96, e8733. 2017
32. Buchfelder, M., Y. Zhao, and S.M. Schlaffer. Surgery for Prolactinomas to Date, *Neuroendocrinology* 109, 77-81. 2019
33. Almutairi, R.D., I.S. Muskens, D.J. Cote, M.D. Dijkman, V.K. Kavouridis, E. Crocker, K. Ghazawi, M.L.D. Broekman, T.R. Smith, R.A. Mekary, and H.A. Zaidi. Gross total resection of pituitary adenomas after

- endoscopic vs. microscopic transsphenoidal surgery: a meta-analysis, *Acta Neurochir (Wien)* 160, 1005-1021. 2018
34. Theodros, D., M. Patel, J. Ruzevick, M. Lim, and C. Bettgowda. Pituitary adenomas: historical perspective, surgical management and future directions, *CNS Oncol* 4, 411-29. 2015
 35. Missale, C., S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber, and M.G. Caron. Dopamine Receptors: From Structure to Function, *Physiological Reviews* 78, 189-225. 1998
 36. Caccavelli, L., F. Feron, I. Morange, E. Rouer, R. Benarous, D. Dewailly, P. Jaquet, C. Kordon, and A. Enjalbert. Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas, *Neuroendocrinology* 60, 314-22. 1994
 37. Arbogast, L.A. and J.L. Voogt. Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta, *Endocrinology* 128, 997-1005. 1991
 38. Schuff, K.G., S.T. Hentges, M.A. Kelly, N. Binart, P.A. Kelly, P.M. Iuvone, S.L. Asa, and M.J. Low. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms, *J Clin Invest* 110, 973-81. 2002
 39. Gudelsky, G.A., D.D. Nansel, and J.C. Porter. Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion, *Endocrinology* 108, 440-4. 1981
 40. Binart N., Y.J., Chanson P. , *Prolactin Assays and Regulation of Secretion: Animal and Human Data.*, in *Prolactin Disorders.*, K.A. Tritos N., Editor. 2019.
 41. Borrelli, E., P.E. Sawchenko, and R.M. Evans. Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2764-8. 1992
 42. Cai, A., J.D. Hayes, N. Patel, and J.F. Hyde. Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia, *Endocrinology* 140, 4955-64. 1999
 43. McAndrew, J., A.J. Paterson, S.L. Asa, K.J. McCarthy, and J.E. Kudlow. Targeting of transforming growth factor- α expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas, *Endocrinology* 136, 4479-88. 1995
 44. Ezzat, S., L. Zheng, X.F. Zhu, G.E. Wu, and S.L. Asa. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis, *J Clin Invest* 109, 69-78. 2002
 45. Taciak, B., I. Pruszynska, L. Kiraga, M. Bialasek, and M. Krol. Wnt signaling pathway in development and cancer, *J Physiol Pharmacol* 69. 2018
 46. Katoh, M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network, *Clin Cancer Res* 13, 4042-5. 2007
 47. Kawano, Y. and R. Kypta. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *J Cell Sci* 116, 2627-34. 2003
 48. Kioussi, C., P. Briata, S.H. Baek, D.W. Rose, N.S. Hamblet, T. Herman, K.A. Ohgi, C. Lin, A. Gleiberman, J. Wang, V. Brault, P. Ruiz-Lozano, H.D. Nguyen, R. Kemler, C.K. Glass, A. Wynshaw-Boris, and M.G. Rosenfeld. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development, *Cell* 111, 673-85. 2002
 49. Huelsken, J. and J. Behrens. The Wnt signalling pathway, *J Cell Sci* 115, 3977-8. 2002
 50. Trejo Córdova, A., M.d.C. Navarro Maldonado, and A. Rosado García. Catenina Beta: características estructurales y funcionales, *Contactos. Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería.* 75, 5. 2010
 51. Kam, Y. and V. Quaranta. Cadherin-Bound β^2 -Catenin Feeds into the Wnt Pathway upon Adherens Junctions Dissociation: Evidence for an Intersection between β^2 -Catenin Pools, *PLoS One* 4, e4580. 2009
 52. Couffignal, T., P. Dufourcq, and C. Dupláa. Beta-Catenin Nuclear Activation, *Circulation Research* 99, 1287-1289. 2006

53. Daugherty, R.L. and C.J. Gottardi. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions, *Physiology (Bethesda)* 22, 303-9. 2007
54. Elston, M.S. and R.J. Clifton-Bligh. Identification of Wnt family inhibitors: a pituitary tumor directed whole genome approach, *Mol Cell Endocrinol* 326, 48-54. 2010
55. Sekine, S., T. Shibata, A. Kokubu, Y. Morishita, M. Noguchi, Y. Nakanishi, M. Sakamoto, and S. Hirohashi. Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor beta-catenin gene mutations, *Am J Pathol* 161, 1997-2001. 2002
56. Semba, S., S.Y. Han, H. Ikeda, and A. Horii. Frequent nuclear accumulation of beta-catenin in pituitary adenoma, *Cancer* 91, 42-8. 2001
57. Buslei, R., M. Nolde, B. Hofmann, S. Meissner, I. Eyupoglu, F. SiebzehnrÄ¼bl, E. Hahnen, J.r. Kreutzer, and R. Fahlbusch. Common mutations of β^2 -catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region, *Acta Neuropathol* 109, 589-597. 2005
58. Lombardi, A.P., R. Pisolato, C.M. Vicente, M.F. Lazari, T.F. Lucas, and C.S. Porto. Estrogen receptor beta (ERbeta) mediates expression of beta-catenin and proliferation in prostate cancer cell line PC-3, *Mol Cell Endocrinol* 430, 12-24. 2016
59. Wandosell, F., O. Varea, M.A. Arevalo, and L.M. Garcia-Segura. Oestradiol regulates beta-catenin-mediated transcription in neurones, *J Neuroendocrinol* 24, 191-4. 2012
60. Varea, O., J.J. Garrido, A. Dopazo, P. Mendez, L.M. Garcia-Segura, and F. Wandosell. Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons, *PLoS One* 4, e5153. 2009
61. Gaston-Massuet, C., C.L. Andoniadou, M. Signore, S.A. Jayakody, N. Charolidi, R. Kyeyune, B. Vernay, T.S. Jacques, M.M. Taketo, P. Le Tissier, M.T. Dattani, and J.P. Martinez-Barbera. Increased Wnt signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011
62. Zhang, Y., Y. Tan, H. Wang, M. Xu, and L. Xu. Long Non-Coding RNA Plasmacytoma Variant Translocation 1 (PVT1) Enhances Proliferation, Migration, and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) of Pituitary Adenoma Cells by Activating β -Catenin, c-Myc, and Cyclin D1 Expression, *Med Sci Monit* 25, 7652-7659. 2019
63. Howng, S.L., C.H. Wu, T.S. Cheng, W.D. Sy, P.C. Lin, C. Wang, and Y.R. Hong. Differential expression of Wnt genes, beta-catenin and E-cadherin in human brain tumors, *Cancer Lett* 183, 95-101. 2002
64. Long, Y., M. Lu, T. Cheng, X. Zhan, and X. Zhan. Multiomics-Based Signaling Pathway Network Alterations in Human Non-functional Pituitary Adenomas, *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 835. 2019
65. Qian, Z.R., C.C. Li, H. Yamasaki, N. Mizusawa, K. Yoshimoto, S. Yamada, T. Tashiro, H. Horiguchi, S. Wakatsuki, M. Hirokawa, and T. Sano. Role of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenins, and p120 (cell adhesion molecules) in prolactinoma behavior, *Mod Pathol* 15, 1357-65. 2002
66. Colli, L.M., F. Saggioro, L.N. Serafini, R.C. Camargo, H.R. Machado, A.C. Moreira, S.R. Antonini, and M. de Castro. Components of the canonical and non-canonical Wnt pathways are not mis-expressed in pituitary tumors, *PLoS One* 8, e62424. 2013
67. Hansen, T.M., S. Batra, M. Lim, G.L. Gallia, P.C. Burger, R. Salvatori, G. Wand, A. Quinones-Hinojosa, L. Kleinberg, and K.J. Redmond. Invasive adenoma and pituitary carcinoma: a SEER database analysis, *Neurosurg Rev* 37, 279-85; discussion 285-6. 2014
68. Dworakowska, D. and A.B. Grossman. Aggressive and malignant pituitary tumours: state-of-the-art, *Endocr Relat Cancer* 25, R559-R575. 2018
69. Pietrantonio, F., F. Perrone, F. de Braud, A. Castano, C. Maggi, I. Bossi, A. Gevorgyan, P. Biondani, M. Pacifici, A. Busico, M. Gariboldi, F. Festinese, E. Tamborini, and M. Di Bartolomeo. Activity of temozolomide in patients with advanced chemorefractory colorectal cancer and MGMT promoter methylation, *Ann Oncol* 25, 404-8. 2014

70. Hart, M.G., R. Garside, G. Rogers, K. Stein, and R. Grant. Temozolomide for high grade glioma, *Cochrane Database Syst Rev*, CD007415. 2013
71. Li, R.H., X.Y. Hou, C.S. Yang, W.L. Liu, J.Q. Tang, Y.Q. Liu, and G. Jiang. Temozolomide for Treating Malignant Melanoma, *J Coll Physicians Surg Pak* 25, 680-8. 2015
72. Syro, L.V., F. Rotondo, L.D. Ortiz, and K. Kovacs. 65 YEARS OF THE DOUBLE HELIX: Treatment of pituitary tumors with temozolomide: an update, *Endocr Relat Cancer* 25, T159-T169. 2018
73. Halevy, C. and B.C. Whitelaw. How effective is temozolomide for treating pituitary tumours and when should it be used?, *Pituitary* 20, 261-266. 2017
74. Lin, A.L., M.W. Sum, and L.M. DeAngelis. Is there a role for early chemotherapy in the management of pituitary adenomas?, *Neuro Oncol* 18, 1350-1356. 2016
75. Hagen, C., H.D. Schroeder, S. Hansen, C. Hagen, and M. Andersen. Temozolomide treatment of a pituitary carcinoma and two pituitary macroadenomas resistant to conventional therapy, *Eur J Endocrinol* 161, 631-7. 2009
76. Raverot, G., N. Sturm, F. de Fraipont, M. Muller, S. Salenave, P. Caron, O. Chabre, P. Chanson, C. Cortet-Rudelli, R. Assaker, H. Dufour, S. Gaillard, P. Francois, E. Jouanneau, J.G. Passagia, M. Bernier, A. Cornelius, D. Figarella-Branger, J. Trouillas, F. Borson-Chazot, and T. Brue. Temozolomide treatment in aggressive pituitary tumors and pituitary carcinomas: a French multicenter experience, *J Clin Endocrinol Metab* 95, 4592-9. 2010
77. Lasolle, H. and G. Raverot. Therapeutic innovations in endocrine diseases - part 3 : temozolomide and future therapeutics for aggressive pituitary tumors and carcinomas, *Presse Med* 45, e211-6. 2016
78. Syro, L.V., L.D. Ortiz, B.W. Scheithauer, R. Lloyd, Q. Lau, R. Gonzalez, H. Uribe, M. Cusimano, K. Kovacs, and E. Horvath. Treatment of pituitary neoplasms with temozolomide: a review, *Cancer* 117, 454-62. 2011
79. Bengtsson, D., H.D. Schroder, M. Andersen, D. Maiter, K. Berinder, U. Feldt Rasmussen, A.K. Rasmussen, G. Johannsson, C. Hoybye, A.J. van der Lely, M. Petersson, O. Ragnarsson, and P. Burman. Long-term outcome and MGMT as a predictive marker in 24 patients with atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas given treatment with temozolomide, *J Clin Endocrinol Metab* 100, 1689-98. 2015
80. Bruno, O.D., L. Juarez-Allen, S.B. Christiansen, M. Manavela, K. Danilowicz, C. Vigovich, and R.M. Gomez. Temozolomide Therapy for Aggressive Pituitary Tumors: Results in a Small Series of Patients from Argentina, *Int J Endocrinol*, 587893. 2015
81. Dai, C., B. Zhang, X. Liu, S. Ma, Y. Yang, Y. Yao, M. Feng, X. Bao, G. Li, J. Wang, K. Guo, W. Ma, B. Xing, W. Lian, J. Xiao, F. Cai, H. Zhang, and R. Wang. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway enhances temozolomide-induced cytotoxicity in pituitary adenoma cell lines in vitro and xenografted pituitary adenoma in female nude mice, *Endocrinology* 154, 1247-59. 2013
82. Wang, Y., S. Gao, W. Wang, and J. Liang. Temozolomide inhibits cellular growth and motility via targeting ERK signaling in glioma C6 cells, *Mol Med Rep* 14, 5732-5738. 2016
83. Yi, G.Z., Y.W. Liu, W. Xiang, H. Wang, Z.Y. Chen, S.D. Xie, and S.T. Qi. Akt and beta-catenin contribute to TMZ resistance and EMT of MGMT negative malignant glioma cell line, *J Neurol Sci* 367, 101-6. 2016
84. Wickstrom, M., C. Dyberg, J. Milosevic, C. Einvik, R. Calero, B. Sveinbjornsson, E. Sanden, A. Darabi, P. Siesjo, M. Kool, P. Kogner, N. Baryawno, and J.I. Johnsen. Wnt/beta-catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance, *Nat Commun* 6, 8904. 2015
85. Dawood, S., L. Austin, and M. Cristofanilli. Cancer stem cells: implications for cancer therapy, *Oncology (Williston Park)* 28, 1101-7, 1110. 2014
86. Dontu, G., M. Al-Hajj, W.M. Abdallah, M.F. Clarke, and M.S. Wicha. Stem cells in normal breast development and breast cancer, *Cell Prolif* 36 Suppl 1, 59-72. 2003

87. Sridharan, S., C.M. Howard, A.M.C. Tilley, B. Subramaniyan, A.K. Tiwari, R.J. Ruch, and D. Raman. Novel and Alternative Targets Against Breast Cancer Stemness to Combat Chemoresistance, *Front Oncol* 9, 1003. 2019
88. Rich, J.N. and C.E. Eyler. Cancer stem cells in brain tumor biology, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73, 411-20. 2008
89. Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells, *Cancer Res* 66, 9339-44. 2006
90. Florio, T. Adult pituitary stem cells: from pituitary plasticity to adenoma development, *Neuroendocrinology* 94, 265-77. 2011
91. Takahashi-Yanaga, F. and M. Kahn. Targeting Wnt Signaling: Can We Safely Eradicate Cancer Stem Cells?, *Clinical Cancer Research* 16, 3153-3162. 2010
92. Chen, J., N. Hersmus, V. Van Duppen, P. Caesens, C. Deneff, and H. Vankelecom. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics, *Endocrinology* 146, 3985-98. 2005
93. Gleiberman, A.S., T. Michurina, J.M. Encinas, J.L. Roig, P. Krasnov, F. Balordi, G. Fishell, M.G. Rosenfeld, and G. Enikolopov. Genetic approaches identify adult pituitary stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6332-7. 2008
94. Caffarini, M., M. Orciani, L. Trementino, R. Di Primio, and G. Arnaldi. Pituitary adenomas, stem cells, and cancer stem cells: what's new?, *J Endocrinol Invest* 41, 745-753. 2018
95. Carreno, G., J.M. Gonzalez-Meljem, S. Haston, and J.P. Martinez-Barbera. Stem cells and their role in pituitary tumorigenesis, *Mol Cell Endocrinol* 445, 27-34. 2017
96. Becu-Villalobos, D., I.M. Lacau-Mengido, S.M. Thyssen, G.S. Diaz-Torga, and C. Libertun. Effects of LHRH and ANG II on prolactin stimulation are mediated by hypophysial AT1 receptor subtype, *Am J Physiol* 266, E274-8. 1994
97. Perez-Millan, M.s., S.s. Berner, G. Luque, C. Bonis, G. Sevlever, D. Becu-Villalobos, and C. Cristina. Enhanced nestin expression and small blood vessels in human pituitary adenomas, *Pituitary*, 1-8. 2012
98. Cristina, C., G. Diaz-Torga, A. Baldi, A. Gongora, M. Rubinstein, M.J. Low, and D. Becu-Villalobos. Increased pituitary vascular endothelial growth factor- α in dopaminergic D2 receptor knockout female mice, *Endocrinology* 146, 2952-62. 2005
99. Perez-Millan, M.s., S.s. Berner, G. Luque, C. Bonis, G. Sevlever, D. Becu-Villalobos, and C. Cristina. Enhanced nestin expression and small blood vessels in human pituitary adenomas, *Pituitary* 16, 303-310. 2013
100. Ramirez, M.C., G.M. Luque, A.M. Ornstein, and D. Becu-Villalobos. Differential neonatal testosterone imprinting of GH-dependent liver proteins and genes in female mice, *J Endocrinol* 207, 301-8. 2010
101. Cristina, C., G. Diaz-Torga, A. Gongora, M.C. Guida, M.I. Perez-Millan, A. Baldi, and D. Becu-Villalobos. Fibroblast growth factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1341-51. 2007
102. Formosa, R., M. Gruppetta, S. Falzon, G. Santillo, J. DeGaetano, A. Xuereb-Anastasi, and J. Vassallo. Expression and clinical significance of Wnt players and survivin in pituitary tumours, *Endocr Pathol* 23, 123-31. 2012
103. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease, *Cell* 127, 469 - 480. 2006
104. Li, T.W., J.H. Ting, N.N. Yokoyama, A. Bernstein, M. van de Wetering, and M.L. Waterman. Wnt activation and alternative promoter repression of LEF1 in colon cancer, *Mol Cell Biol* 26, 5284 - 5299. 2006

105. Johnsen, J.I., M. Wickström, and N. Baryawno. Wingless/ β -catenin signaling as a modulator of chemoresistance in cancer, *Molecular & Cellular Oncology* 3, e1131356. 2016
106. Liu, C., Y. Wu, S. Yu, J. Bai, C. Li, D. Wu, and Y. Zhang. Increased betacatenin and c-myc expression predict aggressive growth of non-functioning pituitary adenomas: An assessment using a tissue microarray-based approach, *Mol Med Rep* 15, 1793-1799. 2017
107. Moldovan, I.M., S. Susman, R. Pirlog, E.M. Jianu, D.C. Leucuta, C.S. Melincovici, D. Crisan, and I.S. Florian. Molecular markers in the diagnosis of invasive pituitary adenomas - an immunohistochemistry study, *Rom J Morphol Embryol* 58, 1357-1364. 2017
108. Bai, J., Y. Wang, C. Li, and Y. Zhang. Effects of fulvestrant on biological activity and Wnt expression in rat GH3 cells, *Neural Regen Res* 7, 283-9. 2012
109. Li, J., W. Dong, Z. Li, H. Wang, H. Gao, and Y. Zhang. Impact of SLC20A1 on the Wnt/betacatenin signaling pathway in somatotroph adenomas, *Mol Med Rep* 20, 3276-3284. 2019
110. Heaney, A.P., M. Fernando, and S. Melmed. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis, *J Clin Invest* 109, 277-83. 2002
111. Freeman, M.E., B. Kanyicska, A. Lerant, and G. Nagy. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion, *Physiol Rev* 80, 1523-631. 2000
112. Hentges, S.T. and M.J. Low. Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice, *Endocrinology* 143, 4536-43. 2002
113. Demarchi, G., G. E, T. MJ, B.-V. D, and C. C, *Estudio de la Vía Wnt en modelos experimentales de prolactinomas. Rol de β -catenina.*, in *Medicina*. 2012. p. 148.
114. Hou, X., Y. Tan, M. Li, S.K. Dey, and S.K. Das. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18, 3035-49. 2004
115. Sutton, L.P., D. Honardoust, J. Mouyal, N. Rajakumar, and W.J. Rushlow. Activation of the canonical Wnt pathway by the antipsychotics haloperidol and clozapine involves dishevelled-3, *J Neurochem* 102, 153-69. 2007
116. Hou, X., Y. Tan, M. Li, S.K. Dey, and S.K. Das. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18, 3035-3049. 2004
117. Giles, A., F. Madec, S. Friedrichsen, K. Featherstone, T. Chambers, C.V. Harper, J. Resch, G. Brabant, and J.R. Davis. Wnt signaling in estrogen-induced lactotroph proliferation, *J Cell Sci* 124, 540-7. 2011
118. Miyakoshi, T., H. Kajiya, K. Miyajima, M. Takei, M. Tobita, S. Takekoshi, and R.Y. Osamura. The expression of Wnt4 is regulated by estrogen via an estrogen receptor alpha-dependent pathway in rat pituitary growth hormone-producing cells, *Acta Histochem Cytochem* 42, 205-13. 2009
119. Giles, A., F. Madec, S. Friedrichsen, K. Featherstone, T. Chambers, C.V. Harper, J. Resch, G. Brabant, and J.R. Davis. Wnt signaling in estrogen-induced lactotroph proliferation, *J Cell Sci* 124, 540-7. 2010
120. Viñas, R. and C.S. Watson. Bisphenol S disrupts estradiol-induced nongenomic signaling in a rat pituitary cell line: effects on cell functions, *Environmental health perspectives* 121, 352-358. 2013
121. Leng, L. and Y. Zhang. Effects of an estrogen receptor antagonist on proliferation, prolactin secretion and growth factor expression in the MMQ pituitary prolactinoma cell line, *J Clin Neurosci* 18, 1694-8. 2011
122. Chao, W., Z. Xuexin, S. Jun, C. Ming, J. Hua, G. Li, C. Tan, and W. Xu. Effects of resveratrol on cell growth and prolactin synthesis in GH3 cells, *Exp Ther Med* 7, 923-928. 2014
123. Shi, L., Y.X. Wu, J.H. Yu, X. Chen, X.J. Luo, and Y.R. Yin. Research of the relationship between β -catenin and c-myc-mediated Wnt pathway and laterally spreading tumors occurrence, *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 252-257. 2017
124. Tang, J., L. Chen, Z. Wang, G. Huang, and X. Hu. SOX2 mediates crosstalk between Sonic Hedgehog and the Wnt/beta-catenin signaling pathway to promote proliferation of pituitary adenoma cells, *Oncol Lett* 18, 81-86. 2019

125. Jiang, Z., Y. Zhang, X. Chen, P. Wu, and D. Chen. Inactivation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway underlies inhibitory role of microRNA-129-5p in epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis of prostate cancer by targeting ZIC2, *Cancer Cell Int* 19, 271. 2019
126. Wang, H., G. Wang, Y. Gao, C. Zhao, X. Li, F. Zhang, C. Jiang, and B. Wu. Lnc-SNHG1 Activates the TGFBR2/SMAD3 and RAB11A/Wnt/ β -Catenin Pathway by Sponging MiR-302/372/373/520 in Invasive Pituitary Tumors, *Cell Physiol Biochem* 48, 1291-1303. 2018
127. Razak, S., T. Afsar, A. Ullah, A. Almajwal, M. Alkholief, A. Alshamsan, and S. Jahan. Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/ beta -catenin signaling pathway, *BMC Cancer* 18, 1043. 2018
128. Shen, D.W., Y.L. Li, Y.J. Hou, Z.D. Xu, Y.Z. Li, and J.Y. Chang. MicroRNA-543 promotes cell invasion and impedes apoptosis in pituitary adenoma via activating the Wnt/beta-catenin pathway by negative regulation of Smad7, *Biosci Biotechnol Biochem* 83, 1035-1044. 2019
129. Wang, X.H., M.N. Liu, P. Huang, J. Xu, A.Y. Liu, J. Chen, C.Q. Lv, and R.L. Xu. Simultaneous silencing of beta-catenin and signal transducer and activator of transcription 3 synergistically induces apoptosis and inhibits cell proliferation in HepG2 liver cancer cells, *Mol Med Rep* 12, 2263-8. 2015
130. Cristina, C., G.M. Luque, G. Demarchi, F. Lopez Vicchi, L. Zubeldia-Brenner, M.I. Perez Millan, S. Perrone, A.M. Ornstein, I.M. Lacau-Mengido, S.I. Berner, and D. Becu-Villalobos. Angiogenesis in pituitary adenomas: human studies and new mutant mouse models, *Int J Endocrinol* 2014, 608497. 2014
131. Cristina, C., M.s. Perez-Millan, G. Luque, R.I. Dulce, G. Sevlever, S.s. Berner, and D. Becu-Villalobos. VEGF and CD31 Association in Pituitary Adenomas, *Endocr Pathol* 21, 154-160. 2010
132. Mallea-Gil, M.S., C. Cristina, M.I. Perez-Millan, A.M. Villafane, C. Ballarino, G. Staldecke, and D. Becu-Villalobos. Invasive giant prolactinoma with loss of therapeutic response to cabergoline: expression of angiogenic markers, *Endocr Pathol* 20, 35-40. 2009
133. Vallee, A., R. Guillevin, and J.N. Vallee. Vasculogenesis and angiogenesis initiation under normoxic conditions through Wnt/beta-catenin pathway in gliomas, *Rev Neurosci* 29, 71-91. 2018
134. Reis, M., C.J. Czupalla, N. Ziegler, K. Devraj, J. Zinke, S. Seidel, R. Heck, S. Thom, J. Macas, E. Bockamp, M. Fruttiger, M.M. Taketo, S. Dimmeler, K.H. Plate, and S. Liebner. Endothelial Wnt/beta-catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression, *J Exp Med* 209, 1611-27. 2012
135. Whitelaw, B.C., D. Dworakowska, N.W. Thomas, S. Barazi, P. Riordan-Eva, A.P. King, T. Hampton, D.B. Landau, D. Lipscomb, C.R. Buchanan, J.A. Gilbert, and S.J. Aylwin. Temozolomide in the management of dopamine agonist-resistant prolactinomas, *Clin Endocrinol (Oxf)* 76, 877-86. 2012
136. Kovacs, K., E. Horvath, L.V. Syro, H. Uribe, L.C. Penagos, L.D. Ortiz, and C.E. Fadul. Temozolomide therapy in a man with an aggressive prolactin-secreting pituitary neoplasm: Morphological findings, *Hum Pathol* 38, 185-9. 2007
137. Riganti, C., I.C. Salaroglio, V. Caldera, I. Campia, J. Kopecka, M. Mellai, L. Annovazzi, A. Bosia, D. Ghigo, and D. Schiffer. Temozolomide downregulates P-glycoprotein expression in glioblastoma stem cells by interfering with the Wnt3a/glycogen synthase-3 kinase/beta-catenin pathway, *Neuro Oncol* 15, 1502-17. 2013
138. Dai, C., B. Zhang, X. Liu, K. Guo, S. Ma, F. Cai, Y. Yang, Y. Yao, M. Feng, X. Bao, K. Deng, Y. Jiao, Z. Wei, W. Junji, B. Xing, W. Lian, and R. Wang. Pyrimethamine sensitizes pituitary adenomas cells to temozolomide through cathepsin B-dependent and caspase-dependent apoptotic pathways, *Int J Cancer* 133, 1982-93. 2013
139. Sheehan, J., J. Rainey, J. Nguyen, R. Grimsdale, and S. Han. Temozolomide-induced inhibition of pituitary adenoma cells, *J Neurosurg* 114, 354-8. 2011

140. Ma, S., X. Liu, Y. Yao, F. Cai, C. Dai, X. Bao, M. Feng, J. Wei, B. Zhang, G. Li, W. Ma, and R. Wang. Effect of temozolomide on cell viability in gonadotroph adenoma cell lines, *Oncol Rep* 26, 543-50. 2011
141. Garcia-Tornadu, I., G. Diaz-Torga, G.S. Risso, P. Silveyra, N. Cataldi, M.C. Ramirez, M.J. Low, C. Libertun, and D. Becu-Villalobos. Hypothalamic orexin, OX1, alphaMSH, NPY and MCRs expression in dopaminergic D2R knockout mice, *Neuropeptides* 43, 267-74. 2009
142. Dillard, T.H., S.H. Gultekin, J.B. Delashaw, Jr., C.G. Yedinak, E.A. Neuwelt, and M. Fleseriu. Temozolomide for corticotroph pituitary adenomas refractory to standard therapy, *Pituitary* 14, 80-91. 2011
143. Ren, J., F. Jian, H. Jiang, Y. Sun, S. Pan, C. Gu, X. Chen, W. Wang, G. Ning, L. Bian, and Q. Sun. Decreased expression of SFRP2 promotes development of the pituitary corticotroph adenoma by upregulating Wnt signaling, *Int J Oncol* 52, 1934-1946. 2018
144. Li, Z.Y., G.D. Huang, L. Chen, C. Zhang, B.D. Chen, Q.Z. Li, X. Wang, X.J. Zhang, and W.P. Li. Tanshinone IIA induces apoptosis via inhibition of Wnt/betacatenin/MGMT signaling in AtT20 cells, *Mol Med Rep* 16, 5908-5914. 2017
145. Gogel, E.L., P.R. Salber, J.B. Tyrrell, M.L. Rosenblum, and J.W. Findling. Cushing's Disease in a Patient With a 'Nonfunctioning' Pituitary Tumor: Spontaneous Development and Remission, *Archives of Internal Medicine* 143, 1040-1042. 1983
146. VAUGHAN, N.J.A., C.M. LAROCHE, I. GOODMAN, M.J. DAVIES, and J.S. JENKINS. PITUITARY CUSHING'S DISEASE ARISING FROM A PREVIOUSLY NON-FUNCTIONAL CORTICOTROPHIC CHROMOPHOBE ADENOMA, *Clin Endocrinol (Oxf)* 22, 147-153. 1985
147. Moshkin, O., L.V. Syro, B.W. Scheithauer, L.D. Ortiz, C.E. Fadul, H. Uribe, R. Gonzalez, M. Cusimano, E. Horvath, F. Rotondo, and K. Kovacs. Aggressive silent corticotroph adenoma progressing to pituitary carcinoma: the role of temozolomide therapy, *Hormones (Athens)* 10, 162-7. 2011
148. Viacava, P., M. Gasperi, G. Acerbi, L. Manetti, E. Cecconi, A.G. Bonadio, A.G. Naccarato, F. Acerbi, G. Parenti, I. Lupi, M. Genovesi, and E. Martino. Microvascular density and vascular endothelial growth factor expression in normal pituitary tissue and pituitary adenomas, *J Endocrinol Invest* 26, 23-8. 2003
149. Tissier, F., C. Cavard, L. Groussin, K. Perlemoine, G. Fumey, A.M. Hagnere, F. Rene-Corail, E. Jullian, C. Gicquel, X. Bertagna, M.C. Vacher-Lavenu, C. Perret, and J. Bertherat. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors, *Cancer Res* 65, 7622-7. 2005
150. Bonnet, S., S. Gaujoux, P. Launay, C. Baudry, I. Chokri, B. Ragazzon, R. Libe, F. Rene-Corail, A. Audebourg, M.C. Vacher-Lavenu, L. Groussin, X. Bertagna, B. Dousset, J. Bertherat, and F. Tissier. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors, *J Clin Endocrinol Metab* 96, E419-26. 2011
151. Tadjine, M., A. Lampron, L. Ouadi, and I. Bourdeau. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas, *Clin Endocrinol (Oxf)* 68, 264-70. 2008
152. Caffarini, M., M. Orciani, L. Trementino, R. Di Primio, and G. Arnaldi. Pituitary adenomas, stem cells, and cancer stem cells: what's new?, *Journal of Endocrinological Investigation* 41, 745-753. 2018
153. Nassar, D. and C. Blanpain. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications, *Annu Rev Pathol* 11, 47-76. 2016