

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURIQUILLA, QRO**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
GEN DE PROLACTINA Y DEL
PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA POR
HIPOXIA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A
M. EN C. GABRIELA COSÍO GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ**

Juriquilla, Querétaro

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la UNAM., bajo la asesoría de la Dra. Carmen Clapp Jiménez y contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

A mis padres

(Wir lassen nie vom Suchen ab, und doch, am Ende allen unieren Suchens, sind wir am Ausgangspunkt zurück und werden diesen Ort zum ersten Mal erfassen).

“No cesaremos de explorar y el final de toda nuestra exploración será llegar al punto de partida y reconocer el lugar por primera vez”.

T.S. Elliot (Little Gidding)

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM.

A mi tutora: Dra. Carmen Clapp.

A mi Comité Tutorial: Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dr. Luis Vaca Domínguez.

A mis sinodales: Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez-Labora, Dr. Jean Louis Charli Casalonga, Dr. Rafael Rubio García, Dr. Alfredo Varela Echavarría, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dr. Miguel Angel Morales Mendoza.

Al apoyo del Dr. Michael C. Jeziorski, M. en C. Gabrel Nava, Nut. Fernando López Barrera, Q. Leonor Casanova, Lic. Carmen Vásquez, M.V.Z. Martín García, Lic. Pilar Galarza, Elsa Ruiz, Ignacio Caballero, Rafael Silva, Lic. Lourdes Lara, Daniel Mondragón Huerta, Don Antonio Prado Galán.

A mis padres.

A mis hermanos.

A Héctor.

A todos mis compañeros y amigos dentro y fuera del INB.

A los miembros presentes y pasados de los laboratorios de Carmen Clapp y de Gonzalo Martínez de la Escalera.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCION.....	3
I.1. Angiogénesis	3
I.2. La hipoxia como principal inductor de la angiogénesis.....	7
I.3. La PRL 16K como inhibidor de la angiogénesis.....	11
I.4. Los adenomas hipofisarios.	17
I.5. La vascularización de adenomas hipofisarios	19
I.6. Relación hipoxia-prolactina.....	25
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS.....	28
V. MATERIAL Y MÉTODOS	28
V.1. Cultivo celular.....	28
V.2. Tratamientos con hipoxia.....	29
V.3. RT-PCR	30
V.4. Northern blot.....	31
V.5. Homogenados celulares y medios condicionados.....	32
V.6. Western blot.....	32
V.7. Tinción con plata.....	33

V.8. ELISA	33
V.9. Análisis de la actividad de la proteasa de PRL y la generación de PRL 16K....	33
V.10. Análisis de la actividad del promotor de prolactina en células GH4C1	34
V.11. Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la localización intracelular de PRL y catepsina D	36
V.12. Análisis Estadístico.....	37
VI. RESULTADOS	38
VI.1. Análisis del efecto de la hipoxia sobre las células GH4C1	38
VI.2. Análisis del efecto de la hipoxia sobre lactotropos normales.....	50
VI.3. Análisis sobre el procesamiento de PRL a PRL 16K.....	53
VII. DISCUSIÓN	59
VIII. REFERENCIAS.....	68

RESUMEN

La baja concentración de oxígeno que se presenta dentro del ambiente tumoral induce la proliferación de nuevos vasos sanguíneos a través de estimular la producción de factores angiogénicos y de inhibir la producción de moléculas anti-angiogénicas. Una molécula potencialmente relevante en el desarrollo de adenomas hipofisarios es la prolactina (PRL). La PRL puede ser procesada proteolíticamente por catepsina D produciendo el fragmento N-terminal de 16 kDa, o PRL 16K, la cual presenta importantes efectos anti-angiogénicos. En este trabajo examinamos la expresión de PRL en las células tumorales hipofisarias GH4C1 sometidas a hipoxia (0.1% oxígeno) durante 12-36 horas. A diferencia del incremento en la expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) inducido por hipoxia, los niveles del mRNA de PRL así como de la PRL intracelular y secretada disminuyeron significativamente en respuesta a este mismo tratamiento. La disminución en la expresión de PRL no se debió a una inhibición general de la transcripción o de la síntesis de proteínas. Si bien no se detectó PRL 16K en el medio condicionado a pH fisiológico, la acidificación de los medios para mimetizar las condiciones ácidas del microambiente tumoral, resultó en la producción de PRL 16K la cual fue significativamente menor en el medio condicionado de las células hipóxicas. La producción de PRL 16K se inhibió fuertemente por el inhibidor de catepsina D, la pepstatina A. La menor producción de PRL 16K en el medio condicionado hipóxico se relacionó con una menor secreción de catepsina D y de su precursor la procatepsina D. De este modo la hipoxia induce un aumento en la expresión del VEGF, una disminución en la síntesis de PRL e impide la conversión de PRL a PRL 16K a través de la inhibición en la proteólisis mediada por catepsina D en las células GH4C1. Estos mecanismos podrían actuar de manera coordinada para estimular la angiogénesis en prolactinomas.

ABSTRACT

Diminished oxygen concentration within growing tumors may stimulate neovascularization by inducing both up-regulation of angiogenic factors and down-regulation of anti-angiogenic agents. A potentially important molecule in the growth of pituitary adenomas is prolactin (PRL), which can be cleaved by cathepsin-D to yield a 16-kDa form (16K-PRL) with potent anti-angiogenic effects. We examined the expression of PRL in cultured GH4C1 pituitary adenoma cells after exposure to hypoxia (0.1% oxygen) for periods of 12 to 36 hrs. In contrast to increased expression of the angiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF) in hypoxic cells, PRL mRNA and levels of intracellular and secreted PRL were significantly reduced under hypoxia. The reduction was not attributable to a general suppression of either transcription or protein synthesis. Although 16K-PRL was not detected in conditioned medium at physiologic pH, lowering it to mimic the acidic tumor microenvironment resulted in generation of 16K-PRL, which was sharply reduced in the conditioned medium from hypoxic cells. Production of 16K-PRL was blocked by the cathepsin-D inhibitor pepstatin-A, and the reduced 16K-PRL formation in hypoxic-conditioned medium correlated with a decrease in secretion of cathepsin-D and its precursor, procathepsin-D. Thus, hypoxia acts upon GH4C1 cells increasing vascular endothelial growth factor expression, decreasing PRL synthesis, and suppressing conversion of PRL to 16K-PRL via inhibition of cathepsin-D proteolysis. These mechanisms may act in concert to stimulate angiogenesis in prolactinomas.

I. INTRODUCCION

I.1. Angiogénesis

El proceso de formación de nuevos vasos capilares a partir de la microvasculatura ya existente se conoce como angiogénesis (Folkman & Cotran, 1976; Folkman & Klagsbrun, 1987). En etapas tempranas del desarrollo, la formación de vasos sanguíneos ocurre mediante el proceso de vasculogénesis en el que las células endoteliales se diferencian y proliferan dentro de un tejido avascular (Yancopoulos *et al.*, 2000). En esta etapa se forman islotes sanguíneos a partir de angioblastos extra-embrionarios que se condensan en grupos y cordones (Polverini, 1995) y se asocian en una red tubular primitiva (Yancopoulos *et al.*, 2000). Posteriormente mediante el proceso de angiogénesis este sistema primitivo experimenta un remodelado, maduración y brote de nuevos vasos para dar lugar a un patrón de ramas interconectadas que se asocian a células de soporte (músculo liso y pericitos) y a una matriz extracelular (Yancopoulos *et al.*, 2000).

En el adulto, las células endoteliales proliferan muy poco y su tasa de recambio está en el orden de varios meses o años (Denekamp, 1984; Tannock & Hayashi, 1972). No obstante, varios procesos biológicos en el adulto dependen directamente de la angiogénesis tales como la regeneración de tejidos, la formación del cuerpo lúteo, el desarrollo de la placenta, la proliferación cíclica del endometrio, etc. (Polverini, 1995). Es así que en respuesta a una serie de señales, las células endoteliales que revisten las vénulas terminales o post-capilares degradan sistemáticamente su membrana basal y la matriz extracelular proximal para migrar, dividirse y organizarse en nuevos vasos capilares (Polverini, 1995). En las etapas iniciales del proceso, el endotelio experimenta cambios en la expresión de sus moléculas de adhesión (integrinas y selectinas, entre otras), de los componentes de la matriz extracelular, exhibe una reorganización del

citoesqueleto (Gamble *et al.*, 1999; Ingber, 1991; Ingber & Folkman, 1988; Ingber & Folkman, 1989; Madri *et al.*, 1988; Nguyen *et al.*, 1993), produce factores de crecimiento así como proteasas, cuya acción sobre la matriz extracelular no sólo favorece la migración endotelial sino también la liberación de factores de crecimiento retenidos en ella (Pepper *et al.*, 1992; Polverini, 1995).

La acción coordinada entre los factores pro- y anti-angiogénicos (Tabla 1) así como el equilibrio en su producción determina que las células del endotelio permanezcan en su estado de latencia o procedan hacia la vascularización (Good *et al.*, 1990; O'Reilly *et al.*, 1994; Rastinejad *et al.*, 1989). Un modelo de esta acción orquestada propone que mientras el VEGF induce la formación de vasos muy permeables e inmaduros, la angiopoyetina-1 (Ang-1) y la efrinaB2 (EphB2) remodelan y promueven su maduración, haciéndolos resistentes a la permeabilidad (Yancopoulos *et al.*, 2000). Por otra parte, la Ang-2, al ser un antagonista de la Ang-1, promueve la desestabilización de los vasos para inducir su regresión (Yancopoulos *et al.*, 2000). Cabe mencionar que la mayoría de los reguladores angiogénicos no son específicos del endotelio sino que tienen acciones sobre un amplio rango de tipos celulares (Polverini, 1995). Algunos de los tipos celulares que participan en la neovascularización mediante la producción de dichas moléculas son los monocitos, los macrófagos, los mastocitos, los linfocitos, las células del tejido conectivo, los pericitos, las células endoteliales y las células tumorales (Folkman, 1995; Folkman & Shing, 1992; Montesano, 1992; Risau, 1990; Weinstat-Saslow & Steeg, 1994).

Bajo ciertas condiciones, la angiogénesis está implicada en el desarrollo de varias patologías que incluyen a las neoplasias (Folkman, 1990), las retinopatías vasoproliferativas y a trastornos crónicos inflamatorios como la artritis reumatoide (Battegay, 1995; Folkman, 1995). Algunas señales que inducen el cambio hacia el

fenotipo angiogénico son el estrés metabólico (baja tensión de oxígeno, bajo pH e hipoglucemia), el estrés mecánico (generado por células en proliferación), respuestas inflamatorias (infiltración de células del sistema inmune) y mutaciones (activación de oncogenes o anulación de genes supresores de tumores) (Kerbel, 2000; Rak *et al.*, 2000).

Moléculas Estimuladoras	Moléculas Inhibidoras
<p>Factores de Crecimiento</p> <p>Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)</p> <p>Factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF)</p> <p>Factor de crecimiento epidérmico (EGF)</p> <p>Eritropoietina</p> <p>Interleucina-8 (IL-8)</p> <p>Interleucina-2 (IL-2)</p> <p>Factor de crecimiento de hepatocitos (SF/HGF)</p> <p>Factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1)</p> <p>Factor activador plaquetario</p> <p>Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF)</p> <p>Factor de crecimiento transformante alfa (TGF-α)</p> <p>Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)</p> <p>Factor de crecimiento tumoral alfa (TNF-α)</p> <p>Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)</p>	<p>Angiostatina</p> <p>Endostatina</p> <p>Trombospondina-1</p> <p>Factor plaquetario IV</p> <p>Interferon α</p> <p>Interferon γ</p> <p>Prolactina 16K</p> <p>Péptidos de fibronectina</p> <p>Somatostatina</p> <p>Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs)</p>
<p>Otras Proteínas y Péptidos</p> <p>Angiotensina II</p> <p>Fibrina</p> <p>Activador del plasminógeno</p> <p>Urocinasa</p> <p>Angiopoyetinas</p> <p>Efrinas</p>	<p>Otros</p> <p>Cobre</p> <p>Heparina</p>

Tabla 1. Algunas moléculas estimuladoras e inhibidoras de la angiogénesis. Tomado de Battegay, 1995; Polverini, 1995.

La angiogénesis es esencial para el crecimiento así como la persistencia de los tumores a través de aportar oxígeno, nutrimentos y de extraer sustancias de desecho. Asimismo, los nuevos capilares proveen de una ruta para la migración de las células tumorales hacia la formación de tumores secundarios o metástasis (Folkman, 1989; Hori *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1993; Millauer *et al.*, 1994). El proceso angiogénico ocurre de manera independiente a la transformación celular y puede desarrollarse en diversas etapas del desarrollo de las neoplasias (Folkman & Shing, 1992; Liotta *et al.*, 1991; Weinstat-Saslow & Steeg, 1994). La expresión temporal y espacial de los reguladores angiogénicos no está tan bien coordinada en los tumores como en la angiogénesis fisiológica (Carmeliet & Jain, 2000).

La neovascularización tumoral se desarrolla muy rápidamente y se caracteriza por presentar vasos muy permeables, tortuosos, dilatados, con distinto diámetro y ramificaciones excesivas (Carmeliet & Jain, 2000). La ultraestructura de los vasos presenta numerosas aberturas, las uniones interendoteliales son muy amplias y la membrana basal está ausente o es discontinua. Las células endoteliales también son anormales en su forma y pueden crecer unas encima de otras y proyectarse hacia el lumen del vaso (Dvorak *et al.*, 1999; Hashizume *et al.*, 2000; Hobbs *et al.*, 1998). Finalmente las paredes de los vasos no siempre están formadas de una capa homogénea de células endoteliales (Jain, 1988) y pueden estar constituidas por células cancerosas o ser un mosaico de células endoteliales y tumorales (Chang *et al.*, 2000). Todas estas características resultan en una vasculatura tumoral aberrante, muy permeable y con un flujo sanguíneo caótico que con frecuencia da lugar a regiones hipóxicas y ácidas en los tumores (Helmlinger *et al.*, 1997).

Los tumores promueven la neovascularización a través de la producción de una variedad de factores angiogénicos. Sin embargo, muchos tumores malignos también

producen moléculas inhibitoras de la angiogénesis (Chen *et al.*, 1995) tales como la angiostatina (Gately *et al.*, 1996; O'Reilly *et al.*, 1994) y la trombospondina (Good *et al.*, 1990). Resulta interesante que varios factores inhibidores de la angiogénesis son fragmentos que resultan de la proteólisis de moléculas con funciones muy distintas; algunos de estos factores son la endostatina que resulta de la proteólisis de la colágena tipo XVIII (O'Reilly *et al.*, 1997); el fragmento del factor plaquetario-4; la angiostatina que es originado a partir del plasminógeno (O'Reilly *et al.*, 1994); la tumstatina que es generado a partir de la colágena tipo IV (Timpl *et al.*, 1981); la anastelina que es derivada de la fibronectina (Morla *et al.*, 1994); y el fragmento N-terminal de 16 kDa originado a partir de la prolactina (Clapp *et al.*, 1993). La presencia de estas moléculas puede deberse a la actividad proteolítica asociada al crecimiento tumoral, que genera inhibidores angiogénicos a partir de proteínas precursoras. Resulta de interés dilucidar la identidad de las proteasas, el sitio de corte en su molécula blanco, así como si su participación en la inhibición de la angiogénesis puede o no estar regulada.

I.2. La hipoxia como principal inductor de la angiogénesis

Todas las células de mamífero obtienen el oxígeno y los nutrientes necesarios para su supervivencia por difusión a partir de vasos sanguíneos ubicados a no más de 100-200 micras (Carmeliet & Jain, 2000). Durante la reparación tisular y el desarrollo de distintas patologías como infecciones, procesos inflamatorios y crecimiento de tumores, ocurre un depósito excesivo de matriz extracelular, un crecimiento tisular anormal y desórdenes vasculares que alteran el suministro de oxígeno, creando así microambientes hipóxicos.

La hipoxia es un factor común a todos los padecimientos angiogénico-dependientes y es un fuerte estímulo para la inducción o represión de una batería de

genes que ayudan a las células a contender con esta condición (Guillemin & Krasnow, 1997; Semenza, 1998; Tacchini *et al.*, 1999). Entre los genes inducidos por hipoxia se incluyen aquellos que regulan el número de eritrocitos y el transporte de oxígeno, genes implicados en el transporte y metabolismo de la glucosa y los que regulan la angiogénesis (Tabla 2.) (Bunn & Poyton, 1996; Wenger & Gassmann, 1997). En lo que respecta a estos últimos, la hipoxia estimula la expresión del gen de la sintetasa inducible de óxido nítrico (Melillo *et al.*, 1995), el del VEGF (Forsythe *et al.*, 1996; Gleadle *et al.*, 1995; Goldberg & Schneider, 1994; Liu *et al.*, 1995), de las angiopoietinas (Currie *et al.*, 2002; Enholm *et al.*, 1997; Mandriota *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 1999), de los factores de crecimiento de fibroblastos (Kuwabara *et al.*, 1995), de los genes que codifican para los receptores de varios de estos factores (Gerber *et al.*, 1997; Tuder *et al.*, 1995; Waltenberger *et al.*, 1996), genes implicados en el metabolismo de la matriz extracelular, incluyendo a metaloproteasas (Ben-Yosef *et al.*, 2002; Norman *et al.*, 2000), de los receptores de activadores e inhibidores del plasminógeno (Graham *et al.*, 1998; Kietzmann *et al.*, 1999) y los de las hidroxilasas de prolina de la colágena (Takahashi *et al.*, 2000). Por otra parte, entre los genes inhibidos por la hipoxia están el de la trombospondina-1 (Phelan *et al.*, 1998; Tenan *et al.*, 2000), la angiopoietina-1 y el de su receptor Tie-2 (Abdulmalek *et al.*, 2001).

La hipoxia regula la expresión génica esencialmente a nivel transcripcional. La principal molécula involucrada es el factor transcripcional inducible por hipoxia tipo-1 (HIF-1), aunque la regulación de varios genes pudiera también verse afectada de manera indirecta a través de cascadas secundarias (Pugh & Ratcliffe, 2003). HIF-1 puede activar o reprimir la expresión génica mediante su unión específica a un elemento de respuesta a hipoxia (HRE o “Hypoxia Responsive Element”) que contiene la secuencia de reconocimiento 5'-RCGTG-3', en donde R corresponde a una purina (R=A/G)

(Richard *et al.*, 1999). HIF-1 es un heterodímero compuesto por la subunidad HIF-1 β , que se expresa constitutivamente, y por la subunidad HIF-1 α cuya actividad está regulada por la concentración celular de oxígeno (Wang *et al.*, 1995). Los dos mecanismos reguladores de HIF1- α obedecen a la actividad de dos hidroxilasas dependientes de oxígeno y hierro. En condiciones normales de oxígeno, HIF-1 α es hidroxilado por una hidroxilasa de prolinas que facilita su interacción con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL) que a su vez lo dirige hacia su degradación por el sistema del proteasoma 26S (Semenza, 2001). Un segundo mecanismo de control es la hidroxilación de un residuo de asparagina localizado en el extremo C-terminal de HIF1- α que bloquea su interacción con el coactivador p300, inhibiendo así su actividad transcripcional (Lando *et al.*, 2002; Mahon *et al.*, 2001).

La hipoxia ejerce un efecto directo durante el desarrollo de tumores (Brahimi-Horn *et al.*, 2001) ya que en los tumores sólidos se han detectado regiones con presiones parciales de oxígeno hasta de cero que pueden presentarse de manera aguda o crónica. Estas microregiones de muy bajo oxígeno o de anoxia están distribuidas de manera heterogénea dentro de la masa tumoral y pueden encontrarse adyacentes a regiones con presiones parciales normales de oxígeno (Hockel & Vaupel, 2001).

En células normales la hipoxia provoca la inhibición de la proliferación celular y eventualmente la muerte (Wouters *et al.*, 2003). Estos mismos efectos se observan en las células tumorales pero son menos severos o se desarrollan más lentamente (Wouters *et al.*, 2003). Esta tolerancia a la hipoxia resulta de una presión selectiva por aquellas células que son capaces de sobrevivir en este tipo de ambientes ya que generalmente presentan alteraciones en los mecanismos que conducen a la muerte como la eliminación de la función de genes pro-apoptóticos como *p53* y a la activación constitutiva de genes anti-apoptóticos como *ras* (Wouters *et al.*, 2003). Es así que el

crecimiento del tumor se ve beneficiado ya que a medida que las células se ajustan para tolerar la hipoxia, estas serán capaces de mantener una señal angiogénica prolongada (Wouters *et al.*, 2003).

Etapas del proceso angiogénico	Factores estimuladores	Factores Inhibidores
Vasodilatación	Sintetasas de óxido nítrico	
Permeabilidad Vascular	<ul style="list-style-type: none"> • VEGF • Flt-1 • Kdr 	Angiopoietina-1; Tie-2
Extravasación de proteínas plasmáticas	VEGF	Angiopoietina-1; Tie-2
Brote o ramificación endotelial	Angiopoietina-2; Tie-2	
Degradación de matriz extracelular	<ul style="list-style-type: none"> • Equilibrio entre metaloproteasas de matriz (MMP) e inhibidores de MMP (TIMP) • Hidroxilasa prolil-4 de colágena 	Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)
Liberación de factores de crecimiento	Receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA)	Trombospondina-1 PAI-1
Proliferación y migración endotelial	<ul style="list-style-type: none"> • Interacción entre VEGFs, angiopoietinas y FGFs • Proteína quimioattractora de monocitos (MCP-1) • Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) 	
Reclutamiento de músculo liso y pericitos	PDGF	
Ensamblaje endotelial y formación del lumen capilar	VEGF121, VEGF165 Ang-1; Tie-2 Integrinas	VEGF189 Trombospondina-1
Estabilización de los nuevos capilares	PAI-1	
Mantenimiento, diferenciación y remodelado	Ang-1; Tie-2	Ang-2; Tie-2

Tabla 2. Factores reguladores de la angiogénesis que son afectados por hipoxia. Tomado de Pugh y Ratcliffe (2003).

La inhibición de la apoptosis en tumores contribuye a la inestabilidad genómica que proporciona a las células una adaptabilidad inherente. Otros mecanismos que participan en esta tolerancia son el incremento en la producción de energía a través de aumentar la tasa de glucólisis mediante una mayor actividad y expresión de prácticamente todas las enzimas glucolíticas (Semenza, 1998) y la reducción de aquellos procesos que implican un alto consumo de energía como la síntesis de proteínas (Koumenis *et al.*, 2002).

I.3. La PRL 16K como inhibidor de la angiogénesis

Una molécula con efectos inhibitorios sobre la angiogénesis es el fragmento amino-terminal de 16 kDa de la prolactina (PRL 16K). La prolactina (PRL) es una hormona proteica implicada en el control de una gran variedad de funciones como la reproducción, la osmorregulación, la respuesta inmune, el crecimiento y el desarrollo (Nicoll, 1980; Russell, 1989). La prolactina se transcribe a partir de un solo gen y la proteína existe en varias formas moleculares resultantes de modificaciones postraduccionales como son la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis (Sinha, 1995). La forma molecular predominante de la PRL consiste de una sola cadena polipeptídica con tres asas disulfuras y una masa molecular de 23 kDa (Sinha, 1995). La proteólisis de la PRL 23K entre los residuos Tyr¹⁴⁵-Leu¹⁴⁶ y Trp¹⁴⁸-Ser¹⁴⁹ (Andries *et al.*, 1992; Baldocchi *et al.*, 1993), la escisión del tripéptido (Leu-Val-Trp) y la reducción de los puentes disulfuro da origen a la PRL 16K. La enzima que produce a la PRL 16K parece ser la catepsina D (Baldocchi *et al.*, 1993), una proteasa lisosomal de ácido aspártico cuya actividad catalítica se encuentra en valores de pH ácidos (Rochefort *et al.*, 2000).

La PRL 16K comparte algunos efectos con la PRL 23K tales como su efecto mitogénico en el buche de pichón (Clapp *et al.*, 1988), en los ensayos de las células Nb2 (Clapp *et al.*, 1988), en la glándula mamaria de la rata (Mittra, 1980) y los efectos mitogénicos y lactogénicos en células de glándula mamaria (Clapp *et al.*, 1988). Sin embargo, el procesamiento proteolítico confiere diversidad a las acciones de la PRL, teniendo así que la PRL 16K presenta efectos únicos que no comparte con la PRL completa. Estos efectos incluyen a la inhibición de la angiogénesis (Clapp *et al.*, 1993; Duenas *et al.*, 1999; Ferrara *et al.*, 1991; Struman *et al.*, 1999) así como la estimulación de la expresión de la forma inducible de la sintetasa de óxido nítrico en fibroblastos de pulmón (Corbacho *et al.*, 2000b).

Ferrara *et al.* (1991) reportaron que la PRL 16K inhibía la proliferación basal e inducida por bFGF de células capilares de cerebro bovino y corteza adrenal, mientras que la PRL 23K no presentaba ningún efecto en estas células. Por otra parte, Clapp *et al.* (1993) mostraron que la PRL 16K humana recombinante inhibía en concentraciones nanomolares la proliferación de células endoteliales bovinas y humanas *in vitro*, así como los efectos proliferativos ejercidos por el bFGF y VEGF en estas células. Los efectos anti-angiogénicos de la PRL 16K resultan de la alteración de varios eventos celulares. Se ha visto que la PRL 16K impide la fosforilación de las MAP cinasas p42 y p44 inducida por bFGF y VEGF en células endoteliales a través de bloquear la activación de Raf-1 (D'Angelo *et al.*, 1995) y Ras (D'Angelo *et al.*, 1999). También se ha mostrado que la PRL 16K frena la migración y formación de nuevos vasos a través de inhibir la acción del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), cuya participación es esencial para la degradación de la matriz extracelular (Lee *et al.*, 1998). Esta inhibición es ejercida indirectamente a través de la estimulación en la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI). Finalmente, la PRL 16K también

induce la apoptosis endotelial a través de la activación de las caspasas 1 y 3 y la inhibición de la acción anti-apoptótica de la familia de proteínas Bcl-2 (Martini *et al.*, 2000).

Todas estas acciones se traducen en la inhibición del proceso integral de la angiogénesis *in vivo*. Al respecto, se ha visto que la PRL 16K recombinante inhibe la vascularización de la córnea inducida por bFGF (Dueñas *et al.*, 1999) y en el ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión del pollo (Clapp *et al.*, 1993; Struman *et al.*, 1999).

La PRL 16K es un potencial agente terapéutico con la capacidad de frenar el desarrollo de distintas patologías angiogénico-dependientes como por ejemplo el crecimiento de tumores. Recientemente se demostró que la PRL 16K es capaz de inhibir la vascularización tumoral y el crecimiento de tumores en ratones inmunosuprimidos. Células tumorales de próstata (Kim *et al.*, 2003) o de colon (Bentzien *et al.*, 2001) fueron transfectadas con un vector de expresión para producir PRL 16K y al ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos no produjeron tumores o bien generaron tumores de menor tamaño y menos vascularizados que aquellos producidos por las células control.

Estos hallazgos indican que la PRL 16K es un potente factor anti-angiogénico que actúa específicamente sobre la células endoteliales ya sea inhibiendo aquellos procesos indispensables para la angiogénesis como la proliferación endotelial y la degradación de la matriz extracelular, como afectando los eventos relacionados con la apoptosis endotelial, tales como los procesos de remodelado y regresión vascular (Corbacho *et al.*, 2002). Se ha mostrado que las células endoteliales contienen sitios de unión de alta afinidad y saturables para el fragmento 16K que no unen a la PRL 23K

(Clapp & Weiner, 1992) y que pueden representar a los receptores responsables de mediar sus efectos.

La contribución de la PRL 16K a la regulación del proceso angiogénico puede estar determinada por la expresión local de sus receptores específicos en el endotelio y posiblemente en otros tipos celulares, así como por la actividad de la enzima responsable de su generación.

El sitio principal de producción de PRL es la hipófisis en donde la PRL 16K representa aproximadamente el 1% del total de la PRL hipofisiaria (Torner *et al.*, 1995). La PRL 16K también se ha detectado en la circulación (Clapp, 1987; Clapp *et al.*, 1994; Sinha, 1995), posiblemente proveniente de la hipófisis o a través de su generación por proteasas presentes en el suero ya que se ha visto que el suero de ratas lactantes procesa específicamente a la PRL para generar a la PRL 16K (Baldocchi *et al.*, 1992). Además, la PRL 16K pudiera también generarse a partir de la PRL 23K en tejidos blanco de su acción. En este sentido, se ha detectado actividad proteolítica de PRL en homogenados de glándula mamaria (Clapp, 1987; Wong *et al.*, 1986), cerebro (Clapp *et al.*, 1994), próstata, hígado, riñón y bazo (Baldocchi *et al.*, 1992; Clapp, 1987; Compton & Witorsch, 1984). Por otra parte varios tejidos extrahipofisarios expresan el gen de PRL (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), como las células endoteliales de vena umbilical humana (Corbacho *et al.*, 2000a) y los fibroblastos de pulmón (Corbacho *et al.*, 2000b), y generan a la PRL 16K a partir de la PRL que producen localmente. Por lo tanto, la PRL 16K podría ejercer sus efectos anti-angiogénicos a través de acciones locales y sistémicas.

La enzima propuesta para el procesamiento proteolítico que da origen a la PRL 16K es la catepsina D, una proteasa lisosomal cuya actividad óptima está en el rango de pH 3–5, dependiendo del sustrato y de las condiciones particulares del medio. La

catepsina D pertenece a la clase de proteasas tipo pepsina de la superfamilia de proteasas ácidas (Barrett, 1977). La enzima es un monómero que se pliega para formar dos dominios, en medio de los cuales se localiza el sitio activo. La función del sitio activo depende de la participación de un residuo de aspartato proveniente de cada uno de los dominios (Prasad & Suguna, 2002). La especificidad de corte de la catepsina D es similar a la de la pepsina; es decir, actúa sobre la unión peptídica más vulnerable entre aminoácidos hidrofóbicos (Barrett, 1977).

La catepsina D es sintetizada como un precursor inactivo (procatepsina D) que se activa en vesículas intracelulares como lisosomas, fagosomas y endosomas (Rochefort *et al.*, 2000). Varios tipos de células tumorales y tumores mamarios secretan niveles altos de catepsina D y también de procatepsina D (Rochefort, 1990) y la sobreexpresión de esta enzima se ha asociado con un alto riesgo de metástasis (Ferrandina *et al.*, 1997; Foekens *et al.*, 1999; Rochefort, 1992).

En los compartimentos intracelulares ácidos la catepsina D tiene el potencial de procesar a factores estimuladores o inhibidores de crecimiento, prohormonas y a sus receptores, contribuyendo así a su activación o inactivación (Rijnboutt *et al.*, 1991) por lo que dependiendo del contexto fisiológico, esta enzima es capaz de favorecer o restringir la proliferación celular. Recientemente se ha observado que la catepsina D además de actuar como proteasa puede presentar actividad mitogénica ya que en células MCF7 en cultivo se observó que el tratamiento con procatepsina D purificada resultó en un incremento en la proliferación celular (Vignon *et al.*, 1986). Además, la transfección de células tumorales con el cDNA de catepsina D estimula su proliferación *in vitro* (García *et al.*, 1990).

La procatepsina D puede ser activada extracelularmente, en particular en el medio tumoral o en sitios de inflamación que presentan un microambiente más ácido

que el medio fisiológico (Griffiths, 1991). El carácter ácido de estas condiciones se debe a la liberación excesiva de protones por parte de las células tumorales y macrófagos (Silver *et al.*, 1988) a través de un incremento en su producción de ácido láctico así como por la actividad de una ATPasa de H⁺ que poseen en su membrana plasmática (Rochefort *et al.*, 2000).

La catepsina D es dirigida del trans-Golgi a los lisosomas a través de los dos receptores de Man-6-P (el de 275 y el de 46 kDa) (von Figura & Hasilik, 1986). También se ha observado que la procatepsina D secretada puede ser incorporada por endocitosis a través de los dos receptores (von Figura & Hasilik, 1986). Recientemente se ha propuesto que la procatepsina D secretada o sobre-expresada puede actuar como un ligando en receptores membranales alternativos a los de Man-6P que pudieran estar implicados no sólo en su tráfico intracelular o en su endocitosis, sino también en mediar su actividad mitogénica (Laurent-Matha *et al.*, 1998; Rochefort *et al.*, 2000) como se ha observado en células de cáncer mamario (Fusek & Vetvicka, 1994; Vetvicka *et al.*, 1997).

Las extremas condiciones ácidas en las que la catepsina D es activa llevaron a cuestionar la relevancia fisiológica del procesamiento de la PRL por esta enzima. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la catepsina D es capaz de procesar proteínas intracelularmente en alguno de los compartimentos ácidos como por ejemplo durante su almacenamiento en los gránulos de secreción o en el medio extracelular ácido de los tumores o sitios de inflamación. Una observación interesante es que recientemente se encontró que la catepsina D puede ser translocada al citosol en donde es capaz de activar sustratos pro-apoptóticos (Bidere *et al.*, 2003), abriendo así la posibilidad de que el pH óptimo para su actividad pueda variar posiblemente en función del sustrato y tal vez de la interacción intermolecular con activadores fisiológicos.

Cabe mencionar que mientras la incubación de PRL con extractos de glándula mamaria o con catepsina D genera al fragmento N-terminal de 16 kDa de la molécula (Baldocchi *et al.*, 1993), otras enzimas como la trombina pueden generar fragmentos de 16 kDa que corresponden al extremo C-terminal de la PRL a través del corte entre los aminoácidos Lys53 y Ala54 (Khurana *et al.*, 1999). Khurana *et al.* (1999) encontraron que la PRL 16K C-terminal retiene muy poca de la actividad mitogénica de la PRL y carece de los efectos anti-angiogénicos de la PRL 16K N-terminal. Aún se desconoce si la trombina es capaz de procesar a la PRL *in vivo* o si el fragmento C-terminal de 16kDa está presente normalmente en el organismo. Sin embargo, debido a estas consideraciones resulta importante precisar la naturaleza del fragmento de 16kDa en cuestión.

I.4. Los adenomas hipofisarios.

La hipófisis anterior está compuesta por varios tipos celulares secretorios que mediante la producción de seis hormonas distintas, controlan las funciones de la glándula adrenal, de la tiroides, de las gónadas y de las glándulas mamarias entre otras, determinando procesos relacionados con la reproducción, el crecimiento y el metabolismo (Faglia & Spada, 2001).

La función hipofisaria está controlada por el predominio o ausencia de señales que regulan su secreción hormonal, así como la proliferación y apoptosis de las células hipofisarias. Las células hipofisarias mantienen una enorme plasticidad y son capaces de proliferar e incluso transdiferenciarse en respuesta a distintos estímulos que incluyen a las neurohormonas hipotalámicas, factores locales y hormonas circulantes (Faglia & Spada, 2001).

Los tumores hipofisarios se originan a partir de la expansión clonal de una sola célula transformada (Alexander *et al.*, 1990; Gicquel *et al.*, 1992; Herman *et al.*, 1990). Su desarrollo está influenciado por múltiples factores como alteraciones en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores (Lloyd, 2001), inestabilidad cromosómica, disponibilidad alterada de hormonas hipotalámicas, variación en la producción local de factores de crecimiento y modificaciones en los mecanismos de retroalimentación hormonal (Faglia & Spada, 2001).

Los adenomas hipofisarios pueden clasificarse de acuerdo a su tamaño, actividad endocrina, tipo hormonal, características ultraestructurales, características histológicas, composición celular, patrón de crecimiento, etc. (Kovacs *et al.*, 2001). Para nuestro propósito sólo mencionaremos que por su tamaño se clasifican en microadenomas y macroadenomas, dependiendo si su diámetro es menor o mayor a 10 mm y que por su producción hormonal se clasifican en: somatoadenomas, prolactinomas, adenomas de corticotropos, adenomas de tirotropos y adenomas de gonadotropos (Kovacs *et al.*, 2001). Existen adenomas que producen más de una hormona (plurihormonales) y pueden estar conformados por uno o varios tipos celulares (Kovacs *et al.*, 2001). También existen adenomas no-funcionales que son adenomas que no manifiestan evidencia clínica o bioquímica de una hipersecreción hormonal, y adenomas nulos que no muestran inmunorreactividad por alguna hormona adenohipofisaria (Kovacs *et al.*, 2001).

Los adenomas hipofisarios representan alrededor del 15% de los tumores intracraneales, si bien se ha descubierto la presencia de adenomas en el 25% de autopsias seleccionadas al azar (Melmed, 2003). El crecimiento de los tumores hipofisarios es distinto en comparación con otros tumores. Los adenomas hipofisarios proliferan lentamente y son benignos a pesar de que puedan presentar un crecimiento

local agresivo (Melmed, 2003). La ocurrencia de estos adenomas tiene un cierto grado de morbilidad debido a su localización, expansión y a la anómala producción hormonal (Melmed, 2003). Las manifestaciones clínicas del adenoma dependen del tipo celular que le dio origen, teniendo así que los adenomas hipofisarios pueden manifestarse con síndromes específicos tales como acromegalia (hipersecreción de hormona de crecimiento o GH), hiperprolactinemia (hipersecreción de prolactina o PRL), enfermedad de Cushing (hipersecreción de ACTH), hipertiroidismo inducido por TSH, etc. (Faglia & Spada, 2001)

Los prolactinomas son los adenomas hipofisarios funcionales más comunes presentando una prevalencia de 60-100/10⁶ habitantes (Melmed, 2003). Las manifestaciones clínicas de los pacientes con prolactinomas son amenorrea, infertilidad y galactorrea en mujeres; e impotencia e infertilidad en hombres (Melmed, 2003). Los microprolactinomas son más comunes que los macroprolactinomas teniendo que los primeros son más frecuentes en mujeres y representan hasta un 90% de las neoplasias hipofisarias, mientras que los segundos ocurren más en varones y representan hasta un 60% de estas neoplasias (Daniels & Martin, 1994). Las dos opciones de tratamiento son el quirúrgico y el farmacológico mediante agonistas dopaminérgicos, como la bromocriptina. Aquí cabe mencionar que la dopamina es el principal factor inhibitorio de la secreción y síntesis de prolactina y lo hace a través de los receptores D2 en los lactotrofos (Melmed, 2003).

I.5. La vascularización de adenomas hipofisarios

La adenohipófisis está irrigada por dos sistemas sanguíneos: el sistema portal hipotálamo-hipofisario proveniente de la eminencia media, que proporciona el medio de comunicación entre el hipotálamo y la hipófisis y que transporta a los factores

estimuladores e inhibidores hipotalámicos (Stanfield, 1960); y un sistema arterial directo que surge a partir de las arterias loral y capsular derivadas de la carótida interna (Stanfield, 1960) y que ha sido relacionado con la oxigenación y nutrición de la glándula (Yamada & Takada, 2003). Varios estudios han determinado que una proporción de los nuevos capilares que se forman durante el desarrollo de adenomas se originan a partir del sistema arterial directo no portal (Elias & Weiner, 1984). Estos vasos contribuyen al crecimiento tumoral ya que la sangre sistémica contiene niveles muy bajos de hormonas hipotalámicas dejando así a la hipófisis fuera de este control (Gorczyca & Hardy, 1988; Schechter *et al.*, 1988).

Las glándulas endócrinas están altamente vascularizadas y sus vasos capilares son altamente permeables debido a la presencia de abundantes fenestraciones (Katoh, 2003). La permeabilidad de los capilares endócrinos es indispensable para la liberación hormonal al torrente circulatorio. Debido a que las glándulas endocrinas normales están altamente vascularizadas, los cambios que ocurren durante su desarrollo neoplásico podrían ser distintos con respecto a lo que ocurre en otros tejidos que normalmente no están tan vascularizados en su estado normal (Lloyd *et al.*, 2003). Los adenomas hipofisarios presentan una menor densidad vascular en comparación con la del tejido hipofisario normal presumiblemente debido al predominio de la acción de moléculas inhibitoras de la angiogénesis que pudiera repercutir en su lento desarrollo así como en su baja ocurrencia de metástasis (Jugenburg *et al.*, 1995; Erroi *et al.*, 1986; Hirano *et al.*, 1972; Kovacs & Horvath, 1973; Schechter, 1972). Esto se contrapone a lo observado en otros tumores como pulmonares (Macchiarini *et al.*, 1992), mamarios (Horak *et al.*, 1992) y prostáticos (Weidner *et al.*, 1993) que son significativamente más vasculares que su correspondiente tejido no tumoral. Otro ejemplo son algunos tumores

precarcinomatosos cuya vascularidad es también mayor que la del tejido no transformado (Brem *et al.*, 1978; Jensen *et al.*, 1982).

Varios estudios han mostrado que el regulador central de la angiogénesis en las glándulas endócrinas incluyendo a la hipófisis es el VEGF (Banerjee *et al.*, 1997; Jabbour *et al.*, 1997; Katoh, 2003). El VEGF fue originalmente aislado a partir de células foliculoestelares de la hipófisis bovina (Gospodarowicz *et al.*, 1989). Sin embargo, se le ha encontrado distribuido en toda la glándula (Ochoa *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2002) y se le ha colocalizado en los gránulos de secreción de distintas células (Fan & Iseki, 1998). El hipotálamo pudiera estar implicado en la regulación de la secreción del VEGF hipofisiario ya que se ha mostrado que los péptidos hipotalámicos PACAP-38 y PACAP-27 estimulan la secreción del VEGF en células foliculoestelares (Gloddek *et al.*, 1999). Adicionalmente, estudios recientes indican que la dopamina inhibe selectivamente la angiogénesis inducida por VEGF presumiblemente a través de los receptores D2 presentes en células endoteliales (Basu *et al.*, 2001).

Las células foliculoestelares pueden ser blanco de la regulación de la producción de VEGF ya que la interleucina-6 (IL-6), el factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) y el factor transformante tipo alfa (TGF- α) estimulan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben (Gloddek *et al.*, 1999). Las células foliculoestelares rara vez se encuentran formando parte del adenoma y generalmente se ubican en una zona de transición entre el tejido normal y el tumoral (Farnoud *et al.*, 1994; Marin *et al.*, 1992). Es posible que durante el desarrollo tumoral, factores secretados por las células tumorales hipofisiarias (IL-6, TGF- α), factores hipotalámicos (PACAP-38) o factores incrementados en la circulación como el IGF-1 durante el desarrollo de adenomas de GH, pudieran estimular la producción de VEGF por las células foliculoestelares en la zona de transición (Lohrer *et al.*, 2001). Esto ha llevado a proponer que el límite del

adenoma es el sitio más importante del inicio y regulación de la angiogénesis (Fukumura *et al.*, 1998). En células tumorales hipofisarias también el TGF- α , el PACAP-38 y el estradiol incrementan la producción de VEGF (Lohrer *et al.*, 2001). El VEGF además de ejercer sus efectos proliferativos sobre el endotelio vascular, puede tener acciones sobre células adenohipofisarias ya que se ha reportado que induce la síntesis y secreción de PRL en la línea tumoral hipofisaria GH3 (Vidal *et al.*, 2000a). En lo que respecta a la expresión de VEGF en distintos adenomas, se le ha encontrado mayormente expresado en adenomas silenciosos, adenomas de GH y de ACTH; mientras que su receptor FLK-1 está mayormente expresado en prolactinomas (Lloyd *et al.*, 2003). El hecho de que el VEGF y sus receptores estén presentes en la hipófisis normal y neoplásica sugiere que existe una regulación parácrina y autócrina entre las células hipofisarias y el endotelio durante el desarrollo tumoral hipofisario. Diversos estudios han mostrado que la expresión de VEGF es mucho mayor en la hipófisis normal y en carcinomas hipofisarios que en adenomas hipofisarios (Lloyd *et al.*, 1999). Esto parece ser un caso particular de la hipófisis cuando se compara con otras glándulas endócrinas ya que se ha encontrado que para el caso de la glándula tiroides, la expresión de VEGF es mucho mayor en adenomas y carcinomas que en la tiroides no transformada (Kato *et al.*, 1999; Soh *et al.*, 1997).

Otra molécula importante en la regulación de la angiogénesis hipofisaria es el bFGF o FGF-2. La hipófisis normal así como todos los adenomas hipofisarios y el endotelio vascular producen al bFGF y a sus receptores (Ezzat *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1992; Suzui *et al.*, 1994). El bFGF intrínseco también puede actuar como regulador de la función hipofisaria (aumentando la secreción basal y estimulada de PRL y TSH) (Baird *et al.*, 1985) así como de su crecimiento y diferenciación (Renner *et al.*, 1996). El bFGF también es capaz de modular la expresión del VEGF en células endoteliales a

través de mecanismos autócrinos y parácrinos (Seghezzi *et al.*, 1998). Otro importante regulador tanto de la angiogénesis como de la tumorigénesis hipofisiaria es el gen tumoral transformante hipofisiario o PTTG. Este factor ha sido identificado en varios tipos tumorales incluyendo el hipofisiario, así como en líneas celulares de cáncer de colon. Estudios recientes han mostrado que los estrógenos y el bFGF estimulan la producción del PTTG en hipófisis, así como que el PTTG induce la expresión del bFGF (Heaney *et al.*, 1999). Asimismo se ha encontrado que el PTTG y el bFGF se expresan concordadamente en adenomas hipofisarios humanos y experimentales (Heaney *et al.*, 1999). Adicionalmente se ha demostrado que el PTTG es un fuerte inductor angiogénico en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Ishikawa *et al.*, 2001).

Hasta ahora se conoce muy poco acerca de las moléculas anti-angiogénicas en la hipófisis. Algunas de estas moléculas que han sido detectadas en la glándula son: el factor inhibitorio de leucemia (LIF) (Ferrara *et al.*, 1992) y la PRL 16K (Sinha *et al.*, 1985; Torner *et al.*, 1995). Como en otros tejidos, el balance entre los factores angiogénicos y anti-angiogénicos determinará el fenotipo vascular de la hipófisis y de los adenomas hipofisarios.

La progresión tumoral se ha relacionado directamente con el grado de neovascularización, por lo que una forma de analizar el comportamiento de los adenomas hipofisarios es a través de evaluar su angiogénesis. No se ha reportado una correlación significativa entre la proliferación tumoral adenohipofisaria y su angiogénesis. Sin embargo, algunos estudios han mostrado una relación entre la neovascularización y la expresión del gen anti-apoptótico bcl-2 en prolactinomas, lo cual sugiere que la angiogénesis está relacionada con la capacidad de las células tumorales de sobrevivir más que con su capacidad proliferativa (Turner *et al.*, 2000c). Aunque los adenomas hipofisarios están menos vascularizados que la hipófisis normal, la relación

entre el tamaño del tumor y su vascularización depende del tipo de adenoma. En el caso de los prolactinomas, los microprolactinomas están menos vascularizados que los macroprolactinomas y que otro tipo de tumores (secretorios y no secretorios) (Turner *et al.*, 2000b). Esta observación se ajusta bien con el hecho de que los microprolactinomas rara vez aumentan de tamaño y algunos muestran regresión espontánea, mientras que los macroprolactinomas pueden llegar a invadir el tejido local (Cunnah & Besser, 1991; Turner *et al.*, 2000b). De manera consistente con la idea de que la ocurrencia de metástasis depende del grado de angiogénesis, varios estudios han reportado una mayor densidad vascular en carcinomas hipofisarios que en adenomas (Turner *et al.*, 2000a; Vidal *et al.*, 2001). Para el caso de los adenomas secretorios de GH se ha observado que la densidad vascular de los microadenomas no es significativamente distinta a la de los macroadenomas (Turner *et al.*, 2000b). No obstante, resulta interesante que los tumores productores de GH y PRL sean menos vasculares que los que sólo producen GH (Turner *et al.*, 2000a). Esta observación ha llevado a especular si en estos tumores pudiera haber una mayor producción de PRL 16K que inhiba su neovascularización. La posibilidad de que la producción de la PRL 16K se modifique en los tumores no es inesperada. De hecho se sabe que algunas células tumorales como células de cáncer mamario (Rocheffort, 1990) y células de cáncer de próstata (Morikawa *et al.*, 2000) secretan catepsina D, la enzima que genera a la PRL 16K a partir de la PRL; y que la hipoxia puede inducir una redistribución de catepsina D de los lisosomas al citosol y a fluidos corporales (Bankowska *et al.*, 1997; Lefer & Galvin, 1978). Además los tumores presentan un pH extracelular más ácido que los tejidos normales (Stubbs *et al.*, 2000), lo que podría favorecer la actividad de la catepsina D y por lo tanto la proteólisis de la PRL hacia PRL 16K. La producción de PRL 16K en la hipófisis sugiere que esta

hormona podría tener especial relevancia en el control de la vascularización de esta glándula.

I.6. Relación hipoxia-prolactina

La hipoxia es un factor común a todos los padecimientos angiogénico-dependientes y es el principal regulador de un gran número de genes involucrados en las distintas etapas del proceso angiogénico (Pugh & Ratcliffe, 2003). Debido a que la PRL 16K es un fuerte inhibidor de la angiogénesis, es posible que la hipoxia pudiera tener algún efecto en su producción ya sea directamente sobre la expresión de su molécula precursora, la PRL, o sobre su procesamiento proteolítico.

La relación hipoxia-prolactina ya ha sido abordada, si bien dentro de un contexto relacionado a la respuesta neuroendócrina vinculada al estrés físico, como por ejemplo durante el ejercicio realizado en condiciones de bajo oxígeno. Se sabe que la hipófisis secreta PRL a la circulación bajo diversas condiciones de estrés (Neill, 1970; Seggie & Brown, 1975), y si bien aún se desconoce con exactitud cual podría ser la importancia de esta secreción, se ha sugerido que la PRL puede actuar como un agente ansiolítico endógeno ya que es capaz de reducir la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal en respuesta al estrés (Torner *et al.*, 2001). Sin embargo, el efecto estimulante de la hipoxia sobre los niveles de PRL circulante aún es tema de debate. En estudios encaminados a analizar el efecto de la hipoxia como agente estresor, se observó que en humanos expuestos a hipoxia aguda (14% O₂) después de un período de ejercicio disminuye su nivel de PRL en la circulación (Bouissou *et al.*, 1987). Asimismo, en ratas macho sometidas durante 0.5 y 2 h a bajo oxígeno (7-10%), disminuye la prolactina hipofisiaria y en el suero (Zhang & Du, 2000). Sin embargo, otros estudios reportaron un aumento en la PRL circulante cuando se realizó ejercicio en condiciones de bajo

oxígeno (14% O₂) (Struder *et al.*, 1996b). Asimismo, se observó un incremento en la PRL circulante en neonatos que presentaron asfixia perinatal en comparación con los neonatos controles (Varvarigou *et al.*, 1996).

Estos datos indican que la hipoxia puede regular la producción de PRL hipofisiaria. Si bien este efecto podría ser secundario al estrés producido por la maniobra experimental, también podría ser resultado de una acción directa de la baja tensión de oxígeno sobre los lactotrofos. Si bien no existían estudios que evaluaran la posible acción directa de la hipoxia sobre la expresión del gen de PRL en lactotrofos en cultivo, nosotros identificamos con base en los bancos de información que el promotor del gen de PRL contiene secuencias de reconocimiento (5'-RCGTG-3') del factor inducible por hipoxia tipo- 1 (HIF-1).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La limitada vascularización de los adenomas hipofisarios sugiere por una parte, el predominio de la acción de moléculas inhibitoras de la angiogénesis y por otra, la generación de zonas de hipoxia. La hipoxia es el principal factor que regula la producción de moléculas pro y anti-angiogénicas (Pouyssegur *et al.*, 2001). Al ser la PRL 16K un fuerte inhibidor de la angiogénesis y estar presente en la hipófisis, resulta posible proponer que la hipoxia pudiera regular la producción de PRL 16K durante el desarrollo de los prolactinomas resultando en una limitada vascularización.

De acuerdo con estas consideraciones, en este estudio investigamos si en lactotrofos la hipoxia modifica la producción de PRL 16K a través de alterar la síntesis de PRL y/o la secreción y actividad de la catepsina D. Asimismo, analizamos si la acción de la hipoxia sobre la expresión de PRL podría involucrar las secuencias de reconocimiento a HIF-1 presentes en el promotor de PRL. Para todos estos estudios

utilizamos la línea GH4C1 de lactotrofos derivada de un tumor secretor de PRL (Tashjian *et al.*, 1970; Yasamura *et al.*, 1966) y cultivos primarios de células adenohipofisarias. Las células GH4C1 tienen como ventaja su homogeneidad celular y su alta tasa de replicación en contraposición con los cultivos primarios de células hipofisarias que son heterogéneos y no proliferan en cultivo. Cabe mencionar que dadas sus propiedades inmortales, las células GH4C1 podrían diferir en su respuesta a hipoxia con respecto a los lactotrofos normales. De ser así, estas diferencias también podrían ser de interés para estudiar los mecanismos involucrados en la vascularización de los prolactinomas.

Finalmente, las diferencias observadas entre los cultivos primarios y las células GH4C1 no relacionadas con los tratamientos con hipoxia sino más bien referentes a las propiedades intrínsecas de cada tipo celular, nos llevaron a investigar acerca del compartimiento celular en donde podía ocurrir la proteólisis de la PRL por catepsina D. El hecho de que los lactotrofos normales almacenan a la PRL en gránulos de secreción mientras que las células GH4C1 secretan a la PRL recién sintetizada sin previo almacenamiento nos llevó a proponer que el gránulo de secreción es un sitio probable para dicho procesamiento. Para este análisis evaluamos la presencia de PRL 16K en ambos tipos celulares e investigamos la colocación de catepsina D en los gránulos de secreción de PRL.

III. HIPÓTESIS

La hipoxia regula la expresión del gen de PRL y su proteólisis hacia PRL 16K en lactotrofos hipofisarios.

IV. OBJETIVOS

Determinar el efecto de la hipoxia (0.1% O₂) sobre la síntesis de PRL y su procesamiento a PRL 16K.

- I. Analizar el mecanismo de acción de la hipoxia sobre la síntesis de PRL.
- II. Investigar la localización celular del procesamiento proteolítico de PRL a PRL 16K.

METAS.

- I. Determinar el efecto de la hipoxia sobre:
 1. el mRNA de PRL
 2. la PRL intracelular y secretada
 3. la catepsina D intracelular y secretada
 4. la actividad de catepsina D para generar PRL 16K
- II. Determinar si el mecanismo de acción de la hipoxia sobre PRL se ejerce a través de la secuencia consenso al sitio de reconocimiento de HIF-1 en el promotor de PRL
- III. Analizar la proteólisis de la PRL en lactotrofos normales y en células GH4C1 a través de evaluar:
 1. la presencia de PRL 16K en lactotrofos normales y en células GH4C1
 2. la localización intracelular de catepsina D y PRL en lactotrofos normales y en células GH4C1

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Cultivo celular

Las células GH4C1 son una subclona de la línea celular GH3 que fue aislada en 1966 a partir de un tumor hipofisario inducido por rayos X y que produce GH y PRL (Tashjian *et al.*, 1970). Las células GH4C1 fueron cultivadas en medio F10 (SIGMA,

St. Louis, Missouri) con 15% suero de caballo inactivado (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California), 2.5% suero fetal bovino inactivado (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) y penicilina-estreptomina (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) a 37°C en presencia de 5% CO₂. Los lactotropos normales fueron aislados a partir de adenohipófisis de rata de acuerdo al método reportado por Pérez y Apfelbaum, (1992) con algunas modificaciones. Brevemente, la adenohipófisis se extrae y se lava cuatro veces con buffer Hank's para quitar exceso de sangre. El tejido se corta en pedazos muy pequeños, se centrifuga y el botón de tejido se dispersa enzimáticamente mediante su incubación con 3 ml (1.6 mg/ml buffer Hank's) de colagenasa tipo I (Worthington) (250 U/mg) y 200 ul de DNasa tipo I (1 mg/ml buffer Hank's) (Sigma) (2500 U/mg) durante 1 hr a 37°C. Se adicionan 200 ul más de DNasa y el tejido se dispersa mecánicamente mediante su paso a través de una pipeta Pasteur siliconizada. Las células se centrifugan y se resuspenden en medio DMEM I adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) y penicilina-estreptomina (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Las células se sembraron en cajas Petri recubiertas con una capa de matriz extracelular MATRIGEL (BD Biosciencias, Bedford, MA). Los lactotropos se cultivaron en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) adicionado con 10% suero fetal bovino inactivado (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) y penicilina-estreptomina (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). El medio se les cambió a las 48 h. Las células se mantuvieron a 37°C en presencia de 5% CO₂.

V.2. Tratamientos con hipoxia

Los tratamientos con hipoxia se llevaron a cabo en una cámara hermética de Plexiglas (Bellco Glass, Vineland, New Jersey) bajo condiciones de presión, humedad y

temperatura constantes, de acuerdo al método descrito (Steinbrech *et al.*, 2000). La cámara fue desoxigenada mediante la infusión de una mezcla de gas compuesta por 95% N₂ y 5% CO₂. La concentración de oxígeno se mantuvo en 0.1% y fue monitoreada a lo largo del experimento mediante un medidor de oxígeno ambiental (BW Technologies, Arlington, Texas) colocado dentro de la cámara. Las células GH4C1 se sembraron en una densidad subconfluyente (2 X 10⁶ células/ cajas 100 mm) y se incubaron en medio F10 durante 12 h. El medio se cambió por Optimem I (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) adicionado con penicilina-estreptomicina y los cultivos se mantuvieron así por 12 h. más con el propósito de sincronizar el ciclo celular del cultivo. El medio se cambió por Optimem I desoxigenado antes de empezar el tratamiento con hipoxia. Los cultivos control fueron tratados de manera idéntica a los experimentales, con la excepción de que los medios de cultivo mantuvieron su concentración normal de oxígeno (20%). Al final de los tratamientos, el número de células viables se determinó mediante el método de exclusión de azul de tripano (Harlow & Lane, 1988).

V.3. RT-PCR

El RNA total se purificó mediante el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987). El RNA (5 ug) se retrotranscribió utilizando la enzima M-MLV retrotranscriptasa (Promega, Madison, Wisconsin) y oligo dT(18) (New England Biolabs). Todas las reacciones de PCR, así como los oligonucleótidos iniciadores para el VEGF y el gen de mantenimiento celular, la proteína ribosomal L19, se hicieron de acuerdo a condiciones ya reportadas (Ochoa *et al.*, 2000). La amplificación del VEGF se hizo utilizando los iniciadores: antisentido 5'-GCTCTCTTGGGTGCACTGGA-3' y sentido 5'-CACCGCCTTGGCTTGTCACA-3' (Nakamura *et al.*, 1996), que amplificaron los fragmentos de 635, 563 y 431 pares de

bases (pb) que corresponden a las isoformas VEGF188, VEGF164 y VEGF120, respectivamente. Para la amplificación del gen de PRL se utilizaron los iniciadores: antisentido 5'-CGAAATCGCCAATGCCAACTC-3' y sentido 5'-TCGTCCATGAGAATCCGCTTG-3' que amplificaron un fragmento de 333 pb. Las condiciones óptimas de la amplificación de VEGF se establecieron a través de variar la concentración de RNA y el número de ciclos de la reacción. Se tomaron 200 ng de la mezcla de reacción de la retrotranscripción para la reacción de PCR cuyas condiciones fueron: desnaturalización a 95°C/30 seg., hibridación a 65°C/45 seg. y extensión a 72°C/45 seg. durante 28 ciclos. Los productos de las PCRs fueron separados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, fotografiados y analizados por densitometría.

V.4. Northern blot

Se analizaron 10 ug de RNA total por Northern blot de acuerdo al método descrito (Sambrook & Russell, 2001). El RNA se separó mediante electroforesis y el gel se transfirió a una membrana de Hybond-N nylon (Millipore, Billerica, Massachusetts), se acopló a la membrana mediante luz U.V., se prehibridó a 63°C (1 hr) y se hibridó a 63°C (8-12 h) con sondas para PRL, GH o β -actina de rata. Se utilizaron los cDNAs completos de PRL y GH de rata (proporcionados por R. Maurer de la Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon y Arturo Gutiérrez-Hartmann de la Universidad de Colorado, respectivamente) como sondas para hibridar. La sonda de β -actina se preparó por RT-PCR a partir de fibroblastos de rata. Los iniciadores para la PCR de β -actina fueron: sentido 5'- ATGGTGGGAATGGGTCAGAA-3' y antisentido 5'-TCGTACTCCTGCTTGCTGA-3'. Las sondas se marcaron con [α -³²P] dCTP mediante el método de oligonucleótidos al azar (Feinberg & Vogelstein, 1983). La expresión del mRNA de PRL y β -actina se cuantificó por densitometría.

V.5. Homogenados celulares y medios condicionados

Después de los tratamientos, se colectó el medio condicionado, se centrifugó para quitar restos celulares (1200 xg/10 min), se concentró 10 veces (Centricon 3: Amicon Millipore, Billerica, Massachusetts) y se congeló a -70°C. Las células se lisaron en 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 ug/ml aprotinina y 100 ug/ml fenilmetilsulfonil fluoruro (SIGMA).

V.6. Western blot

Los homogenados celulares y los medios condicionados se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y desnaturalizantes al 15% para el caso de PRL, al 12% para el caso de catepsina D y al 10% para el caso de Pit-1. El análisis de PRL se hizo con 11 ug de homogenado y 170 ng de medio condicionado de las células GH4C1. En el caso de los lactotropos normales, el análisis de PRL se hizo con 1 ug de homogenado y 500 ng de medio condicionado. Para examinar la presencia de catepsina D se usaron 7-12 ug de homogenado o medio condicionado de las células GH4C1 y de lactotropos normales. El análisis de Pit-1 se hizo con 100 ug de homogenado de las células GH4C1. Las inmunotransferencias se realizaron de acuerdo al método descrito (Lane & Harlow, 1999). Para detectar PRL se utilizó un antisuero anti-PRL producido en el laboratorio (C1) en una dilución 1:1000 o los anticuerpos monoclonales (líquido de ascitis) anti-PRL INN-1y anti-PRL INN-368 (proporcionados por el Dr. Peter Berger, Innsbruck, Austria) en una dilución 1:500. Para detectar catepsina D se utilizó un anticuerpo policlonal anti-catepsina D en una concentración de 0.8 ug/ul (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California). La β -actina se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-actina en una dilución 1:250 (mouse ascites fluid, clone AC-40, SIGMA). El factor Pit-1 se detectó con un anticuerpo policlonal proporcionado por el Dr. Gutiérrez-Hartmann de la Universidad de Colorado en una dilución 1:1000. Las

proteínas se revelaron mediante un estuche comercial para una reacción de quimio-luminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (dilución 1:10,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California) o con un estuche comercial (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, California) para una reacción con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (dilución de 1:5000; Jackson Immunoresearch labs, Inc.). La densidad de las bandas inmunorreactivas se determinó mediante el programa 1D Image Analysis Software v3-5 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York).

V.7. Tinción con plata

Los medios condicionados de cultivos de 6.5×10^4 células GH4C1 tratados con normoxia o hipoxia, se precipitaron con ácido tricloroacético. Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras y desnaturalizantes.

V.8. ELISA

El ELISA se realizó de acuerdo al método descrito (Duenas *et al.*, 1999). La placa se cubrió con 10 ng de PRL 23K y se utilizó un antisuero anti-PRL producido en el laboratorio en una dilución de 1:4000 y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en una dilución de 1:5000 (Jackson ImmunoResearch Laboratorios, Inc., West Grove, Pennsylvania). Los anticuerpos acoplados a peroxidasa se revelaron mediante la reacción con dihidrocloruro de *o*-fenilendiamina en presencia de peróxido de hidrógeno. Se midió la absorbancia 490 nm.

V.9. Análisis de la actividad de la proteasa de PRL y la generación de PRL 16K

La actividad enzimática que procesa PRL y produce PRL 16K se determinó de acuerdo al método descrito (Clapp, 1987) con algunas modificaciones. Se mezclaron

650 ng de medio condicionado por las células GH4C1 (5 ul) con 5 ul de 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) y 10 ul de mezcla de reacción (0.1 M fosfato de citratos, 0.15 M NaCl, pH 5.0) y se incubaron durante 24 h a 37°C. El pH final de la mezcla de reacción fue de 5.6. Los productos del corte de la PRL se analizaron por SDS-PAGE-Western blot en condiciones reductoras. La identificación de la actividad proteolítica tipo catepsina D se validó con el uso del inhibidor específico de proteasas ácidas, la pepstatina-A (Marciniszyn *et al.*, 1977). La pepstatina A se usó a una concentración de 1 μ M que es la que comúnmente se ha empleado para bloquear la actividad de proteasas de ácido aspártico presentes en medios condicionados (Morikawa *et al.*, 2000). Las bandas inmunorreactivas se analizaron por densitometría.

V.10. Análisis de la actividad del promotor de prolactina en células GH4C1

Las células GH4C1 se transfectaron transitoriamente utilizando lipofectamina (GIBCO, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) de acuerdo al protocolo del proveedor. Se utilizó el plásmido reportero -2500 PRL*Luc*, proporcionado por el Dr. R. Maurer (Universidad de Iowa). Este plásmido contiene 2.5 kilobases de la región 5' que flanquea al gen de PRL de rata. Esta región comprende al promotor proximal y al enhancer distal ubicados río arriba del gen de la luciferasa en el vector pSV232AL-A 5' (Maurer, 1989) (Fig. 1). El plásmido -425 PRL*Luc* fue proporcionado por el Dr. Arturo Gutiérrez-Hartmann (Universidad de Colorado). Este plásmido contiene la secuencia que va de -425 a +73 de la región promotora del gen de PRL de rata insertada río arriba del gen de la luciferasa en el vector pA3*Luc* (Jackson *et al.*, 1992) (Fig. 1). En el caso de la secuencia promotora del gen de GH, se utilizó el plásmido pA3GH*Luc*, también proporcionado por el Dr. Gutiérrez-Hartmann. Este plásmido presenta la secuencia que comprende de -528 a +65 del promotor de GH de rata fusionada al gen de la luciferasa en el vector pA3*Luc* (Conrad & Gutierrez-Hartmann, 1992). El vector -2500 PRL*Luc*

contiene una secuencia consenso de respuesta a HIF-1 entre las bases -1413/-1418 con respecto al inicio de la transcripción de la PRL. El plásmido -425 PRL*Luc*, carece de dicho sitio por lo que si HIF-1 medía el efecto de la hipoxia, se esperaría que en las células transfectadas con este vector, la actividad de la luciferasa en hipoxia vs normoxia fuera la misma.

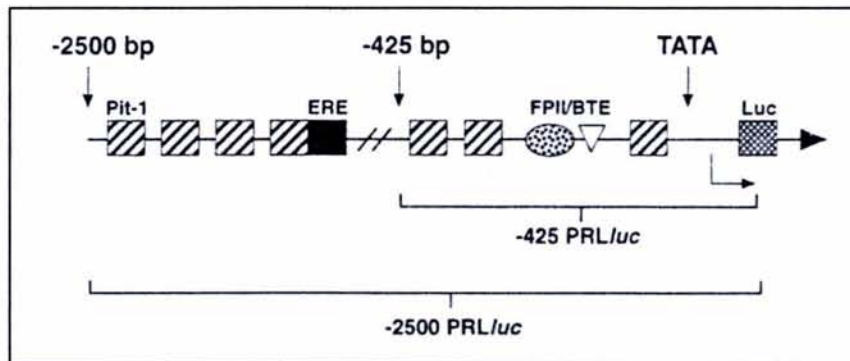


Fig. 1. Esquema de los plásmidos reporteros -425 PRL*Luc*, que contiene al promotor proximal (-425 a +73), y -2500 PRL*Luc* que comprende al promotor proximal y al enhancer distal. En el esquema también se indica la posición de los elementos responsivos a Pit-1, a estrógenos (ERE) y el elemento transcripcional basal (FPII/BTE).

El plásmido -pPRL*Luc* se utilizó como control negativo en los experimentos con -2500 PRL*Luc* y se construyó a partir de la escisión del promotor de PRL en -2500 PRL*Luc* mediante el corte con SacI y HindIII. El plásmido pA3*Luc*, donado por el Dr. Gutiérrez-Hartmann, se usó como control negativo en los experimentos con -425 PRL*Luc* y pA3GH*Luc*. Ninguno de los plásmidos controles contienen alguna secuencia reguladora eucariota capaz de dirigir la expresión de la luciferasa. Los cultivos transfectados se trataron con hipoxia durante distintos tiempos. Por cada pozo de cultivo (placas con 6 pozos) se utilizaron 400 µl de buffer de lisis (Cell Culture Lysis Reagent, Promega, Madison, WI). Para medir la actividad de la luciferasa se utilizaron 20 µl de homogenado celular (equilibrado a temperatura ambiente) y 100 µl del sustrato

luciferina (Luciferase Assay Reagent, Promega, Madison, WI). La actividad de la luciferasa se determinó mediante un luminómetro manual (TD-20/20 Turner Designs). La actividad enzimática se comenzó a registrar después de 2 seg de haber introducido la muestra al luminómetro. El tiempo total de registro fue de 10 seg. Se hicieron triplicados de cada condición experimental y los datos de la actividad de la luciferasa se normalizaron por concentración de proteína.

V.11. Análisis por inmunofluorescencia y microscopía confocal de la localización intracelular de PRL y catepsina D

Los lactotopos normales se sembraron en cubreobjetos redondos recubiertos con una capa de MATRIGEL (BD Biosciencias, Bedford, MA). Después de 48 h del aislamiento, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4%-PBS durante 10 min a 4°C. Después de lavar 4 veces con PBS, las células se incubaron en PBS/Tritón 0.3%/BSA 5% durante 2 h. Se aplicó el anticuerpo primario monoclonal anti-PRL INN-1 (líquido de ascitis), proporcionado por el Dr. Peter Berger (Innsbruck, Austria) en una dilución 1:500 y se incubó durante la noche. Al día siguiente se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno en agitación con PBS/Tritón 0.3%. Para detectar a la PRL se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a fluoresceína en una dilución 1:100 en PBS/Tritón 0.3% y se incubó durante 2 h. Se hicieron 2 lavados de 10 minutos cada uno con agitación. Se aplicó el anticuerpo policlonal anti-catepsina D en una dilución 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California) y se incubó durante la noche. Para detectar a la catepsina D se utilizó el sistema biotina-avidina-Texas red para lo cual se incubó con un anticuerpo anti-IgG de cabra acoplado a biotina en una dilución 1:100 durante 1 h. Se hicieron 2 lavados de 10 min cada uno en agitación con PBS-Tritón 0.3% y se incubó con un complejo avidina-Texas Red en una dilución 1:100 por 1 h. Se hicieron 2 lavados de 10 minutos

cada uno en agitación con PBS-Triton 0.3% y se montaron las laminillas con PBS-Glicerol. Para el caso de las células GH4C1, el procedimiento es relativamente distinto que para los lactotropos normales. Antes de ser fijadas en paraformaldehído, las células GH4C1 se lavan 3X en medio F10 (SIGMA, St. Louis, Missouri) en ausencia de suero. Las células se fijan por 30 minutos en paraformaldehído 4% en buffer Sörensen (pH 7.4), se lavan 4X en 0.1 M PBS/5% sacarosa y se permeabilizan en Tritón/0.1% PBS por 4 minutos. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se incubó con PBS/sacarosa 5%/BSA 5% durante 1-2 h. La incubación de los anticuerpos se hace de la misma forma que para los lactotropos normales pero diluidos en PBS/sacarosa 5%. Todos los lavados se hacen con PBS/sacarosa 5%. Las laminillas se analizaron en colaboración con el Dr. Miguel Morales del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, mediante un objetivo de aceite de inmersión 100X y aumentos digitales de 1.5X y 2.5X en un microscopio confocal (CLSM; modelo LSM5 Pascal, Zeiss, Jena, Germany). Para cada célula se examinaron series de 5-10 imágenes en el eje Z de aprox. 350 nm de grosor y se analizaron utilizando el sistema de canal dual con filtros excitadores verde (514 nm) y azul (418 nm). Las secciones ópticas se proyectaron en un plano de dos dimensiones, empalmado aquellas imágenes de las células con doble marca.

V.12. Análisis Estadístico

Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y los blots (Western y Northern) se analizaron 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 standard de por lo menos tres experimentos independientes. Los promedios se compararon mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Fisher. Se incluyó un gen o proteína control en todos los experimentos de PCR así como Northern y Western blots para verificar la cantidad y calidad de las muestras.

VI. RESULTADOS

VI.1. Análisis del efecto de la hipoxia sobre las células GH4C1

El tratamiento con hipoxia consistió en la exposición de las células GH4C1 a 0.1% de oxígeno durante 12, 24 y 36 h. El número total de células se mantuvo constante en los cultivos control y experimentales hasta las 24 h de hipoxia (Fig. 2A). A las 36 h de hipoxia se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el número de células con respecto al control. No obstante, mediante el método de exclusión de azul de tripano, observamos que la viabilidad de las células GH4C1 no se altera en forma importante después de la hipoxia (Fig. 2B). No se observó ningún cambio morfológico en ninguno de los periodos de tratamiento.

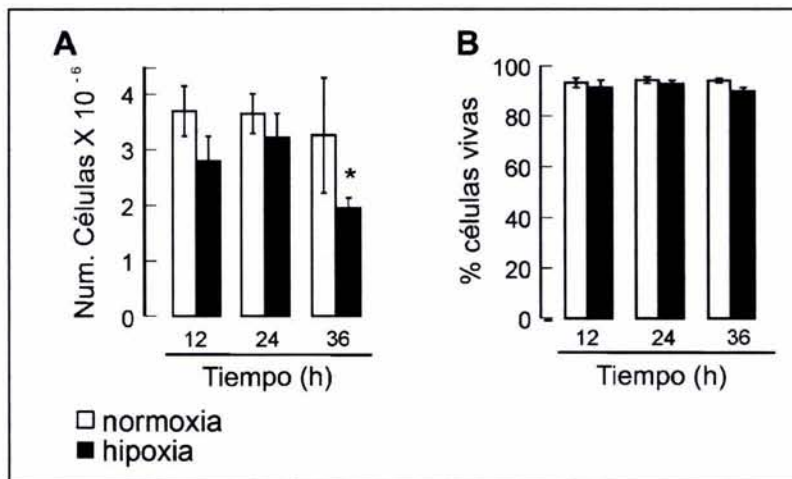


Fig. 2. Efecto de la hipoxia sobre el número (A) y viabilidad celular (B). Cultivos confluentes de células GH4C1 fueron sometidos a hipoxia durante 12-36 h. Las células en el cultivo se desprendieron mediante su tratamiento con tripsina, se contaron en un hemocitómetro y se determinó el porcentaje de células viables mediante el método de exclusión de azul de tripano. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

Para validar el posible efecto de hipoxia de inducir la expresión de genes específicos, se determinó la expresión del factor VEGF mediante RT-PCR. Las condiciones óptimas de la reacción de amplificación se establecieron a través de variar el número de ciclos y la cantidad de RNA. Se aplicaron 28 ciclos y 200 ng de RNA ya

que estas fueron las condiciones en las cuales el aumento en la densidad óptica de los productos amplificados mostró un comportamiento lineal.

El VEGF es un conocido gen de respuesta a hipoxia en distintos tipos celulares tumorales (Minchenko *et al.*, 1994; Shweiki *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado que la línea celular GH3, a partir de la cual derivó la línea GH4C1, expresa VEGF (Lohrer *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2000b). De acuerdo con lo reportado para las células GH3, observamos que las células GH4C1 expresan los transcritos que codifican para las isoformas VEGF164 y VEGF120 (Fig. 3A). Asimismo, conforme a lo esperado para otros tipos celulares, ambos transcritos incrementaron su expresión en respuesta a hipoxia después de 12 h y 24 h de tratamiento (Fig. 3A).

El aumento en la expresión de los mRNAs que codifican para el VEGF164 y VEGF120 fue de aproximadamente 2 y 1.5 veces mayor en hipoxia vs. normoxia, respectivamente (Fig. 3B). Estos resultados indican que el método de hipoxia utilizado es adecuado para analizar la expresión de genes inducidos específicamente por la baja concentración de oxígeno.

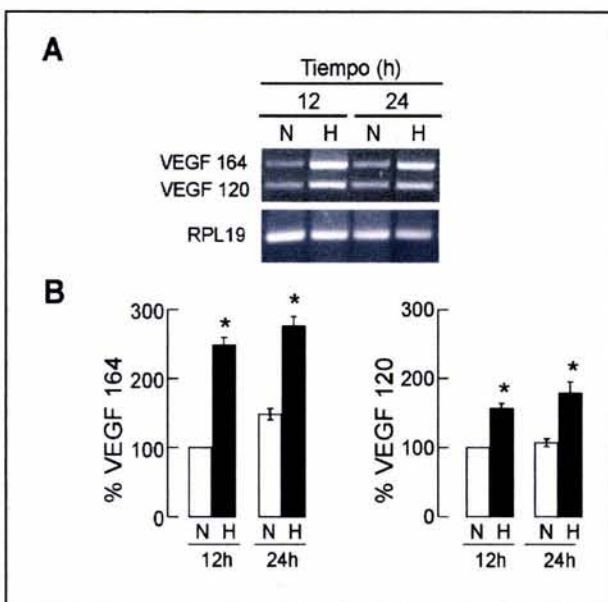


Fig. 3. Inducción del VEGF por hipoxia. **A.** La expresión del VEGF164 y del VEGF120 se analizó por RT-PCR a partir del RNA total purificado de células GH4C1 expuestas a hipoxia (H) o normoxia (N) por 12-24 h. La amplificación del gen de mantenimiento celular de la proteína ribosomal L19 (RPL19) se usó como control. **B.** Las bandas se evaluaron densitométricamente y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

A diferencia del efecto sobre VEGF, la hipoxia produjo una disminución en los niveles del mRNA de PRL. El análisis por Northern blot mostró que los niveles del mRNA de PRL disminuyeron a partir de las 12 h de hipoxia. La disminución fue más acentuada a mayores tiempos de tratamiento, observándose que el transcrito de PRL aumentó en las células control pero disminuyó progresivamente en las células hipóxicas (Fig. 4A). Después de 36 h en hipoxia, el mRNA de PRL se redujo aproximadamente en un 80% (Fig. 4B). La reducción en el nivel de mRNA no pareció ser un efecto general, ya que la expresión del mRNA de β -actina no mostró cambio bajo los distintos tiempos de tratamiento (Fig. 4A).

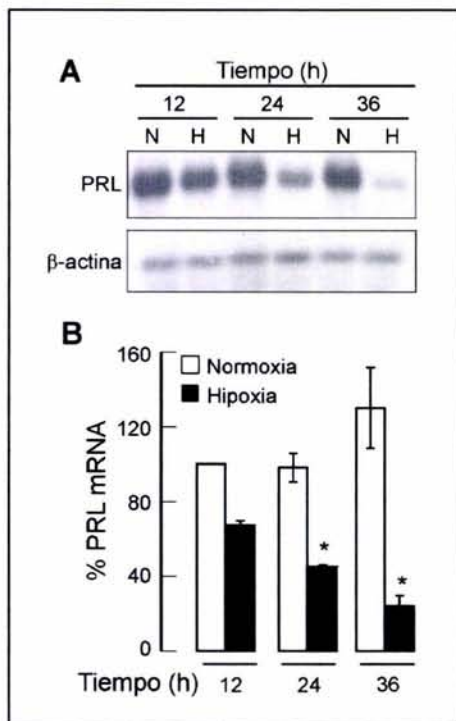


Fig. 4. Disminución del mRNA de PRL por hipoxia. **A.** Análisis por Northern blot de los mRNAs de PRL y β -actina de células GH4C1 expuestas a normoxia (N) o hipoxia (H) por 12-36 h. **B.** Los valores del mRNA de PRL se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

De manera consistente con la disminución en el mRNA, la PRL 23K intracelular y la secretada al medio de cultivo disminuyeron por efecto de la hipoxia. El análisis por Western blot de los homogenados celulares mostró una disminución en los niveles de la PRL intracelular después de 12 y hasta de 36 h de hipoxia. También de acuerdo con lo

observado para el mRNA, la PRL intracelular se incrementó progresivamente en condiciones de normoxia mientras sus niveles decayeron bajo hipoxia. Asimismo, los niveles de β -actina se observaron constantes independientemente de la concentración de oxígeno (Fig. 5A).

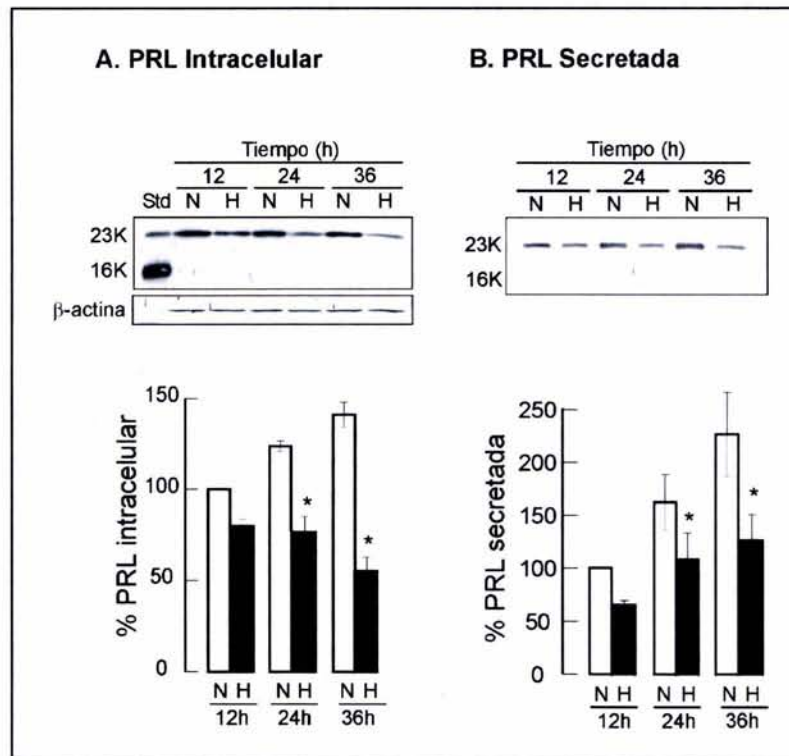


Fig. 5. Reducción en la PRL intracelular y secretada inducida por hipoxia. Análisis por Western blot de la PRL intracelular (A) y secretada (B) de las células GH4C1 expuestas a normoxia (N) o hipoxia (H) por 12-36 h. Las bandas de PRL se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

La PRL secretada también se acumuló en condiciones de normoxia, incrementándose al doble a las 36 h con respecto al valor de las 12 h de tratamiento. Bajo hipoxia, la secreción de PRL al medio de cultivo fue menor desde las 12 h de incubación en comparación a la observada en los cultivos control. La cantidad de PRL acumulada en los medios condicionados se incrementó bajo normoxia y disminuyó bajo hipoxia (Fig. 5B). Estos resultados se confirmaron mediante ensayos de ELISA en

donde se encontró una reducción significativa ($p < 0.05$) de hasta dos veces menor en los niveles de PRL secretada en hipoxia (83.6 ± 6.1 vs $43.3 \pm 6.6 \mu\text{g}/10^6$ células para las 24 h de normoxia vs hipoxia, respectivamente).

Con el propósito de examinar si la reducción en la secreción de PRL era un fenómeno general para todas las proteínas secretadas, analizamos mediante una tinción con plata, los niveles de proteínas secretadas bajo condiciones de hipoxia vs. normoxia (Fig. 6). No se detectaron diferencias en el patrón de proteínas totales secretadas bajo hipoxia vs. normoxia.

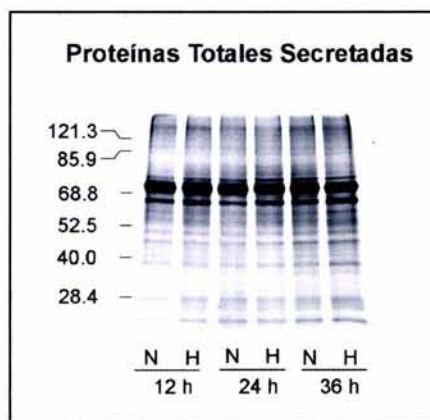


Fig. 6. Tinción con plata de las proteínas secretadas por las células GH4C1 sometidas a normoxia (N) o hipoxia (H) durante 12-36 h. Las proteínas del medio condicionado por 6.5×10^4 células se precipitaron con TCA y se analizaron por SDS-PAGE en un gel reductor al 10%. La proteína de 70 kDa que se observa en mayor proporción es un constituyente del medio no condicionado (Optimem I). Ninguna de las otras proteínas se detectaron en el medio no condicionado que fue procesado de manera idéntica al medio condicionado por las células GH4C1 (datos no mostrados).

Cabe señalar que aunque se usó un anticuerpo policlonal que reconoce varias formas de PRL, incluyendo a las PRLs 23K y 16K, no se detectó PRL 16K por Western blot ni en los homogenados celulares ni en el medio de cultivo de las células GH4C1 (Figs. 5A, 5B). Por lo tanto es posible que las células GH4C1 no produzcan PRL 16K.

Debido a que la catepsina D es la enzima propuesta para procesar a la PRL hacia PRL 16K, que esta enzima es activa a pH ácido y que el pH del medio extracelular de los tumores es ácido (Stubbs *et al.*, 2000), nosotros especulamos sobre la posibilidad de que la PRL 16K pudiera generarse extracelularmente debido a la acción de la catepsina D secretada por células tumorales. Con la idea de determinar si la actividad proteolítica

responsable de la generación de PRL 16K está presente en el medio condicionado de las células GH4C1 y es capaz de generar a la PRL 16K bajo condiciones ácidas, acidificamos el medio condicionado por cultivos sometidos a 24 h de hipoxia o normoxia, lo incubamos durante 24 h a 37 °C, y evaluamos la proteólisis de la PRL por Western blot. La incubación en pH ácido resultó en la aparición de un segundo producto inmunoreactivo de 16 kDa (Fig. 7A). El análisis por densitometría mostró que el nivel de la PRL de 16 kDa relativo a la PRL 23K fue 4 veces menor en el medio de las células hipóxicas vs. las células control. La generación de este producto se atribuye a la actividad de una proteasa liberada por las células ya que cuando una preparación pura de PRL se incubó a pH ácido en medio no condicionado, no se observó la aparición del producto de 16 kDa (Fig. 7A). La producción de la PRL 16K por el medio condicionado se bloqueó con pepstatina A, un inhibidor de catepsina D, sugiriendo así que la catepsina D es la proteasa responsable de este procesamiento (Fig. 7A).

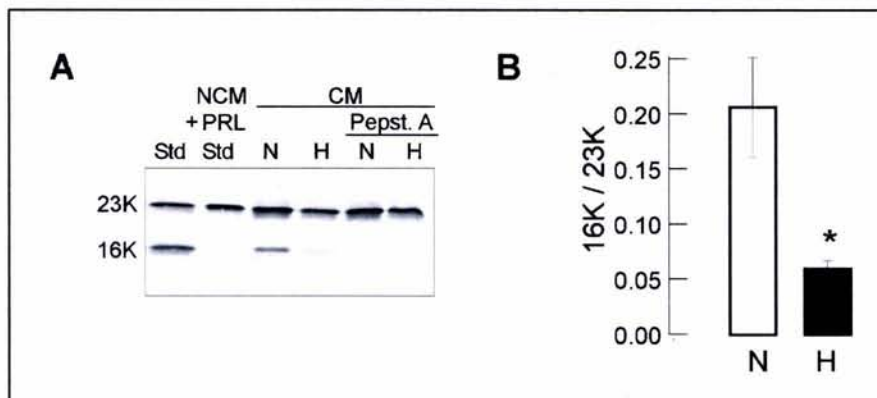


Fig. 7. Disminución de la proteólisis de PRL en medio ácido inducida por hipoxia. **A.** EL medio condicionado de las células GH4C1 sometidas a normoxia o hipoxia por 24 h se acidificó a pH 5.6, y se incubó a 37°C por 24 h en ausencia o presencia de pepstatina-A (*Pepst.A* 1 μ M). La proteólisis de PRL se evaluó por Western blot. El medio no condicionado y acidificado (NCM) se incubó con un estándar de PRL 23K purificado en las mismas condiciones que el medio condicionado (CM). **B.** Las bandas de PRL se evaluaron densitométricamente y se expresaron como el cociente de PRL 16K/PRL 23K. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

Para sustentar esta conclusión, examinamos la presencia de las isoformas de catepsina D intracelulares y secretadas de las células GH4C1. Intracelularmente, las células GH4C1 contienen a las tres isoformas de catepsina D: los precursores pro- y pseudo-catepsina de 52 y 42 kDa, respectivamente y la forma madura de 33 kDa. No se observaron cambios en los niveles intracelulares de las tres isoformas entre hipoxia y normoxia (Fig. 8A).

Las células GH4C1 también secretan a las tres isoformas de catepsina D, aunque la forma madura apenas se detecta mediante Western blot (Fig. 8B). La hipoxia indujo una disminución en la secreción de las isoformas de alto peso molecular de catepsina D (Fig. 8B).

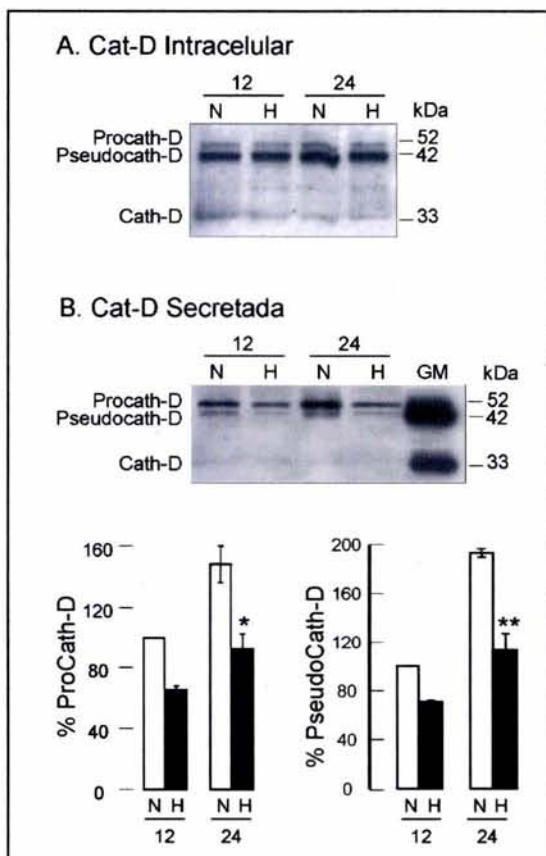


Fig. 8. Disminución de la secreción de las isoformas de catepsina D inducida por hipoxia. Análisis por Western blot de los niveles de procatepsina D (Procath-D), pseudocatepsina D (PseudoCath-D) y catepsina D (Cath-D) intracelulares (A) y en los medios condicionados (B) de las células GH4C1 sometidos a normoxia (N) o hipoxia (H) durante 12 y 24 h. Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al valor en normoxia.

Una observación interesante es que la proporción entre las formas de catepsina parece distinta dentro que fuera de la célula. Por una parte se detecta más catepsina madura en los homogenados que en los medios condicionados y por otra, las células parecen secretar más pro-catepsina D que pseudo-catepsina e intracelularmente contienen más pseudo-catepsina D que pro-catepsina D (Fig. 8).

Los precursores de la catepsina D tienen la capacidad de autoprocresarse en condiciones ácidas para dar lugar a la forma activa de 33 kDa (Hasilik *et al.*, 1982; Richo & Conner, 1994; Wittlin *et al.*, 1999). Es por esto que para determinar si la forma de 33 kDa era capaz de producirse extracelularmente a partir de los precursores secretados, acidificamos el medio condicionado de las células GH4C1.

La acidificación del medio permitió la detección de la catepsina activa de 33 kDa. En el medio condicionado acidificado se detectaron la pro-catepsina D y la forma de 33 kDa pero no en el medio no condicionado (Fig. 9). Los niveles de ambas isoformas se incrementaron con el tiempo de tratamiento aunque fueron menores bajo hipoxia vs. normoxia (Fig. 9).

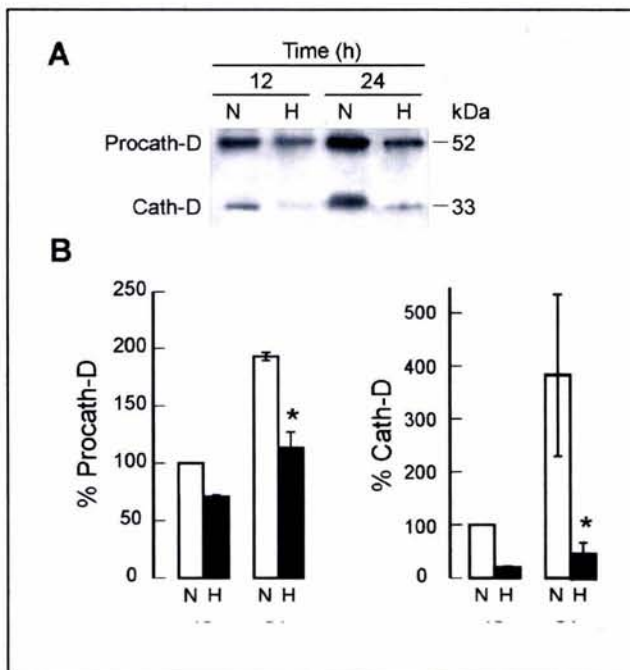


Fig. 9. Disminución de la secreción y producción en medio ácido de las isoformas de catepsina D inducida por hipoxia. **A.** Análisis por Western blot de los niveles de procatepsina D (Procath-D) y catepsina D (Cath-D) en los medios condicionados por las células GH4C1 sometidos a normoxia (N) o hipoxia (H) durante 12 y 24 h y acidificados a pH 5.6. **B.** Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

Para empezar a estudiar el mecanismo de la inhibición de PRL por hipoxia, analizamos si el promotor del gen de PRL de rata contenía elementos responsivos semejantes a los de otros genes regulados por la baja tensión de oxígeno. El principal factor transcripcional involucrado en la regulación de genes por hipoxia es HIF-1 y lo hace a través de su unión específica a su elemento de respuesta a hipoxia HRE (*Hypoxia Responsive Element*) que contiene la secuencia de reconocimiento 5'-RCGTG-3' (Richard *et al.*, 1999).

La expresión de PRL está regulada de manera tejido-específica a través de varias regiones en su promotor. La secuencia que comprende hasta 2.5 kb río arriba del inicio de la transcripción del gen de PRL de rata controla su expresión en hipófisis y comprende dos dominios: un promotor proximal (entre +33 y +250 pb) y un enhancer distal (entre -1300 y -1800 pb) (Gourdji & Laverriere, 1994; Nowakowski & Maurer, 1994). Una región promotora superdistal localizada de -3100 a -5000 pb regula la expresión de PRL en sitios extrahipofisarios (Berwaer *et al.*, 1991). Analizamos la región promotora que dirige la expresión de PRL hipofisiaria y encontramos en la base de datos una secuencia consenso al sitio HRE entre -1413/-1418 del inicio de la transcripción.

Para evaluar la posible participación de este factor, transfectamos transitoriamente a las células GH4C1 con plásmidos reporteros que contenían secuencias promotoras del gen de PRL acopladas al gen reportero de la luciferasa. Utilizamos el plásmido -2500 PRL luc que comprende 2,500 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción de PRL (Fig. 1) y que contiene al sitio consenso HRE, y el plásmido -425 PRL luc que contiene 425 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción de PRL (Fig. 1) y que no incluye ninguna secuencia HRE. Si HIF-1 participa en la inhibición de PRL por hipoxia entonces se observará una disminución en

la actividad de luciferasa en las células transfectadas con el plásmido -2500 PRL*luc* pero no en los cultivos transfectados con -425 PRL*luc*, a menos que dentro de esta secuencia existan elementos de regulación por hipoxia que no involucren a HIF-1. La actividad del promotor se normalizó con respecto a la concentración de proteína de cada homogenado celular. La actividad disminuyó en condiciones de hipoxia en las células transfectadas con los plásmidos -2500 PRL*luc* y -425 PRL*luc*. La actividad se redujo en un 50% y 70% a las 12h y 24h de hipoxia respectivamente con el plásmido -2500 PRL*luc*; y en un 40% y 80% a las 12h y 24h de hipoxia respectivamente con el plásmido -425 PRL*luc* (Fig. 10).

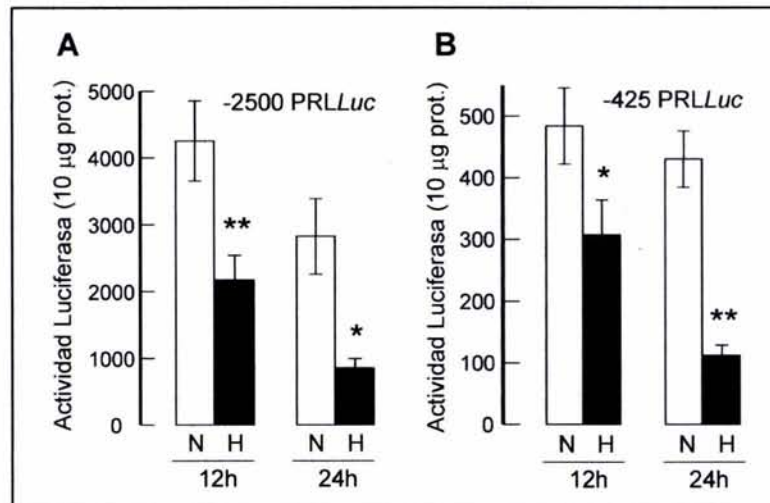


Fig. 10. Actividad del promotor de PRL medida a través del gen reportero de la luciferasa en las células GH4C1. Actividad de la luciferasa normalizada con respecto a 10 µg de proteína total, producida por los plásmidos -2500 PRL*luc* (A) y -425 PRL*luc* (B) en normoxia (N) o hipoxia (H) durante 12 o 24 h de tratamiento. Los datos representan el promedio de seis experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$, * $p < 0.01$ con respecto al valor en normoxia.

Para examinar si la reducción en la actividad de los promotores es un efecto específico para el gen de PRL, analizamos también la actividad del promotor de GH a través del gen reportero de la luciferasa. Esto era posible ya que las células GH4C1 provienen de un tumor hipofisiario secretor de ambas hormonas por lo que estas células

también producen GH. Se utilizó el plásmido pA3GH luc que comprende 528 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción de GH de rata acopladas al gen de luciferasa. Los experimentos con el plásmido reportero mostraron que la hipoxia estimuló la actividad del promotor de GH (Fig. 11A) lo cual se correlacionó con el aumento en el mRNA de GH observado mediante el análisis por Northern blot (Fig. 11B).

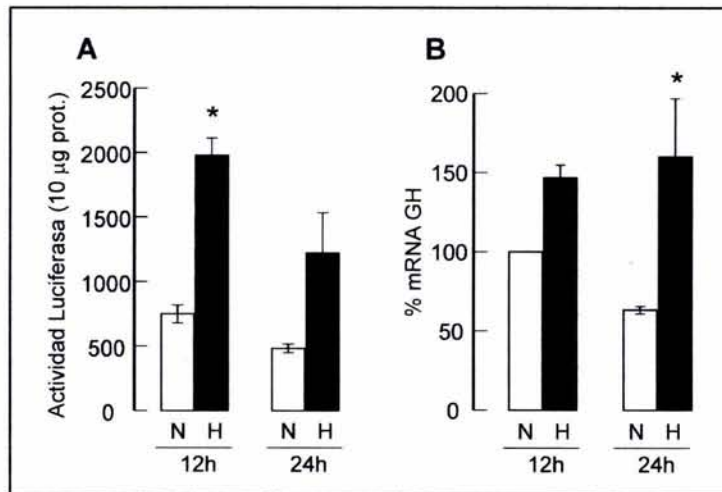


Fig. 11. Inducción de la actividad del promotor de GH y de la expresión de su mRNA por hipoxia. **A.** Actividad del promotor de PRL medida a través del gen reportero de la luciferasa en las células GH4C1. Actividad de la luciferasa normalizada con respecto a 10 µg de proteína total, producida por el plásmido pA3GH luc en normoxia (N) o hipoxia (H) durante 12 o 24 h de tratamiento. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia. **B.** Representación gráfica del mRNA de GH analizado por Northern blot. Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

Estos datos sugieren que el gen de GH es un gen inducible por hipoxia. Esto no resulta del todo sorprendente ya que estudios previos muestran que la hipoxia puede incrementar el contenido de GH hipofisiaria (Zhang & Du, 2000) y un aumento en la GH circulante cuando se realiza ejercicio en condiciones de bajo oxígeno (Schmidt *et al.*, 1995; Struder *et al.*, 1996a; Struder *et al.*, 1996b; Sutton, 1977). Además otros

trabajos han mostrado un aumento en el nivel de GH circulante en neonatos que presentaron asfixia perinatal en comparación con neonatos control (Varvarigou *et al.*, 1996), y se le ha propuesto como parte de la regulación metabólica del crecimiento (Thorner *et al.*, 1998). Asimismo, existen evidencias que indican que la GH puede tener efectos angiogénicos (Alzaid *et al.*, 1994; Hellstrom *et al.*, 1999; Rymaszewski *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1997; Struman *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 1969).

No sólo HIF-1 sino también otros factores transcripcionales pudieran participar en la inhibición del gen PRL por hipoxia. En este sentido comenzamos a estudiar si Pit-1, un factor transcripcional específico de hipófisis que rige la expresión hormonal e identidad de la glándula (Pickett & Gutierrez-Hartmann, 1997), participaba en esta regulación.

La expresión de Pit-1 es necesaria para el desarrollo de tirotrópos, somatotrópos y lactotrópos (Pickett & Gutierrez-Hartmann, 1997) así como para la expresión de PRL, GH y TSH (Dolle *et al.*, 1990; Simmons *et al.*, 1990). Pit-1 es fundamental para activar la transcripción de PRL y lo hace a través de su unión a sitios específicos en el promotor de PRL (Fig. 1) (Fox *et al.*, 1990; Mangalam *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1988). Debido a que Pit-1 es esencial para la expresión basal de PRL hipofisiaria, es posible suponer que la hipoxia pudiera regular la expresión de PRL directamente a través de modificar la acción de dicho factor transcripcional sobre el promotor de PRL.

Para continuar con el análisis molecular, analizamos el efecto de la hipoxia sobre los niveles de Pit-1 en las células GH4C1. El análisis por Western blot de los homogenados celulares mostró una disminución en Pit-1 (isoformas de 36 kDa y 33 kDa) después de 12 y 24 h de tratamiento (Fig. 12) lo cual pudiera sugerir que la hipoxia inhibe la expresión de PRL a través de reducir los niveles de este factor.

Con el propósito de examinar si el efecto de la hipoxia es específico para las células GH4C1 debido a su fenotipo inmortal, analizamos el efecto de la hipoxia sobre la expresión del gen de PRL en cultivos primarios de lactotrofos normales.

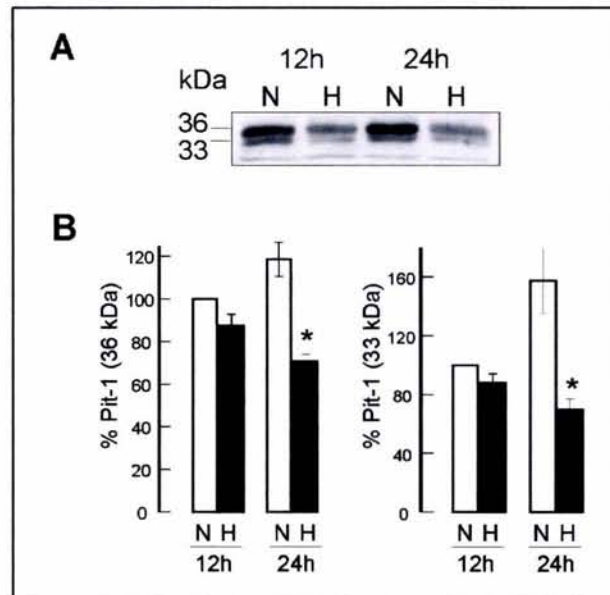


Fig.12. Reducción en la producción de Pit-1 inducida por hipoxia. Análisis por Western blot de homogenados de células GH4C1 expuestas a normoxia (N) o hipoxia (H) por 12-24 h. Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de cuatro experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ con respecto al valor en normoxia.

VI.2. Análisis del efecto de la hipoxia sobre lactotrofos normales

Para el análisis de lactotrofos normales, aislamos y cultivamos células hipofisiarias de ratas macho. En estos cultivos la proporción de lactotrofos es de aproximadamente el 10-15% del total de células hipofisiarias.

A diferencia de lo observado en las células GH4C1, en los cultivos primarios de células hipofisiarias, la disminución en la expresión del mRNA de PRL ocurrió hasta las 24 h de tratamiento (Fig. 13). De hecho durante las primeras 12 h de hipoxia, se observó un aumento inicial en los niveles del mRNA de PRL (Fig. 13). No se detectó ninguna

evidencia de degradación del RNA, a juzgar por la cantidad y calidad del rRNA 18S que fue comparable entre las diferentes muestras.

El análisis por Western blot de los homogenados y medios condicionados no mostró cambios en los niveles intracelulares (Fig. 14A) y secretados (Fig. 14B) de PRL en respuesta a hipoxia. Es posible que esta ausencia de efecto sobre los niveles de la proteína se deba a que a diferencia de las células GH4C1 que no almacenan PRL, en los lactotropos normales una gran proporción de la hormona se encuentra almacenada en gránulos de secreción (Ho *et al.*, 1989; Tixier-Vidal, 1975). De esta manera, una proporción importante de la hormona ya estaba presente en la célula antes de someterlas a hipoxia. Para tratar de eliminar la PRL almacenada no afectada por hipoxia, se diseñó otro experimento en el que se eliminó la PRL secretada durante las primeras 3 h tanto para los cultivo hipóxicos como para las células control. Así, al cabo de 3 h el medio de cultivo se sustituyó por nuevo medio (desoxigenado para las células hipóxicas y normal para los cultivos control) y se continuó con la incubación hasta completar 12 o 24 h.

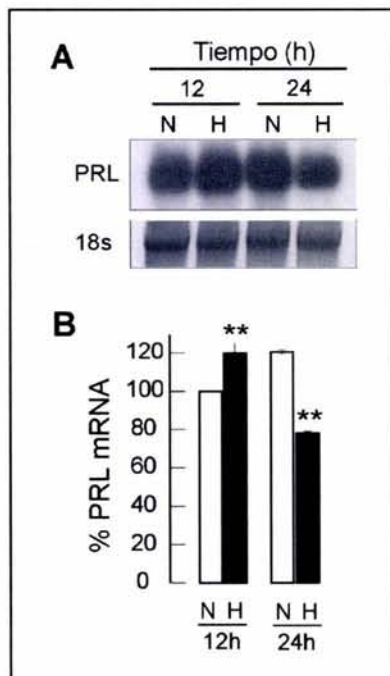


Fig. 13. La hipoxia induce un aumento inicial en los niveles del mRNA de PRL a las 12h de tratamiento y un decremento a las 24h. **A.** Análisis por Northern blot del mRNA de PRL en cultivos de lactotropos sometidos a normoxia (N) o hipoxia (H) por 12-24 h. **B.** Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. ** $p < 0.01$ con respecto al valor en normoxia.

La eliminación del medio condicionado por los lactotropos hipofisarios después de las primeras 3 h de incubación mostró que la hipoxia produjo una disminución de aproximadamente el 20% en los niveles de PRL acumulados en el medio durante las siguientes horas (Fig. 14C). Esta disminución es consistente con la menor expresión del mRNA observada en estas células y con el efecto inhibitorio de la hipoxia en las células GH4C1.

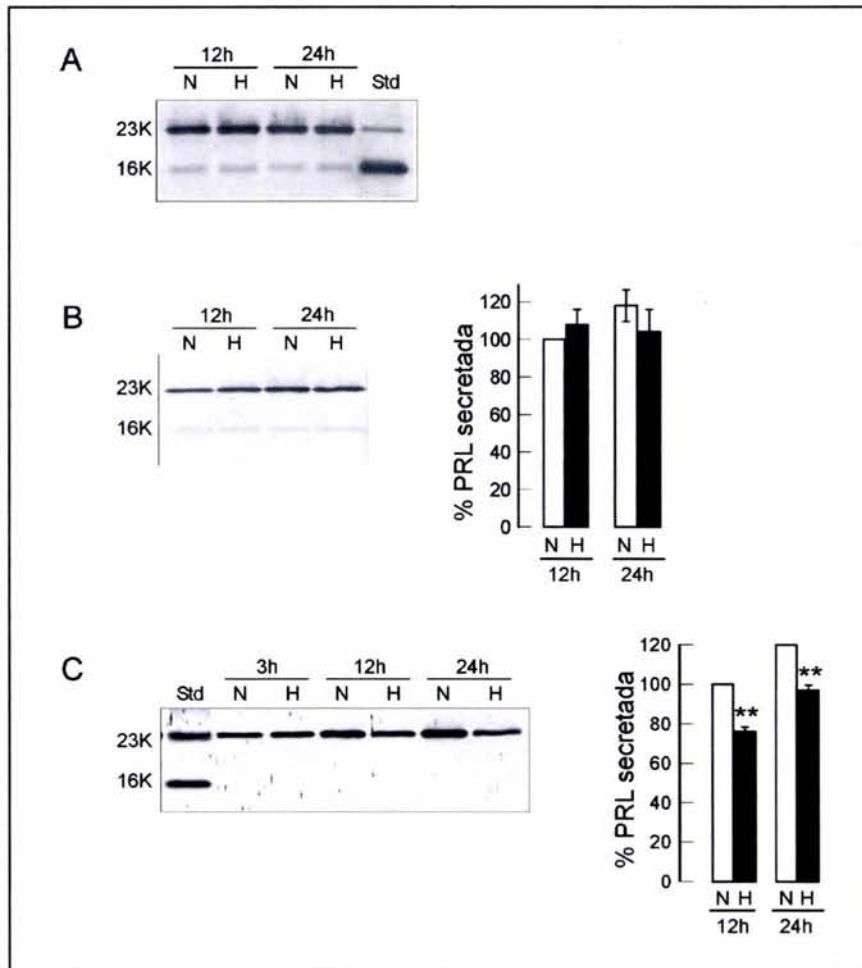


Fig. 14. La hipoxia reduce la secreción de PRL en lactotropos normales pero no modifica los niveles de PRL intracelular. Western blot de la PRL intracelular (A) y secretada (B) de los lactotropos sometidos a normoxia (N) o hipoxia (H) por 12-24 h. C. Western blot de la PRL secretada por lactotropos (después de 12 h o 24 h en normoxia o hipoxia) que se vaciaron parcialmente de su contenido de PRL mediante su preincubación durante 3h (en normoxia o hipoxia). Las bandas se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con respecto al valor de 12 h en normoxia. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM ** $p < 0.01$ con respecto al valor en normoxia.

VI.3. Análisis sobre el procesamiento de PRL a PRL 16K

Fue interesante observar que a diferencia de las células GH4C1, los cultivos primarios de células hipofisarias presentaron a la PRL 16K tanto en los lisados celulares como en el medio de cultivo (Figs. 14A, 14B) confirmando así los reportes de Andries *et al.*, (1992) en lactotopos en cultivo, y los de Shah & Hymer (1989) y Torner *et al.* (1995) en homogenados de hipófisis. La ausencia de PRL 16K en las células GH4C1 sugiere que estas células carecen de las condiciones para que tenga lugar este procesamiento. Al respecto, las células GH4C1 presentan una secreción predominantemente constitutiva de PRL (Krown *et al.*, 1992) y no la almacenan como lo hacen los lactotopos normales (Greenan *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1989; Tixier-Vidal, 1975). Se ha demostrado que en las células GH4C1 los gránulos de secreción de PRL están ausentes o son muy escasos (Tixier-Vidal, 1975) mientras que los lactotopos adenohipofisarios almacenan a la PRL en gránulos grandes que pueden llegar a tener un diámetro de 200-900 nm (Farquhar, 1977). En comparación a los lactotopos, el contenido hormonal de las células GH4C1 es muy bajo y se renueva rápidamente (cada 90-120 min para PRL mientras que para las células presentes en la hipófisis es cada 91 h) (Tashjian *et al.*, 1970).

Es posible que el procesamiento de PRL a 16K pudiera llevarse a cabo durante su almacenamiento en el gránulo de secreción ya que además, la enzima que procesa PRL, la catepsina D, es activa al pH ácido (pH 5.3) que se sabe está presente en los gránulos de secreción de la hormona (Carty *et al.*, 1982; Lorenson *et al.*, 1984). La ausencia de PRL 16K en las células GH4C1 puede deberse entonces a que al no almacenar a la PRL, la catepsina D podría no interactuar con la hormona intracelularmente.

Inicialmente investigamos la presencia de PRL 16K en lactotropos normales (Fig. 15). Utilizamos dos tipos de cultivos, uno obtenido a partir de ratas macho y otro a partir de ratas hembra ovariectomizadas y tratadas crónicamente por 4 semanas con implantes subcutáneos conteniendo estradiol (Wiklund *et al.*, 1981). El tratamiento con estradiol induce la proliferación de los lactotropos y aumenta hasta en un 80% su población. El aumento en la proporción de células productoras de PRL resulta en niveles mayores de la hormona y sus fragmentos moleculares.

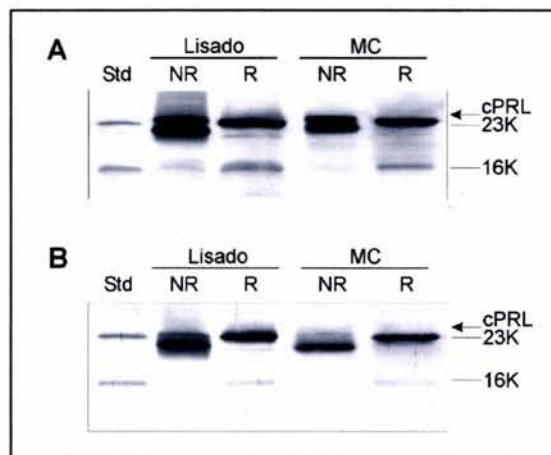


Fig. 15. Análisis por Western blot que muestra la presencia de PRL 16K, PRL 23K y PRL 23K cortada (cPRL) en homogenados y medios condicionados de lactotropos de hembras OVX/E2 (A) y machos (B) en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR).

En la figura 15 se muestran los lisados celulares y los medios condicionados analizados mediante Western blot en condiciones no reductoras y reductoras, es decir en ausencia y presencia de 2-βmercaptoetanol. Bajo condiciones no reductoras se pueden apreciar PRLs inmunoreactivas de 25, 23 y 16kDa. La PRL de 25 kDa corresponde a la PRL cortada entre los aminoácidos 145 y 149 que se mantiene unida por el puente disulfuro intermedio de la PRL. Este corte le da un radio molecular mayor que frena su migración confiriéndole un peso molecular “aparentemente” mayor. Esta forma cortada es el precursor inmediato de la PRL 16K ya que bajo condiciones reductoras, la PRL de

25 kDa desaparece y aumenta la concentración proteica de la PRL 16K. Para corroborar la identidad de estas PRLs utilizamos dos anticuerpos monoclonales, uno que reconoce específicamente el extremo C-terminal (INN-368) y otro que reconoce el extremo N-terminal de la molécula (INN-1) de PRL. El análisis por Western blot mostró que la PRL 16K hipofisiaria corresponde al fragmento N-terminal de la PRL ya que no fue reconocida por el INN-368 pero sí por el INN-1 (Fig. 16).

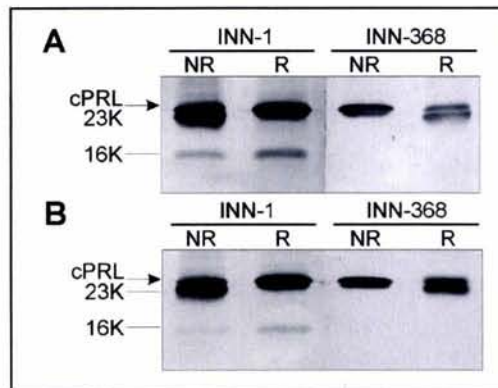


Fig. 16. Análisis por Western blot que confirma la identidad de la PRL 16K en homogenados de lactotopos de hembras OVX/E2 (**A**) y machos (**B**) en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). La PRL 16K lactohipofisiaria es reconocida por el anticuerpo dirigido específicamente contra el extremo N-terminal de la molécula (INN-1) pero no por el generado contra el extremo C-terminal (INN-368).

Para corroborar la identidad de la PRL cortada y en colaboración con el Dr. Manuel Aguilar de la Unidad de Bioquímica Analítica del Instituto de Neurobiología-UNAM, secuenciamos los extremos N-terminal de la molécula. Brevemente, las proteínas de un extracto de adenohipófisis de rata macho se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se tiñó con una solución de 0.025% Azul de Coomassie R-250 en 40% metanol durante 50 min y se destiñó en una solución de 50% metanol durante 5 min. La banda correspondiente a la PRL cortada (peso aprox. 25 kDa) se cortó con una navaja y

se aplicó directamente en el equipo Procise 491 Protein Sequencing System (Applied Biosystems; Foster City, CA) para su secuenciación mediante la reacción de Edman automatizada. Después de varios ciclos de secuenciación (3-5 ciclos), se determinaron dos secuencias distintas que comenzaron por el extremo amino terminal. Una de ellas comprendió a los residuos de las primeras posiciones de la molécula de PRL (NH₂- L₁- P₂-V₃-C₄-S₅ -...-COOH) y la otra a los residuos de la posición 149 en adelante (NH₂- S₁₄₉-Q₁₅₀-L₁₅₁-P₁₅₂-S₁₅₃ -...-COOH). La presencia del fragmento N-terminal que comienza en el residuo 149 es consistente con que la PRL puede ser cortada en dicho sitio y se correlaciona con resultados previos que muestran que la PRL puede modificarse por proteólisis entre los aminoácidos Tyr₁₄₅-Ser₁₄₉ (Andries *et al.*, 1992; Baldocchi *et al.*, 1993) para dar lugar a un fragmento N-terminal de 16 kDa y a uno C-terminal de 6 kDa (Fig. 17).

El hecho de que la PRL cortada y la PRL 16K se produzcan en lactotropos normales podría deberse a la presencia de catepsina D en los gránulos de secreción de estos últimos, lo que favorecería su interacción con la PRL durante su almacenamiento. Para analizar esta posibilidad determinamos mediante doble inmunofluorescencia y microscopía confocal la localización intracelular de PRL y catepsina D en lactotropos normales y en las células GH4C1. En los lactotropos normales la catepsina D y la PRL se localizan en gránulos que se distribuyen a través de todo el citoplasma (Fig. 18). Sin embargo, algunos gránulos contienen a las dos proteínas ya que el empalme de las dos imágenes tomadas en el eje Z (350 nm de grosor), una con el filtro verde (para detectar a la catepsina D) y otra con el azul (para detectar a la prolactina), para una misma célula con las dos marcas muestra estructuras granulares de color amarillo, lo que indica que ambas proteínas se localizan en dichos sitios (Fig. 18). También analizamos la localización de PRL y catepsina D en las células GH4C1 (Fig. 19). En estas células

observamos en general una señal menos intensa para las dos proteínas. A diferencia de los lactotopos normales en los que la PRL se encuentra en gránulos distribuidos por toda la célula, las células GH4C1 no presentan estructuras granulares positivas, la marca se presenta difusa y tenue a través del citoplasma y/o concentrada e intensa en estructuras en forma de saco que se encuentran adyacentes al núcleo. En lo que se refiere a la catepsina D, la marca sí se localiza en gránulos y además colocaliza con PRL en estructuras en forma de saco (Fig. 19).

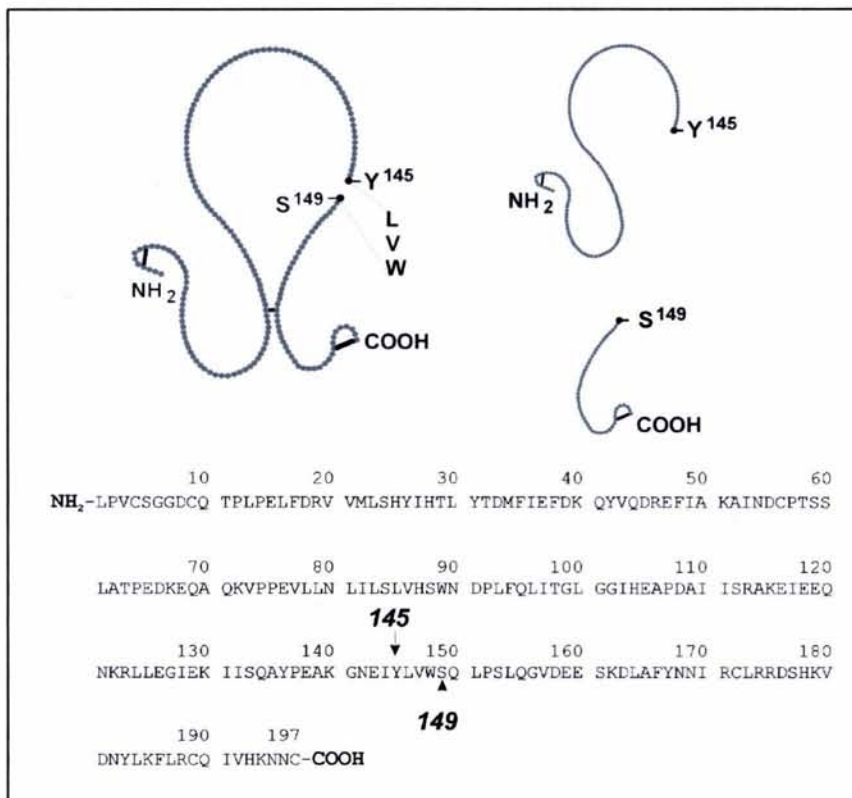


Fig. 17. Diagrama que muestra los sitios de corte, así como la secuencia aminoacídica de la PRL adenohipofisiaria de rata. La proteólisis y reducción de la PRL resulta en un fragmento N-terminal de 16 kDa y uno C-terminal de 6 kDa.

A diferencia de los lactotopos, en las células GH4C1, la marca de catepsina D pero no de PRL se localiza en estructuras granulares (posiblemente lisosomas). Estas

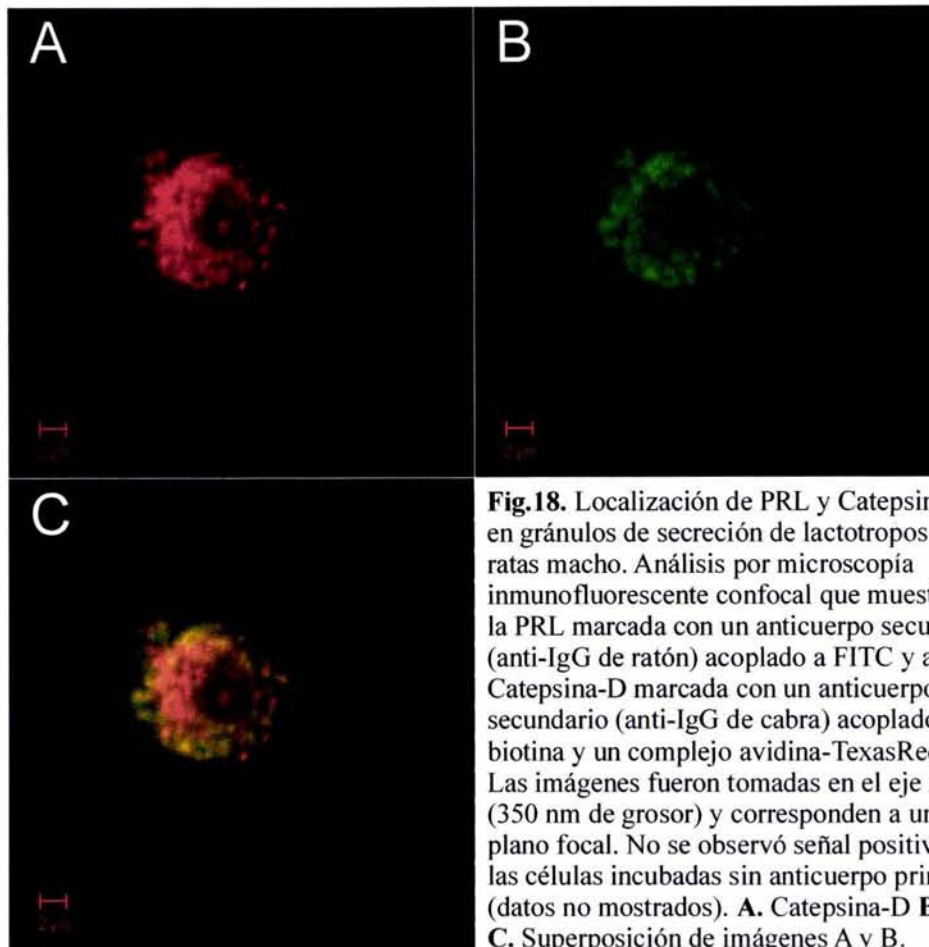


Fig.18. Localización de PRL y Catepsina D en gránulos de secreción de lactotrofos de ratas macho. Análisis por microscopía inmunofluorescente confocal que muestra a la PRL marcada con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) acoplado a FITC y a la Catepsina-D marcada con un anticuerpo secundario (anti-IgG de cabra) acoplado a biotina y un complejo avidina-TexasRed. Las imágenes fueron tomadas en el eje Z (350 nm de grosor) y corresponden a un sólo plano focal. No se observó señal positiva en las células incubadas sin anticuerpo primario (datos no mostrados). **A.** Catepsina-D **B.** PRL **C.** Superposición de imágenes A y B.

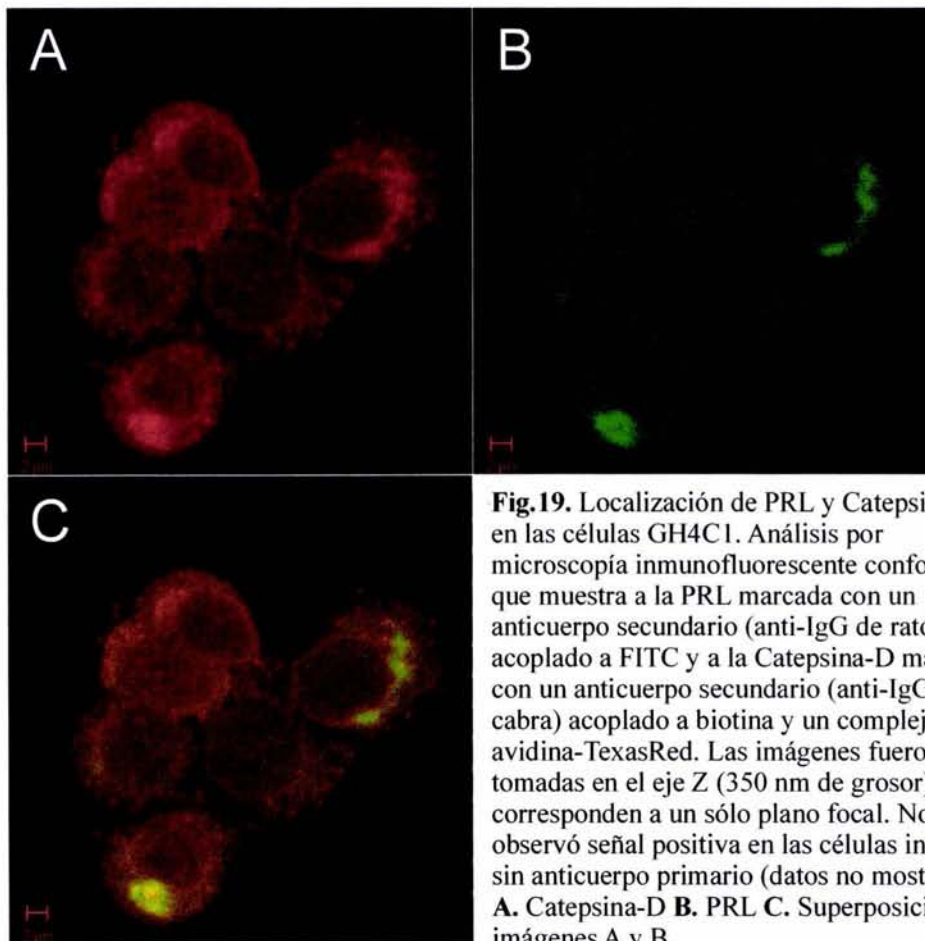


Fig.19. Localización de PRL y Catepsina D en las células GH4C1. Análisis por microscopía inmunofluorescente confocal que muestra a la PRL marcada con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) acoplado a FITC y a la Catepsina-D marcada con un anticuerpo secundario (anti-IgG de cabra) acoplado a biotina y un complejo avidina-TexasRed. Las imágenes fueron tomadas en el eje Z (350 nm de grosor) y corresponden a un sólo plano focal. No se observó señal positiva en las células incubadas sin anticuerpo primario (datos no mostrados). **A.** Catepsina-D **B.** PRL **C.** Superposición de imágenes A y B.

observaciones son consistentes con la ausencia de gránulos de secreción reportada para las células GH3, de las cuales provienen las células GH4C1 (Tixier-Vidal, 1975). Por otra parte, ambas proteínas colocalizaron en las estructuras en forma de saco. Desconocemos la identidad de estas estructuras, dada su morfología y su ubicación en un polo del núcleo, es posible que dichas estructuras correspondan al aparato de Golgi y deberán ser identificadas con marcadores específicos.

VII. DISCUSIÓN

La hipoxia es un fuerte estímulo para la inducción o represión de una batería de genes que ayudan a las células a contender con la baja concentración de oxígeno (Guillemin & Krasnow, 1997; Semenza, 1998; Tacchini *et al.*, 1999). Uno de los principales mecanismos adaptativos inducidos por la hipoxia es la angiogénesis y lo hace a través de regular la expresión de moléculas pro- y anti-angiogénicas.

Durante el crecimiento tumoral pueden llegar a rebasarse los límites de difusión del oxígeno lo cual genera una hipoxia tisular que promueve la proliferación de nuevos vasos capilares. La angiogénesis es esencial para el crecimiento y metástasis de los tumores (Folkman, 2002). La PRL 16K es un potente inhibidor de la angiogénesis que actúa directamente sobre las células endoteliales inhibiendo procesos indispensables para la neovascularización como son la proliferación endotelial, la degradación de la matriz extracelular y la sobrevivencia endotelial (Corbacho *et al.*, 2002). Para entender la participación de la PRL 16K en la inhibición de la angiogénesis es de interés investigar si su generación se regula por factores que como la hipoxia, determinan este proceso. En este trabajo mostramos evidencia de que la producción de la PRL 16K puede reducirse en respuesta a hipoxia y que esta reducción podría tener lugar en células

tumorales productoras de PRL. Así, encontramos que en los lactotrofos tumorales GH4C1 la hipoxia es un estímulo directo capaz de inhibir la expresión del mRNA de PRL y la producción y secreción de la proteína.

En apoyo a la efectividad del método utilizado, la hipoxia indujo la expresión del VEGF, un conocido gen estimulado por hipoxia en sus isoformas VEGF164 y VEGF120. Las isoformas VEGF164 y VEGF120 son las isoformas secretadas de VEGF, activas en angiogénesis (Robinson & Stringer, 2001), siendo VEGF164 la isoforma mayoritaria (Goth *et al.*, 2003). Se ha observado que la hipoxia induce la expresión de estas isoformas en varias líneas celulares (Minchenko *et al.*, 1994; Shweiki *et al.*, 1992). Si bien se sabía que las células GH4C1 producen VEGF, este es el primer reporte de su estimulación por hipoxia en este tipo celular. El efecto sobre el VEGF pudiera influir sobre el fenotipo de los tumores secretores de prolactina. En este sentido, se ha observado que los niveles de VEGF y de su receptor KDR están incrementados en tumores hipofisarios humanos (McCabe *et al.*, 2002), así como en los prolactinomas inducidos por estrógenos (Banerjee *et al.*, 1997). También se ha observado que tanto el VEGF164 como el VEGF120 se incrementan en respuesta a estrógenos en hipófisis y en la línea tumoral de lactotrofos GH3 (Ochoa *et al.*, 2000).

No se observaron efectos tóxicos de la hipoxia en las células GH4C1 a juzgar por su apariencia y morfología. Tampoco se detectaron diferencias en el número de las células GH4C1 ni en su viabilidad durante los primeros periodos de hipoxia. A las 36h de hipoxia se observó una disminución significativa en el número celular. No obstante, no se detectaron cambios en la viabilidad de las células que permanecieron adheridas. Aquí resulta importante mencionar que la exposición prolongada a bajo oxígeno puede inducir apoptosis en ciertos tipos celulares (Graeber *et al.*, 1996) pero no en otros (Berk *et al.*, 1999; Lou *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la hipoxia tumoral

constituye un modo de selección por aquellas células con un bajo potencial apoptótico ya sea debido a la pérdida de *p53* o a la sobreexpresión del gen antiapoptótico *Bcl-2* (Graeber *et al.*, 1996). De este modo la hipoxia selecciona a aquellas células con una alta capacidad de sobrevivencia (Graeber *et al.*, 1996; Semenza, 2002), lo que eventualmente resulta en un fenotipo tumoral más agresivo (Brizel *et al.*, 1996).

La reducción en los niveles de PRL no fue resultado de un efecto inespecífico de la hipoxia sobre la síntesis y secreción de proteínas ya que la expresión del mRNA del gen constitutivo β -actina y la β -actina no se alteraron como tampoco se modificaron los niveles secretados de las proteínas totales a lo largo de los tratamientos con hipoxia. Este resultado concuerda con lo observado para otros tipos celulares tumorales sometidos a hipoxia por 12h y 24 h en donde no se detectan cambios en los niveles de la mayoría de las proteínas secretadas (Tenan *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha reportado para otros tipos celulares que la hipoxia induce una reducción general reversible en la síntesis de proteínas (Hochachka *et al.*, 1996) mediada por la hiperfosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2- α (Koumenis *et al.*, 2002).

La reducción en la síntesis de PRL podría limitar la producción del factor antiangiogénico PRL 16K. Sin embargo, a través de los experimentos con las células GH4C1 no pudo detectarse a la PRL 16K. Debido a que la catepsina D requiere de condiciones ácidas para que sea activa, la producción de PRL 16K pudiera no llevarse a cabo en el medio extracelular de tejidos normales pero sí en el medio extracelular tumoral. Una característica del medio intersticial de los tumores es un pH bajo que puede variar entre 6.6 y 7.2 (Helmlinger *et al.*, 1997; Tannock & Rotin, 1989), aunque también se ha reportado un pH de hasta de 5.8 (Wike-Hooley *et al.*, 1984a; Wike-Hooley *et al.*, 1984b). Adicionalmente, los tejidos cancerosos y líneas celulares tumorales secretan niveles altos del precursor inactivo de catepsina D, procatepsina D

(Rochefort *et al.*, 2000). El ambiente tumoral ácido permite la autoactivación de la procatepsina D que genera a la catepsina D, así como también le permite a la enzima madura ser activa (Conner, 1989; Morikawa *et al.*, 2000). De hecho, se ha reportado que células de cáncer de próstata secretan catepsina D capaz de procesar al plasminógeno hacia un fragmento interno de 36 kDa conocido como angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis (Morikawa *et al.*, 2000).

En apoyo a la posible generación de PRL 16K en el medio extracelular de los lactotropos tumorales GH4C1, la acidificación de su medio condicionado resultó en el procesamiento proteolítico de PRL hacia la PRL 16K. Este efecto pareció deberse a la actividad de la catepsina D ya que el procesamiento se inhibió fuertemente con pepstatina A, un inhibidor selectivo de catepsina D. El nivel de conversión a PRL 16K fue significativamente menor en el medio condicionado de las células hipóxicas lo cual se relacionó con una menor concentración de las formas secretadas de catepsina D (pro- y pseudo-catepsina) en el medio condicionado. La acidificación de los medios condicionados resultó en la aparición de la catepsina D madura (y desaparición del precursor pseudo-catepsina), confirmando así que la forma activa de la enzima es capaz de producirse extracelularmente a partir de los precursores secretados en un medio extracelular tumoral. Es así que no sólo la disminución en la expresión de PRL sino también la reducción en los niveles de la forma activa de la catepsina D resultan en una restricción importante en la generación de PRL 16K en condiciones de bajo oxígeno.

En este trabajo investigamos si el efecto de la hipoxia ocurre directamente a través de secuencias de respuesta a hipoxia (HRE) presentes en el promotor de PRL. Con este propósito evaluamos la actividad promotora de dos regiones con distinta longitud del promotor de PRL, una de las cuales contiene un sitio consenso al elemento HRE. El ensayo con los plásmidos reporteros mostró una disminución semejante en la

actividad de las dos secuencias del promotor de PRL. Estos resultados muestran que existen elementos en *cis* que están implicados en la represión del promotor de PRL por hipoxia y que al parecer no compromete al elemento HRE. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios para determinar los elementos en el promotor de PRL que están implicados en esta regulación así como los factores transcripcionales involucrados. Al respecto, la hipoxia indujo un decremento en la producción de Pit-1, el principal factor transcripcional responsable de la expresión de PRL hipofisiaria, lo cual sugiere que la hipoxia inhibe la expresión de PRL a través de restringir los niveles de dicho factor. Por otra parte, cabe mencionar que Pit-1 también dirige la transcripción de la GH hipofisiaria (Nelson *et al.*, 1988) por lo que parece incompatible que la hipoxia deprima la producción de Pit-1 y estimule los niveles del mRNA de GH así como la actividad de su promotor. En este sentido resulta interesante considerar que la expresión de GH por hipoxia pudiera ser independiente de Pit-1 y que pudiera estar regulada por otros factores. Al respecto se ha observado que los receptores de la hormona tiroidea (TR) dirigen la expresión de GH de manera independiente de Pit-1 en respuesta a T₃ (Suen & Chin, 1993) por lo que pudiera especularse que la hipoxia estimula la expresión de GH a través de la activación de otros factores aún por determinar.

El efecto de la hipoxia sobre las células GH4C1 no parece del todo exclusivo de su transformación tumoral ya que cuando examinamos el efecto sobre lactotrofos normales observamos que la hipoxia indujo una disminución tardía en la expresión del mRNA de PRL. La razón de la mayor latencia del efecto de la hipoxia no es clara y denota un mecanismo de regulación en las células normales ausente en el fenotipo tumoral. Al respecto, la regulación de la expresión y secreción de PRL difiere entre los dos tipos celulares. Mientras que en los lactotrofos normales la síntesis esta influenciada por factores hipotalámicos, principalmente dopamina, las células GH4C1

presentan una alta tasa de expresión de PRL y carecen de receptores a dopamina por lo que no responden a este y a otros factores hipotalámicos (Cronin *et al.*, 1980; Tam & Dannies, 1980). Por otra parte, mientras que los lactotrofos normales tienen una gran capacidad de almacenamiento de la hormona que se regula por la actividad de diversos secretagogos fisiológicos (Macleod *et al.*, 1970; Meites & Clemens, 1972), las células GH4C1 la secretan inmediatamente después de sintetizarla (Ho *et al.*, 1989; Krown *et al.*, 1992; Tixier-Vidal, 1975).

Debido a la gran versatilidad de funciones que tiene la PRL, resulta de interés discutir sobre el posible significado fisiológico de su reducción por hipoxia. La relevancia fisiológica de esta reducción no es clara pero pudiera representar una respuesta sistémica adaptativa por ejemplo en respuesta al estrés. La disminución de la PRL sistémica no es del todo inesperada ya que se ha observado que la hipoxia induce la expresión de la hidroxilasa de tirosina, una enzima clave en la síntesis de dopamina, que como se mencionó, es el principal inhibidor de la síntesis y secreción de PRL (Czyzyk-Krzeska *et al.*, 1994a; Czyzyk-Krzeska *et al.*, 1994b; Norris & Millhorn, 1995). También se ha reportado que la hipoxia es capaz de inhibir la función inmune (Bai *et al.*, 1997a; Bai & Du, 1997; Bai *et al.*, 1997b) y reducir el crecimiento corporal y la función reproductiva (Du & Li, 1982; Moromisato *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1995), funciones en las que también participa la PRL.

La inhibición en la expresión de PRL por hipoxia pudiera tener una influencia a nivel local hipofisiario; por ejemplo, promoviendo la neovascularización. Por una parte, la hipoxia induce la expresión del factor angiogénico VEGF, y por otra inhibe la síntesis de PRL y la actividad y concentración de catepsina D, la enzima responsable de generar a la PRL 16K anti-angiogénica. Si bien es importante extender estos estudios a cultivos primarios de prolactinomas humanos, el hecho de que estas acciones tengan lugar sobre

las células GH4C1 derivadas de un prolactinoma hipofisario permite especular sobre la posibilidad de que estos mecanismos de respuesta a hipoxia pudieran operar en el control de la angiogénesis de los adenomas hipofisarios. Sabemos que esta consideración es altamente aventurada; sin embargo, creemos que es útil para la discusión, el intentar involucrar la participación de los mecanismos descritos en este proyecto en la progresión de los adenomas hipofisarios.

Nosotros proponemos que las células tumorales hipersecretoras de PRL pudieran generar más PRL 16K en el espacio extracelular debido a una alta liberación de PRL y catepsina D en el medio tumoral ácido. El aumento en PRL 16K puede ser importante para mantener la reducida vascularización de los prolactinomas. Eventualmente, el crecimiento tumoral y los bajos niveles de neovascularización resultarían en regiones hipóxicas capaces de contrarrestar los efectos anti-angiogénicos de la 16K a través de estimular la expresión de VEGF y de disminuir la generación de PRL 16K mediante la inhibición en la expresión de PRL y la reducción en catepsina D. Estos mecanismos son consistentes con que los macroprolactinomas son los adenomas hipofisarios más vascularizados (Turner *et al.*, 2000b). Sin embargo, estos tumores siguen siendo menos vasculares que la hipófisis normal (Turner *et al.*, 2000b) lo cual sugiere que la inhibición del angiogénesis en estos tumores sigue siendo importante y pudiera reflejar la acción de factores anti-angiogénicos aún remanentes entre los que pudiera incluirse la PRL 16K.

Resulta interesante que estudios recientes indican que la PRL 23K es capaz de estimular la angiogénesis. Sin embargo, se ha sugerido que este efecto depende de las condiciones locales del endotelio vascular ya que no se ha podido reproducir en todos los modelos de angiogénesis estudiados (Merkle *et al.*, 2000; Struman *et al.*, 1999). La PRL 23K induce la vascularización en el ensayo de la membrana corioalantoidea del

embrión de pollo en su etapa tardía (Struman *et al.*, 1999); es decir, la etapa en la cual detiene su crecimiento y las células endoteliales dejan de dividirse y gradualmente van adquiriendo las características de un fenotipo más diferenciado (Corbacho *et al.*, 2002). De acuerdo con estas observaciones, la PRL 23K promueve la neovascularización en etapas avanzadas del desarrollo y su acción depende del estado local de la red vascular que pudiera favorecer la expresión de su receptor (Merkle *et al.*, 2000). La mayoría de los endotelios analizados no expresan al receptor de PRL. Sólo existe un estudio en el que el daño mecánico de una monocapa de células endoteliales de arteria pulmonar bovina, indujo la expresión del receptor de PRL (Merkle *et al.*, 2000). Al parecer la forma de PRL que consistentemente ejerce efectos específicos sobre el endotelio vascular es la PRL 16K ya que las propiedades angiogénicas de la PRL 23K dependen en gran medida del contexto celular así como de la expresión de su receptor que generalmente no está presente en las células endoteliales.

Además de promover la angiogénesis, el efecto inhibitorio de la hipoxia sobre la expresión de PRL y la actividad de catepsina D, puede limitar el desarrollo de prolactinomas a través de otros mecanismos. La PRL puede actuar como un factor de crecimiento autócrino en la hipófisis, ya que es capaz de estimular la proliferación de las células GH3 (Krown *et al.*, 1992). Además, las células GH3 y los lactotropos normales expresan los receptores de PRL (Krown *et al.*, 1992; Morel *et al.*, 1994). Por otra parte se ha reportado que la catepsina D puede promover la invasión tumoral a través de estimular la proliferación celular (Glondou *et al.*, 2001; Liaudet *et al.*, 1995), de reducir la inhibición por contacto (Liaudet *et al.*, 1995; Rochefort *et al.*, 2000; Rochefort & Liaudet-Coopman, 1999), o bien mediante la digestión de los componentes de la matriz extracelular (Briozzo *et al.*, 1988; Heylen *et al.*, 2002). Estos mecanismos

en respuesta a la hipoxia podrían explicar la baja tasa de crecimiento de los adenomas hipofisarios, así como su limitada capacidad invasiva.

Debido a la importancia de los efectos de la PRL 16K, resulta necesario dilucidar el sitio y mecanismo de su producción *in situ*. Inicialmente se determinó que la adenohipófisis de rata y los lactotrofos en cultivo contienen a la PRL cortada en el residuo 149, que es el sitio de corte en la PRL reportado para la catepsina D (Andries *et al.*, 1992; Baldocchi *et al.*, 1993). Asimismo, se determinó su carácter N-terminal mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente al extremo N-terminal (INN-1) pero no al extremo C-terminal (INN-368). La posibilidad de que la PRL 16K pudiera generarse durante su almacenamiento en el gránulo de secreción de lactotrofos se exploró mediante técnicas de inmunofluorescencia acopladas a microscopía confocal y encontramos que la PRL y la catepsina D colocalizan en el mismo gránulo de lactotrofos normales. No se encontraron gránulos de secreción de PRL en las células GH4C1. Los resultados apoyan al gránulo de secreción como sitio posible en el que ocurre la conversión de PRL a PRL 16K, si bien es necesario hacer más estudios para determinar con detalle el sitio celular y las características del procesamiento que genera a la PRL 16K.

En conclusión, este estudio demuestra que la hipoxia inhibe la síntesis de PRL y que esta acción puede resultar en su menor procesamiento hacia PRL 16K antiangiogénica. Este mecanismo podría contribuir al desarrollo y comportamiento de los prolactinomas. Asimismo el presente estudio señala la importancia de estudiar la regulación de esta familia hormonal en este y otros padecimientos angiogénico-dependientes.

VIII. REFERENCIAS

- Abdulmalek, K., Ashur, F., Ezer, N., Ye, F., Magder, S. & Hussain, S. N. (2001). Differential expression of Tie-2 receptors and angiopoietins in response to in vivo hypoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(3), L582-90.
- Alexander, J. M., Biller, B. M., Bikkal, H., Zervas, N. T., Arnold, A. & Klibanski, A. (1990). Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* **86**(1), 336-40.
- Alzaid, A. A., Dinneen, S. F., Melton, L. J. & Rizza, R. A. (1994). The role of GH in the development of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **17**, 531-534.
- Andries, M., Tilemans, D. & Denef, C. (1992). Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochem J* **281**(Pt 2), 393-400.
- Bai, H., Du, J. & Jia, H. (1997a). Effect of hypoxia on spleen mono nuclear cell DNA content and proliferation of neonatal rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* **13**(3), 220-3.
- Bai, H. B. & Du, J. Z. (1997). Norepinephrine regulation of T-lymphocyte proliferation of rat during acute hypoxia. *Sheng Li Xue Bao* **49**(3), 261-6.
- Bai, H. B., Du, J. Z. & Jia, H. W. (1997b). Inhibition effect of hypoxia on humoral immunity of rats. *Sheng Li Xue Bao* **49**(2), 167-72.
- Baird, A., Mormede, P., Ying, S. Y., Wehrenberg, W. B., Ueno, N., Ling, N. & Guillemin, R. (1985). A nonmitogenic pituitary function of fibroblast growth factor: regulation of thyrotropin and prolactin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(16), 5545-9.
- Baldocchi, R. A., Tan, L., King, D. S. & Nicoll, C. S. (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* **133**(2), 935-8.
- Baldocchi, R. A., Tan, L. & Nicoll, C. S. (1992). Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro. *Endocrinology* **130**(3), 1653-9.
- Banerjee, S. K., Sarkar, D. K., Weston, A. P., De, A. & Campbell, D. R. (1997). Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* **18**(6), 1155-61.
- Bankowska, A., Gacko, M., Chyczewska, E. & Worowska, A. (1997). Biological and diagnostic role of cathepsin D. *Rocz Akad Med Bialymst* **42**(Suppl 1), 79-85.
- Barrett, A. J. (1977). Human cathepsin D. *Adv Exp Med Biol* **95**, 291-300.

- Basu, S., Nagy, J. A., Pal, S., Vasile, E., Eckelhoefer, I. A., Bliss, V. S., Manseau, E. J., Dasgupta, P. S., Dvorak, H. F. & Mukhopadhyay, D. (2001). The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* **7**(5), 569-74.
- Battegay, E. J. (1995). Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* **73**(7), 333-46.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L. & Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* **17**(6), 639-69.
- Bentzien, F., Struman, I., Martini, J. F., Martial, J. & Weiner, R. (2001). Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res* **61**(19), 7356-62.
- Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H. & Miller, A. (2002). Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res* **90**(7), 784-91.
- Berk, J. L., Massoomi, N., Hatch, C. & Goldstein, R. H. (1999). Hypoxia downregulates tropoelastin gene expression in rat lung fibroblasts by pretranslational mechanisms. *Am J Physiol* **277**(3 Pt 1), L566-72.
- Berwaer, M., Monget, P., Peers, B., Mathy-Hartert, M., Bellefroid, E., Davis, J. R., Belayew, A. & Martial, J. A. (1991). Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 bp of its upstream sequence. *Mol Cell Endocrinol* **80**(1-3), 53-64.
- Bidere, N., Lorenzo, H. K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C. & Senik, A. (2003). Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem* **278**(33), 31401-11.
- Bouissou, P., Brisson, G. R., Peronnet, F., Helie, R. & Ledoux, M. (1987). Inhibition of exercise-induced blood prolactin response by acute hypoxia. *Can J Sport Sci* **12**(1), 49-50.
- Brahimi-Horn, C., Berra, E. & Pouyssegur, J. (2001). Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends Cell Biol* **11**(11), S32-6.
- Brem, S. S., Jensen, H. M. & Gullino, P. M. (1978). Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast. *Cancer* **41**(1), 239-44.
- Briozzo, P., Morisset, M., Capony, F., Rougeot, C. & Rochefort, H. (1988). In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res* **48**(13), 3688-92.

Brizel, D. M., Scully, S. P., Harrelson, J. M., Layfield, L. J., Bean, J. M., Prosnitz, L. R. & Dewhirst, M. W. (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* **56**(5), 941-3.

Bunn, H. F. & Poyton, R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* **76**(3), 839-85.

Carmeliet, P. & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**(6801), 249-57.

Carty, S. E., Johnson, R. G. & Scarpa, A. (1982). Electrochemical proton gradient in dense granules isolated from anterior pituitary. *J Biol Chem* **257**(12), 7269-7273.

Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K. & Munn, L. L. (2000). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26), 14608-13.

Chen, C., Parangi, S., Tolentino, M. J. & Folkman, J. (1995). A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res* **55**(19), 4230-3.

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

Clapp, C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* **121**(6), 2055-64.

Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F. & Weiner, R. I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**(3), 1292-9.

Clapp, C., Sears, P. S., Russell, D. H., Richards, J., Levay-Young, B. K. & Nicoll, C. S. (1988). Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* **122**(6), 2892-8.

Clapp, C., Torner, L., Gutierrez-Ospina, G., Alcantara, E., Lopez-Gomez, F. J., Nagano, M., Kelly, P. A., Mejia, S., Morales, M. A. & Martinez de la Escalera, G. (1994). The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10384-8.

Clapp, C. & Weiner, R. I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* **130**(3), 1380-6.

Compton, M. M. & Witorsch, R. J. (1984). Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* **115**(2), 476-84.

Conner, G. E. (1989). Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography. Autocatalytic proteolysis of the zymogen form of the enzyme. *Biochem J* **263**(2), 601-4.

Conrad, K. E. & Gutierrez-Hartmann, A. (1992). The ras and protein kinase A pathways are mutually antagonistic in regulating rat prolactin promoter activity. *Oncogene* **7**(7), 1279-86.

Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M. A., Martinez De La Escalera, G. & Clapp, C. (2000a). Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol* **166**(1), 53-62.

Corbacho, A. M., Martinez De La Escalera, G. & Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* **173**(2), 219-38.

Corbacho, A. M., Nava, G., Eiserich, J. P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., Martinez De La Escalera, G., Freeman, B. A. & Clapp, C. (2000b). Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem* **275**(18), 13183-6.

Cronin, M. J., Faure, N., Martial, J. A. & Weiner, R. I. (1980). Absence of high affinity dopamine receptors in GH3 cells: a prolactin-secreting clone resistant to the inhibitory action of dopamine. *Endocrinology* **106**, 718.

Cunnah, D. & Besser, M. (1991). Management of prolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* **34**(3), 231-5.

Currie, M. J., Gunningham, S. P., Turner, K., Han, C., Scott, P. A., Robinson, B. A., Chong, W., Harris, A. L. & Fox, S. B. (2002). Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas; regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *J Pathol* **198**(4), 502-10.

Czyzyk-Krzeska, M. F., Dominski, Z., Kole, R. & Millhorn, D. E. (1994a). Hypoxia stimulates binding of a cytoplasmic protein to a pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *J Biol Chem* **269**(13), 9940-5.

Czyzyk-Krzeska, M. F., Furnari, B. A., Lawson, E. E. & Millhorn, D. E. (1994b). Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem* **269**(1), 760-4.

D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J. & Weiner, R. I. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol* **13**(5), 692-704.

D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J. & Weiner, R. I. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14), 6374-8.

Daniels, G. H. & Martin, J. H. (1994). Regulación neuroendocrina y enfermedades de la hipófisis anterior y del hipotálamo. In *Principios de medicina interna* (Isselbacher, K. J., Braunwald, E., Wilson, J. D., Martin, J. B., Fauci, A. S., Kasper, D. L. & Harrison, eds.), pp. 2180-2187. Interamericana McGraw-Hill, Mexico.

Denekamp, J. (1984). Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* **23**(4), 217-25.

Dolle, P., Castrillo, J. L., Theill, L. E., Deerinck, T., Ellisman, M. & Karin, M. (1990). Expression of GHF-1 protein in mouse pituitaries correlates both temporally and spatially with the onset of growth hormone gene activity. *Cell* **60**(5), 809-20.

Du, J. Z. & Li, Q. F. (1982). Effects of simulated hypoxia acclimation on organism, organ and hematology in *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Theriologica Sinica* **2**, 35-42.

Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F. A., Berger, P., Martinez 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* **40**(11), 2498-505.

Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F. & Dvorak, A. M. (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* **237**, 97-132.

Elias, K. A. & Weiner, R. I. (1984). Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(14), 4549-53.

Enholm, B., Paavonen, K., Ristimaki, A., Kumar, V., Gunji, Y., Klefstrom, J., Kivinen, L., Laiho, M., Olofsson, B., Joukov, V., Eriksson, U. & Alitalo, K. (1997). Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* **14**(20), 2475-83.

Ezzat, S., Smyth, H. S., Ramyar, L. & Asa, S. L. (1995). Heterogenous in vivo and in vitro expression of basic fibroblast growth factor by human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **80**(3), 878-84.

Faglia, G. & Spada, A. (2001). Genesis of pituitary adenomas: state of the art. *J Neurooncol* **54**(2), 95-110.

Fan, L. & Iseki, S. (1998). Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the endocrine glands of the rat. *Arch Histol Cytol* **61**(1), 17-28.

Farnoud, M. R., Kujas, M., Derome, P., Racadot, J., Peillon, F. & Li, J. Y. (1994). Interactions between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* **424**(1), 75-82.

Farquhar, M. G. (1977). Secretion and crinophagy in prolactin cells. *Adv Exp Med Biol* **80**, 37-94.

- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**(1), 6-13.
- Ferrandina, G., Scambia, G., Bardelli, F., Benedetti Panici, P., Mancuso, S. & Messori, A. (1997). Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* **76**(5), 661-6.
- Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129**(2), 896-900.
- Ferrara, N., Winer, J. & Henzel, W. J. (1992). Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(2), 698-702.
- Foekens, J. A., Look, M. P., Bolt-de Vries, J., Meijer-van Gelder, M. E., van Putten, W. L. & Klijn, J. G. (1999). Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* **79**(2), 300-7.
- Folkman, J. (1989). Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med* **320**(18), 1211-2.
- Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* **82**(1), 4-6.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**(1), 27-31.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* **29**(6 Suppl 16), 15-18.
- Folkman, J. & Cotran, R. (1976). Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* **16**, 207-48.
- Folkman, J. & Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* **235**(4787), 442-7.
- Folkman, J. & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**(16), 10931-4.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**(9), 4604-13.
- Fox, S. R., Jong, M. T., Casanova, J., Ye, Z. S., Stanley, F. & Samuels, H. H. (1990). The homeodomain protein, Pit-1/GHF-1, is capable of binding to and activating cell-specific elements of both the growth hormone and prolactin gene promoters. *Mol Endocrinol* **4**(7), 1069-80.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K. & Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* **94**(6), 715-25.

Fusek, M. & Vetvicka, V. (1994). Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide. *Biochem J* **303**(Pt 3), 775-80.

Gamble, J., Meyer, G., Noack, L., Furze, J., Matthias, L., Kovach, N., Harlant, J. & Vadas, M. (1999). B1 integrin activation inhibits in vitro tube formation: effects on cell migration, vacuole coalescence and lumen formation. *Endothelium* **7**(1), 23-34.

Garcia, M., Derocq, D., Pujol, P. & Rochefort, H. (1990). Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* **5**(12), 1809-14.

Gately, S., Twardowski, P., Stack, M. S., Patrick, M., Boggio, L., Cundiff, D. L., Schnaper, H. W., Madison, L., Volpert, O., Bouck, N., Enghild, J., Kwaan, H. C. & Soff, G. A. (1996). Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* **56**(21), 4887-90.

Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. & Ferrara, N. (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **272**(38), 23659-67.

Gicquel, C., Le Bouc, Y., Luton, J. P., Girard, F. & Bertagna, X. (1992). Monoclonality of corticotroph macroadenomas in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **75**(2), 472-5.

Gleadle, J. M., Ebert, B. L., Firth, J. D. & Ratcliffe, P. J. (1995). Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol* **268**(6 Pt 1), C1362-8.

Gloddek, J., Pagotto, U., Paez-Pereda, M., Arzt, E., Stalla, G. K. & Renner, U. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol* **160**(3), 483-90.

Glondou, M., Coopman, P., Laurent-Matha, V., Garcia, M., Rochefort, H. & Liaudet-Coopman, E. (2001). A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* **20**(47), 6920-9.

Goldberg, M. A. & Schneider, T. J. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem* **269**(6), 4355-9.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. & Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(17), 6624-8.

Gorczyca, W. & Hardy, J. (1988). Microadenomas of the human pituitary and their vascularization. *Neurosurgery* **22**(1 Pt 1), 1-6.

- Gospodarowicz, D., Abraham, J. A. & Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19), 7311-5.
- Goth, M. I., Hubina, E., Raptis, S., Nagy, G. M. & Toth, B. E. (2003). Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Microsc Res Tech* **60**(1), 98-106.
- Gourdji, D. & Laverriere, J. N. (1994). The rat prolactin gene: a target for tissue-specific and hormone-dependent transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* **100**(1-2), 133-42.
- Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W. & Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**(6560), 88-91.
- Graham, C. H., Fitzpatrick, T. E. & McCrae, K. R. (1998). Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway. *Blood* **91**(9), 3300-7.
- Greenan, J. R., Balden, E., Ho, T. W. & Walker, A. M. (1989). Biosynthesis of the secreted 24 K isoforms of prolactin. *Endocrinology* **125**(4), 2041-8.
- Griffiths, J. R. (1991). Are cancer cells acidic? *Br J Cancer* **64**(3), 425-7.
- Guillemin, K. & Krasnow, M. A. (1997). The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* **89**(1), 9-12.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988). *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K. & McDonald, D. M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol.* **156**(4), 1363-80.
- Hasilik, A., von Figura, K., Conzelmann, E., Nehr Korn, H. & Sandhoff, K. (1982). Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2. *Eur J Biochem* **125**(2), 317-21.
- Heaney, A. P., Horwitz, G. A., Wang, Z., Singson, R. & Melmed, S. (1999). Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med* **5**(11), 1317-21.
- Hellstrom, A., Svensson, E., Carlsson, B., Niklasson, A. & Albertsson-Wikland, K. (1999). Reduced retinal vascularization in children with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 795-798.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. & Jain, R. K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**(2), 177-82.

- Herman, V., Fagin, J., Gonsky, R., Kovacs, K. & Melmed, S. (1990). Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **71**(6), 1427-33.
- Heylen, N., Vincent, L. M., Devos, V., Dubois, V., Remacle, C. & Trouet, A. (2002). Fibroblasts capture cathepsin D secreted by breast cancer cells: possible role in the regulation of the invasive process. *Int J Oncol* **20**(4), 761-7.
- Ho, T. W., Greenan, J. R. & Walker, A. M. (1989). Mammothroph autoregulation: the differential roles of the 24K isoforms of prolactin. *Endocrinology* **124**(3), 1507-14.
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P. & Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8), 4607-12.
- Hochachka, P. W., Buck, L. T., Doll, C. J. & Land, S. C. (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18), 9493-8.
- Hockel, M. & Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* **93**(4), 266-76.
- Horak, E. R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K. & Harris, A. L. (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* **340**(8828), 1120-4.
- Hori, A., Sasada, R., Matsutani, E., Naito, K., Sakura, Y., Fujita, T. & Kozai, Y. (1991). Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* **51**(22), 6180-4.
- Ingber, D. (1991). Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* **47**(3), 236-41.
- Ingber, D. & Folkman, J. (1988). Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab Invest* **59**(1), 44-51.
- Ingber, D. E. & Folkman, J. (1989). How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* **58**(5), 803-5.
- Ishikawa, H., Heaney, A. P., Yu, R., Horwitz, G. A. & Melmed, S. (2001). Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(2), 867-74.
- Jabbour, H. N., Boddy, S. C. & Lincoln, G. A. (1997). Pattern and localisation of expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1 in the ovine pituitary gland: expression is independent of hypothalamic control. *Mol Cell Endocrinol* **134**(2), 91-100.

- Jackson, S. M., Keech, C. A., Williamson, D. J. & Gutierrez-Hartmann, A. (1992). Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. *Mol Cell Biol* **12**(6), 2708-19.
- Jain, R. K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* **48**(10), 2641-58.
- Jensen, H. M., Chen, I., DeVault, M. R. & Lewis, A. E. (1982). Angiogenesis induced by "normal" human breast tissue: a probable marker for precancer. *Science* **218**(4569), 293-5.
- Jugenburg, M., Kovacs, K., Stefanescu, L. & Scheithauer, B. W. (1995). Vasculature in Nontumorous Hypophyses, Pituitary Adenomas, and Carcinomas: A Quantitative Morphologic Study. *Endocr Pathol* **6**(2), 115-124.
- Katoh, R. (2003). Angiogenesis in endocrine glands: special reference to the expression of vascular endothelial growth factor. *Microsc Res Tech* **60**(2), 181-5.
- Katoh, R., Miyagi, E., Kawaoi, A., Hemmi, A., Komiyama, A., Oyama, T. & Shibuya, M. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid neoplasms. *Hum Pathol* **30**(8), 891-7.
- Kerbel, R. S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* **21**(3), 505-15.
- Khurana, S., Liby, K., Buckley, A. R. & 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.
- Kietzmann, T., Roth, U. & Jungermann, K. (1999). Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**(12), 4177-85.
- Kim, J., Luo, W., Chen, D. T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L. Y. & Lin, S. H. (2003). Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* **63**(2), 386-93.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S. & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. **362**(6423), 841-4.
- Koumenis, C., Naczki, C., Koritzinsky, M., Rastani, S., Diehl, A., Sonenberg, N., Koromilas, A. & Wouters, B. G. (2002). Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol* **22**(21), 7405-16.
- Kovacs, K., Horvath, E. & Vidal, S. (2001). Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol* **54**(2), 121-7.
- Krown, K. A., Wang, Y. F., Ho, T. W., Kelly, P. A. & Walker, A. M. (1992). Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH3 cells. *Endocrinology* **131**(2), 595-602.

Kuwabara, K., Ogawa, S., Matsumoto, M., Koga, S., Clauss, M., Pinsky, D. J., Lyn, P., Leavy, J., Witte, L. & Joseph-Silverstein, J., *et al.* (1995). Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10), 4606-10.

Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J. & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**(5556), 858-61.

Lane, D. & Harlow, E. (1999). *Using Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Laurent-Matha, V., Farnoud, M. R., Lucas, A., Rougeot, C., Garcia, M. & Rochefort, H. (1998). Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *J Cell Sci* **111**(Pt 17), 2539-49.

Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J. & Weiner, R. I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* **139**(9), 3696-703.

Lefer, A. M. & Galvin, M. J. (1978). Comparison of the cytotoxic actions of hypoxia and endotoxin in the perfused cat liver. *Circ Shock* **5**(2), 145-55.

Li, Y., Koga, M., Kasayama, S., Matsumoto, K., Arita, N., Hayakawa, T. & Sato, B. (1992). Identification and characterization of high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **75**(6), 1436-41.

Liaudet, E., Derocq, D., Rochefort, H. & Garcia, M. (1995). Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors. *Cell Growth Differ* **6**(9), 1045-52.

Liotta, L. A., Steeg, P. S. & Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* **64**(2), 327-36.

Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T. & Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* **77**(3), 638-43.

Lloyd, R. V. (2001). Molecular pathology of pituitary adenomas. *J Neurooncol* **54**(2), 111-9.

Lloyd, R. V., Scheithauer, B. W., Kuroki, T., Vidal, S., Kovacs, K. & Stefaneanu, L. (1999). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Endocr Pathol* **10**(3), 229-235.

Lloyd, R. V., Vidal, S., Horvath, E., Kovacs, K. & Scheithauer, B. (2003). Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microsc Res Tech* **60**(2), 244-50.

Lohrer, P., Gloddek, J., Hopfner, U., Losa, M., Uhl, E., Pagotto, U., Stalla, G. K. & Renner, U. (2001). Vascular endothelial growth factor production and regulation in rodent and human pituitary tumor cells in vitro. *Neuroendocrinology* **74**(2), 95-105.

Lorenson, M. Y., Miska, S. P. & Laurence, S. J. (1984). Molecular mechanism of prolactin release from pituitary secretory granules. In *Prolactin Secretion: A Multidisciplinary Approach* (Mena, F. & Valverde - R, C. M., eds.), pp. 141-160. Academic Press, Inc, Orlando.

Lou, Y., Oberpriller, J. C. & Carlson, E. C. (1997). Effect of hypoxia on the proliferation of retinal microvessel endothelial cells in culture. *Anat Rec* **248**(3), 366-73.
Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M. J., Squartini, F. & Angeletti, C. A. (1992). Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* **340**(8812), 145-6.

Macleod, R. M., Fontham, E. H. & Lehmeyer, J. E. (1970). Prolactin and growth hormone production as influenced by catecholamines and agents that affect brain catecholamines. *Neuroendocrinology* **6**, 283.

Madri, J. A., Pratt, B. M. & Yannariello-Brown, J. (1988). Matrix-driven cell size change modulates aortic endothelial cell proliferation and sheet migration. *Am J Pathol* **132**(1), 18-27.

Mahon, P. C., Hirota, K. & Semenza, G. L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**(20), 2675-86.

Mandriota, S. J., Pyke, C., Di Sanza, C., Quinodoz, P., Pittet, B. & Pepper, M. S. (2000). Hypoxia-inducible angiopoietin-2 expression is mimicked by iodonium compounds and occurs in the rat brain and skin in response to systemic hypoxia and tissue ischemia. *Am J Pathol* **156**(6), 2077-89.

Mangalam, H. J., Albert, V. R., Ingraham, H. A., Kapiloff, M., Wilson, L., Nelson, C., Elsholtz, H. & Rosenfeld, M. G. (1989). A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* **3**(7), 946-58.

Marciniszyn, J. J., Hartsuck, J. A. & Tang, J. (1977). Pepstatin inhibition mechanism. *Adv Exp Med Biol* **95**, 199-210.

Marin, F., Kovacs, K., Stefaneau, L., Horvath, E. & Cheng, Z. (1992). S-100 protein immunopositivity in human nontumorous hypophyses and pituitary adenomas. *Endocr Pathol* **3**, 28-38.

- Martini, J. F., Piot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A. & Weiner, R. I. (2000). The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol* **14**(10), 1536-49.
- Maurer, R. A. (1989). Both isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit can activate transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* **264**(12), 6870-3.
- McCabe, C. J., Boelaert, K., Tannahill, L. A., Heaney, A. P., Stratford, A. L., Khaira, J. S., Hussain, S., Sheppard, M. C., Franklyn, J. A. & Gittoes, N. J. (2002). Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(9), 4238-44.
- Meites, J. & Clemens, J. A. (1972). Hypothalamic control of prolactin secretion. *Vitam Horm* **30**, 165.
- Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W. & Varesio, L. (1995). A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* **182**(6), 1683-93.
- Melmed, S. (2003). Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest* **112**(11), 1603-18.
- Merkle, C. J., Schuler, L. A., Schaeffer, R. C. J., Gribbon, J. M. & Montgomery, D. W. (2000). Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells: evidence for an endothelial prolactin receptor. *Endocrine* **13**(1), 37-46.
- Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W. & Ullrich, A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Nature* **367**(6463), 576-9.
- Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S. & Caro, J. (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* **71**(3), 374-9.
- Mitra, I. (1980). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem Biophys Res Commun* **95**(4), 1760-7.
- Montesano, R. (1992). 1992 Mack Forster Award Lecture. Review. Regulation of angiogenesis in vitro. *Eur J Clin Invest* **22**(8), 504-15.
- Morel, G., Ouhtit, A. & Kelly, P. A. (1994). Prolactin receptor immunoreactivity in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* **59**(1), 78-84.
- Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S. & Kuwano, M. (2000). Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* **275**(49), 38912-20.

- Morla, A., Zhang, Z. & Ruoslahti, E. (1994). Superfibronectin is a functionally distinct form of fibronectin. *Nature* **367**(6459), 193-6.
- Moromisato, D. Y., Moromisato, M. Y., Brasel, J. A. & Cooper, D. M. (1999). Effect of growth hormone therapy in mitigating hypoxia-induced and food restriction-induced growth retardation in the newborn rat. *Crit Care Med* **27**(10), 2234-8.
- Nakamura, Y., Morishita, R., Higaki, J., Kida, I., Aoki, M., Moriguchi, A., Yamada, K., Hayashi, S., Yo, Y., Nakano, H., Matsumoto, K., Nakamura, T. & Ogihara, T. (1996). Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens* **14**(9), 1067-72.
- Neill, J. D. (1970). Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* **87**(6), 1192-7.
- Nelson, C., Albert, V. R., Elsholtz, H. P., Lu, L. I. & Rosenfeld, M. G. (1988). Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* **239**(4846), 1400-5.
- Nguyen, N. M., Lehr, J. E. & Pienta, K. J. (1993). Pentosan inhibits angiogenesis in vitro and suppresses prostate tumor growth in vivo. *Anticancer Res* **13**(6A), 2143-7.
- Nicoll, C. S. (1980). Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Fed Proc* **39**(8), 2563-6.
- Norman, J. T., Clark, I. M. & Garcia, P. L. (2000). Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* **58**(6), 2351-66.
- Norris, M. L. & Millhorn, D. E. (1995). Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* **270**(40), 23774-9.
- Nowakowski, B. E. & Maurer, R. A. (1994). Multiple Pit-1-binding sites facilitate estrogen responsiveness of the prolactin gene. *Mol Endocrinol* **8**(12), 1742-9.
- Ochoa, A. L., Mitchner, N. A., Paynter, C. D., Morris, R. E. & Ben-Jonathan, N. (2000). Vascular endothelial growth factor in the rat pituitary: differential distribution and regulation by estrogen. *J Endocrinol* **165**(2), 483-92.
- Oh, H., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Matsumura, M. & Honda, Y. (1999). Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **274**(22), 15732-9.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**(2), 277-85.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. & Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis

inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**(2), 315-28.

Pepper, M. S., Vassalli, J. D., Orci, L. & Montesano, R. (1992). Proteolytic balance and capillary morphogenesis in vitro. In *Angiogenesis: key principles* (Steiner, R. & Weisz, P. B., eds.), pp. 137-145. Birkhauser Verlag, Basel.

Perez, G. T. & Apfelbaum, M. E. (1992). Modulatory effect of steroid hormones on GnRH-induced LH secretion by cultured rat pituitary cells. *Can J Physiol Pharmacol* **70**(7), 963-9.

Phelan, M. W., Forman, L. W., Perrine, S. P. & Faller, D. V. (1998). Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* **132**(6), 519-29.

Pickett, C. A. & Gutierrez-Hartmann, A. (1997). . In *Disease of the Pituitary : Diagnosis and Treatment* (Wierman, M. E., ed.), Vol. 3, pp. 1-31. Humana Press Inc, Totowa, N. J.

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

Pouyssegur, J., Franchi, A. & Pages, G. (2001). pHi, aerobic glycolysis and vascular endothelial growth factor in tumour growth. *Novartis Found Symp* **240**, 186-96;

Prasad, B. V. & Suguna, K. (2002). Role of water molecules in the structure and function of aspartic proteinases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 2), 250-9.

Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* **9**(6), 677-84.

Rak, J., Yu, J. L., Klement, G. & Kerbel, R. S. (2000). Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**(1), 24-33.

Rastinejad, F., Polverini, P. J. & Bouck, N. P. (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* **56**(3), 345-55.

Renner, U., Pagotto, U., Arzt, E. & Stalla, G. K. (1996). Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *Eur J Endocrinol* **135**(5), 515-32.

Richard, D. E., Berra, E. & Pouyssegur, J. (1999). Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* **266**(3), 718-22.

Richo, G. R. & Conner, G. E. (1994). Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J Biol Chem* **269**(20), 14806-12.

Rijnboutt, S., Aerts, H. M., Geuze, H. J., Tager, J. M. & Strous, G. J. (1991). Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J Biol Chem* **266**(8), 4862-8.

- Risau, W. (1990). Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res* **2**(1), 71-9.
- Robinson, C. J. & Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* **114**(Pt 5), 853-65.
- Rochefort, H. (1990). Cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **16**(1), 3-13.
- Rochefort, H. (1992). Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* **28A**(11), 1780-3.
- Rochefort, H., Garcia, M., Glondu, M., Laurent, V., Liaudet, E., Rey, J. M. & Roger, P. (2000). Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* **291**(2), 157-70.
- Rochefort, H. & Liaudet-Coopman, E. (1999). Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand. *APMIS* **107**(1), 86-95.
- Russell, D. H. (1989). New aspects of prolactin and immunity: a lymphocyte-derived prolactin-like product and nuclear protein kinase C activation. *Trends Pharmacol Sci* **10**(1), 40-4.
- Rymaszewski, Z., Cohen, R. M. & Chomczynski, P. (1991). hGH stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 617-621.
- Sambrook & Russell. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edit. 3 vols, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schechter, J., Goldsmith, P., Wilson, C. & Weiner, R. (1988). Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **67**(4), 713-9.
- Schmidt, W., Dore, S., Hilgendorf, A., Strauch, S., Gareau, R. & Brisson, G. R. (1995). Effects of exercise during normoxia and hypoxia on the growth hormone-insulin-like growth factor I axis. *Eur J Appl Occup Physiol* **71**(5), 424-430.
- Seggie, J. A. & Brown, G. M. (1975). Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Can J Physiol Pharmacol* **53**(4), 629-37.
- Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R. L., Galloway, A. C., Rifkin, D. B. & Mignatti, P. (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* **141**(7), 1659-73.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* **8**(5), 588-94.

Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* **13**(2), 167-71.

Semenza, G. L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* **8**(4 Suppl), S62-7.

Shah, G. N. & Hymer, W. C. (1989). Prolactin variants in the rat adenohypophysis. *Mol Cell Endocrinol* **61**(1), 97-107.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**(6398), 843-5.

Silver, I. A., Murrills, R. J. & Etherington, D. J. (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* **175**(2), 266-76.

Simmons, D. M., Voss, J. W., Ingraham, H. A., Holloway, J. M., Broide, R. S., Rosenfeld, M. G. & Swanson, L. W. (1990). Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* **4**(5), 695-711.

Sinha, Y. N. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* **16**(3), 354-69.

Sinha, Y. N., Gilligan, T. A., Lee, D. W., Hollingsworth, D. & Markoff, E. (1985). Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **60**(2), 239-43.

Smith, L. E. H., Kopchick, J. J., Chen, W., Knapp, J., Kinose, F., Daley, D., Foley, E., Smith, R. G. & Schaeffer, J. M. (1997). Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* **276**, 1706-1709.

Soh, E. Y., Duh, Q. Y., Sobhi, S. A., Young, D. M., Epstein, H. D., Wong, M. G., Garcia, Y. K., Min, Y. D., Grossman, R. F., Siperstein, A. E. & Clark, O. H. (1997). Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(11), 3741-7.

Stanfield, J. P. (1960). The blood supply of the human pituitary gland. *J Anat* **94**, 257-73.

Steinbrech, D. S., Mehrara, B. J., Saadeh, P. B., Greenwald, J. A., Spector, J. A., Gittes, G. K. & Longaker, M. T. (2000). VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**(4), C853-60.

Struder, H. K., Hollmann, W., Donike, M., Platen, P. & Weber, K. (1996a). Effect of O₂ availability on neuroendocrine variables at rest and during exercise: O₂ breathing increases plasma prolactin. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **74**(5), 443-449.

Struder, H. K., Hollmann, W. & Platen, P. (1996b). Increased prolactin response to hyperoxia at rest and during endurance exercise. *Int J Sports Med* **17**(5), 390-2.

Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. I. & Martial, J. A. (1999). Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4), 1246-51.

Stubbs, M., McSheehy, P. M., Griffiths, J. R. & Bashford, C. L. (2000). Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* **6**(1), 15-9.

Suen, C. S. & Chin, W. W. (1993). Ligand-dependent, Pit-1/growth hormone factor-1 (GHF-1)-independent transcriptional stimulation of rat growth hormone gene expression by thyroid hormone receptors in vitro. *Mol Cell Biol* **13**(3), 1719-27.

Sutton, J. R. (1977). Effect of acute hypoxia on the hormonal response to exercise. *J Appl Physiol* **42**(4), 587-592.

Suzui, H., Takahashi, J. A., Fukumoto, M., Hashimoto, N., Itoh, N., Hatanaka, M. & Kikuchi, H. (1994). Immunohistochemical study for basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I in pituitary adenomas. *Neurosci Lett* **171**(1-2), 192-6.

Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. & Cairo, G. (1999). Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* **274**(34), 24142-6.

Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T. & Miura, T. (2000). Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem* **275**(19), 14139-46.

Tam, S. W. & Dannies, P. S. (1980). Dopaminergic inhibition of ionophore A23187-stimulated release of prolactin from rat anterior pituitary cells. *J Biol Chem* **255**, 6595.

Tannock, I. F. & Hayashi, S. (1972). The proliferation of capillary endothelial cells. *Cancer Res* **32**(1), 77-82.

Tashjian, A. H. J., Bancroft, F. C. & 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), 61-70.

Tenan, M., Fulci, G., Albertoni, M., Diserens, A. C., Hamou, M. F., El Atifi-Borel, M., Feige, J. J., Pepper, M. S. & Van Meir, E. G. (2000). Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med* **191**(10), 1789-98.

Thorner, M. O., Vance, M. L., Laws, J. E. R., Horvath, E. & Kovacs, K. (1998). *The anterior pituitary*. 9th edit. Williams Textbook of Endocrinology (Wilson, J., Foster, D., Kronenberg, H. & Larsen, P., Eds.), Saunders, Philadelphia.

Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. & Kuhn, K. (1981). A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* **120**(2), 203-11.

Tixier-Vidal, A. (1975). *The Anterior Pituitary* (Farquhar, M. G. & Tixier-Vidal, A., Eds.), Academic Press, New York.

Torner, L., Mejia, S., Lopez-Gomez, F. J., Quintanar, A., Martinez 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**(12), 5454-60.

Torner, L., Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R. & Neumann, I. D. (2001). Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci* **21**(9), 3207-14.

Tuder, R. M., Flook, B. E. & Voelkel, N. F. (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* **95**(4), 1798-807.

Turner, H. E., Nagy, Z., Gatter, K. C., Esiri, M. M., Harris, A. L. & Wass, J. A. (2000a). Angiogenesis in pituitary adenomas - relationship to endocrine function, treatment and outcome. *J Endocrinol* **165**(2), 475-81.

Turner, H. E., Nagy, Z., Gatter, K. C., Esiri, M. M., Harris, A. L. & Wass, J. A. (2000b). Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(3), 1159-62.

Turner, H. E., Nagy, Z., Gatter, K. C., Esiri, M. M., Wass, J. A. & Harris, A. L. (2000c). Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behaviour. *Br J Cancer* **82**(8), 1441-5.

Varvarigou, A., Vagenakis, A. G., Makri, M., Frimas, C. & Beratis, N. G. (1996). Prolactin and growth hormone in perinatal asphyxia. *Biol Neonate* **69**(2), 76-83.

Vetvicka, V., Vetvickova, J., Hilgert, I., Voburka, Z. & Fusek, M. (1997). Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells. *Int J Cancer* **73**(3), 403-9.

Vidal, S., Kovacs, K., Horvath, E., Scheithauer, B. W., Kuroki, T. & Lloyd, R. V. (2001). Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. *Virchows Arch* **438**(6), 595-602.

Vidal, S., Lloyd, R. V., Moya, L., Scheithauer, B. W. & Kovacs, K. (2002). Expression and distribution of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in the rat pituitary. *J Histochem Cytochem* **50**(4), 533-40.

Vidal, S., Oliveira, M. C., Kovacs, K., Scheithauer, B. W., Lloyd, R. & Davis, J. R. (2000a). Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in the GH3 cell line. *Cell & Tissue Research* **300**(1), 83-8.

- Vidal, S., Scheithauer, B. W. & Kovacs, K. (2000b). Vascularity in Nontumorous Human Pituitaries and Incidental Microadenomas: A Morphometric Study. *Endocr Pathol* **11**(3), 215-227.
- Vignon, F., Capony, F., Chambon, M., Freiss, G., Garcia, M. & Rochefort, H. (1986). Autocrine growth stimulation of the MCF 7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 K protein. *Endocrinology* **118**(4), 1537-45.
- von Figura, K. & Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* **55**, 167-93.
- Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S. & Hombach, V. (1996). Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* **94**(7), 1647-54.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12), 5510-4.
- Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W. & Folkman, J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* **143**(2), 401-9.
- Weinstat-Saslow, D. & Steeg, P. S. (1994). Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *FASEB J* **8**(6), 401-7.
- Wenger, R. H. & Gassmann, M. (1997). Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* **378**(7), 609-16.
- Wike-Hooley, J. L., Haveman, J. & Reinhold, H. S. (1984a). The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* **2**(4), 343-66.
- Wike-Hooley, J. L., Van der Zee, J., van Rhoon, G. C., Van den Berg, A. P. & Reinhold, H. S. (1984b). Human tumour pH changes following hyperthermia and radiation therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* **20**(5), 619-23.
- Wiklund, J., Wertz, N. & Gorski, J. (1981). A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. *Endocrinology* **109**(5), 1700-7.
- Wittlin, S., Rosel, J., Hofmann, F. & Stover, D. R. (1999). Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation. *Eur J Biochem* **265**(1), 384-93.
- Wong, V. L., Compton, M. M. & Witorsch, R. J. (1986). Proteolytic modification of rat prolactin by subcellular fractions of the lactating rat mammary gland. *Biochim Biophys Acta* **881**(2), 167-74.

Hypoxia Inhibits Expression of Prolactin and Secretion of Cathepsin-D by the GH4C1 Pituitary Adenoma Cell Line

Gabriela Cosío, Michael C. Jeziorski, Fernando López-Barrera, Gonzalo Martínez de la Escalera, and Carmen Clapp

Neurobiology Institute, National Autonomous University of Mexico, Campus UNAM-Juriquilla, Queretaro, Qro, Mexico

SUMMARY: Diminished oxygen concentration within growing tumors may stimulate neovascularization by inducing both up-regulation of angiogenic factors and down-regulation of antiangiogenic agents. A potentially important molecule in the growth of pituitary adenomas is prolactin (PRL), which can be cleaved by cathepsin-D to yield a 16-kDa form (16K-PRL) with potent antiangiogenic effects. We examined the expression of PRL in cultured GH4C1 pituitary adenoma cells after exposure to hypoxia (0.1% oxygen) for periods of 12 to 36 hours. In contrast to increased expression of the angiogenic factor vascular endothelial growth factor in hypoxic cells, PRL mRNA and levels of intracellular and secreted PRL were significantly reduced under hypoxia. The reduction was not attributable to a general suppression of either transcription or protein synthesis. Although 16K-PRL was not evident in conditioned medium at physiologic pH, lowering the pH to mimic the acidic tumor microenvironment resulted in generation of 16K-PRL, which was sharply reduced in medium drawn from hypoxic cells. Production of 16K-PRL was blocked by the cathepsin-D inhibitor pepstatin-A, and the reduced 16K-PRL formation in hypoxic-conditioned medium correlated with a decrease in secretion of cathepsin-D and its precursor, procathepsin-D. Thus, hypoxia acts upon GH4C1 cells to increase vascular endothelial growth factor expression, decrease PRL synthesis, and suppress conversion of PRL to 16K-PRL via inhibition of cathepsin-D proteolysis. These mechanisms may act in concert to stimulate angiogenesis in prolactinomas. (*Lab Invest* 2003, 83:1-●●●).

Fnu

The growth of pituitary adenomas, as of all tumors, depends on adequate vascularization once tumors have grown beyond a few millimeters in size (Folkman, 1990). However, in contrast to other tumors, pituitary adenomas are less vascularized than the normal tissue (Jugenburg et al, 1995; Schechter, 1972; Turner et al, 2000a). Because an adequate blood supply enables tumor cells to proliferate further or metastasize to another organ, the reduced vascularization of pituitary adenomas suggests that inhibition of angiogenesis in these tumors plays a role in their characteristic slow growth and failure to reach the carcinoma stage (Jugenburg et al, 1995; Turner et al, 2000a, 2000b; Vidal et al, 2000a). Among pituitary tumors, those secreting prolactin (PRL) occur most frequently. They range from microprolactinomas,

which rarely progress in size, to large extracellular macroprolactinomas that may invade local tissues (Cunnah and Besser, 1991). These differences fit with the observation that the vascular density of macroprolactinomas is significantly greater than that of microprolactinomas (Turner et al, 2000a) and further suggest that inhibitors of angiogenesis might influence the phenotype and behavior of these tumors.

One putative inhibitor of angiogenesis in the pituitary gland is a fragment of PRL. The full-length 23-kDa PRL molecule can be posttranslationally processed by proteolytic cleavage to a 16-kDa form (16K-PRL) that has unique antiangiogenic actions not shared with the full-length molecule (Clapp et al, 1993; Corbacho et al, 2002). 16K-PRL can be generated in the anterior pituitary gland of rats (Shah and Hymer, 1989; Torner et al, 1995), mice (Sinha and Gilligan, 1984), and humans (Pellegrini et al, 1988; Sinha et al, 1985; Warner et al, 1993) and acts as a potent inhibitor of angiogenesis in vivo and in vitro, inhibiting endothelial cell proliferation (Clapp et al, 1993) and stimulating type 1 plasminogen activator inhibitor expression (Lee et al, 1998) and endothelial cell apoptosis (Martini et al, 2000). Inhibition of angiogenesis by 16K-PRL would be critically influenced by the availability of both the parent molecule (PRL) and the protease responsible for processing PRL. Various lines of evidence suggest that the protease is cathepsin-D, a ubiquitous acidic-aspartyl endopro-

DOI: 10.1097/01.LAB.0000098429.59348.36

Received August 27, 2003.

This work was supported by Grants 36041-N and 34309-N from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), Grants PUIS, IN227502, and IN221702 from the National Autonomous University of Mexico, and Grant 55000595 from the Howard Hughes Medical Institute.

Address reprint requests to: Dr. C. Clapp, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro., Mexico 76001. E-mail: clapp@servidor.unam.mx

Cosio et al

teinase in lysosomes (Baldocchi et al, 1993; Corbacho et al, 2002). Cathepsin-D is secreted by tumor cells (Morikawa et al, 2000; Rochefort et al, 1990) and is thought to be associated with tumor progression (Berchem et al, 2002; Rochefort et al, 2000).

Hypoxia, a common feature of solid tumors, results from insufficient blood perfusion and oxygen consumption rates that exceed oxygen supply (Hockel and Vaupel, 2001). Hypoxic conditions affect the expression of a well-characterized battery of genes that help cells cope with low oxygen concentrations, including the up-regulation of several genes encoding angiogenic factors and the down-regulation of angiogenesis inhibitors (Richard et al, 1999; Tenan et al, 2000). Because 16K-PRL is antiangiogenic, we speculated that a hypoxic milieu could reduce its generation of 16K-PRL in pituitary tumor cells, either by affecting expression of the parent PRL form or by modulating the availability of the protease responsible for processing PRL. Lowering 16K-PRL may be one of the mechanisms determining the increased vascularization of macroprolactinomas versus microprolactinomas and other pituitary adenomas. In the present study, we examined the effects of hypoxia on PRL gene expression and cathepsin-D levels in the rat GH4C1 pituitary adenoma cell line.

Results

The experimental protocol used to study hypoxia involved exposure of GH4C1 cells to 0.1% oxygen for periods of up to 36 hours. GH4C1 cells were found to be relatively resistant to hypoxia-induced reduction of cell viability. No morphologic change was seen in GH4C1 cells at any of the time points (not shown), and the number of adherent cells was constant for up to 24 hours of hypoxia (Fig. 1A). By 36 hours there was a significant ($p < 0.05$) reduction in the number of adherent cells; however, for the cells that remained attached, hypoxic treatment for up to 36 hours induced no discernible loss of viability (Fig. 1B).

Because low concentrations of oxygen have previously been reported to stimulate the expression of angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor cells (Minchenko et al, 1994; Shweiki et al, 1992) and because the GH3 cell line, parental to GH4C1 cells, expresses VEGF (Lohrer et al, 2001; Ochoa et al, 2000; Vidal et al, 2000b), we used RT-PCR to assay transcription of several forms of VEGF in GH4C1 cells in response to hypoxia. Transcription of both the 164 and 120 amino acid variants of VEGF was elevated in GH4C1 cells after hypoxic treatment for 12 hours (Fig. 2A), and this increase persisted for at least 24 hours. At each time point, the increase in the mRNA encoding for VEGF164 was about 2-fold and that of VEGF120 was about 1.5-fold (Fig. 2B). No band corresponding to a VEGF188 transcript was detected.

In contrast to VEGF, PRL mRNA levels were significantly decreased under the same conditions. Northern blots showed that PRL mRNA was reduced in GH4C1 cells after 12 hours of exposure to hypoxia.

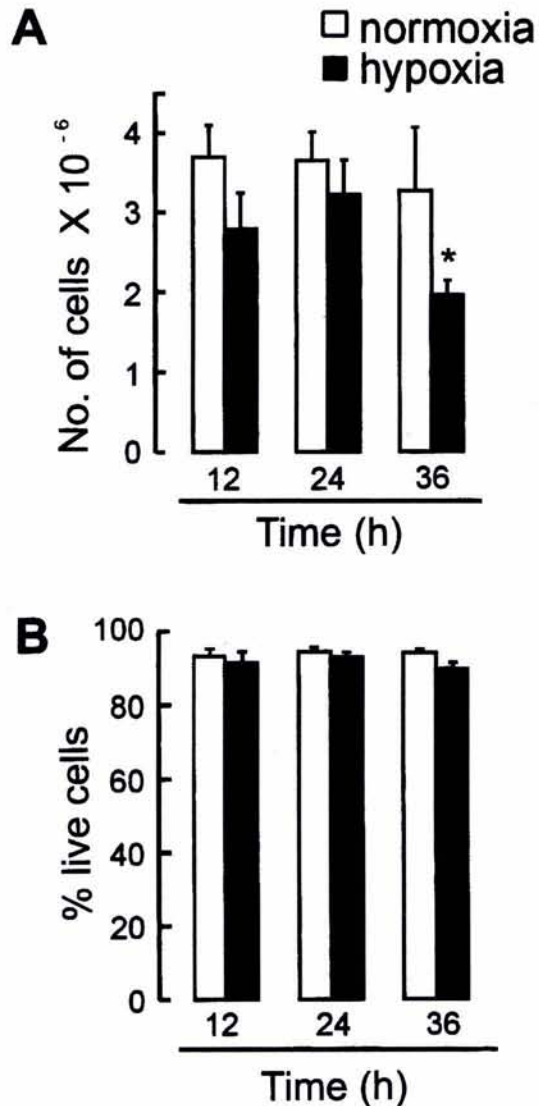


Figure 1. Effect of hypoxia on cell number (A) and viability (B). Confluent GH4C1 cells were cultured in normoxic or hypoxic conditions for 12 to 36 hours. Adherent cells were lifted by trypsin treatment and counted by hemocytometer, and the percentage of viable cells was determined by trypan blue exclusion. Data are mean values \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs corresponding normoxic value.

The decrease was more apparent with longer treatments, because the PRL transcript accumulated in cells under normoxic conditions but declined in hypoxic cells (Fig. 3A). After 36 hours of hypoxia, PRL mRNA was reduced by approximately 80% (Fig. 3B). Reduction of transcription was not a general phenomenon in hypoxic GH4C1 cells, because rehybridizing with a probe for β -actin showed no alteration of expression of this constitutive gene under hypoxia (Fig. 3A).

The decrease in transcription of the PRL gene was accompanied by a reduction in levels of the protein. Western blotting of GH4C1 homogenates showed decreased PRL levels after 12 to 36 hours of hypoxic treatment (Fig. 4A). As with mRNA levels, intracellular

F1

F2

F3

F4

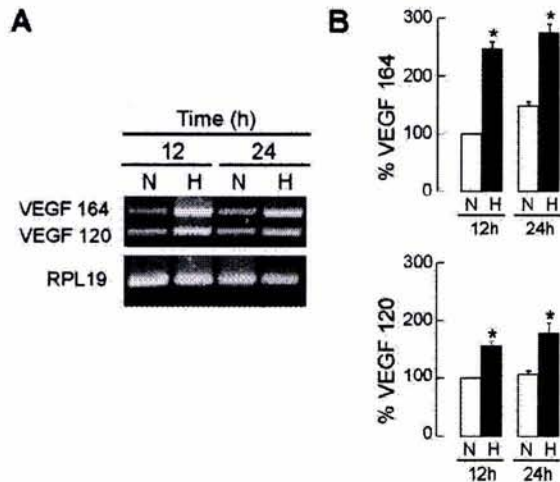


Figure 2.

Hypoxia-induced up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. A, VEGF mRNAs encoding isoforms 164 (563 bp) and 120 (431 bp) were analyzed by RT-PCR performed on total RNA extracted from GH4C1 cells cultured for 12 or 24 hours under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions. Amplification of the housekeeping gene ribosomal protein L19 was used as a control. B, VEGF mRNA values were evaluated densitometrically and normalized with respect to the 12-hour normoxia value. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ with respect to the corresponding normoxic value.

PRL continued to accumulate when oxygen concentration was normal but declined under hypoxia. In contrast, levels of β -actin remained unaltered by the oxygen status of the culture. Secreted PRL was also examined and found to rise under normoxic conditions, increasing more than 2-fold between 12 and 36 hours of incubation (Fig. 4B). In comparison, hypoxic cells secreted less PRL after 12 hours of treatment, and PRL levels at subsequent time points were consistently lower than in normoxic cells. Furthermore, the rate of accumulation of secreted PRL was lower under hypoxia than under normoxia. These findings were confirmed by ELISA determinations showing a significant ($p < 0.05$) 2-fold reduction of secreted PRL under hypoxia (83.5 ± 6.1 vs $43.3 \pm 6.6 \mu\text{g}/10^6$ cells for 24 hours of normoxia vs hypoxia, respectively). To examine whether reduction of PRL secretion could be a general phenomenon for all proteins secreted by GH4C1 cells, we compared levels of secreted proteins under hypoxia and normoxia by silver staining (Fig. 4C). Levels of the majority of secreted proteins were not altered under hypoxia.

Although the polyclonal antibody used in these experiments binds to several forms of PRL, including the 23-kDa and 16-kDa variants, no product other than 23K-PRL was detected in either GH4C1 cell homogenates or conditioned media. Because cathepsin-D, the presumed PRL-processing enzyme, acts at acidic pH and because the extracellular pH of tumors is acidic (Stubbs et al, 2000), we speculated that 16K-PRL could be generated extracellularly via cathepsin-D secreted by tumor cells into an acidic microenvironment. To determine whether the proteolytic activity responsible for generation of 16K-PRL was present in the conditioned medium of GH4C1

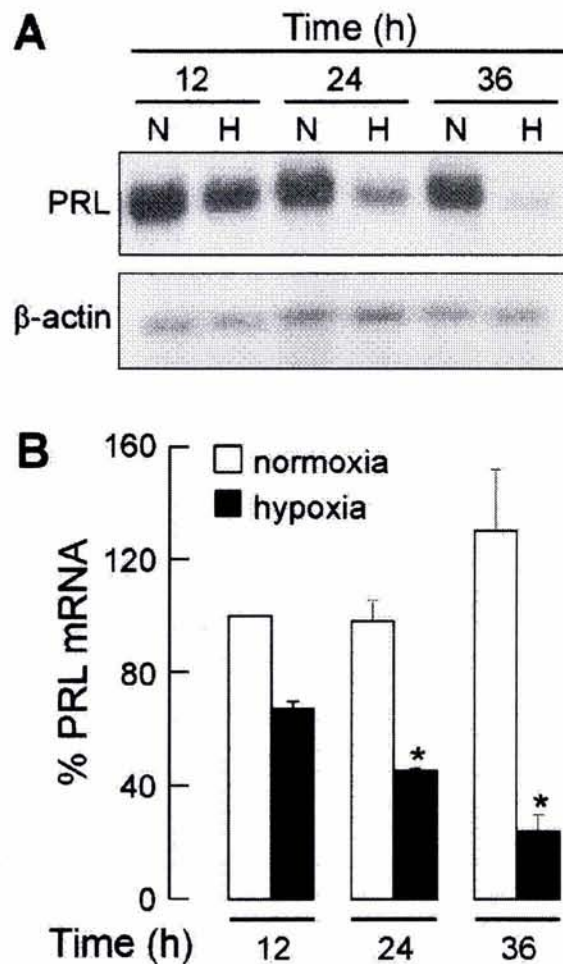


Figure 3.

Hypoxia-induced down-regulation of prolactin (PRL) mRNA. A, Northern blot for PRL mRNA and β -actin in GH4C1 cells exposed for 12 to 36 hours to normoxia (N) or hypoxia (H). B, PRL mRNA values were quantified densitometrically and normalized with respect to the 12-hour normoxia value. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ with respect to the corresponding normoxic value.

cells, medium drawn from cells after 24 hours of normoxia or hypoxia was incubated at pH 5.6 for 24 hours at 37°C, and proteolysis of PRL in the medium was evaluated by Western blots. When conditioned medium was exposed to low pH, a second immunoreactive product was seen in addition to PRL that corresponded in size to 16K-PRL (Fig. 5A). The concentration of the 16-kDa product relative to that of 23K-PRL was 4-fold lower in medium drawn from hypoxic cells (Fig. 5B). Generation of the 16-kDa product seemed to be attributable to a protease released by the cells, because no 16K-PRL was evident when the conditioned medium was heat inactivated (not shown) or when a 23K-PRL standard was incubated at a low pH in nonconditioned medium (Fig. 5A).

In support of cathepsin-D being the responsible protease, the generation of the 16K-PRL at acidic pH was inhibited by the cathepsin-D inhibitor pepstatin-A (Fig. 5A). We examined the acidified medium from

F5

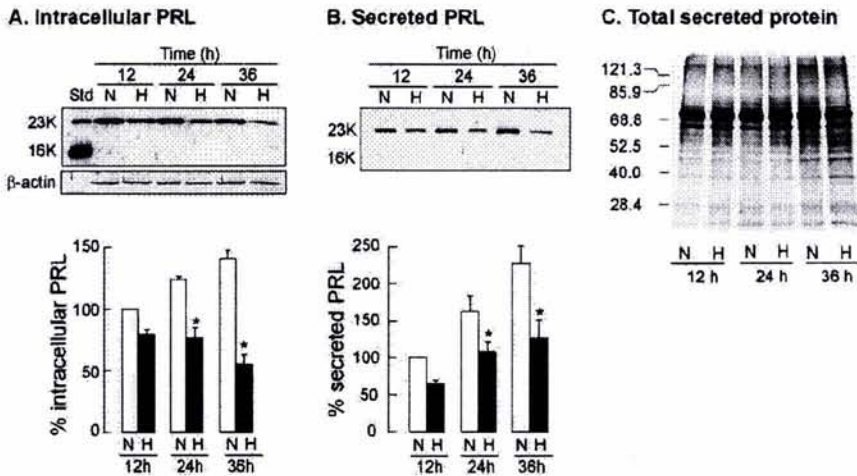


Figure 4.

Hypoxia-induced inhibition of intracellular and secreted PRL. PRL was analyzed by Western blots in homogenates (A) and conditioned media (B) of GH4C1 cells exposed to normoxia (N) or hypoxia (H) for 12 to 36 hours. Blots from homogenates were reblotted with anti- β -actin antibodies (A). PRL bands were evaluated densitometrically and normalized with respect to the 12-hour normoxia value. Data are mean \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$ with respect to the corresponding normoxic value. C, Silver staining of secreted proteins from GH4C1 cells exposed to normoxia (N) or hypoxia (H) for 12 to 36 hours. Proteins from conditioned medium drawn from 6.5×10^4 cells were precipitated with trichloroacetic acid and loaded. The major protein band of 70 kDa is a medium constituent, and none of the other proteins were detected in nonconditioned medium processed in the same way as GH4C1-conditioned medium.

GH4C1 cells by immunoblotting to detect cathepsin-D isoforms and determined whether their levels decreased under hypoxic conditions. Procathepsin-D, the 52-kDa precursor of cathepsin-D, and mature cathepsin-D (33 kDa) were detected in GH4C1 conditioned medium (Fig. 6A) but not in nonconditioned medium (not shown). The concentration of both forms of the enzyme increased with time but was lower in hypoxic cells at the two times measured (Fig. 6B).

Discussion

Cells exposed to low oxygen levels adapt by altering the transcription of numerous genes involved either in decreasing cellular oxygen consumption or in increasing oxygen availability to the tissues (Bunn and Poyton, 1996). Angiogenesis is one major mechanism that increases oxygen availability, and hypoxia up-regulates angiogenesis activators and down-regulates inhibitors. Because 16K-PRL, a potent inhibitor of angiogenesis, is derived from PRL by proteolysis, we reasoned that hypoxia might down-regulate PRL gene expression in pituitary lactotrophs. Here, we report that PRL production, as well as its cathepsin-D-mediated conversion to 16K-PRL, are decreased by exposure of a pituitary tumor cell line to low oxygen.

We demonstrate that hypoxia reduces the expression of PRL mRNA and protein in the GH4C1 lactotroph cell line. In contrast to PRL, VEGF164 and VEGF120 mRNA were up-regulated by hypoxia, demonstrating the ability of GH4C1 cells to respond to low oxygen tension via the transcription of hypoxia-inducible genes. VEGF164 and 120 are secreted isoforms of VEGF that are active in angiogenesis (Enholm et al, 1997), and their expression is increased in several tumor cell lines in response to hypoxia (Minchenko et al, 1994; Shweiki et al, 1992). Thus, the

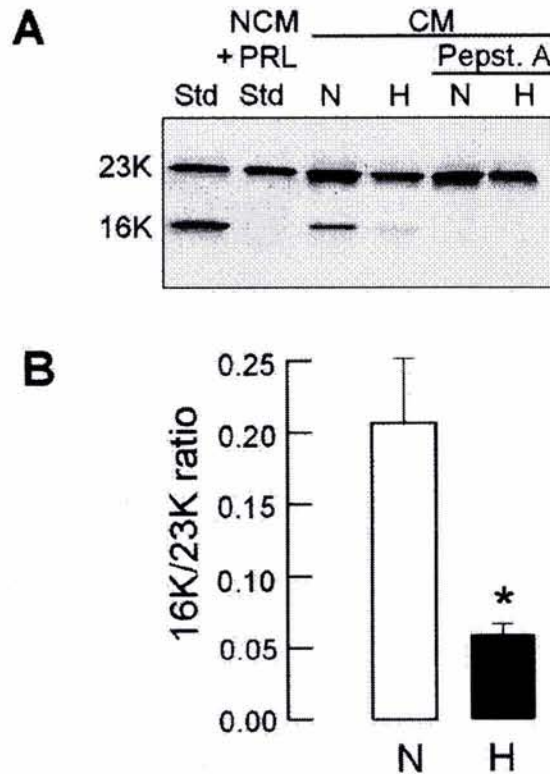


Figure 5.

Hypoxia-induced inhibition of PRL-cleaving activity. A, The conditioned medium (CM) of GH4C1 cells exposed to normoxia (N) or hypoxia (H) for 24 hours was acidified (pH 5.6), incubated at 37°C for 24 hours in the absence or presence of pepstatin-A (Pepst.A, 1 μ M), and analyzed by Western blot. Acidified nonconditioned medium (NCM) was incubated with a purified 23K-PRL standard under the same conditions as CM. B, PRL bands were evaluated densitometrically and expressed as the ratio of 16K-PRL to 23K-PRL. Ratios are mean \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$ with respect to the corresponding normoxic value.

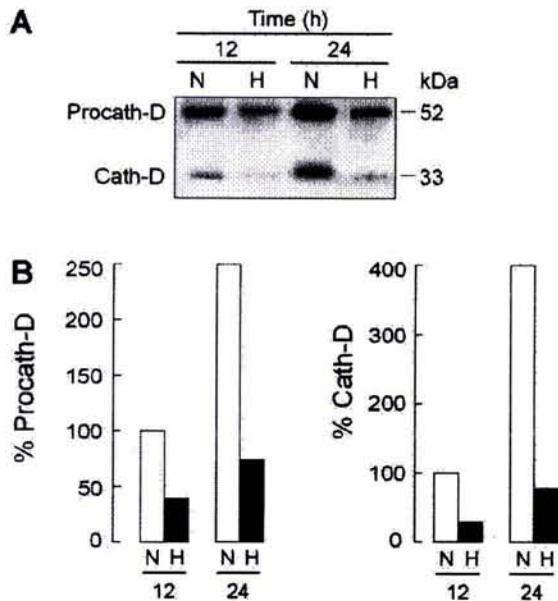


Figure 6. Hypoxia-induced inhibition of secretion of cathepsin-D isoforms. A, Western blot analysis of pro-cathepsin-D (*Procath-D*) and cathepsin-D (*Cath-D*) in acidified (pH 5.6) conditioned medium from GH4C1 cultures exposed to normoxia (N) or hypoxia (H) for 12 or 24 hours. B, Protein bands were evaluated densitometrically and normalized with respect to the 12-hour value under normoxia.

up-regulation of VEGF by hypoxia in GH4C1 cells supports the notion that hypoxia is an important factor for the progression of PRL-secreting adenomas. In this regard, VEGF levels increase in the pituitary gland during the development of estrogen-induced prolactinomas (Banerjee et al, 1997), and both VEGF164 and VEGF120 are up-regulated by estrogens in the pituitary gland and in the GH3 lactotroph cell line (Ochoa et al, 2000).

Hypoxia did not inhibit PRL mRNA and protein through toxic effects on GH4C1 cells. Morphologically, the cells appeared unaffected by the extreme levels of oxygen deprivation used in this study, which recreate near-zero tissue oxygen levels measured in experimental models of wound repair (Niinikoski et al, 1972) or in areas within solid tumors (Hockel and Vaupel, 2001). Functionally, there was no difference in the number of GH4C1 cells for up to 24 hours of hypoxia, and the viability of attached cells remained constant at all times. Prolonged exposure to hypoxia can induce programmed cell death in some mammalian cells (Graeber et al, 1996) but not in others (Berk et al, 1999; Lou et al, 1997). Resistance to hypoxia-induced apoptosis seems particularly important among tumor cells, in which some studies claim that by inducing apoptosis, hypoxia may select for cells with defective apoptotic regulators such as p53 (Graeber et al, 1996) and a more aggressive phenotype (Brizel et al, 1996).

Likewise, hypoxia did not reduce PRL levels in GH4C1 cells by nonspecific suppression of protein synthesis and secretion. The mRNA levels of a constitutive protein (β -actin) and the levels of the majority of

secreted proteins remained unaltered under hypoxic conditions. Hypoxia exposure for 12 to 24 hours exerts no effect on total protein levels in some cell types (Tenan et al, 2000), although prolonged exposures generally decrease the rate of total protein synthesis (Hochachka et al, 1996).

The functional implication of hypoxia-induced inhibition of PRL expression is unclear. Reduction in tissue oxygen concentration is usually associated with numerous cellular, local, and systemic adaptive responses. Reduction in PRL production by pituitary cells could represent a systemic adaptive response to hypoxia. In fact, exposure to hypoxia does affect systemic PRL concentrations in rats (Zhang and Du, 2000) and humans (Bouissou et al, 1987). Placing male rats for 2 hours in hypobaric chambers simulating an altitude of 7 km (7.2% oxygen) reduced the content of PRL in the pituitary gland and in the circulation (Zhang and Du, 2000). Similarly, acute exposure to hypoxia (14.5% oxygen) inhibits the increase in blood PRL induced by maximal exercise in human subjects (Bouissou et al, 1987). At the whole body level, the inhibitory effect of acute hypoxia upon PRL is not entirely unexpected. Hypoxia increases expression of the gene encoding tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in the synthesis of dopamine, which is the main inhibitor of pituitary PRL synthesis and secretion (Czyzyk-krzeska et al, 1994). Furthermore, the effects of blood oxygen partial pressure on PRL levels may be part of a stress-induced response. Hypoxia can activate the hypothalamo-pituitary-adrenocorticoid axis (Chen and Du, 1996), inhibit immune function (Bai et al, 1997), and suppress body growth and reproduction (Du and Li, 1982; Moromisato et al, 1999; Yang et al, 1995).

Nevertheless, here we show that hypoxia acts directly on pituitary lactotrophs to inhibit PRL expression. Although further studies are underway to localize hypoxia-responsive motifs repressing PRL promoter function, our current results suggest that inhibition of PRL expression by a reduction in oxygen supply could have an impact at the local pituitary level, perhaps by promoting neovascularization. Inhibition of PRL expression would limit the production of 16K-PRL, a potent antiangiogenic factor. However, the experiments conducted in GH4C1 cells failed to detect 16K-PRL beyond trace levels. These findings contrast with those detecting 16K-PRL by immunoblotting in the pituitary gland (Shah and Hymer, 1989; Torner et al, 1995) and in pituitary lactotrophs in primary culture (Andries et al, 1992). The reason for this difference is unclear but may relate to the fact that unlike pituitary lactotrophs, which possess dense secretory granules, GH4C1 cells have minimal storage capacity and release PRL rapidly after synthesis (Dannies et al, 1984; Ho et al, 1989). Secretory granules are a possible site for the cleavage of PRL to 16K-PRL, because the putative PRL-protease, cathepsin-D, is active at acidic pH values (<5.5) and PRL granules are acidic (Lorenson et al, 1984). Likewise, because of the acidic pH requirement, proteolysis of PRL may not take place extracellularly in normal tissues but can occur in the extracellular milieu of tumors. Low interstitial pH is a

well-established pathophysiologic characteristic of solid tumors (Helmlinger et al, 1997; Tannock and Rotin, 1989). On average, tumor pH ranges from 6.6 to 7.2 (Helmlinger et al, 2002), although the extracellular space within malignant tissues has been measured to be as low as pH 5.8 (Wike-Hooley et al, 1984a, 1984b). In addition, cancerous tissues and cell lines secrete abnormally high levels of the inactive cathepsin-D precursor (procathepsin-D) (Rochefort et al, 2000), and the tumor environment allows for acid-dependent autoactivation of procathepsin-D to yield cathepsin-D and for the catalytic action of the mature enzyme (Conner, 1989; Morikawa et al, 2000). In fact, cathepsin-D secreted by prostate carcinoma cells is responsible for the generation of angiostatin, a potent endogenous inhibitor of angiogenesis that is produced by tumor-mediated proteolysis of plasminogen (Morikawa et al, 2000).

Consistent with the extracellular generation of 16K-PRL by PRL-secreting tumor cells, acidification of conditioned medium from GH4C1 cells resulted in the proteolytic processing of the secreted hormone to a 16-kDa product. Because this conversion was inhibited by pepstatin-A, and because both procathepsin-D and mature cathepsin-D were detected in acidified GH4C1 conditioned medium, these findings indicate that the cells secrete active cathepsin-D able to generate 16K-PRL under acidic conditions. Interestingly, the degree of conversion of PRL to 16K-PRL was significantly decreased in medium drawn from hypoxic cells, indicating a reduction in secreted cathepsin-D isoforms. Lower levels of both the precursor and the mature protease in hypoxic medium were directly shown by Western blot. When coupled with the decrease in expression of the parent PRL molecule, the suppression of cathepsin-D activity suggests a substantial reduction of 16K-PRL under hypoxic conditions.

In conclusion, our results demonstrate that hypoxia acts in GH4C1 cells to up-regulate VEGF expression and to down-regulate PRL production and cathepsin-D-mediated proteolysis. GH4C1 cells are a clonal strain of rat pituitary tumor cells that have been used extensively to explore mechanisms controlling PRL synthesis and secretion. It would be particularly convenient to extend the present studies in GH4C1 cells to primary cultures of human PRL tumor cells as a better model of the human neoplastic condition, particularly because there are species differences with respect to PRL that have weakened extrapolations from the rat to the human pituitary. For example rat pituitaries can be exquisitely sensitive to induction of prolactinomas by estrogens, whereas a similar role for estrogens in the etiology of human prolactinomas has not been demonstrated (Horvath and Kovacs, 1994).

Although we hesitate to extend results with a cell line to interpretations concerning tumors, it is useful to consider whether these hypoxia-induced mechanisms might play a role in the development of the human disease. Because pituitary adenomas have limited angiogenic capacity (Jugenburg et al, 1995; Turner et al, 2000a, 2000b; Vidal et al, 2000a), it is conceivable

that inhibition of angiogenesis plays a significant role in controlling the dynamics of their progression. Hence, we hypothesize that endocrinologically hyperactive PRL-tumor cells (such as GH3 cells) would generate more 16K-PRL in the extracellular space due to their high release of PRL and cathepsin D into an acidic microenvironment. The increase in 16K-PRL could be important for maintaining reduced vascularization of prolactinomas. Eventually, such reduction would result in hypoxic areas able to counteract 16K-PRL inhibition by stimulating the expression of VEGF and by decreasing the generation of 16K-PRL via reduced expression of PRL and lower availability of mature cathepsin-D. Although these mechanisms are consistent with the observation that macroprolactinomas are the most vascularized of pituitary adenomas (Turner et al, 2000a), these tumors continue to be less vascularized than the normal tissue (Turner et al, 2000a), indicating that inhibition of angiogenesis is still important and may reflect the action of remaining antiangiogenic factors, including 16K-PRL.

It should be emphasized that tumor angiogenesis depends on the interplay of multiple regulatory factors. Here, we are proposing the interaction of two that are important in the pituitary gland, but it is clear that much more information is needed to form the complete picture of this interaction. For example, 16K-PRL is known to inhibit the angiogenic action of VEGF (Clapp et al, 1993); however, its potency relative to that of VEGF has not been determined, nor its concentration in the pituitary gland adequately measured.

In addition to promoting angiogenesis, hypoxia-induced down-regulation of PRL and cathepsin-D activity can affect other mechanisms limiting the progression of prolactinomas. PRL can act as an autocrine growth factor within the pituitary itself, because it stimulates the proliferation of GH3 cells (Krown et al, 1992), and both GH3 cells and normal lactotrophs express PRL receptors (Krown et al, 1992; Morel et al, 1994). In addition, cathepsin-D can promote tumor invasiveness by stimulating cell growth (Glondou et al, 2001; Liaudet et al, 1995), by reducing contact inhibition (Liaudet et al, 1995; Rochefort and Liaudet-Coopman, 1999; Rochefort et al, 2000), and by digestion of extracellular matrix components (Briozzo et al, 1988; Heylen et al, 2002). Thus, our findings suggest new pathways contributing to the slow growth and limited invasiveness of prolactinomas and warrant further investigation.

Materials and Methods

Cell Culture

GH4C1 cells are a subclone of the cell line GH3 isolated in 1966 from pituitary tumors that had been induced by x-irradiation and found to produce both growth hormone and PRL (Tashjian et al, 1970). The stock line was maintained between passages 3 and 10. GH4C1 cells were cultured in F10 medium (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) supplemented with 15% heat-inactivated horse serum (GIBCO, Invitrogen

Corporation, Carlsbad, California), 2.5% heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO, Invitrogen Corporation), and penicillin-streptomycin at 37° C in 5% CO₂. All hypoxia experiments were performed using a standard Plexiglas chamber (Bellco Glass, Vineland, New Jersey) under standard tissue culture conditions for pressure, humidity, and temperature. The chamber was deoxygenated by positive infusion of a 5% CO₂-95% nitrogen gas mixture. During the experiment, O₂% saturation was maintained at 0.1% and was continuously monitored with an ambient oxygen sensor (BW Technologies, Arlington, Texas). Subconfluent GH4C1 cell cultures (2 × 10⁶ cells/100 mm plates) were plated and incubated in supplemented F10 medium for 12 hours, then incubated in deoxygenated low-serum Opti-MEM I medium (GIBCO, Invitrogen Corporation) supplemented with antibiotics for 12 hours before exposure to hypoxia for 12 to 36 hours. The medium was changed to fresh deoxygenated Opti-MEM I at the beginning of the experiment. Cells under normoxic conditions were treated identically, except that Opti-MEM and the chamber were maintained at normal oxygen concentrations (20%). At the end of incubation, the number of viable cells was estimated by the dye exclusion method (Harlow and Lane, 1988).

RT-PCR

Total RNA was isolated using the guanidinium isothiocyanate method (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA (5 µg) was reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin) and random hexamers (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana). All PCR reactions and primers used for VEGF and the internal control, ribosomal protein L19, were done as described previously (Ochoa et al, 2000). Briefly, PCR reactions were performed using the following primers for VEGF: antisense primer 5'-GCTCTCTTGGGTGCACTGGA-3' and sense primer 5'-CACCGCCTTGGCTTGTCACA-3' (Nakamura et al, 1996), with expected sizes of 635, 563, and 431 bp for amplification of VEGF188, VEGF164, and VEGF120, respectively. Primers for the internal control, ribosomal protein L19, were antisense primer 5'-CGAAATCGCCAATGCCAACTC-3' and sense primer 5'-TCGTCCATGAGAAATCCGCTTG-3', with an expected size of 333 bp. The PCR conditions were as follows: denaturation at 95° C for 30 seconds, annealing at 65° C for 45 seconds, and extension at 72° C for 45 seconds, for 28 cycles. PCR products were separated on a 2% agarose gel, visualized using ethidium bromide, photographed, and analyzed by scanning densitometry.

Northern Blot

Total RNA was prepared as previously described (Chomczynski and Sacchi, 1987), and 10 µg was analyzed by Northern blot as described elsewhere (Sambrook and Russell, 2001). RNA subjected to electrophoresis was transferred to Hybond-N nylon

membranes (Millipore, Billerica, Massachusetts), cross-linked, prehybridized at 63° C (1 hour), and hybridized (8–12 hours) at 63° C with rat PRL or β -actin probes. The complete cDNA for rat PRL was used as a probe (generously supplied by R. Maurer, Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon). The β -actin probe was prepared by RT-PCR from rat fibroblasts. The β -actin primers were the sense primer 5'-ATGGTGGGAATGGGTGTCAGAA-3' and the antisense primer 5'-TCGTACTCCTGCTTGCTGA-3'. The probes were labeled with [α -³²P]dCTP using the random primer procedure (Feinberg and Vogelstein, 1983). Autoradiography followed posthybridization washes. PRL and β -actin mRNA expression was quantified using scanning densitometry.

GH4 Lysates and Conditioned Media

After hypoxic exposure, conditioned media were collected, clarified by centrifugation (1200 ×g/10 minutes), concentrated 10 times (Centricon 3; Amicon Millipore, Billerica, Massachusetts), and stored at -70° C. Cells were lysed in 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 µg/ml aprotinin, and 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma).

Western Blot Analysis

Eleven micrograms of total protein from GH4C1 cell lysates or 170 ng of protein from conditioned media was mixed with electrophoresis sample buffer containing β -mercaptoethanol, boiled, and resolved in a 15% SDS-polyacrylamide gel for PRL analysis and β -actin, and in a 12% SDS-polyacrylamide gel for cathepsin-D analysis. Gels were blotted onto nitrocellulose membranes and probed with a 1:1000 dilution of a locally produced anti-PRL antiserum or with 0.8 µg/µl of anti-cathepsin-D polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California). β -actin was detected by using a 1:250 dilution of a monoclonal anti-actin (mouse ascites fluid, clone AC-40; Sigma). The proteins were detected by using enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) or the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Optical density values were determined using 1D image analysis software v3-5 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York).

Silver Staining

Serum-free conditioned medium drawn from 6.5 × 10⁴ GH4C1 cells grown under normoxia or hypoxia was precipitated with trichloroacetic acid. Proteins were subjected to electrophoresis on a reducing 10% SDS-PAGE. Silver staining was performed according to the method described (Bollag et al, 1996).

ELISA

ELISA was performed as described elsewhere (Dueñas et al, 1999), using wells coated with 10 ng of

PRL, a 1:4000 dilution of locally raised anti-PRL anti-serum, and a 1:5000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pennsylvania). Bound horseradish peroxidase-conjugated antibodies were revealed by reaction with o-phenylenediamine dihydrochloride in the presence of hydrogen peroxide. Optical density was measured at 490 nm.

PRL Cleavage Analyses

The activity of the enzymes that cleave PRL to 16K-PRL was assayed as described previously (Clapp, 1987) with the following modifications: briefly, 650 ng (5 μ l) of conditioned media was mixed with 5 μ l of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) and 10 μ l of reaction buffer (0.1 M citrate-phosphate, 0.15 M NaCl, pH 5.0) for 24 hours at 37° C. The final pH of the reaction mixture was 5.6. The PRL cleavage products were determined by reducing SDS-PAGE and Western blot analyses. Immunoreactive bands were quantified using scanning densitometry.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SE of at least three replicates. Means were compared using either Student's *t* test or ANOVA followed by Fisher's test for post-hoc comparisons. All PCR and blotting experiments included a control gene or protein that was used to verify identical initial conditions. Because of nonlinearity in signal strength between the experimental and control bands, in some instances the 12-hour normoxia group was used as a baseline to normalize the data. In these instances, the 12-hour normoxia group was not included in the ANOVA, and post-hoc comparisons to this group were made with respect to the normalized mean.

Acknowledgements

We thank G. Nava, A. Prado, D. Mondragón, M. García, and P. Galarza for their expert technical assistance, and D.D. Pless for editing the manuscript.

References

Andries M, Tilemans D, and Deneef C (1992). Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochem J* 15:393-400.

Bai HB, Du JZ, and Jia HW (1997). Inhibition effect of hypoxia on humoral immunity of rats. *Acta Physiologica Sinica* 49: 167-172.

Baldocchi RA, Tan L, King DS, and Nicoll CS (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: Evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133:935-938.

Banerjee SK, Sarkar DK, Weston AP, De A, and Campbell DR (1997). Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced

rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* 18:1155-1161.

Berchem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, and Liaudet-Coopman E (2002). Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: Proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 21:5951-5955.

Berk JL, Massoomi N, Hatch C, and Goldstein RH (1999). Hypoxia downregulates tropoelastin gene expression in rat lung fibroblasts by pretranslational mechanisms. *Am J Physiol* 277:L566-L572.

Bollag DM, Rozycki MD, and Edelman SJ (1996). *Protein methods*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.

Bouissou P, Brisson GR, Peronnet F, Helie R, and Ledoux M (1987). Inhibition of exercise-induced blood prolactin response by acute hypoxia. *Can J Sport Sci* 12:49-50.

Briozzo P, Morisset M, Capony F, Rougeot C, and Rochefort H (1988). In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Res* 48:3688-3692.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, and Dewhirst MW (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56:941-943.

Bunn HF and Poyton RO (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia (Review). *Physiol Rev* 76:839-885.

Chen Z and Du JZ (1996). Hypoxia effects on hypothalamic corticotropin-releasing hormone and anterior pituitary cAMP. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 17:489-492.

Chomczynski P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

Clapp C (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: Characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121:2055-2064.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, and Weiner RI (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299.

Conner GE (1989). Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography: Autocatalytic proteolysis of the zymogen form of the enzyme. *Biochem J* 263:601-604.

Corbacho AM, Martinez de la Escalera G, and Clapp C (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis (Review). *J Endocrinol* 173:219-238.

Cunnah D and Besser M (1991). Management of prolactinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 34:231-235.

Czyzyk-krzeska MF, Furnari BA, Lawson EE, and Millhom DE (1994). Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biol Chem* 269:760-764.

Dannies PS, Kiino DR, and Amara JF (1984). Estrogen effects on prolactin storage and cell growth in GH cells. In: Mena F and Valverde-RC, editors. *Prolactin secretion: A multidisciplinary approach*. Orlando: Academic Press, 121-140.

- Du JZ and Li QF (1982). Effects of simulated hypoxia acclimation on organism, organ and hematology in *Ochotona curzoniae* and rats. *Acta Theriologica Sinica* 2:35-42.
- Dueñas Z, Tomer L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, Lopez-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martinez de la Escalera G, and Clapp C (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2498-2505.
- Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Kiefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, and Alitalo K (1997). Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 14: 2475-2483.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Folkman J (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4-6.
- Glondou M, Coopman P, Laurent-Matha V, Garcia M, Rochefort H, and Liaudet-Coopman E (2001). A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene* 20:6920-6929.
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, and Giaccia AJ (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.
- Harlow E and Lane D (1988). *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 256.
- Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, and Jain RK (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 8:1284-1291.
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, and Jain RK (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3:177-182.
- Heylen N, Vincent LM, Devos V, Dubois V, Rémacle C, and Trouet A (2002). Fibroblasts capture cathepsin D secreted by breast cancer cells: Possible role in the regulation of the invasive process. *Int J Oncol* 20:761-767.
- Ho TW, Greenan JR, and Walker AM (1989). Mammothyporegulation: The differential roles of the 24K isoforms of prolactin. *Endocrinology* 124:1507-1514.
- Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, and Land SC (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9493-9498.
- Hockel M and Vaupel P (2001). Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects (Review). *J Natl Cancer Inst* 93:266-276.
- Horvath E and Kovacs K (1994). Morphology of adenohypophyseal cells and pituitary adenomas. In: Imura H, editor. *The pituitary gland*, 2nd ed. New York: Raven Press, 29-62.
- Jugenburg M, Kovacs K, Stefaneanu L, and Scheithauer BW (1995). Vasculature in nontumorous hypophyses, pituitary adenomas and carcinomas: A quantitative morphologic study. *Endocr Pathol* 6:115-124.
- Krown KA, Wang YF, Ho TW, Kelly PA, and Walker AM (1992). Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH3 cells. *Endocrinology* 131:595-602.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, and Weiner RI (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: Activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139:3696-3703.
- Liaudet E, Derocq D, Rochefort H, and Garcia M (1995). Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors. *Cell Growth Differ* 6:1045-1052.
- Lohrer P, Gloddek J, Hopfner U, Losa M, Uhl E, Pagotto U, Stalla GK, and Renner U (2001). Vascular endothelial growth factor production and regulation in rodent and human pituitary tumor cells in vitro. *Neuroendocrinology* 74:95-105.
- Lorenson MY, Miska SP, and Lacobs LS (1984). Molecular mechanism of prolactin release from pituitary secretory granules. In: Mena F and Valverde-RC, editors. *Prolactin secretion: A multidisciplinary approach*. Orlando: Academic Press, 141-160.
- Lou Y, Oberpriller JC, and Carlson EC (1997). Effect of hypoxia on the proliferation of retinal microvessel endothelial cells in culture. *Anat Rec* 248:366-373.
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, and Weiner RI (2000). The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol* 14:1536-1549.
- Minchenko A, Bauer T, Salceda S, and Caro J (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71:374-379.
- Morel G, Ouhit A, and Kelly PA (1994). Prolactin receptor immunoreactivity in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59:78-84.
- Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Takemoto S, Ono M, Fukushi J, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S, and Kuwano M (2000). Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 275:38912-38920.
- Moromisato DY, Moromisato MY, Brasel JA, and Cooper DM (1999). Effect of growth hormone therapy in mitigating hypoxia-induced and food restriction-induced growth retardation in the newborn rat. *Crit Care Med* 27:2234-2238.
- Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, Yamada K, Hayashi S, Yo Y, Nakano H, Matsumoto K, Nakamura T, and Ogihara T (1996). Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: Additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens* 14:1067-1072.
- Niinikoski J, Hunt TK, and Dunphy JE (1972). Oxygen supply in healing tissue. *Am J Surg* 123:247-252.
- Ochoa AL, Mitchner NA, Paynter CD, Morris RE, and Ben-Jonathan N (2000). Vascular endothelial growth factor in the rat pituitary: Differential distribution and regulation by estrogen. *J Endocrinol* 165:483-492.
- Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P, and Jaquet P (1988). Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: Immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and non-glycosylated forms. *Endocrinology* 122:2667-2674.

- Richard DE, Berra E, and Pouyssegur J (1999). Angiogenesis: How a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 266:718-722.
- Rochefort H, Capony F, and Garcia M (1990). Cathepsin D in breast cancer: From molecular and cellular biology to clinical applications. *Cancer Cells* 2:383-388.
- Rochefort H, Garcia M, Glondu M, Laurent V, Liaudet E, Rey JM, and Roger P (2000). Cathepsin D in breast cancer: Mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta* 291:157-170.
- Rochefort H and Liaudet-Coopman E (1999). Cathepsin D in cancer metastasis: A protease and a ligand. *APMIS* 107:86-95.
- Sambrook J and Russell DW (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schechter J (1972). Ultrastructural changes in the capillary bed of human pituitary tumors. *Am J Pathol* 67:109-126.
- Shah GN and Hymer WC (1989) Prolactin variants in the rat adenohypophyses. *Mol Cell Endocrinol* 61:97-107.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, and Keshet E (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
- Sinha YN and Gilligan TA (1984). A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: Identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* 114:2046-2053.
- Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, and Markoff E (1985). Cleaved prolactin: Evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 60:239-243.
- Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, and Bashford CL (2000). Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* 6:15-19.
- Tannock IF and Rotin D (1989). Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* 49:4373-4384.
- Tashjian AH Jr, Bancroft FC, and 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* 47:61-70.
- Tenan M, Fulci G, Albertoni M, Diserens AC, Hamou MF, El Atfi-Borel M, Feige JJ, Pepper MS, and Van Meir EG (2000). Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med* 191:1789-1798.
- Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez de la Escalera G, and Clapp C (1995). A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136:5454-5460.
- Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, and Wass JA (2000a). Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1159-1162.
- Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, and Wass JA (2000b). Angiogenesis in pituitary adenomas: Relationship to endocrine function, treatment and outcome. *J Endocrinol* 165:475-481.
- Vidal S, Oliveira MC, Kovacs K, Scheithauer BW, and Lloyd R (2000a). Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in the GH3 cell line. *Cell Tissue Res* 300:83-88.
- Vidal S, Scheithauer BW, and Kovacs K (2000b). Vascularity in nontumorous human pituitaries and incidental microadenomas: A morphometric study. *Endocr Pathol* 11:215-227.
- Warner MD, Sinha YN, and Peabody CA (1993). Growth hormone and prolactin variants in normal subjects: Relative proportions in morning and afternoon samples. *Horm Metab Res* 25:425-429.
- Wike-Hooley JL, Haveman J, and Reinhold HS (1984a). The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol* 2:343-366.
- Wike-Hooley JL, Van der Zee J, van Rhoon GC, Van den Berg AP, and Reinhold HS (1984b). Human tumour pH changes following hyperthermia and radiation therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20:619-623.
- Yang SM, Du JZ, and Li LC (1995). Effect of hypoxia on the development of hypothalamic corticotropin-releasing factor of neonatal rats. *Chin J Appl Physiol* 12:294-297.
- Zhang YS and Du JZ (2000). The response of growth hormone and prolactin of rats to hypoxia. *Neurosci Lett* 279:137-140.