



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURQUILLA**

**LOS EFECTOS DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
(TNF- α) SOBRE LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE
PROLACTINA EN LA HIPÓFISIS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
Q.F.B. MAYDA LIZETH RAMÍREZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MICHAEL C. JEZIORSKI



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la dirección académica del comité tutorial integrado por los Doctores Michael Jeziorski, Carlos Valverde Rodríguez y Rocío Brenda Anguiano Serrano, así como a los integrantes del jurado Doctores Enrique Pedernera Astegiano, Alfredo Varela Echavarría y María Teresa Morales Guzmán.

Al apoyo de los Doctores Carmen Clapp y Gonzalo Martínez de la Escalera.

Al Nut. Fernando López Barrera y el M. en C. Gabriel Nava Pinto por el apoyo técnico.

A la asistencia de los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta.

Al MVZ Martín García Servin, responsable del Bioterio del Instituto de Neurobiología.

A los miembros de la biblioteca del Instituto de Neurobiología: Bib. Pilar Galarza Barrios, Rafael Silva Cruz e Ignacio Caballero Navarro.

A la Q. Leonor Casanova Rico de la unidad de enseñanza, así como a Yolanda Orduña Cruz y Magdalena Reyes Olán.

A todos los miembros de los laboratorios de Endocrinología de la Reproducción y Endocrinología Molecular.

Al apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No. 200257) y la UNAM.

INDICE

Resumen	i
Summary	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Angiogénesis	3
I.2. Neoplasias y angiogénesis	7
I.3. Los adenomas hipofisarios	7
I.4. Prolactina y vasoinhibinas	9
I.5. El factor de necrosis tumoral	12
I.6. Efectos del TNF sobre los tumores y la angiogénesis	15
II. JUSTIFICACIÓN	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	19
V. MATERIAL Y MÉTODOS	20
V.1. Cultivo celular	20
V.2. Tratamientos con TNF- α	20
V.3. Aislamiento y purificación de ARN	21
V.4. Retrotranscripción	21
V.5. PCR en tiempo real	22
V.6. Lisados celulares y medios condicionados	22
V.7. Cuantificación de proteína por el método Bradford	23
V.8. Western blot	23
V.9. ELISA	24
V.10. Análisis estadístico	24
VI. RESULTADOS	25
VI.1. Efecto del TNF- α sobre el nivel de ARNm de PRL	25
VI.2. Efecto del tratamiento con TNF- α sobre la generación	

intracelular de PRL	26
VI.3. Efecto del tratamiento con TNF- α sobre la liberación de PRL	27
VI.4. El tratamiento con TNF- α durante 8 h no modifica la producción ni la secreción de PRL en cultivos de células GH4C1	31
VI.5. La vasoinhibina está presente en el lisado celular de los CPAH y las células GH4C1.	31
VI.6. La acidificación del medio condicionado por las células GH4C1 promueve la generación de vasoinhibinas.	33
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIÓN	40
IX. REFERENCIAS	41
X. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	50

RESUMEN

Los prolactinomas poseen una vascularización menor en comparación con el tejido normal. El bajo nivel de angiogénesis en estos tumores podría estar relacionado con su fenotipo benigno. En la hipófisis, la prolactina puede ser fragmentada por proteasas como la catepsina-D para producir un péptido N-terminal con un potente efecto anti-angiogénico al que se ha denominado PRL-16K o vasoinhibina. La regulación de la expresión de prolactina en la hipófisis anterior y su procesamiento hacia vasoinhibina bajo las condiciones determinadas por el crecimiento tumoral podrían tener relación con la inhibición de la angiogénesis. El desarrollo de un tumor induce la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α . En este trabajo examinamos el efecto del tratamiento con TNF- α a diferentes concentraciones durante 24 h, sobre la generación y secreción de prolactina y vasoinhibina en somatolactotropos transformados GH4C1 y cultivos primarios de adenohipófisis (CPAH) de rata. El TNF- α estimuló la transcripción del gen de prolactina, así como su traducción a proteína y secreción al medio de cultivo en las GH4C1, pero no en los CPAH. La vasoinhibina fue detectada en el lisado celular de los CPAH y de las GH4C1. La catepsina-D tiene actividad óptima a pH ácido, cuando se acidificó el medio condicionado por las GH4C1 tratadas con TNF- α se vio favorecida la producción de vasoinhibina. En conclusión, el TNF- α promueve la expresión y secreción de PRL en las células GH4C1, así como su procesamiento a vasoinhibinas, esto podría ser parte del mecanismo por el cual la angiogénesis está reducida en los prolactinomas.

SUMMARY

Prolactin (PRL)-secreting pituitary adenomas are less vascularized than normal tissue, and this reduced angiogenesis may be related to their benign phenotype. PRL can be cleaved in the pituitary gland to yield an N-terminal fragment (16K-PRL or vaso-inhibin) with potent anti-angiogenic effects. The regulation of PRL expression in the anterior pituitary gland and its cleavage to vaso-inhibins under conditions caused by tumor growth may thus be relevant to inhibition of angiogenesis. Tumor development induces release of proinflammatory cytokines such as TNF- α . Here, we examined the effects of TNF- α treatment for 24 h on the generation and secretion of PRL and vaso-inhibins in transformed GH4C1 cells and cultures of primary anterior pituitary cells from male rats. Expression of PRL mRNA and production of PRL were increased in GH4C1 cells in response to TNF- α treatment, but not in primary cultures. Low levels of a 16 kDa immunoreactive product identified as vaso-inhibins were detected in lysates from both GH4C1 cells and primary cultures. Concentration and acidification of conditioned medium revealed greater generation of vaso-inhibins in medium collected from GH4C1 cells treated with TNF- α . These data indicate that TNF- α increases the expression of PRL and the subsequent generation of vaso-inhibins in a tumoral cell line, suggesting a potential mechanism by which angiogenesis can be suppressed during formation of prolactinomas.

I. INTRODUCCIÓN

La aparición de organismos multicelulares a través de la evolución, creó la necesidad de establecer sistemas de coordinación para regular e integrar la función de los diferentes tipos de células. Así surgieron el sistema nervioso y el sistema endócrino. El primero emplea señales electroquímicas para enviar señales hacia los órganos periféricos y recibir información de ellos; en tanto que, el último lleva a cabo su función regulatoria produciendo agentes químicos que, en general, son transportados a través de la circulación hacia los órganos blanco. Ambos sistemas se encuentran íntimamente relacionados, los mejores ejemplos de ello son el hipotálamo y la hipófisis. Las células neurosecretoras del hipotálamo producen sustancias que son liberadas hacia los vasos sanguíneos portales y transportados hacia la hipófisis anterior donde regulan la secreción de hormonas adenohipofisarias. Otras neuronas hipotalámicas dirigen sus axones hacia la hipófisis posterior y sus terminaciones se sitúan próximas al lecho vascular de la glándula donde liberan sus productos neurosecretores directamente en el torrente circulatorio. Debido a la interrelación existente entre las glándulas endócrinas y los componentes del sistema nervioso que regulan la función endócrina, a este sistema se le ha denominado el sistema neuroendócrino.

Sin embargo, el sistema neuroendócrino también se encuentra regulado por estímulos que recibe del sistema inmune. Varias observaciones apoyan el concepto de la interacción entre los sistemas neuroendócrino e inmune: 1) La naturaleza dimórfica de la respuesta inmune en ambos géneros, 2) las alteraciones en la respuesta inmune luego de la extirpación de glándulas endócrinas o de un tratamiento hormonal, 3) la modificación de la respuesta inmune durante diferentes estadios del ciclo reproductor y, 4) la identificación de receptores hormonales en las células del sistema inmune. La relación entre los sistemas neuroendócrino e inmune es recíproca: las hormonas influyen al componente celular del sistema inmune y, las citocinas, originalmente descritas como productos de secreción de las células del sistema inmune, afectan las funciones neuroendócrinas. Tanto el sistema inmune como el sistema neuroendócrino producen citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IFN- α , TNF- α , etc.), neuropéptidos (encefalinas, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo, α MSH, etc.) y hormonas (ACTH, GH, PRL, TSH, CRH, β -endorfina, etc.) para las que ambos poseen receptores.

El sistema inmune muestra un grado de autonomía considerable y una red regulatoria interna muy elaborada. Por ello, no era bien aceptada la idea de que las señales inmunomodulatorias también provienen del sistema neuroendócrino, a pesar de las muchas demostraciones de la comunicación existente entre estos sistemas. Un parteaguas en este sentido ha sido la descripción de similitudes estructurales entre las citocinas linfo-hematopoyéticas, la prolactina (PRL) hipofisiaria, la hormona de crecimiento (GH) y la hormona del tejido adiposo, la leptina. Casi todas estas citocinas funcionan como agentes hormonales, parácrinos o autócrinos, y juegan un papel importante tanto en la homeostasis del cuerpo como en la respuesta a las agresiones. Los receptores para estos mediadores también comparten características comunes. Se han realizado estudios sobre la función del receptor que han revelado una vía de señalización intracelular única donde participan las tirosina cinasas Janus (JAK) citoplásmicas y los factores de transcripción transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT). Un receptor de citocinas en particular puede mediar distintas y múltiples señales intracelulares que conduzcan a la activación de varios genes y funciones. Y varias citocinas pueden activar los mismos factores de transcripción, que se unen a sitios comunes en el promotor de los genes blanco.

Desde 1930 hasta la fecha se han publicado muchas evidencias que sugieren la participación de la PRL y otras hormonas hipofisiarias en la modulación del sistema inmune. Se han realizado estudios clínicos y en animales, combinados con estudios *in vitro*, que sugieren que la PRL ejerce efectos inmunoestimulatorios. Se ha demostrado que la PRL estimula a las células T, las células B, las células citolíticas naturales (natural killer, NK), los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas y las células hematopoyéticas (Kooijman et al., 1996; Matera et al., 2001). Experimentos realizados en animales knock out para el receptor de PRL, sugieren que la PRL no es esencial para el desarrollo normal o la función del sistema inmune. Sin embargo, la PRL podría ser importante para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune bajo condiciones de reto, como en las enfermedades autoinmunes y en condiciones estresantes como trauma, infección e inflamación.

La inflamación es un proceso fisiológico que ocurre en respuesta al daño tisular que resulta de la infección por microorganismos patógenos, de la irritación provocada por agentes químicos o por daño mecánico. En estadios tempranos de la

inflamación, los neutrófilos son las primeras células que migran a los sitios de inflamación, guiados por moléculas que son rápidamente producidas por los macrófagos y los mastocitos preestacionados en los tejidos. A medida que progresa el proceso inflamatorio varios tipos de leucocitos y otras células inflamatorias se activan, estas células son atraídas hacia el sitio de inflamación por medio de una red de señalización que involucra un gran número de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. La inflamación aguda es una respuesta crítica de protección contra insultos por agentes patógenos, toxinas y daño físico. Sin embargo, si el organismo no es capaz de resolver el problema, la respuesta inflamatoria se degenera y se vuelve crónica, una condición asociada con algunas patologías como el cáncer.

El papel de la inflamación en la promoción de la carcinogénesis fué propuesto originalmente por Virchow en 1863, quien señaló que los cánceres tendían a aparecer en sitios de inflamación crónica; recientemente este concepto ha resurgido y ahora se considera a la inflamación como un elemento clave en muchos tipos de cáncer (Balkwill et al., 2005). La célula tumoral, ha perdido su programa de control de crecimiento original, lo que altera el microambiente y provoca una serie de eventos como los que ocurren de manera típica cuando hay una lesión. Además del reclutamiento de células del sistema inmune, un tumor en crecimiento estimula el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, el proceso denominado angiogénesis (Albini et al., 2005).

I.1. Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fundamental por medio del cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los capilares pre-existentes. Este evento es esencial para una gran variedad de estados fisiológicos tales como el desarrollo prenatal, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la reparación de tejidos (Folkman y Shing, 1992).

La generación de vasos sanguíneos es un proceso complejo que involucra el remodelamiento de la matriz extracelular y la migración y proliferación de células endoteliales (Risau, 1997). Ante un estímulo adecuado, por ejemplo, una señal de crecimiento, las células endoteliales activadas (las más cercanas al estímulo angiogénico) liberan proteasas que provocan la degradación de la matriz extracelular que rodea el capilar. Simultáneamente, las células endoteliales migran en dirección del estímulo angiogénico y a proliferan. Las células endoteliales se reorganizan en

una estructura tubular y enseguida se fusionan con estructuras similares formando el lumen de los nuevos vasos. Posteriormente ocurre la maduración funcional del endotelio que comienza con la deposición de pericitos que se alinean a lo largo de la superficie exterior del vaso y, finalmente, se produce una nueva membrana basal (Patan, 2000). Los capilares sanguíneos consisten en células endoteliales y pericitos. Estos dos tipos celulares poseen toda la información genética para formar tubos, ramificaciones y redes capilares completas.

El proceso angiogénico puede iniciar por la aparición de moléculas angiogénicas específicas y detenerse por acción de moléculas inhibitorias específicas. Estas moléculas con acciones opuestas parecen estar actuando en conjunto para mantener una microvasculatura quiescente. Durante las dos décadas pasadas se han encontrado una gran cantidad de factores angiogénicos, así como factores inhibidores, pero los mecanismos mediante los cuales interactúan apenas comienzan a descubrirse. Los factores angiogénicos más prominentes son los factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento transformante alpha (TGF- α) y la interleucina 8 (IL-8). Entre los factores antiangiogénicos se encuentran la trombospondina, la endostatina, la angiostatina, la vasostatina y las vaso inhibinas. Las tablas 1 y 2 muestran un listado más completo de algunas moléculas que hasta ahora han mostrado ejercer un efecto estimulador e inhibitorio respectivamente, sobre la angiogénesis.

Así pues, la angiogénesis es el resultado de un delicado balance entre factores estimuladores e inhibidores. En el adulto, la angiogénesis se activa durante breves periodos que requieren de este proceso, como por ejemplo en la reparación de tejidos, y luego se inhibe por completo. Cuando dicha inhibición se pierde puede resultar en la inducción de diversas patologías como las retinopatías vasoproliferativas, la aterosclerosis, la artritis reumatoide y las neoplasias.

Tabla 1. Algunas moléculas promotoras de la angiogénesis

Factores de crecimiento

Factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF)
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
Eritropoyetina
Interleucinas 1, 2, y 6 (IL-1, IL-2 e IL-6)
Factor de crecimiento de hepatocitos/Scatter factor (HGF/SF)
Factores de crecimiento transformante α y β (TGF- α y TGF- β)
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
Factor de crecimiento placentario (PIGF)
Factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1)
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
Factor derivado de las células del estroma (SDF-1)

Lípidos

Prostaglandinas E1 y E2
 β -estradiol

Otras proteínas y péptidos

Angiogenina
Angiotensina II
Fibrina
Interleucina 8 (IL-8)
Activador del plasminógeno
Leptina
Urocinasa
Angiopoyetinas 1 y 2
Semaforina-4D
Slit-2
Efrinas
Adrenomedulina
Substancia P

Otros

Angiotropina
Cobre
Heparina
Nicotinamida

Tomado de Polverini, 1995; Gariano y Gardner, 2005; Neufeld y Kesler, 2006; Pandya et al., 2006.

Tabla 2. Moléculas inhibidoras de la angiogénesis

Angiostatina
Endostatina (fragmento de colágena XIII)
Trombospondina 1 (TSP-1)
Factor plaquetario IV
Interferones α , β y γ (INF- α , INF- β e INF- γ)
Vasoinhibinas (fragmentos de Prolactina)
Péptidos de fibronectina y laminina
Somatostatina
Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs)
Anti-trombina III
Heparinasas
Interleucinas 4, 12, 18 y 24 (IL-4, IL12, IL-18 e IL-24)
Inhibidor del activador del plasminógeno
Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF)
Retinoides
Receptor soluble de VEGF
Inhibidor de la angiogenina
Inhibidor de la sintetasa de prostaglandinas
Proteína 10 inducible por IFN- γ (IP10)
Canstatina (cadena $\alpha 2$ de la colágena IV)
Arrestina (cadena $\alpha 1$ de la colágena IV)
Restina (fragmento de colágena XV)
Vasostatina (cadena $\alpha 1$ de la colágena VIII)
Maspina
p53
Survivina
Caplostatina

Tomado de Polverini, 1995; Gariano y Gardner, 2005; Pandya et al., 2006; Liu et al., 2006; Folkman, 2006; Clapp, 2006.

I.2. Neoplasias y angiogénesis

El crecimiento de tumores y las metástasis son dependientes de la angiogénesis. Un tumor requiere de estimular constantemente el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para sostener el crecimiento propio. De esta manera, los nuevos vasos sanguíneos embebidos en el tumor forman por una parte, la vía de entrada de nutrientes y oxígeno, y además una vía para células tumorales que puedan entrar en la circulación y producir metástasis (Folkman, 1995).

La angiogénesis, medida como densidad microvascular del tumor, está asociada al comportamiento del mismo. En varios tumores humanos como en los de próstata, glándula mamaria, estómago y vejiga, se ha mostrado que el incremento en la angiogénesis se correlaciona con el desarrollo de metástasis (Weidner et al, 1993), así como con un pobre pronóstico (Weidner et al, 1992) y una menor sobrevivencia (Maeda et al, 1995). Sin embargo, los tumores de la glándula pituitaria frecuentemente crecen de forma lenta y contienen menos vasos sanguíneos que el tejido sano (Turner et al., 2003). Varios estudios de inmunomarcaje con anticuerpos dirigidos contra diferentes marcadores endoteliales como el antígeno relacionado al factor VIII, CD31 y algunos otros (Yamada y Takada, 2003, Viacava et al, 2003), han mostrado que la densidad microvascular de los adenomas hipofisarios es significativamente menor que la del tejido normal.

La mayor vascularización del tejido hipofisario normal, en comparación con el tejido tumoral, es contrastante con una gran variedad de tejidos, donde un incremento en la proliferación requiere un incremento en el suplemento vascular. Aún las lesiones pre-malignas han mostrado ser más vascularizadas que el tejido normal, por ejemplo en el cérvix (Dobbs et al, 1997) y en glándula mamaria (Jensen et al, 1982). Otros tumores endócrinos benignos, como los adenomas de la paratiroides y la hiperplasia de la misma glándula, muestran una densidad microvascular mayor que la glándula normal (García de la Torre et al, 2004). Sin embargo, la vascularización disminuida en un tumor, en comparación al tejido normal, ha sido reportada en otros tejidos endócrinos como en la corteza adrenal (Bernini et al, 2002) y la tiroides (García de la Torre et al, 2006).

I.3. Los adenomas hipofisarios

Los adenomas hipofisarios parecen ser comunes en la población general. Según los datos derivados de una serie de autopsias y estudios radiológicos, la

incidencia de los mismos es de entre el 10% y el 20% (Ciccarelli et al, 2005, Kars et al., 2006). Cabe señalar que en aproximadamente 20% de individuos sin signos ni síntomas de desordenes hipofisarios se han detectado accidentalmente microadenomas hipofisarios por medio de estudios de imagen radiológica de alta resolución que frecuentemente son prolactinomas.

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios más comunes y representan más del 45% de tumores hipofisarios en la clínica. De acuerdo al tamaño, los prolactinomas se clasifican en microprolactinomas (< 10 mm) y macroprolactinomas (> 10 mm). Se ha reportado que los microprolactinomas son significativamente menos vascularizados que los macroprolactinomas (Turner et al, 2000). Este hallazgo es congruente con la observación clínica de que los microprolactinomas rara vez progresan en tamaño y son una entidad clínica distinta de los macroprolactinomas, los cuales pueden crecer a un tamaño considerable. Además, se ha visto que la densidad microvascular de los macroprolactinomas invasivos es significativamente mayor que la de los macroprolactinomas no invasivos (Turner et al, 2000). El seguimiento a largo plazo de pacientes con microprolactinomas sugiere que estos tumores tienen una baja tendencia, si es que la hay, a crecer con el paso del tiempo. Además, en adultos jóvenes, los prolactinomas son mucho más frecuentes en mujeres que en hombres, aunque las mujeres tienden a desarrollar microprolactinomas y en los hombres hay una frecuencia más alta de macroprolactinomas (Ciccarelli et al, 2005).

Los carcinomas hipofisarios ocurren raramente. Hasta la fecha se han reportado aproximadamente 140 casos en la literatura y una tercera parte de ellos son prolactinomas malignos (Kars et al, 2006). Los prolactinomas malignos no presentan signos clínicos distintos de los tumores benignos y la apariencia radiológica inicial podría mimetizar la de un adenoma. Generalmente producen metástasis en el sistema nervioso central y tejidos aracnoidales, las metástasis distantes son raras. El pronóstico es malo, sólo el 50% de los pacientes descritos en la literatura sobrevivieron más de un año.

El sistema de capilares sinusoidales del lóbulo anterior de la hipófisis tiene una capa de células endoteliales fenestradas como en todos los órganos endócrinos que permite a los factores solubles difundir hacia el tejido circundante. En este sentido, los factores de crecimiento proangiogénicos y antiangiogénicos de la hipófisis se pueden unir fácilmente a las células endoteliales, y las hormonas

producidas en glándulas endócrinas periféricas o sus análogos sintéticos pueden influenciar la producción de hormonas y factores de crecimiento por las células tumorales.

Un factor que potencialmente afecta la densidad vascular de tumores de la pituitaria es la prolactina (PRL). La PRL puede ser procesada post-traduccionalmente por enzimas proteolíticas hacia fragmentos N-terminales que poseen actividades antiangiogénicas únicas, no compartidas con la molécula nativa y que recientemente se identificaron como vasoinhibinas (Clapp et al 2006).

I.4. Prolactina y vasoinhibinas

La PRL es una hormona peptídica codificada por un solo gen en los mamíferos y cuya forma molecular predominante tiene 199 aminoácidos y 23 kDa de masa molecular. La PRL es un miembro de la superfamilia de hormonas peptídicas que también incluye a la hormona del crecimiento (GH) y al lactógeno placentario (PL). Las tres hormonas tienen un 25% de identidad en su secuencia aminoacídica en mamíferos, lo que sugiere que las tres provienen de un gen ancestral común. Además, la prolactina comparte la misma estructura terciaria, que comprende cuatro α -hélices, con las otras dos hormonas. Esta similitud estructural se traduce en la capacidad de activar los receptores de esta familia hormonal. El receptor de PRL es capaz de ser activado por la GH de la especie humana y es el único receptor conocido para el PL (Corbacho et al, 2002).

La principal fuente de la PRL circulante son los lactotrofos de la hipófisis anterior, aunque la PRL también es secretada por muchos otros tejidos y tipos celulares, incluyendo células de la decidua, del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, células NK, etc), del epitelio mamario y de algunas regiones del cerebro. La amplia variedad de tejidos que expresan PRL y sus sitios de unión, señalan su implicación en un gran número de procesos fisiológicos. Además de ser la principal hormona responsable de la secreción de leche durante la lactancia, efecto por el cual recibió su nombre, la PRL participa en funciones reproductivas, de osmorregulación, inmunorregulación, crecimiento y metabolismo (Ben-Jonathan et al, 1996).

El gen de la PRL humana se localiza en el cromosoma 6 e inicialmente fue descrito como un gen que contiene 5 exones y 4 intrones, con una longitud total de 10 kilobases (kb) (Truong et al., 1984), cuya expresión da origen a un ARNm de 1

Kb en la hipófisis. Sin embargo, cuando se describió la expresión de PRL en sitios extrahipofisarios, como leucocitos y células de la decidua, se observó que en estos tejidos el ARNm de PRL es más grande que su contraparte hipofisaria (DiMattia et al., 1988; Gellersen et al., 1989). La razón para esta discrepancia es que, en la decidua humana y los linfocitos, la transcripción de PRL es dirigida por un promotor alternativo, que se localiza 5.8 Kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción en la hipófisis, lo que resulta en la transcripción de un exón extra, el exón denominado 1a. Este exón inicial alternativo no contiene una secuencia codificante y, por tanto, la transcripción por este promotor alternativo no genera isoformas de la proteína de distinto tamaño. Sin embargo, un exón extra podría contribuir a la expansión del repertorio transcripcional y/o traduccional de el gen de PRL (Gerlo et al., 2006).

Aunque la mayoría de los efectos de la PRL están relacionados a la isoforma de 23 KDa, se ha demostrado que fragmentos proteolíticos de la hormona que contienen su extremo N-terminal tienen un papel significativo en la inhibición de la angiogénesis y la regulación de la función vascular. El primero de estos fragmentos que mostró dicha actividad tenía una masa molecular de 16 kDa, por lo que el péptido fue nombrado PRL-16K (Clapp et al, 1993). En estudios subsecuentes se han descrito fragmentos N-terminales de la PRL en el rango de entre 12 y 17 KDa, que exhiben efectos similares (Clapp et al 2006). Más aún, fragmentos equivalentes de la región N-terminal del PL y de la GH, también han mostrado tener efectos antiangiogénicos, por lo que recientemente se extendió el nombre vasoinhibinas a los fragmentos de los miembros de la superfamilia PRL/GH/PL con acciones inhibitorias de la función vascular (Clapp et al, 2006b).

La actividad antiangiogénica de las vasoinhibinas se ha confirmado en varios ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Las vasoinhibinas inhiben la proliferación de células endoteliales en cultivo, inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o por el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), y estimulan la apoptosis de dichas células (Clapp et al 1993). En estas acciones de las vasoinhibinas parece participar la inhibición de la producción de óxido nítrico endotelial, un importante promotor de la angiogénesis y de la homeostasis vascular. Las vasoinhibinas bloquean la estimulación de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) por el VEGF, y esta inhibición disminuye la proliferación de células endoteliales en cultivo y, la dilatación de vasos coronarios aislados (Gonzalez et al,

2004). En apoyo a la relevancia funcional de estas acciones, evidencias recientes indican vasoinhibinas endógenas que ejercen una supresión tónica de la proliferación de vasos sanguíneos en tejidos oculares. La aplicación local de anticuerpos que secuestran vasoinhibinas estimula la formación de vasos sanguíneos en la córnea y en la retina (Dueñas et al., 1999, Aranda et al., 2005), y estas acciones pudieran tener repercusiones importantes para el control de las retinopatías vasoproliferativas (Dueñas et al 2004). Por otra parte, células tumorales que expresan y liberan vasoinhibinas forman tumores más pequeños y menos vascularizados que células de tumores similares que no expresan dichos péptidos (Bentzien et al, 2001, Kim et al, 2003).

La presencia endógena de vasoinhibinas derivadas de la PRL se ha documentado en varios tipos celulares y fluidos fisiológicos, incluyendo a las células endoteliales, los fibroblastos, los condrocitos, las células de la retina, el suero, el fluido amniótico, y el líquido subretiniano entre otros. También se han identificado en la hipófisis anterior (Torner et al, 1995), que es la fuente principal de la PRL circulante. Se ha demostrado que la catepsina D y las metaloproteasas de la matriz generan vasoinhibinas *in vitro* a partir de la proteólisis de la PRL (Clapp et al 2006b), sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual se generan las vasoinhibinas *in vivo*.

Varias evidencias sugieren que la catepsina-D es la encargada de generar a las vasoinhibinas en la hipófisis anterior. La catepsina D es una proteasa lisosomal, cuya actividad depende de un pH ácido (pH 3-5). Ésta enzima es sintetizada como un precursor inactivo (procatepsina D) que se activa en vesículas intracelulares como lisosomas, fagosomas y endosomas tardíos. Varios tipos de células tumorales y tumores mamarios secretan niveles altos de catepsina D y también de procatepsina D (Rocheft et al., 1989). En los compartimientos intracelulares ácidos la catepsina D puede procesar factores estimuladores o inhibidores de crecimiento, prohormonas y sus receptores, contribuyendo a su activación o inactivación, y por lo tanto, esta enzima es capaz de modificar diversas funciones celulares. La procatepsina D puede ser activada extracelularmente, en microambientes ácidos como el tumoral o el asociado a la reacción inflamatoria (Rocheft et al., 2000).

I.5. El factor de necrosis tumoral

Dos condiciones locales agudas causadas por el crecimiento de un tumor son la hipoxia y la inflamación. Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que lactotopos transformados GH4C1 (Ooi et al., 2004) cultivados bajo condiciones de hipoxia disminuyen su expresión de PRL y su conversión a vaso-inhibinas via catepsina D (Cosío et al., 2003). La menor abundancia de vaso-inhibinas podría ser parte del mecanismo proangiogénico de la hipoxia y por lo tanto influir sobre el desarrollo de los adenomas hipofisarios.

Un factor que puede modular el crecimiento de tumores hipofisarios es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) -una citocina que es liberada por los macrófagos y otras células durante la inflamación-. El TNF- α fue aislado por primera vez del suero de ratones tratados con endotoxinas bacterianas. En éstos experimentos se inducía el desarrollo de sarcomas en ratones con metilcolantreno, al administrar endotoxinas bacterianas se producía necrosis; cuando se aisló y administró el TNF- α mostró ejercer el mismo efecto (Carswell et al., 1975). Se sabe que el TNF- α tiene varios efectos en procesos celulares incluyendo la proliferación (van Horssen et al., 2006), la diferenciación (Takeda et al., 1986) y la apoptosis (Mocellin et al., 2005).

El gen de TNF se localiza en el cromosoma 6p21.3 y es expresado principalmente por macrófagos activados, células NK y linfocitos T, aunque otros tipos celulares como fibroblastos, astrocitos, células de Kupffer, células de músculo liso, queratinocitos y células tumorales también lo expresan. El TNF es sintetizado como un pro-péptido de 26 KDa unido a la membrana y es liberado al ser cortado por la enzima TACE. En su forma soluble, el TNF actúa como trímero, con un peso molecular de 17 KDa cada subunidad (157 aminoácidos). Esta molécula se une a dos receptores distintos, denominados TNF-R1 y TNF-R2. El receptor tipo 1 también se conoce como TNFRp55/p60, tiene un peso molecular de 60 KDa y se expresa en todos los tipos celulares (Chen y Goeddel, 2002). A diferencia de éste, el receptor tipo 2 también llamado TNFRp75/p80, con un peso de 80 KDa, sólo se expresa en células inmunes y células endoteliales (Aggarwal, 2003). Ninguno de los receptores muestra actividad enzimática, las señales se transmiten mediante el reclutamiento de más de una docena de diferentes proteínas, que en conjunto inician cascadas de señalización que pueden culminar en la activación de proteínas efectoras y proteínas

cinasas, éstas últimas principalmente involucradas en la activación de factores de transcripción.

Mediante múltiples herramientas experimentales se ha demostrado que la mayoría de acciones biológicas del TNF se inician a través del TNF-R1. Para activar la señalización por medio de TNF-R1 se requiere la unión del homotrímero de TNF al dominio extracelular del receptor, lo que induce la trimerización del mismo y la liberación de la proteína inhibidora silenciadora de los dominios de muerte. En ese momento, la proteína de unión al dominio de muerte del receptor de TNF (TRADD) puede unirse y reclutar otras proteínas que activan diversas vías de señalización. Entre ellas puede activar, por medio del dominio de muerte asociado a Fas (FADD), a la procaspasa 8 hacia caspasa 8 e iniciar una cascada de proteasas que conduce a apoptosis. O bien, por medio de una proteína adaptadora como por ejemplo el factor asociado al receptor de TNF-2 (TRAF-2) que puede reclutar a las proteínas inhibidoras de la apoptosis 1 y 2 (IAP-1 e IAP-2) e iniciar una vía que culmine en la fosforilación/activación de factores de transcripción (c-Jun, c-Fos, ATF-2) vía activación de MAPK (JNK, p38MAPK y ERK). TRAF-2 también activa a la cinasa que interactúa con el receptor (RIP), que es un factor crítico para la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), un factor de transcripción conformado por complejos homodiméricos y heterotriméricos de los miembros de la familia Rel/NF- κ B. En base a lo anterior, el receptor tipo 1 de TNF posee un complejo de señalización que puede promover ambos procesos, la muerte celular o la sobrevivencia, como se muestra en la figura 1.

El TNF puede inducir dos formas principales de muerte celular programada (MCP) por la vía extrínseca: a) apoptosis clásica, caracterizada por la condensación de cromatina y fragmentación dependiente de caspasas, ondulamiento de la membrana y generación de cuerpos apoptóticos, y b) MCP similar a necrosis, independiente de caspasas, caracterizada por condensación de cromatina marginal o ausente, falta de fragmentación nuclear y deterioro de la integridad de membrana. Otra vía apoptótica activada por TNF es la evolutivamente conservada vía de muerte lisosomal, que es mediada por la familia de proteasas de catepsina.

Por otra parte, TNF-R1 puede activar las vías de NF- κ B y JNK, las cuales pueden iniciar respuestas inflamatorias, proliferativas y también anti-apoptóticas. En particular, la activación de NF- κ B promueve la síntesis del inhibidor de kappa B (I κ B) y factores anti-apoptóticos, tales como la proteína inhibidora de FLICE y miembros

de la familia IAP, que son potentes inhibidores de la MCP. Aunque, bajo ciertas circunstancias, NF- κ B puede promover la muerte celular mediante la inducción de genes que codifican receptores de muerte o por la represión de genes antiapoptóticos (Pacífico y Leonardi, 2006). Hasta el momento, se desconoce que eventos determinan en última instancia si la activación de NF- κ B induce una respuesta anti-apoptótica o pro-apoptótica.

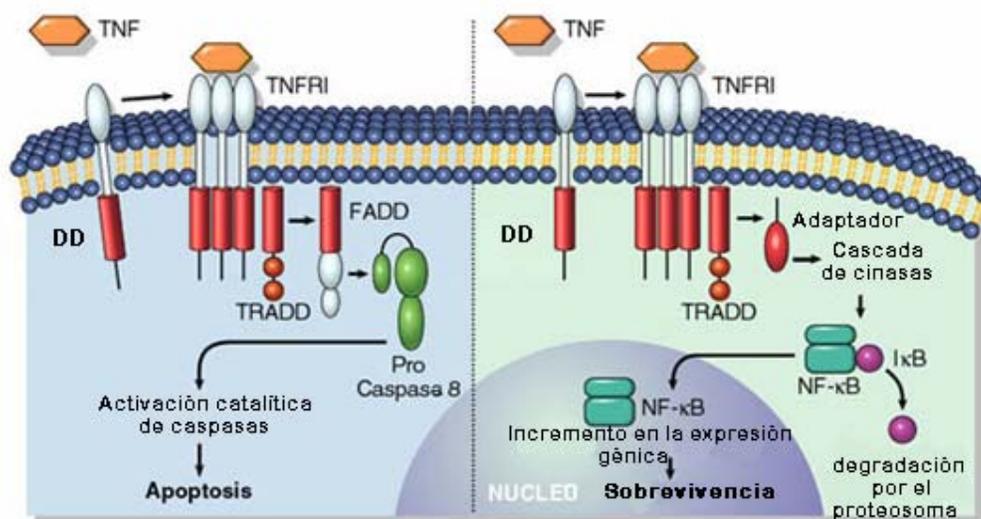


Figura 1. Vías de señalización inducidas por la unión de TNF- α a su receptor tipo I. DD: dominio de muerte; FADD: dominio de muerte asociado a Fas; I κ B: inhibidor de kappa B; NF κ B: Factor nuclear kappa B; TNF: factor de necrosis tumoral; TNFRI: Receptor I de TNF; TRADD: dominio de muerte asociado al receptor de TNF.

La señalización mediada por el receptor tipo 2 está confinada a las células hematopoyéticas y endoteliales, y hasta el momento no se conoce mucho sobre su estructura y función. Aunque se ha visto que pro-TNF se une a TNF-R2 a través de contacto directo célula-célula y presenta una mayor afinidad por éste receptor que la molécula de TNF soluble. Además el receptor tipo 2 carece del dominio de muerte intracelular y, por tanto, no podría estimular el proceso de apoptosis, aunque su interferencia en la muerte celular programada por medio de NF- κ B y la activación de la vía JNK, o la inhibición de TRAF-2 aún se desconoce.

I.6. Efectos del TNF sobre los tumores y la angiogénesis

El TNF-R1 ha mostrado tener efectos citostáticos y/o citotóxicos en algunas líneas celulares tanto humanas como animales. El desarreglo genómico propio del desarrollo tumoral puede en sí sensibilizar las células malignas a la muerte celular ocasionada por TNF mediante una inducción de la sobreexpresión de Catepsina B (Fehrenbacher et al., 2004), lo que en parte explicaría la citotoxicidad selectiva del TNF hacia el cáncer en comparación a los tejidos normales. También se ha comprobado recientemente que la unión de TNF a este receptor activa una vía de señalización que incluye la activación de la esfingomielinasa ácida (A-SMase), una enzima que promueve la generación de ceramida. La ceramida induce la maduración de la prepro-catepsina D (52 KDa) hacia pro-catepsina D activa (48 KDa) unida a la membrana y a la isoforma soluble activa de la catepsina D (32 KDa), así como la translocación de ésta última desde los endosomas hacia el citosol. En el citosol la catepsina D puede cortar a Bid, que a su vez induce la liberación del citocromo c de la mitocondria y la activación de las caspasas 3 y 9, culminando con la apoptosis de la célula (Heinrich et al., 2004). Es importante señalar que se ha documentado la acidificación del citoplasma en la progresión de la apoptosis, antes de que se presenten los cambios morfológicos, y que es un evento necesario para la activación de las caspasas en la vía mitocondrial de apoptosis (Matsuyama et al., 2000).

Fisiológicamente, los vasos sanguíneos se encuentran entre los principales blancos de las citocinas en el proceso de inflamación. Se cree que el efecto principal del TNF en el endotelio es la activación de las células endoteliales, incluyendo el incremento en la cantidad de receptores de superficie y la pérdida de adhesión intercelular. Bajo circunstancias patológicas, la sobreexpresión de TNF mantiene el fenómeno inflamatorio (aumento en la permeabilidad vascular, congestión y adhesión de leucocitos en la pared del vaso, diapedesis de leucocitos a través del endotelio, daño tisular por la infiltración de leucocitos) característico de algunas enfermedades, como el choque séptico y la autoinmunidad.

Los efectos vasculares del TNF seguramente son críticos para su actividad antitumoral. En el modelo de fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno, las células tumorales son resistentes al efecto citotóxico del TNF *in vitro* mientras que, de manera consistente, la administración sistémica de TNF *in vivo* provoca necrosis hemorrágica de tumores subcutáneos (vasculares), pero no de tumores

intraperitoneales (avasculares, ascíticos) (Van de Wiel et al., 1989). La inyección intratumoral de TNF en tumores humanos transplantados en ratones desnudos provoca también necrosis hemorrágica, pero si se administra por vía intraperitoneal o sistémica no produce efecto (Furrer et al., 1997). A pesar de que dosis bajas de TNF tienen un efecto favorable en la angiogénesis, dosis altas de ésta citocina provocan la destrucción de los vasos sanguíneos recién formados (Fajardo et al., 1992). Hace unos pocos años se demostró que el receptor 1 de TNF presente en las células endoteliales podría ser uno de los blancos más importantes para la actividad antitumoral del TNF. Empleando ratones knock out (KO) para TNF-R1 y TNF-R2, se observó que la administración de TNF resulta en necrosis tumoral sólo en los animales de tipo silvestre y en los KO para TNF-R2, pero no en los KO para TNF-R1 (Stoelcker et al., 2000).

La actividad antitumoral del TNF también está mediada por el sistema inmune. Es bien sabido que el TNF estimula la inmunidad innata *in vitro* y en modelos animales. El TNF induce la producción de otras citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8) y factores citotóxicos (óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno) en los macrófagos, lo que podría mediar la supresión de tumores en ratones. En humanos se ha visto que el tratamiento de células NK *in vitro* con TNF incrementa la actividad citolítica antitumoral y la producción de proteínas relacionadas con citotoxicidad (INF- γ , TIA-1).

El TNF juega un papel fisiológico importante en la regulación del crecimiento, la diferenciación celular, y la respuesta a infecciones virales, fúngicas y parasitarias. Sin embargo, la sobreexpresión inapropiada de esta citocina ha sido implicada en la patogénesis de un amplio espectro de padecimientos humanos, como la autoinmunidad (esclerosis múltiple, artritis reumatoide), alergias, choque séptico y resistencia a la insulina. También podría ejercer efectos promotores sobre tejido tumoral puesto que se ha observado que dosis bajas de TNF pueden promover la proliferación de algunas líneas celulares malignas (Wu et al., 1993; Ferrajoli et al., 2002). Además, se ha visto que puede aumentar la expresión de metaloproteasas de la matriz en células malignas (Leber y Balkwill, 1998; Katerinaki et al., 2003). Algunos autores refieren que células cancerosas que secretan TNF muestran un alto índice de metástasis y que éste fenómeno se revierte administrando anticuerpos que neutralizan al TNF (Orosz et al., 1993; Waterston et al., 2004). Aunque éste efecto no es universal, ya que algunos tumores transfectados con TNF son rápidamente

rechazados o favorecen la formación de metástasis dependiendo de la línea celular empleada (Qin et al., 1993). Mas aún, aunque dosis altas de TNF inducen que la vasculatura tumoral se colapse, se cree que dosis bajas crónicas de la citocina promueven la angiogénesis y este efecto parece estar mediado por la sobreexpresión, provocada por el TNF, de factores pro-angiogénicos tales como VEGF, VEGF-R2, b-FGF, IL-8, PAF, efrina-A, NO, E-selectina e ICAM-1 (Yoshida et al., 1997; De Cesaris et al., 1999; Cheng y Chen, 2001; Nabors et al., 2003) .

El papel de TNF- α en la hipófisis, particularmente su efecto sobre la síntesis y la liberación de PRL, no está resuelto. TNF- α (Arras et al., 1996) y su receptor (Kobayashi et al., 1997) son expresados en la hipófisis anterior y se han ubicado en células liberadoras de hormonas, pero ni uno ni otro se han investigado en los lactotopos. Se ha reportado que TNF- α aumenta (Koike et al., 1991; Yamaguchi et al., 1991) o disminuye (Theas et al., 2000; De Laurentiis et al., 2002) la liberación de la PRL en cultivos primarios de células hipofisarias. Recientemente se ha reportado que el TNF- α es un potente activador del promotor de PRL en la línea celular GH3 y que este efecto está asociado a la activación del NF- κ B (Friedrichsen et al., 2006). También se ha detectado la presencia de TNF-R1 en ésta línea celular y si infectan dichas células con vectores adenovirales para sobreexpresar el TNF- α , las células mueren por apoptosis (Candolfi et al., 2006). Pero aun no se han realizado estudios en la línea celular GH4C1 y además, no se conoce el efecto de TNF- α sobre la generación de vasoinhibinas.

II. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, no hay una explicación clara para la disminución en el crecimiento y la densidad de vasos sanguíneos en tumores hipofisarios. Se ha propuesto que la acción antiangiogénica de las vasoinhibinas es la base de la supresión del crecimiento de vasos sanguíneos en adenomas hipofisarios (Turner et al., 2003). Sin embargo, la PRL y las vasoinhibinas se expresan en la hipófisis normal y la inhibición en la formación de nuevos vasos sanguíneos, sugiere un aumento en la expresión de PRL asociada con el desarrollo de un nuevo tumor. Debido a que el crecimiento de un tumor generalmente se asocia a procesos inflamatorios, el papel potencial de las citocinas proinflamatorias como TNF- α modulando la expresión de PRL merece ser estudiado. Un aumento en la expresión de PRL y la formación de vasoinhibinas podría mediar el efecto de TNF- α , provocando la apoptosis de nuevas células endoteliales en este tipo de tumores.

Este proyecto se diseñó para investigar los efectos de TNF- α sobre la expresión de PRL en dos preparaciones distintas de cultivos hipofisarios. Una es un cultivo primario de células de la hipófisis anterior, que es heterogéneo e incluye varios tipos de células además de los lactotopos. En esta preparación, TNF- α puede actuar directamente sobre los lactotopos o, indirectamente, sobre otras células para inducir cambios en la expresión de PRL. La segunda preparación consiste en lactotopos GH4C1, provenientes de un tumor hipofisario de rata. Aunque este cultivo no contiene las otras células del cultivo primario, permitirá analizar más directamente los efectos de la citocina sobre la expresión de PRL en lactotopos.

III. HIPÓTESIS

El TNF- α estimula la expresión de PRL y su procesamiento a vasoinhibinas en los tumores hipofisarios.

IV. OBJETIVOS

Analizar los efectos de TNF- α en la transcripción y traducción de PRL y la generación de vasoinhibinas en cultivos primarios de adenohipófisis y lactotropos transformados.

- I. Determinar el efecto del TNF- α sobre el nivel de expresión de PRL en células adenohipofisarias normales y de la línea celular GH4C1.
- II. Evaluar el efecto del TNF- α sobre los niveles de PRL y de vasoinhibinas en el medio condicionado y en los lisados de células adenohipofisarias normales y de la línea celular GH4C1.
- III. Determinar si el TNF- α modifica la actividad enzimática responsable de generar vasoinhibinas en el medio condicionado de células adenohipofisarias normales y de la línea celular GH4C1, y si esta enzima corresponde a la catepsina D.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Cultivo celular

Se emplearon dos tipos de cultivo celular: cultivos primarios de adenohipófisis de rata y la línea celular GH4C1. Las células GH4C1 (Tashjian et al., 1970) son una subclona de la línea celular GH3 que fue aislada en 1966 a partir de un tumor hipofisario de rata inducido por rayos X, y que produce GH y PRL (Ooi et al., 2004). Las células GH4C1 fueron cultivadas en cajas de 35 mm de diámetro a una concentración subconfluente de 100 000 células por pozo en medio F10 (SIGMA, St. Louis MO) con 15% suero de caballo inactivado (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA), 2.5% suero fetal bovino inactivado (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) y penicilina-estreptomicina 1% (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37°C en presencia de 5% CO₂.

Los cultivos primarios de adenohipófisis fueron obtenidos a partir de adenohipófisis de ratas macho de la cepa Wistar (250 g) que fueron procesadas de acuerdo al método reportado por Pérez y Apfelbaum (1992). Brevemente, la adenohipófisis se extrae y se lava con Buffer Hank's para eliminar el exceso de sangre. El tejido se corta en pedazos muy pequeños y se resuspende en 10 ml de buffer Hank's, se centrifuga y el botón se dispersa enzimáticamente mediante su incubación con 3 ml de colagenasa tipo I (Worthington, 200 U/mg) (1.6 mg/ml en buffer Hank's) y 200 µl de DNasa tipo I (Sigma, 2500 U/mg) (1 mg/ml en buffer Hank's) durante 1 hr a 37°C. Se adicionan 200 µl más de DNasa y el tejido se dispersa mecánicamente haciendo pasar la suspensión varias veces a través de una pipeta Pasteur. Las células se centrifugan y se resuspenden en medio DMEM I (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) adicionado con 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina 1%. Las células se siembran en cajas Petri recubiertas con una capa de matriz extracelular MATRIGEL (BD Biosciences, Bedford, MA). Después de 48 h las células se resiembran en Opti-MEM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA), que es un medio de composición definida que no contiene suero, para sincronizar el ciclo celular y se mantienen a 37°C en presencia de 5% CO₂.

V.2. Tratamientos con TNF-α

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación durante 24 h previas al tratamiento en Opti-MEM. Posteriormente se lavaron con el mismo medio un par de

veces y enseguida se adicionó 1 ml de Opti-MEM conteniendo 12.5, 25 o 50 ng/ml de TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO₂ para luego ser procesadas y obtener muestras de medio condicionado y lisados celulares, así como para hacer la extracción de RNA total. También se realizó otro juego de experimentos en los cuales se trató a las células GH4C1 con TNF- α durante 8 h, para observar si el TNF- α podría ejercer efectos tempranos sobre la producción de PRL. Los cultivos control fueron procesados de manera idéntica pero se adicionó Opti-MEM sin TNF- α . Cada experimento incluyó tres repeticiones idénticas de tratamiento y de control. Se realizaron 3 experimentos independientes.

V.3. Aislamiento y purificación de ARN

El ARN total se purificó mediante el método de isotiocianato de guanidina con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El reactivo TRIzol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, constituye una modificación del método Chomczynski y Sacchi (1987) para aislar ARN en un solo paso. El medio de las células fue aspirado y luego se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos (PBS) para retirar el exceso. A cada una de las cajas de cultivo se les adicionó 1 ml de TRIzol y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min para luego hacer pasar el lisado a través de una pipeta y transferirlo a un tubo eppendorf. Se adicionaron 200 μ l de cloroformo a cada tubo los tubos y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos para luego incubarlos a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugaron para separar la fase acuosa que contiene el ARN y pasarla a un tubo nuevo. Para precipitar el ARN de la solución se adicionaron 0.5 ml de alcohol isopropílico y luego se centrifugaron para decantar el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua desionizada libre de RNasa. De esta solución se preparó una dilución 1:100 en agua desionizada libre de RNasa para medir en un espectrofotómetro la relación de absorbencia A_{260}/A_{280} y determinar la pureza y la concentración del ARN obtenido.

V.4. Retrotranscripción

El ARN (1 μ g) se retrotranscribió utilizando la enzima Superscript II Transcriptasa Inversa (Invitrogen) y oligo (dT)₁₇. Al ARN en solución se le adicionó el oligo dT y en el termociclador se incubó durante 3 min a 65°C para romper uniones inespecíficas en el ARN y permitir que se extienda por completo la cadena, de esta

manera se puede unir el oligo dT en forma correcta a la cola poli A de los ARNm; posteriormente el tubo donde se llevó a cabo la reacción se colocó en hielo y se le adicionó buffer single strand conteniendo ditiotretitol 100mM, mezcla de dNTPs 200 μ M e inhibidor de RNasa 5 U (todos de Invitrogen), el tubo se colocó nuevamente en el termociclador a 42°C, se añadió la enzima y se mantuvo a esa temperatura durante 2 horas para que se lleve a cabo la reacción, luego se incubó 20 min a 65°C y finalmente a 4°C. Las muestras de ADNc fueron almacenadas a -80°C.

V.5. PCR en tiempo real

En la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, mediante detección por fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es directamente proporcional al ADN formado. Para la amplificación del mensajero de PRL de rata se emplearon los oligos CCT GGA ATG ACC CTC TGT TT (sentido) y GAT TCT TCA TCA ACT CCT TGC (antisentido). Se tomó 1 μ l de la mezcla de retrotranscripción y se adicionó buffer single strand conteniendo dNTPs 200 μ M, 250 nm de cada oligo y 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen) y SYBR-Green. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización a 94°C/1 seg, hibridación a 62°C/3 seg y extensión a 72°C/12 seg durante 50 ciclos. Se determinó la temperatura de disociación de los productos para verificar si hay productos inespecíficos. Por último se verifica la temperatura a la cual se ha amplificado el 50% de productos y en base a ella se calculó la concentración inicial de ADNc. Para normalizar los resultados de la amplificación de PRL contra la cantidad de ADNc, se midió la concentración de actina en otro juego de las mismas muestras. Se emplearon los oligos CCA TCA TGA AGT GTG ACG TTG (sentido) y ACA GAG TAC TTG CGC TCA GGA (antisentido) y se usó un ciclo de desnaturalización a 94°C/1 seg, hibridación a 56°C/10 seg y extensión a 72°C/16 seg durante 40 ciclos. La concentración de ADNc de PRL en cada muestra de ADNc fue normalizada contra la concentración de ADNc de actina para determinar el valor final.

V.6. Lisados celulares y medios condicionados

Después de los tratamientos con TNF- α se colectó el medio condicionado de cultivo condicionado por las células, las muestras fueron concentradas por

centrifugación a 2300 rpm, a una temperatura de 4 °C durante 40 min en columnas Centricon con un tamaño de poro de 10 KDa. El medio condicionado concentrado fue colectado y se separó en alícuotas que fueron almacenadas a -80 °C. Las células fueron lavadas con PBS y se les adicionó buffer de lisis (Igepal 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Aprotinina 1 µg/ml, PMSF 0.5mM y TRIS pH 7.4 50 mM), luego de unos minutos el lisado se hizo pasar varias veces por la punta de una pipeta para asegurar que las células se hubiesen lisado por completo. A ambos tipos de muestra se les determinó el contenido de proteína total por el método Bradford.

V.7. Cuantificación de proteína por el método Bradford

Se prepararon soluciones para realizar una curva estándar de albúmina sérica de bovino de 0, 0.5, 1, 2, 4 y 8 µg y se colocaron 800 µl en cada tubo. De igual manera se disponen tubos por duplicado para cada una de las muestras y se colocan 10 µl de cada una de ellas en 800 µl de agua desionizada. Se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford a cada tubo y se agitaron en vórtex brevemente, el desarrollo de color se llevó a cabo en unos pocos segundos. Cada solución se transfirió a una cubeta para leer la absorbencia a 595 nm en el espectrofotómetro. Realizando el análisis de regresión lineal con los datos obtenidos para la curva estándar se calculó la concentración de cada una de las muestras.

V.8. Western blot

Las muestras de los homogenados celulares y los medios condicionados se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y la inmunodetección se realizó empleando un antisuero anti-PRL producido en el laboratorio llamado C2 (antisuero generado en conejo contra PRL de rata) en una dilución 1:1000 en PBS-Tween y posteriormente un segundo anticuerpo contra IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:5000 en PBS-Tween. Las membranas donde se analizaron las muestras de lisado celular también fueron incubadas con un primer anticuerpo anti-Actina generado en cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA) 1:250 en PBS-Tween y luego con un segundo anticuerpo dirigido contra IgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, CA) 1:5000 en PBS-Tween. El revelado de las proteínas se realizó

empleando un estuche comercial (BIO-RAD Laboratorios, Hercules, California). Los blots fueron escaneados y analizados por densitometría.

V.9. ELISA

Se emplearon placas Immulon 2 de polivinilo, cada pozo se forró con el antígeno, en este caso la PRL diluída en amortiguador de carbonatos y se incubaron por 16 h a 4°C. Se prepararon soluciones para una curva estándar de prolactina en el rango de 0.04 a 20 ng en 50 µl de amortiguador de fosfatos (PBS) 0.05%, Tween 20, 1% albúmina sérica de bovino (BSA). Se prepararon diluciones de las muestras problema (3, 6, 12, 25 y 50 µl) a un volumen final de 50 µl con el mismo amortiguador. A cada serie de diluciones se les adicionó el primer anticuerpo (50 µl dilución 1:4000) y se incubaron 16 h a 4°C. Las placas forradas con el antígeno se lavaron con PBS 0.05% Tween 20, 1% BSA y se incubaron durante 1 hr con 100 µl por pozo con solución bloqueadora (PBS Tween 0.05%, 1% BSA). Las placas se lavaron nuevamente con la misma solución y se añadieron 50 µl de cada una de las muestras problema en el pozo correspondiente, así como las soluciones preparadas para la curva estándar. La placa se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Para revelar los complejos antígeno-anticuerpo se agregaron 50 µl por pozo de una dilución 1:4000 de un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa y de nuevo se incubó a temperatura ambiente. Transcurridas 2 h se lavaron las placas nuevamente y se hizo el revelado por adición de 50 µl por pozo de una solución de o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno manteniéndolo en oscuridad por 15 min. La reacción se detuvo agregando 50 µl de ácido sulfúrico 4N. La cuantificación se realizó por lectura de absorbencia a 490 nm en espectrofotómetro.

V.10. Análisis estadístico

Las membranas fueron escaneadas y las bandas analizadas por densitometría mediante el programa Kodak 1D v 3.5.3 Scientific Imaging Systems (New Haven, CT). Los datos se expresaron como el promedio \pm error estándar de por lo menos tres experimentos independientes. Los promedios se compararon mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba post-hoc Bonferroni o mediante una prueba t de Student, con una $p < 0.05$ para determinar significancia en todos los experimentos. Los datos fueron normalizados contra un gen o proteína control en todos los experimentos de PCR así como en el Western blot.

VI. RESULTADOS

VI. 1. Efecto del TNF- α sobre el nivel de ARNm de PRL

Inicialmente se determinó el efecto del TNF- α sobre la expresión de PRL en cultivos primarios de células adenohipofisarias y en los lactotropos transformados GH4C1. Ambos cultivos fueron tratados o no con 3 diferentes concentraciones de TNF- α durante 24 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje de inducción con respecto al control. La gráfica de la figura 2 muestra que el TNF- α estimuló marcadamente la expresión del ARN mensajero de PRL (4 y 8 veces con 12.5 y 50 ng/ml, respectivamente) en las células GH4C1, pero no la modificó en los cultivos primarios de células hipofisarias.

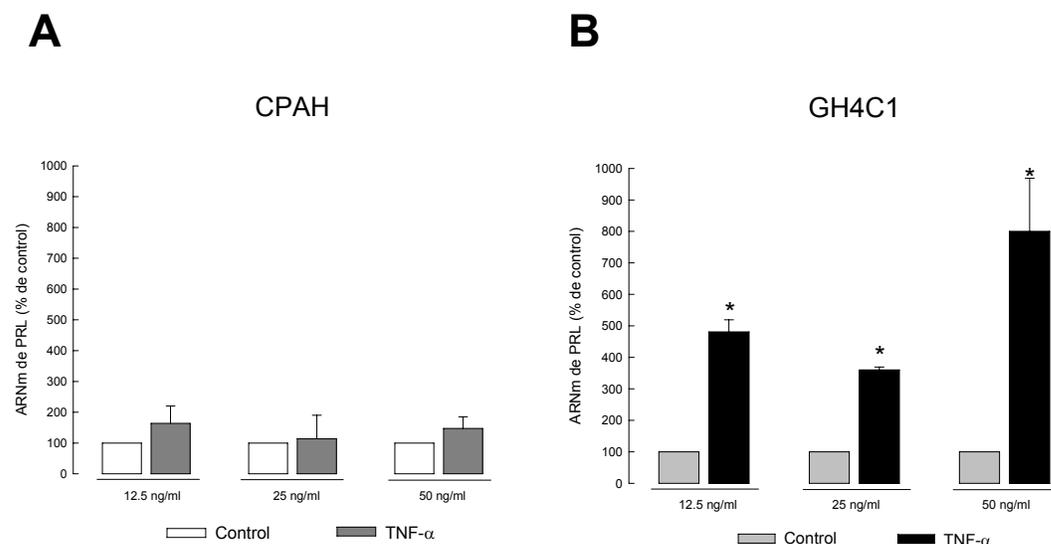


Figura 2. Efecto del tratamiento con TNF- α sobre la expresión del ARNm de PRL. La expresión de PRL se analizó por RT-PCR a partir del ARN purificado de (A) células de cultivos primarios de adenohipófisis (CPAH) y de (B) células GH4C1, tratadas con 12.5, 25 y 50 ng/ml de TNF- α . Los resultados fueron normalizados contra el control correspondiente. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar. *p < 0.05 con respecto al control.

VI. 2. Efecto del tratamiento con TNF- α sobre la generación intracelular de PRL.

Para determinar si los cambios en la expresión del ARN mensajero de PRL en las células GH4C1 se correlacionan con cambios en los niveles de la proteína, se determinó el efecto del tratamiento con 12.5, 25 y 50 ng/ml de TNF- α durante 24 h sobre la concentración de PRL presente en las células en cultivo, evaluada por ELISA (Fig. 3). De acuerdo con los niveles del mensajero de PRL previamente analizados, el TNF- α no produjo cambios en la cantidad de PRL producida en las células de los CPAH excepto a la dosis máxima de 50 ng/ml. En las células GH4C1, el tratamiento con 12.5 y 50 ng/ml no afectó la cantidad de PRL intracelular mientras que, a la dosis de 25 ng/ml se aprecia un aumento significativo de 2 veces la cantidad de PRL.

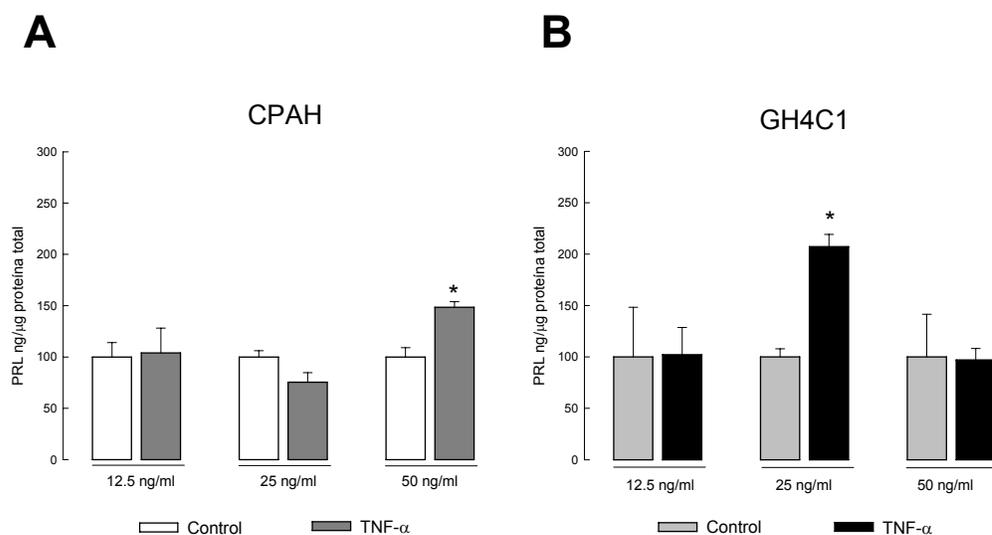


Figura 3. Cuantificación de la PRL intracelular por ELISA en muestras de CPAH (A) y cultivos de GH4C1 (B) tratados con TNF- α . Cultivos primarios adenohipofisarios y cultivos de GH4C1 fueron tratados o no con 12.5, 25 y 50 ng/ml de TNF- α , luego de 24 h las células fueron lavadas y lisadas para determinar la concentración intracelular de PRL por el método de ELISA. Los valores fueron normalizados con respecto al control correspondiente y las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0.05$ con respecto al control.

La producción de PRL en las células también fue evaluada mediante el análisis de las muestras por Western blot y densitometría de bandas. En las muestras analizadas por Western blot, la banda de ~23 kDa representó la gran mayoría de la señal marcada por el anticuerpo policlonal anti-PRL (Fig. 4A); la presencia de bandas en el rango de 12-17 kDa que correspondan a las vasoinhibinas fue muy débil o ausente. Por esta razón, se evaluó la densidad de la banda de ~23 kDa como la señal de la PRL intracelular. En la figura 4A se muestran ejemplos representativos de las bandas de PRL obtenidas, en condiciones control y de tratamiento con TNF- α ; así como las bandas correspondientes a la inmunodetección de actina donde se observa que la cantidad de proteína total cargada en cada gel fue la misma. La densitometría de las bandas (fig. 4B) indica que el TNF- α no produjo cambios en los niveles de PRL intracelular a la dosis de 12.5 ng/ml en los CPAH, pero hay un incremento significativo en la cantidad de PRL a la dosis de 25 ng/ml y también un aumento a la concentración de 50 ng/ml que no es significativo. En el caso de las células GH4C1 (Fig. 4C) el TNF- α estimuló la producción de PRL aproximadamente 4 veces independientemente de la dosis empleada en este rango de concentraciones.

VI. 3. Efecto del tratamiento con TNF- α sobre la liberación de PRL

Una vez evaluada la PRL intracelular se procedió a determinar la cantidad de PRL secretada al medio de cultivo. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos al realizar la determinación de PRL presente en el medio de cultivo por el método de ELISA, los valores de la PRL se expresaron como porcentaje del valor basal sin TNF- α . El TNF- α no tuvo efecto en el nivel de PRL presente en el medio de cultivo de los CPAH (Fig. 5A). En cambio, en las células GH4C1, el tratamiento con TNF- α aumentó 2 veces la concentración de PRL en el medio de cultivo independientemente de la dosis empleada (Fig. 5B).

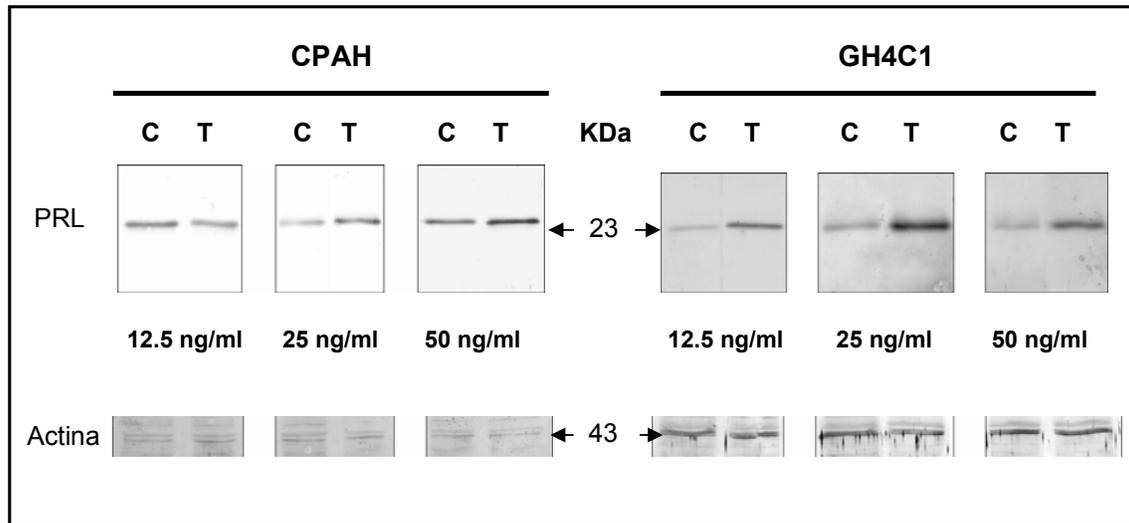
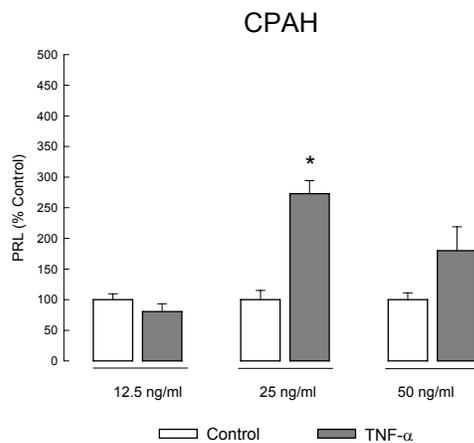
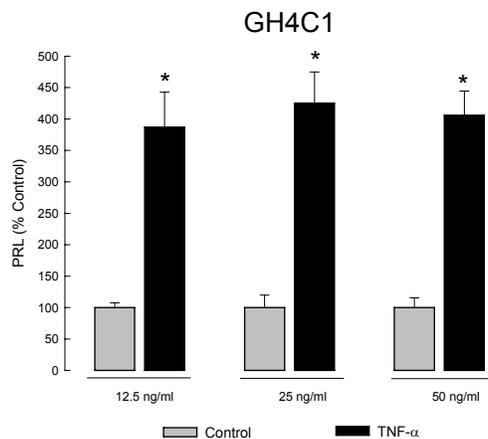
A**B****C**

Figura 4. Determinación de PRL en muestras de lisados celulares de CPAH y células GH4C1 tratadas con TNF- α , mediante Western blot y densitometría de bandas. (A) Ejemplos representativos de las bandas de PRL inmunoreactiva en los lisados celulares de cultivos no tratados (C) o tratados con TNF- α (T) durante 24 h a las concentraciones indicadas. La cantidad de PRL fue estimada por densitometría de las bandas de ~23 KDa en los CPAH (B) y en la línea celular (C). Los valores fueron normalizados con respecto a un control de actina y las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0.05$ con respecto al control.

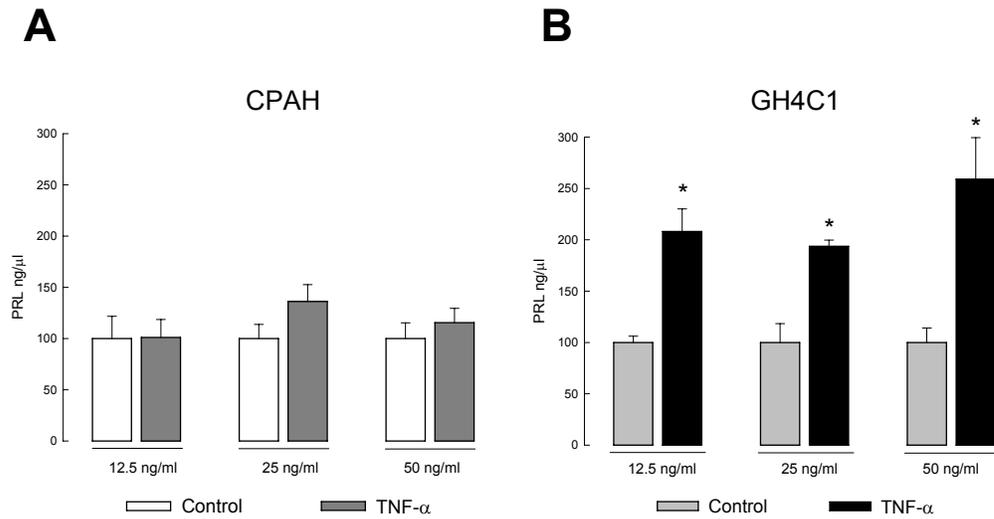


Figura 5. Cuantificación de la PRL secretada al medio de cultivo, en muestras de CPAH (A) y cultivos de GH4C1 (B) tratadas con TNF- α . Cultivos primarios adenohipofisarios y cultivos de GH4C1 fueron tratados o no con 12.5, 25 y 50 ng/ml de TNF- α , luego de 24 h el medio de cultivo fue colectado y concentrado para determinar la concentración de PRL por el método de ELISA. Los valores fueron normalizados con respecto al control correspondiente y las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0.05$ con respecto al control

También se evaluó la PRL de las muestras del medio condicionado por las células mediante la técnica de Western blot, donde se determinó la densidad de la banda de ~23 kDa como la señal de la PRL secretada (Fig. 6A). Los resultados obtenidos mediante la densitometría de bandas son congruentes con los datos obtenidos por la técnica de ELISA. El tratamiento con TNF- α no tuvo efecto en los niveles de la PRL detectados en el medio condicionado de los CPAH (Fig. 6B), pero aumentó significativamente la PRL (2 veces) en el medio de cultivo de las células GH4C1 a las tres dosis estudiadas (Fig. 6C). El efecto del TNF- α sobre la cantidad de PRL secretada al medio de cultivo por las células GH4C1 no parece ser dependiente de la dosis en este rango de concentraciones.

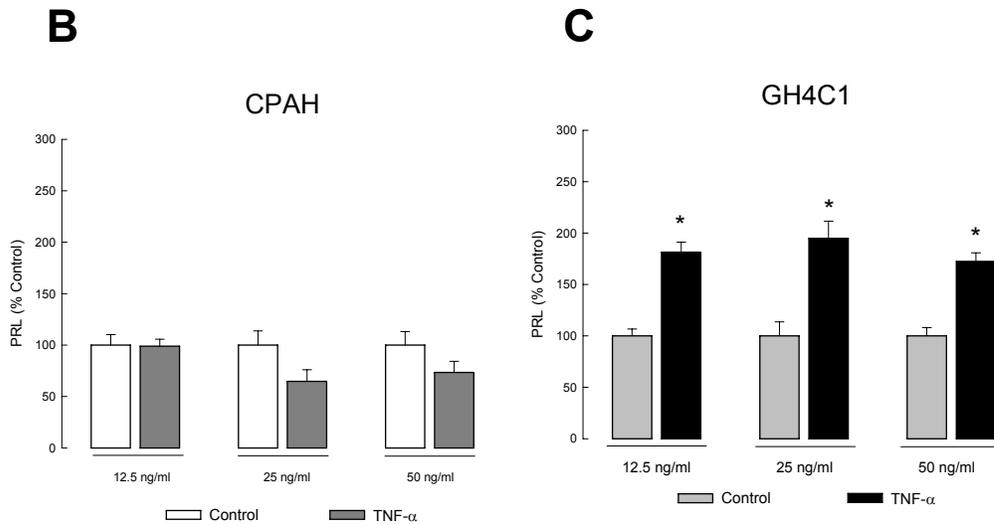
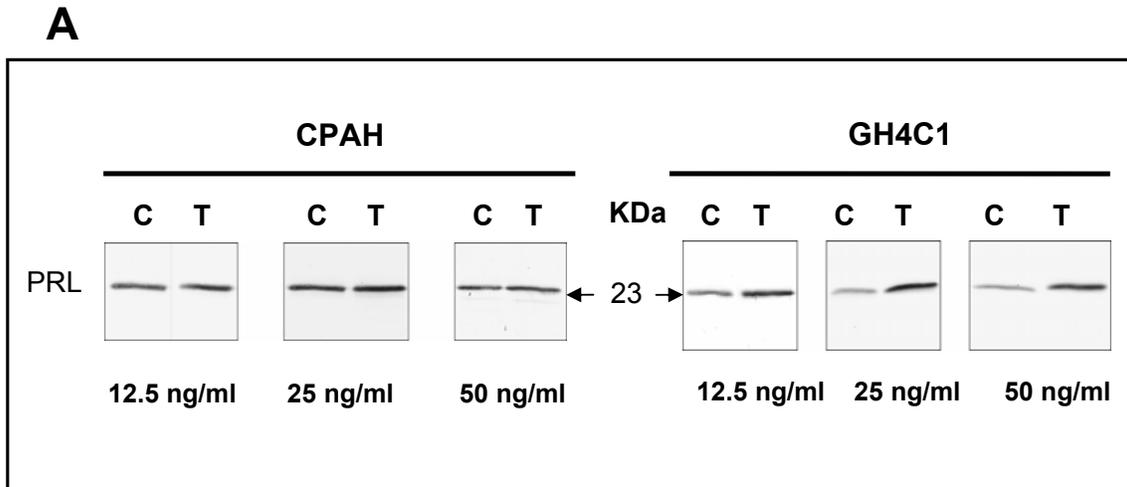


Figura 6. Efecto del tratamiento de CPAH y cultivos de GH4C1 con TNF- α , sobre la secreción de PRL al medio de cultivo, determinado por Western blot y densitometría de bandas. Ejemplos representativos de las bandas de PRL inmunoreactiva en muestras de medio condicionado por las células de CPAH y GH4C1 no tratadas (C) o tratadas con TNF- α (T) a las concentraciones indicadas (A). La cantidad de PRL fue estimada por densitometría de la banda de ~23 KDa en los CPAH (B) y la línea celular (C). Los valores fueron normalizados con respecto al control correspondiente y las barras representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm error estándar. * $p < 0.05$ con respecto al control.

VI.4. El tratamiento con TNF- α durante 8 h no modifica la producción ni la secreción de PRL en cultivos de células GH4C1.

Con la intención de observar si el TNF- α pudiera producir un efecto temprano, se realizó un nuevo juego de experimentos en los que se trató a las células GH4C1 con 12.5 ng/ml de TNF- α durante un lapso más corto. Las muestras fueron colectadas luego de 8 h de tratamiento, que se considera un periodo suficiente para permitir que se lleven a cabo los procesos de transcripción y traducción, de tal manera que se puedan observar cambios a nivel de la proteína. El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante Western blot donde se empleó el anticuerpo policlonal contra PRL C2. Al realizar la densitometría de las bandas (Fig. 7) se observó que no existe diferencia entre la cantidad de PRL producida en los cultivos tratados con TNF- α en comparación con los cultivos control. Esta observación es válida tanto para la PRL intracelular, como para la PRL secretada al medio de cultivo.

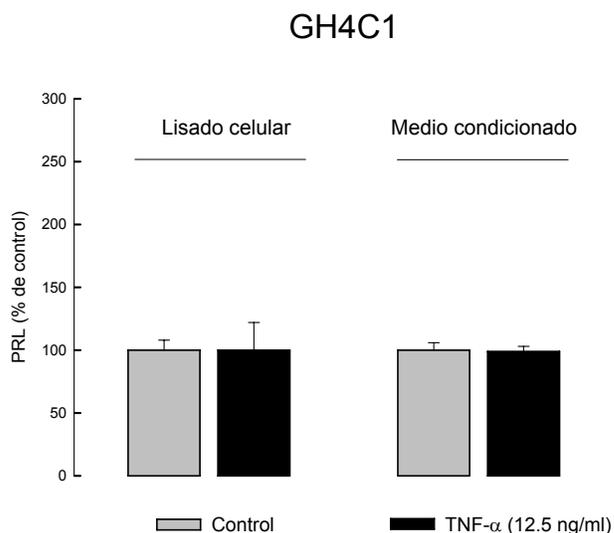


Figura 7. Determinación de la PRL intracelular y secretada al medio de cultivo por las células GH4C1 luego del tratamiento con 12.5 ng/ml de TNF- α durante 8 h. Cultivos de células GH4C1 fueron tratadas o no, con 12.5 ng/ml de TNF- α , luego de 8 h se colectó y concentró el medio de cultivo, y las células fueron lavadas y lisadas para luego analizar las muestras mediante Western blot para PRL y la densitometría de las bandas inmunoreactivas. Los valores fueron normalizados con respecto al control.

VI.5. Las vasoinhibinas están presentes en el lisado celular de los CPAH y las células GH4C1.

El análisis de las muestras mediante Western blot para PRL es el único método que permite observar a las vasoinhibinas. Aunque en la mayoría de los experimentos se detectó solo una banda con un peso de ~23 KDa, en un par de

ocasiones, cuando las muestras presentaron una mayor concentración de proteína total, se detectó una banda débil con un peso aproximado de 16 KDa en el lisado celular de los CPAH en condiciones normales (Fig. 8A), esta banda de menor peso siempre representó menos del 5% de la señal total de PRL de 23 KDa. Cuando se cargó una muestra de lisado celular de GH4C1 que contenía 10 veces más proteína total, fue posible distinguir una banda débil con un peso aproximado de 16 KDa. Las vasoinhibinas se caracterizan por contener el extremo amino terminal (N-term) de la PRL. Para determinar si el fragmento de 16 KDa observado en el lisado celular los CPAH corresponde a vasoinhibina se analizaron las muestras por Western blot empleando 3 diferentes anticuerpos: el anticuerpo policlonal C2 anti-PRL, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo N-term de la PRL denominado INN-1, así como un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo carboxilo terminal (C-term) de la PRL (INN-368). El anticuerpo policlonal detectó las bandas de ~23 kDa y 16 kDa en los lisados (Fig. 8B), al igual que el anticuerpo monoclonal INN-1 marcó las dos bandas. En contraste, el anticuerpo monoclonal INN-368 reconoció solamente la banda de 23 kDa, mostrando que el fragmento de ~16 kDa corresponde a un fragmento amino terminal.

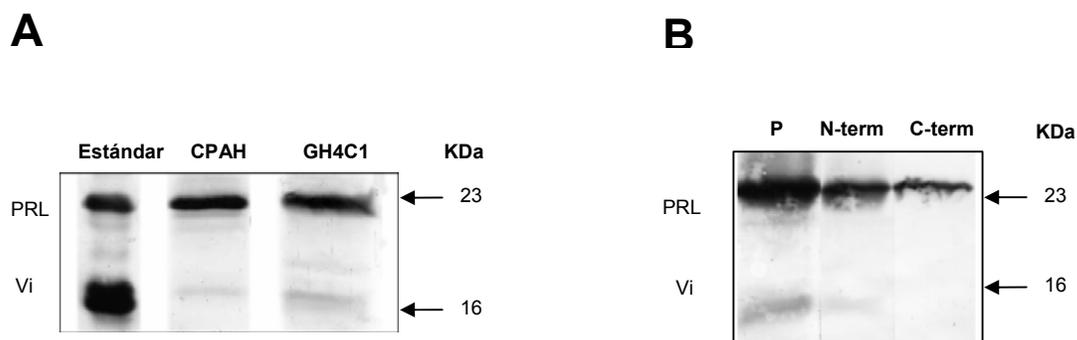


Figura 8. Inmunodetección de PRL y Vi en el lisado celular de CPAH y células GH4C1. (A) Ejemplos de muestras de los lisados celulares de CPAH y GH4C1 no tratados analizadas por Western blot donde aparecen bandas inmunoreactivas de ~16 kDa. (B) Inmunodetección de PRL en muestras idénticas de lisado celular de CPAH no tratados empleando diferentes anticuerpos; un anticuerpo policlonal anti-PRL (P), un anticuerpo monoclonal dirigido contra la región N-terminal de la PRL (N-term) o un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo C-terminal de PRL (C-term). Se indican los pesos estimados de las bandas.

VI.6. La acidificación del medio condicionado por las células GH4C1 promueve la generación de vasoINHIBINA.

La PRL puede ser cortada hacia vasoINHIBINA por acción de la cathepsina D, una proteasa que presenta actividad óptima a un pH ácido. Para determinar si hay actividad proteolítica en el medio de cultivo de las células GH4C1, se incubó el medio condicionado concentrado a pH 5.5, que está en el rango óptimo de actividad de la cathepsina D. La generación de los fragmentos de PRL fue analizada por Western blot. No hubo evidencia para la producción de fragmentos de PRL en el medio de cultivo de células no tratadas (Fig. 9A). Sin embargo, se detectó una banda de ~16 kDa en el medio de cultivo acidificado de las células GH4C1 tratadas con 12.5 ng/ml TNF- α . La banda de ~16 kDa representó el 11% de la señal total de las banda de PRL (23 KDa) en las muestras que fueron tratadas con TNF- α (Fig. 9B). La señal de PRL de 16 kDa en muestras control fue nula o estuvo por debajo de niveles detectables.

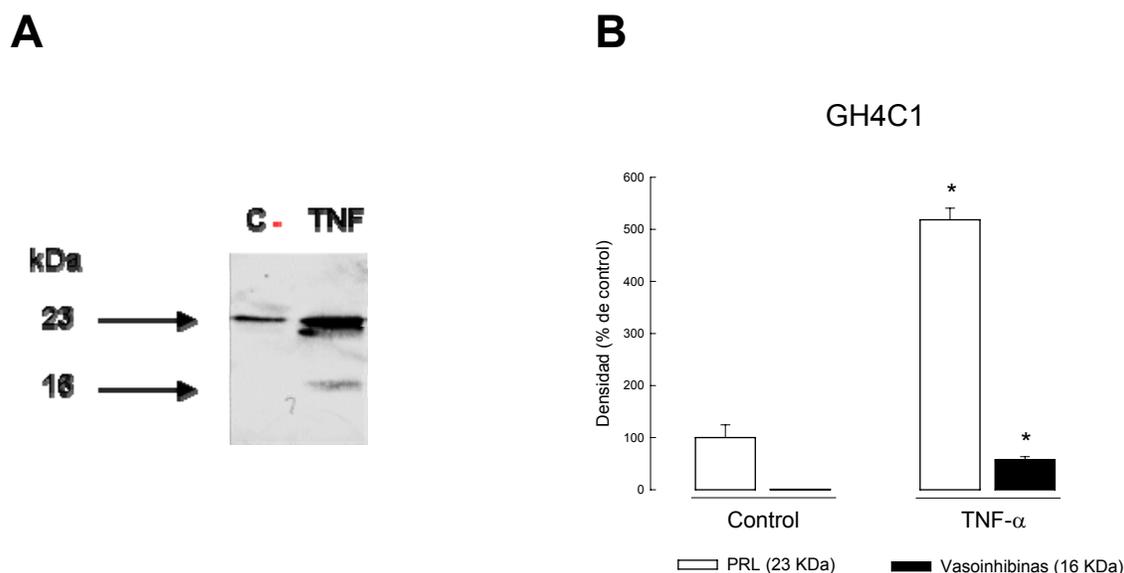


Figura 9. Vi en el medio condicionado acidificado de las células GH4C1. (A) Muestras de medio condicionado por las células GH4C1 tratadas (TNF) o no (C) con 12.5 ng/ml de TNF- α , incubadas a pH 5.5 durante 24 h y analizadas por Western blot para PRL. Se indican los pesos de las bandas detectadas. (B) Densitometría de bandas de PRL inmunoreactivas. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes \pm error estándar. * $p < 0.05$ con respecto al control.

VII. DISCUSIÓN

Los adenomas secretores de prolactina son los tumores hipofisarios que ocurren con mayor frecuencia. Los tumores hipofisarios generalmente son benignos y rara vez producen metástasis, este hecho se ha asociado con el hallazgo de que la hipófisis tumoral es un tejido menos vascularizado en comparación con la hipófisis normal. Debido a que la hipófisis es la principal fuente de la prolactina circulante y que esta hormona puede ser procesada mediante proteasas del tipo de la catepsina D hacia fragmentos proteicos que poseen propiedades antiangiogénicas, es posible que la presencia de estos fragmentos, denominados vasoinhibinas, formen parte importante del mecanismo por el cual la angiogénesis se encuentra fuertemente inhibida en este tipo de tumores.

El propósito del presente estudio fue el de investigar si la inflamación que se genera durante el desarrollo de un tumor puede ser un factor que promueva la producción de PRL y, consecuentemente, una mayor cantidad de vasoinhibinas. Para ello se empleó como modelo de estudio a la rata, se prepararon cultivos primarios de adenohipófisis a los cuales se administró un tratamiento con TNF- α , una de las principales citocinas proinflamatorias, durante 24 h a diferentes concentraciones y posteriormente se evaluó la expresión y secreción de PRL. Los mismos experimentos fueron llevados a cabo en cultivos de la línea celular GH4C1, que provienen de un prolactinoma de rata.

Los resultados muestran que el TNF- α ejerce un aumento marcado en la expresión del ARNm de PRL por las células GH4C1, a diferencia de los cultivos primarios de adenohipófisis donde no se observó efecto. Existen algunas diferencias notables que podrían explicar esta diferencia en la respuesta. Primero, los cultivos de células GH4C1 incluyen sólo somatolactotopos transformados, mientras que los cultivos primarios contienen varios tipos celulares además de los lactotopos, incluyendo los corticotopos, los tirotopos, los gonadotopos y los somatotopos (Denef et al., 2005). Al respecto, se ha encontrado que en cultivos primarios de hipófisis de ratas macho adultas, aproximadamente un 36% de las células son positivas para PRL (De Paul et al., 1997). Deberá determinarse qué porcentaje de células en los cultivos primarios adenohipofisarios de estos experimentos poseen las características de los lactotopos. Sin embargo, aún cuando se encontrara una fracción significativa de lactotopos en dichos cultivos, existe la posibilidad de que el

TNF- α produzca diferentes efectos en los diversos tipos celulares presentes en el cultivo. Puede ser que la estimulación sobre los lactotopos primarios sea inhibida o revertida por la secreción de algún factor liberado por otro tipo celular del cultivo en respuesta al tratamiento con TNF- α . Un ejemplo de un efecto indirecto sobre los lactotopos es la observación de que la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) estimula la secreción de PRL en la hipófisis en desarrollo, experimentos posteriores demostraron que la GnRH ejerce su efecto sobre los gonadotropos haciendo que liberen un factor que, a su vez, va a inducir la secreción de PRL por los lactotopos (Denef et al., 2001). Hay evidencias de que el receptor tipo 1 de TNF- α está presente en la hipófisis de la rata (Watanobe y Yoneda, 2003), pero hasta el momento no se ha determinado qué tipos celulares son los que poseen el receptor (Candolfi et al., 2006). En cultivos primarios de adenohipófisis de ratas hembra, el TNF- α a concentraciones altas es capaz de inducir apoptosis de los lactotopos, sugiriendo que hay receptores para TNF- α en estas células (Candolfi et al., 2002), pero se desconoce si los lactotopos del macho expresan de igual modo el receptor.

Segundo, las células GH4C1 son una línea celular inmortalizada derivada de un tumor hipofisiario y poseen características distintas de los lactotopos primarios. Por ejemplo, las células GH4C1 almacenan menos PRL que los lactotopos primarios debido a que no presentan gránulos grandes de secreción (Dannies et al., 1984). Además, las células transformadas GH, incluyendo a las GH4C1, no poseen receptores para dopamina (Cronin et al., 1980; Albert et al., 1990), el principal factor inhibidor de la secreción de PRL. Se ha reportado que el TNF- α puede activar el promotor de PRL extrahipofisiario (Gerlo et al., 2005). Además, recientemente Friedrichsen et al. (2006) demostraron que el TNF- α activa la transcripción del gen de PRL en las células GH3 mediante la vía de señalización del NF- κ B. De acuerdo con los resultados obtenidos es este trabajo, los autores encontraron que el tratamiento con 10 ng/ml de TNF- α durante 24 h estimuló 4 veces más el promotor del gen de la PRL en las células GH3.

Las diferencias entre los lactotopos primarios y los somatomamototopos transformados podrían ser desde el nivel de expresión de los receptores a TNF- α , la disponibilidad de las proteínas necesarias para las vías de señalización, la presencia de otros factores de transcripción estimuladores o inhibidores, o la estabilidad de los

depósitos intracelulares de PRL. Cada uno de estos potenciales mecanismos han de ser cuidadosamente estudiados.

El efecto estimulador del TNF- α sobre la expresión de PRL en las células GH4C1 se observó tanto a nivel del ARNm como de la proteína, indicando que el TNF- α ejerce sus efectos a nivel de la transcripción genética y la posterior traducción a proteína en estas células. El efecto del TNF- α sobre la cantidad de PRL intracelular y secretada al medio de cultivo no fue estrictamente dependiente de la dosis dentro del rango de concentración estudiado. Se seleccionó una concentración inicial de TNF- α de 12.5 ng/ml que corresponde a una dosis comúnmente usada en combinación con otras citocinas proinflamatorias para inducir inflamación (Asano et al., 1994). Se seleccionaron además dos dosis adicionales, 25 y 50 ng/ml para establecer la respuesta máxima de expresión de PRL en respuesta al TNF- α . La dosis máxima empleada fue de 50 ng/ml, ya que precisamente a esta concentración de TNF- α se empieza a observar evidencia de apoptosis en los lactotrofos de cultivos primarios de adenohipófisis de ratas hembra luego de 24 h de tratamiento (Candolfi et al., 2002). En base a los resultados obtenidos, es posible que el rango de concentración de 12.5 a 50 ng/ml se encuentre dentro de la fase de respuesta máxima en la curva dosis-respuesta, con respecto a la estimulación de la expresión de PRL en las células GH4C1. Sin embargo el análisis a dichas concentraciones fue necesario para establecer firmemente la ausencia de un efecto estimulador en los cultivos primarios de células hipofisarias. Se tendrán que realizar nuevos experimentos donde se prueben dosis menores de 12.5 ng/ml para analizar el umbral de respuesta en las células GH4C1 y así obtener una descripción completa de la relación dosis-respuesta entre el TNF- α y la expresión de PRL en estas células. Aún así, queda por aclarar si la ausencia de efecto en los lactotrofos primarios fue debido a una menor sensibilidad a TNF- α . El uso de concentraciones mayores permitirá resolver esa pregunta.

La diferencia entre los resultados obtenidos mediante ELISA y Western blot, de las mediciones de los niveles relativos de PRL presente en las células GH4C1 podría explicarse desde el punto de vista de la naturaleza de la proteína. La PRL es capaz de formar agregados en las células GH4C1 cuando se expresa en grandes cantidades. Tales agregados podrían ser resistentes al reconocimiento por los anticuerpos, a menos que se encuentren en condiciones desnaturizantes y reductoras como en el Western blot. Aunque la técnica de ELISA proporciona una

medición cuantitativa más sólida de la concentración de la proteína, es un método que detecta a la PRL soluble, mientras que el análisis por Western blot se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes y reductoras, bajo las cuales se deben haber dispersado los agregados proteicos y así los anticuerpos fueron capaces de detectar los epítopes. De esta manera, los niveles de PRL marcadamente incrementados en las células GH4C1 inducidos por TNF- α , como ya había sido predicho por la estimulación en la transcripción del ARNm de PRL, pueden observarse por Western blot, mas no por ELISA.

La mayoría de los experimentos anteriormente descritos fueron realizados con una duración de 24 h de exposición al TNF- α , un periodo de tiempo que pretende permitir que el efecto de esta citocina alcance un nivel estable (Palladino et al., 1987; Jikihara y Handwerker, 1994; Baur et al., 2000; Candolfi et al., 2002). Los niveles de PRL en las células GH4C1 no se modificaron luego del tratamiento con TNF- α durante 8 h, indicando que el efecto estimulador del TNF- α luego de la transcripción y traducción del gen de la PRL requiere varias horas para verse incrementado por arriba del nivel umbral.

Con respecto a las vasoinhibinas, de antemano se esperaba encontrarlas en el lisado celular de los cultivos primarios de adenohipófisis pues este hallazgo ya había sido reportado en 1995 por Torner et al., en homogenados de hipófisis de rata. Lo sorprendente es que también fue posible detectar a la vasoinhibina en los lisados de las células GH4C1 cuando analizamos muestras con una concentración de proteína total 10 veces mayor que la de los lisados de CPAH. Existen evidencias de que las vasoinhibinas podrían ser generadas durante el almacenamiento de la PRL en los gránulos de secreción que presentan un ambiente ácido (Lorenson et al. 1984). Mas aún, en nuestro grupo de trabajo Gabriela Cosío demostró, mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal, que la PRL y la catepsina D colocalizan en los gránulos de secreción de los lactotrofos de ratas macho (resultados no publicados). El mismo experimento llevado a cabo en las células GH4C1 mostró que la PRL y la catepsina D colocalizan en estructuras en forma de saco que posiblemente correspondan al aparato de Golgi, en este caso la marca es difusa pues como ya se ha comentado las células GH4C1 tienen capacidad limitada, casi nula, de formar gránulos de secreción.

En tanto que, los fragmentos N-terminal de la PRL (vasoinhibinas) producen un potente efecto sobre la proliferación y apoptosis de células endoteliales, así como

sobre la vasodilatación; los fragmentos correspondientes a la región C-terminal de la PRL carecen de dichos efectos (Khurana et al., 1999). Por ello, es importante la identificación de los fragmentos proteolíticos como N-terminal o C-terminal, para determinar la actividad biológica potencial de tales fragmentos. Empleando dos anticuerpos monoclonales contra la PRL de rata, uno que reconoce un epítipo de la región N-terminal y el otro un epítipo de la región C-terminal, fue posible identificar de manera concluyente el fragmento de la PRL de ~16 kDa presente en los lisados celulares de cultivos primarios adenohipofisarios como un fragmento N-terminal, estableciendo así que estas células son capaces de generar vasoinhibina.

Aunque los fragmentos generados en el medio condicionado por las células GH4C1 aún no han sido identificados de la misma manera, el hecho de que sólo fueron observados después de la incubación a un pH ácido, óptimo para la actividad de catepsina D (la proteasa que corta a la PRL para generar un fragmento N-terminal de ~16 kDa), sugiere fuertemente que las vasoinhibinas pueden ser generadas en el medio extracelular de las células GH4C1. Se sabe que algunos tejidos cancerosos y líneas celulares secretan niveles altos del precursor inactivo de catepsina D, la procatepsina D (Rocheffort et al., 1989). También se ha reportado que la procatepsina D puede ser activada en el ambiente extracelular, particularmente en el medio tumoral o en sitios de inflamación que presentan un microambiente más ácido que el medio fisiológico (Griffiths, 1991). La acidificación del medio en estas condiciones se debe a la liberación excesiva de protones por parte de las células tumorales y los macrófagos (Silver et al., 1988). De manera interesante se observó que al acidificar el medio condicionado por las células GH4C1 tratadas con TNF- α se favorece la generación de vasoinhibina; pero no fue posible obtener el mismo efecto cuando se acidificó el medio condicionado por las células en condiciones control. Este resultado sugiere que el tratamiento con TNF- α no solo estimula la expresión de PRL si no que también podría estimular la expresión y secreción de catepsina D o de las moléculas precursoras, así como el procesamiento de la proteasa hacia su forma activa. Todo esto tiene sentido si recordamos que ya se había mencionado que una de las vías de señalización desencadenada por la unión del TNF- α a su receptor tipo I involucra la activación de la esfingomielinasa ácida que, a su vez, promueve la producción de ceramida (un segundo mensajero de naturaleza lipídica), misma que induce la activación autocatalítica de la catepsina D (Heinrich et al. 2004).

El corte de la PRL en el medio condicionado acidificado es consistente con hallazgos previos en nuestro laboratorio, en experimentos donde se investigó la expresión de PRL en respuesta a la hipoxia (Cosío et al., 2003). Estos estudios demostraron que la expresión y la liberación de PRL por las células GH4C1 se ve disminuida en condiciones de hipoxia. Además, hay una reducción en la expresión de catepsina D. La combinación de los dos efectos resulta en la disminución intensa de la producción de vasoinhibina en el medio condicionado acidificado. Sin embargo, la disminución en la cantidad de vasoinhibina por hipoxia no puede explicar el nivel reducido de neovascularización asociado a los prolactinomas (Turner et al., 2003).

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo sugieren un mecanismo por el cual un prolactinoma podría presentar una menor neovascularización. El TNF- α es secretado por los macrófagos y otros tipos celulares durante las fases iniciales de la inflamación, como la que se da cuando hay una proliferación celular descontrolada. Si el TNF- α está actuando sobre los lactotopos tumorales estimulando la expresión y liberación de la PRL durante el desarrollo de un prolactinoma, y también estimula la proteólisis de PRL por la catepsina D, se produciría un aumento importante en los niveles de vasoinhibina que a su vez ejercerían un efecto inhibitorio en la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido que está proliferando.

Por lo tanto, el TNF- α es un factor que probablemente contribuye a activar las vías de señalización que van a limitar la angiogénesis, o que incluso podría ocasionar la regresión de los vasos ya formados, en los prolactinomas. Resulta interesante que el efecto estimulador del TNF- α sobre la expresión de PRL descrito en estos experimentos haya sido restringido solamente a la línea celular tumoral. La transformación que sufren las células hacia el fenotipo tumoral podría involucrar un incremento en la sensibilidad a las citocinas u otros agentes que pueden ser empleados como alternativas terapéuticas en el tratamiento del cáncer.

Aún quedan muchas cuestiones por resolver para poder sustentar este modelo sobre la acción del TNF- α . Hay que determinar la expresión de los receptores a TNF- α en ambos tipos celulares, las células GH4C1 y la población heterogénea de células presentes en los cultivos primarios de adenohipófisis. Además, se deben realizar experimentos que verifiquen que la expresión y secreción de catepsina D se ve incrementada por acción del TNF- α en las células GH4C1. De igual manera se deberá realizar un estudio más completo que incluya el curso temporal y la relación dosis-respuesta del tratamiento con TNF- α , en un rango más

amplio de concentración. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos para formular una hipótesis interesante acerca de cómo podría encontrarse regulada la angiogénesis en los prolactinomas. Idealmente, este estudio provee las bases para poder extender estos experimentos a un modelo in vivo, donde se puede inducir el desarrollo de prolactinomas en la rata mediante la administración de estrógenos y posteriormente administrar el TNF- α para evaluar el papel que desempeña en la vascularización del tejido tumoral.

VIII. CONCLUSIÓN

Los presentes hallazgos establecen lo siguiente: 1) El TNF- α estimula la transcripción del gen de PRL en los lactotrofos transformados GH4C1, pero no en los cultivos primarios hipofisarios; 2) el incremento en la transcripción de PRL en las células GH4C1 provoca un incremento en la traducción y secreción de PRL, como ya se ha demostrado mediante el análisis de las muestras por western blot; 3) el efecto estimulador del TNF- α se observó luego de 24 h de tratamiento, pero no a las 8 h; 4) los fragmentos de PRL inmunoreactivos observados en los lisados celulares de los cultivos primarios hipofisarios poseen las características de las vaso-inhibinas; y 5) las células GH4C1 tratadas con TNF- α secretan grandes cantidades de PRL y de la proteasa capaz de cortar a la PRL hacia un fragmento de 16 KDa. En conjunto, estos resultados sugieren un posible mecanismo por el cual el TNF- α podría estimular la generación de vaso-inhibinas por los lactotrofos, lo que potencialmente provocaría un aumento en la supresión de la angiogénesis y la inhibición de la vascularización en los tumores hipofisarios.

IX. REFERENCIAS

Aggarwal B. (2003) Signaling pathways of the TNF superfamily: a double edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-56.

Albert PR, Neve KA, Buzow JR, Civelli O. (1990) Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J Biol Chem.* 5;265(4):2098-104.

Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. (2005) Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 65(23):10637-41.

Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, López-Barrera F, Quiróz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2005) Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46:2497-53.

Arras M, Hoche A, Bohle R, Eckert P, Riedel W, Schaper J. (1996) Tumor necrosis factor-alpha in macrophages of heart, liver, kidney, and in the pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 285:39-49.

Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;91(21):10089-93.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7.

Baur A, Bauer K, Jarry H, Kohrle J. (2000) Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinase type I and type II. *J Endocrinol.* 167(3):505-515.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. (1996) Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev* 17(6):639-69

Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R. (2001) Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HTC116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Research* 61:7356-62.

Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iaconi P, Miccoli P, Salvetti A. (2002) Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4961-5.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 19:225-68.

Candolfi M, Jaita G, Pisera D, Ferrari L, Barcia C, Liu C, Yu I, Liu G, Castro MG, Seilicovich A. (2006) Adenoviral vectors encoding tumor necrosis factor- α y FasL induce apoptosis of normal and tumoral anterior pituitary cells. *J Endocrinol* 189:681-90.

Candolfi M, Zaldivar V, De Laurentiis A, Jaita G, Pisera D, Seilicovich A. (2002) TNF-alpha induces apoptosis of lactotropes from female rats. *Endocrinology*. 143(9):3611-7.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975) An edotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(9):3666-70.

Chen G, Goeddel DV. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296 (5573):1634-5.

Cheng N, Chen J. (2001) Tumor necrosis factor-alpha induction of endothelial ephrin A1 expression is mediated by a p38 MAPK- and SAPK/JNK-dependent but nuclear factor -kappa B-independent mechanism. *J Biol Chem* 276(17):13771-7.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.

Ciccarelli A, Daly A, Beckers A. (2005) The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary* 8:3-6.

Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. (2006) Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17(8):301-7.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133: 1292-9.

Corbacho AM, Martínez de la Escalera G y Clapp C. (2002) Roles of prolactin and related members of the prolactin / growth hormone / placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 173:219-38.

Cosio G, Jeziorski MC, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2003) Hypoxia inhibits expresión of prolactin and secretion of cathepsin D by the GH4C1 pituitary cell line. *Laboratory investigation* 83:1627-33.

Cronin MJ, Faure N, Martial JA, Weiner RI. (1980) Absence of high affinity dopamine receptors in GH3 cells: A prolactin-secreting clone resistant to the inhibitory action of dopamine. *Endocrinology* 106(3): 718-23.

Dannies PS, Kiino DR, Amara JF. (1984) Estrogen effects on prolactin storage and cell growth in GH cells. En *Prolactin Secretion: A Multidisciplinary Approach* (Mena F y Valverde CM, eds.), Academic Press, Orlando FL, pp. 121-140.

De Cesaris P, Starace D, Starace G, Filippini A, Stefanini M, Ziparo E. (1999) Activation of Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway by tumor necrosis factor alpha leads to intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 274 (41):28978-82.

De Laurentiis A, Pisera D, Caruso C, Candolfi M, Mohn C, Rettori V, Seilicovich A. (2002) Lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-induced changes in prolactin secretion and dopaminergic activity in the hypothalamic-pituitary axis. *Neuroimmunomodulation*. 10:30-9.

Denef C, Pals K, Hauspie A, Vankelecom H, Seuntjens E. (2005) Combinatorial expression of phenotypes of different cell lineages in the rat and mouse pituitary. *Ann N Y Acad Sci*.1040:84-8.

Denef C, Roudbaraki M, Van Bael A. (2001) Growth and differentiation factors derived from the N-terminal domain of pro-opiomelanocortin. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 28(3):239-43.

De Paul A, Pons P, Aoki A, Torres A. (1997) Different behavior of lactotroph cell subpopulations in response to angiotensin II and thyrotrophin-releasing hormone. *Cell Mol Neurobiol*. 17(2):245-58.

DiMattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. (1988) A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 122:2508-17.

Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. (1997) Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 76:1410-15.

Dueñas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, Lopez-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2004) Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regresión. *Invest Ophthalmol Vis Sci Jul* 45(7):2049-55.

Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, Lopez-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (1999) Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-KDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci Oct* 40(11):2498-505.

Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. (1992) Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 140(3):539-44.

Fehrenbacher N, Gyrd-Hansen M, Poulsen B, Felbor U, Kallunki T, Boes M et al. (2004) Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. *Cancer Res* 64(15):5301-10.

Ferrajoli A, Keating MJ, Manshour T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, et al. (2002) The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100(4):1215-9.

Folkman J. (2006) Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57:1-18.

Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* 1:27-31.

Folkman J, Shing Y. (1992) Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 267:10931-4.

Friedrichsen S, Harper CV, Semprini S, Wilding M, Adamson AD, Spiller DG, Nelson G, Mullins JJ, White MRH, Davis JRE. (2006) Tumor necrosis factor- α activates the human prolactin gene promoter via nuclear factor- κ B signaling. *Endocrinology* 147(2):773-81.

Furrer M, Altermatt HJ, Ris HB, Althaus U, Ruegg C, Lienard D, et al. (1997) Lack of antitumour activity of human recombinant tumour necrosis factor-alpha, alone or in combination with melphalan in a nude mouse human melanoma xenograft system. *Melanoma Res* 7(Suppl.2):S43-9.

García de la Torre N, Buley I, Wass JAH, Jackson D, Turner HE. (2004) Angiogenesis and lymphangiogenesis in parathyroid proliferative lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2890-6.

García de la Torre N, Buley I, Wass JAN, Turner HE. (2006) Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocrine-Related Cancer* 13(3):931-44.

García de la Torre N, Turner HE, Wass JAH. (2005) Angiogenesis in prolactinomas: regulation and relationship with tumour behaviour. *Pituitary* 8:17-23.

Gariano RF, Gardner TW. (2005) Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438(7070):960-6.

Gellersen B, DiMattia GE, Friesen HG, Bohnet HG. (1989) Prolactin (PRL) mRNA from human decidual cells differs from pituitary PRL mRNA but resembles the IM-9-P3 lymphoblast PRL transcript. *Mol Cell Endocrinol* 64:127-30.

Gerlo S, Davis JRE, Mager DL, Kooijman R. (2006) Prolactin in man: a tale of two promoters. *BioEssays* 28:1051-5.

Gerlo S, Verdood P, Kooijman R. (2006) Tumor necrosis factor- α activates the extrapituitary PRL promoter in myeloid leukemic cells. *J Neuroimmunol* 172 (1-2):206-10.

Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Munos M, Rubio R, Lin SH, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2004) 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145(12):5714-22.

Griffiths, JR. (1991) Are cancer cells acidic?. *Br J Cancer* 64(3):425-7.

Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Wickel M, Schneider-Brachert W, Trauzold A, Hethke A, Schütze S. (2004) Cathepsin D links TNF-induced acis sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death and Differ* 11:550-63.

Jensen HM, Chen I, DeVault MR, Lewis AE. (1982) Angiogenesis induced by normal human breast tissue: A probable marker for precancer. *Science* 218:293-5.

Jikihara H, Handwerger S. (1994) Tumor necrosis factor alpha inhibits the synthesis and release of human decidual prolactin. *Endocrinology* 134: 353-7.

Kars M, Roelfsema F, Romijn JA, Pereira AM. (2006) Malignant prolactinoma: case report and review of the literature. *Eur J Endocrinol* 155:523-34.

Katerinaki E, Evans GS, Lorigan PC, MacNeil S. (2003) TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. *Br J Cancer* 89(6):1123-9.

Khurana S, Liby K, Buckley AR, Ben-Jonathan N. (1999) Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology*. 140(9):4127-32.

Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH. (2003) Antitumor activity of the 16 KDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer res* 63(2):386-93.

Kobayashi H, Fukata J, Murakami N, Usui T, Ebisui O, Muro S, Hanaoka I, Inoue K, Imura H, Nakao K. (1997) Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res*. 758:45-50.

Koike K, Hirota K, Ohmichi M, Kadowaki K, Ikegami H, Yamaguchi M, Miyake A, Tanizawa O. (1991) Tumor necrosis factor-alpha increases release of arachidonate and prolactin from rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*. 128:2791-8.

Kooijman R, Hooghe-Peters EL, Hooghe R. (1996) Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor –I in the immune system. *Adv Immunol* 63:377-454.

Leber TM, Balkwill FR. (1998) Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br J Cancer* 78(6):724-32.

Lorenson MY, Miska SP, Laurence SJ. (1984) Molecular mechanism of prolactin release from pituitary secretory granules. *En Prolactin Secretion: A multidisciplinary Approach* (Mena F y Valverde CM, eds.), Academic Press, Orlando FL. pp.141-60.

Liu C, Shen Z, Kung H, Lin MCM. (2006) Cancer gene therapy targeting angiogenesis: An updated review. *World J Gastroenterol* 12(43):6941-8.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Sawada T, Yamashita Y, Onoda N, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y. (1995) Tumour angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 13:477-81.

Matera L, Mori M, Galetto A. (2001) Effect of prolactin on the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus* 10(10):728-34.

Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2:318-25.

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. (2005) Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:35-53.

Nabors LB, Suswam E, Huang Y, Yang X, Johnson MJ, King PH. (2003) Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res* 63(14):4181-7.

Nesbit M, Schaidler H, Miller TH, Herlyn M. (2001) Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. *J Immunol.* 166:6483-90.

Neufeld G, Kessler O. (2006) Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 25:373-85.

Ooi GT, Tawadros N, Escalona RM. (2004) Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molec Cel Endocrinol* 228:1-21.

Olieman AF, van Ginkel RJ, Hoekstra HJ, Mooyaart EL, Molenaar WM, Koops HS. (1997) Angiographic response of locally advanced soft-tissue sarcoma following hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor. *Ann Surg Oncol.* 4:64-9.

Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, Weber D, Mannel DN. (1993) Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 177(5):1391-8.

Pacifico F, Leonardi A. (2006) NF- κ B in solid tumors. *Biochem Pharmacol* 72(9):1142-52.

Palladino MA Jr, Shalaby MR, Kramer SM, Ferraiolo BL, Baughman RA, Deleo AB, Crase D, Marafino B, Aggarwal BB, Figari IS, Liggitt D, Patton JS. (1987) Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J Immunol.* 138:4023-32.

Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. (2006) Angiogenesis – a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 44(5):265-74.

Patan S. (2000) Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neuro-Oncol* 50:1-15.

Pérez GT, Apfelbaum ME. (1992) Modulatory effect of steroid hormones on GnRH-induced LH secretion by cultured rat pituitary cells. *Can J Physiol Pharmacol* 70(7):963-9.

Polverini PJ. (1995) The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 6(3):230-47.

Qin Z, Kruger-Krasagakes S, Kunzendorf U, Hock H, Diamantstein T, Blankenstein T. (1993) Expression of tumor necrosis factor by different tumor cell lines results either in tumor suppression or augmented metastasis. *J Exp Med* 178(1):355-60.

Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-4.

Rocheffort H, García M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, Roger P. (2000) Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 291(2):157-70.

Rocheffort H, Cavailles V, Augereau P, Capony F, Maudelonde T, Touitou I, García M. (1989) Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 34:77-182.

Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. (1988) Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175(2):266-76.

Stoelcker B, Ruhland B, Hehlhans T, Bluethmann H, Luther T, Mannel DN. (2000) Tumor necrosis factor induces tumor necrosis via tumor necrosis factor receptor type I-expressing endothelial cells of the tumor vasculature. *Am J Pathol* 156(4):1171-6.

Takeda K, Iwamoto S, Sugimoto H, Takuma T, Kawatani N, Noda M, Masaki A, Morise H, Arimura H, Konno K. (1986) Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature* 323(6086):338-40.

Tashjian AHJ, Bancroft FC, Levine L (1970). Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol* 47(1):67-70.

Theas S, Pisera D, Duvilanski B, De Laurentiis A, Pampillo M, Lasaga M, Seilicovich A. (2000) Estrogens modulate the inhibitory effect of tumor necrosis factor-alpha on anterior pituitary cell proliferation and prolactin release. *Endocrine*. 12:249-55.

Torner L, Mejía S, López-Gómez FJ, Quintanar A, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (1995) A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136:5454-60.

Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, et al. (1984) Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J* 3:429-37.

Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JAH. (2003) Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocrine Rev*. 24:600-32.

Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, Wass JAH. (2000) Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1159-62.

Van de Wiel PA, Bloksma N, Kuper CF, Hofhuis FM, Willers JM. (1989) Macroscopic and microscopic early effects of tumour necrosis factor on murine Meth A sarcoma, and relation to curative activity. *J Pathol* 157(1):65-73.

van Etten B, de Vries MR, van IJken MG, Lans TE, Guetens G, Ambagtsheer G, van Tiel ST, de Boeck G, de Bruijn EA, Eggermont AM, ten Hagen TL. (2003) Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion. *Br J Cancer*. 88:314-9.

van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. (2006) TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11(4):397-408.

Viacava P, Gasperi M, Acerbi G, , Manetti L, Cecconi E, Bonadio A, Naccarato AG, Acerbi F, Parenti G, Lupi I, Genovesi M, Martino E. (2003) Microvascular density and vascular endothelial growth factor expresión in normal pituitary tissue and pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest* 26:23-8.

Watanobe H, Yoneda M. (2003) A mechanism underlying the sexually dimorphic ACTH response to lipopolysaccharide in rats: Sex steroid modulation of cytokine binding sites in the hypothalamus. *J. Physiol.* 547: 221-32.

Waterston AM, Salway F, Andreakos E, Butler DM, Feldmann M, Coombes RC. (2004) TNF autovaccination induces self anti-TNF antibodies and inhibits metastasis in a murine melanoma model. *Br J Cancer* 90(6):1279—84.

Weidner N, Carrol PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. (1993) Tumour angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 143:401-9.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Alfred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. (1992) Tumour angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84:1875-87.

Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, Berchuck A, Wiener JR, Weinberg JB, et al. (1993) Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Res* 53(8):1939-44.

Yamada S, Takada K. (2003) Angiogenesis in pituitary adenomas. *Microscopy Res and Technique* 60:236-43.

Yamaguchi M, Koike K, Yoshimoto Y, Ikegami H, Miyake A, Tanizawa O. (1991) Effect of TNF-alpha on prolactin secretion from rat anterior pituitary and dopamine release from the hypothalamus: comparison with the effect of interleukin-1 beta. *Endocrinol Jpn.* 38:357-61.

Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. (1997) Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17(7):4015-23.

X. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Algunas moléculas promotoras de la angiogénesis	5
Tabla 2.	Moléculas inhibitorias de la angiogénesis	6
Figura 1.	Vías de señalización inducidas por la unión de TNF- α a su receptor tipo I	14
Figura 2.	Efecto del tratamiento con TNF- α sobre la expresión del ARNm de PRL	25
Figura 3.	Cuantificación de la PRL intracelular por ELISA en muestras de CPAH y cultivos de GH4C1 tratados con TNF- α	26
Figura 4.	Determinación de PRL en muestras de lisados celulares de CPAH y células GH4C1 tratadas con TNF- α , mediante Western blot y densitometría de bandas	28
Figura 5.	Cuantificación de la PRL secretada al medio de cultivo, en muestras de CPAH (A) y cultivos de GH4C1 (B) tratadas con TNF- α	29
Figura 6.	Efecto del tratamiento de CPAH y cultivos de GH4C1 con TNF- α , sobre la secreción de PRL al medio de cultivo, determinado por Western blot y densitometría de bandas	30
Figura 7.	Determinación de la PRL intracelular y secretada al medio de cultivo por las células GH4C1 luego del tratamiento con 12.5 ng/ml de TNF- α durante 8 h	31
Figura 8.	Inmunodetección de PRL y Vi en el lisado celular de CPAH y células GH4C1	32
Figura 9.	Vi en el medio condicionado acidificado de las células GH4C1	33