



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

EFFECTOS DE INTERLEUQUINA-6 EN LA REGULACIÓN DE LA
PROLIFERACIÓN Y SENESCENCIA DE CÉLULAS HIPOFISARIAS
NORMALES Y TUMORALES EN CULTIVO PRIMARIO

Tesinista

Lic. Genovese, Darío Martín

Directora

Dra. De Paul, Ana Lucía

Lugar de Trabajo

Centro de Microscopía Electrónica. Instituto de Investigaciones en
Ciencias de la Salud (INICSA-CONICET).

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba,
Córdoba, Argentina.

Efectos de Interleuquina-6 en la regulación de la
proliferación y senescencia de células hipofisarias
normales y tumorales en cultivo primario

Tribunal examinador:

Dra. Franchi, Nilda Anahí

Dra. Rivarola, María Angélica

Dra. Vivas, Laura Marta

Fecha: 25 de agosto de 2017

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas que, con su apoyo intelectual y emocional, han hecho posible la realización de esta tesina de grado, ayudándome a finalizar la hermosa carrera Ciencias Biológicas:

- A mis padres, Rubén Mario y Liliana Isabel Luisa, quienes me enseñaron la importancia del saber, y a vivir en la perseverancia y el desafío personal.
- Al resto de mi familia, quienes pacientemente observan mis pasos.
- A la directora del Centro de Microscopía Electrónica, Dra. Alicia Inés Torres, quien generosamente me abrió las puertas del establecimiento.
- A mi directora de tesina, Dra. Ana Lucía De Paul, quien con sus conocimientos y gran experiencia me ha sostenido firmemente.
- A la Dra. María Eugenia Sabatino y al Biol. Ezequiel Grondona, por sus continuas y esclarecedoras orientaciones respecto a las diferentes técnicas desarrolladas en la presente tesina.
- Al resto de los profesores y personal de apoyo U.N.C. y CONICET del Centro de Microscopía Electrónica, así como también a los becarios, que allí se desempeñan con tenacidad día tras día, quienes generosamente contribuyeron en mi formación integral.
- A mis compañeras y compañeros de carrera, que se convirtieron en auténticos amigos, acompañándome en todo momento. Entre ellos destaco especialmente a Virginia, Victoria, Patricia, Pablo, Micaela, Mariana, María de los Ángeles, Marcela, Luna, Luciana, Helena, Erika, Daniela, Dahyana, Carolina, Bettina y Alejandro.

A mis “mundos paralelos”, aquellos que me reconstruyen a diario con su dinámica, con sus desafíos, con su magia... el ajedrez, la ciencia, la salud, la docencia y, por supuesto, la pasión y el amor... mis pasiones y mis amores...

ÍNDICE

Resumen	01
Introducción	03
Objetivos e Hipótesis	16
Materiales y Métodos	17
Resultados	26
Discusión	36
Conclusión	42
Bibliografía	43

RESUMEN

La senescencia celular es actualmente considerada una respuesta al estrés y está caracterizada por un arresto estable del ciclo celular acompañado de aumentos en la expresión de diferentes citoquinas, entre ellas interleuquina 6 (IL-6), la cual es necesaria para la inducción y mantenimiento de este proceso. En el presente trabajo de Tesina se propuso evaluar, *in vitro*, los efectos de IL-6 exógena y endógena sobre la proliferación y senescencia de células hipofisarias normales y tumorales.

Para este fin se realizaron cultivos primarios adenohipofisarios de ratas macho Wistar adultas a las que se indujo el desarrollo tumoral mediante la implantación subcutánea de capsulas de silástico conteniendo benzoato de estradiol (10mg) durante 40 días (E40). Animales controles fueron implantados con capsulas vacías (n=8/cultivo). Al quinto día de cultivo, las células fueron expuestas a IL-6 exógena (1-10ng/ml; 24h) en tanto que los efectos de IL-6 endógena fueron evaluados mediante el desafío con lipopolisacárido bacteriano (LPS; 0,1-2µg/ml; 24h). Además, las células fueron incubadas con Brefeldin-A, bloqueante de la secreción (BFA; 0,1µg/ml; 2h) o con BAY, inhibidor de la translocación nuclear de NF-κB (1µg/ml, 24h) solos o combinados con LPS. Con posterioridad a los tratamientos se evaluó: la actividad de β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal) por ensayos citoquímicos; la proliferación celular mediante la inmunodetección de Ki67; la expresión de IL-6 por inmunofluorescencia (IF); secreción esta citoquina mediante ELISA y la expresión del factor de transcripción NF-κB por western blot. Para el análisis estadístico de los datos, se empleó MLGM y Test de Fisher (p<0,05).

En hipófisis normales, IL-6 exógena disminuyó tanto el número de células senescentes como proliferantes. Sin embargo, en E40, IL-6 incrementó el porcentaje de células SA-β-gal positivas acompañado por una disminución en la proliferación celular. El desafío con LPS indujo la translocación nuclear de NF-κB, estimuló la secreción de IL-6 y aumentó el número de células senescentes normales y tumorales, mientras que sólo promovió la proliferación celular en contextos tumorales. En cultivos tratados BFA+LPS, el bloqueo de la secreción de IL-6 inhibió la capacidad de LPS de aumentar el número de células senescentes, exponiendo que la inducción de senescencia requiere de la secreción de factores al medio. La inhibición de la translocación de NF-κB mediante BAY reveló que este factor es un importante regulador del balance en las respuestas senescente y proliferativa.

Los resultados obtenidos permiten evidenciar la contribución de IL-6 en la regulación de la proliferación y senescencia hipofisarias en contextos normales y tumorales, con la participación de NF- κ B como modulador de las respuestas al estrés celular. Dada la gran relevancia funcional de esta glándula endocrina en el organismo, la emergencia de la senescencia celular constituye, indudablemente, una de las variadas respuestas tisulares de la hipófisis frente a lesiones proliferativas y su rol adquiere relevancia en la fisiopatogenia del tumor hipofisario a fin de regular su crecimiento descontrolado.

INTRODUCCIÓN

En la evolución de los organismos superiores fue necesario el desarrollo de dos mecanismos conducentes al control y coordinación de las funciones de los diferentes órganos: el sistema nervioso y el sistema endocrino. El eje hipotálamo-hipofisario, uno de los ejemplos de esta integración funcional, está encargado de la integración de las señales provenientes del medio externo e interno, coordinando respuestas mediante la producción y secreción de neurotransmisores o neurohormonas que impactan en la actividad de sus órganos blanco.

El eje hipotálamo-hipofisario participa en la regulación del crecimiento somático, la maduración de las gónadas, la adaptación de la corteza adrenal al estrés, la secreción de leche, la liberación de hormonas tiroideas y la excreción de agua en el riñón. También contribuye a la regulación de la presión sanguínea y del gasto energético global del organismo (Figura 1).

En el organismo, el sistema endócrino, cuyo parénquima está formado por células de secreción interna, se distribuye de manera difusa o conforma poblaciones celulares localizadas dentro de órganos, constituyendo las glándulas endócrinas. Entre éstas se destaca la hipófisis, o glándula pituitaria, situada en la base del cráneo, dentro de la silla turca del hueso esfenoides, por debajo del cerebro, al que está unido por el tallo pituitario y múltiples conexiones vasculares.

1. Glándula hipófisis

1.1 Morfofisiología hipofisaria

La hipófisis está compuesta por dos partes histológica y funcionalmente diferenciadas, incluso poseen orígenes embriológicos diferentes. Esta glándula está conformada por una porción nerviosa, denominada neurohipófisis, originada a partir del techo del tercer ventrículo, y una porción epitelial, la adenohipófisis, derivada embriológicamente de una extensión de la bolsa de Rathke.

La neurohipófisis está constituida por la eminencia media, el tallo infundibular y la *pars nervosa*. En esta última se encuentran los axones de las neuronas de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular que secretan las hormonas vasopresina y oxitocina, respectivamente, ante la llegada de estímulos específicos (Figura 2).

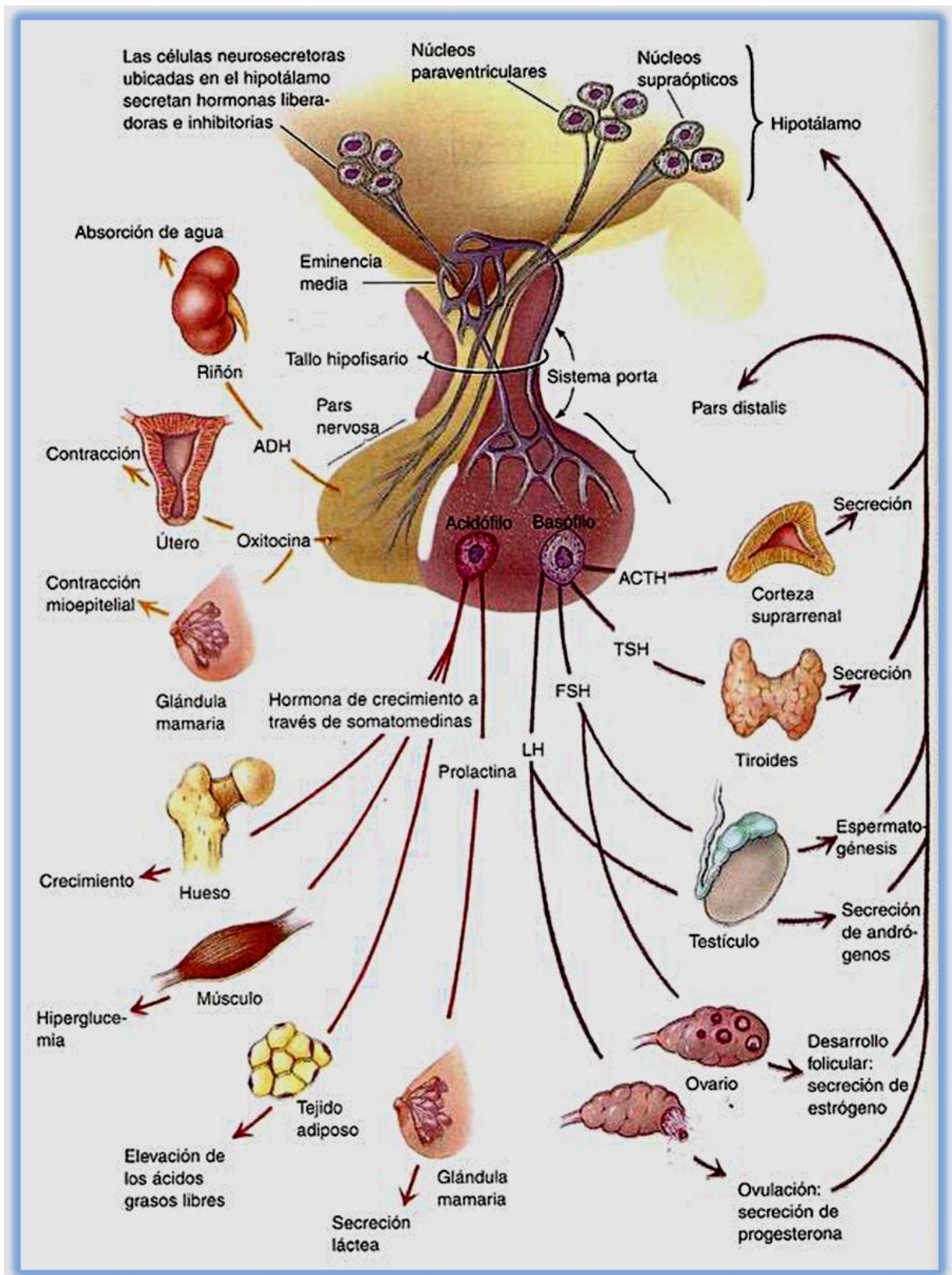


Figura 1. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipofisario-órganos blanco. Extraído de Atlas Color de Histología de Gartner y Hiatt (1998).

La adenohipófisis está conformada por diferentes poblaciones celulares endocrinas y no endócrinas y su actividad funcional se encuentra finamente regulada por el balance de señales centrales, periféricas e intrínsecas de la glándula. Comprende la *pars distalis* o lóbulo anterior, *pars tuberalis* y *pars intermedia*. La adenohipófisis sintetiza, almacena y secreta productos hormonales que controlan y regulan el desarrollo anatómico y funcional de la mayoría de las glándulas endocrinas, por lo que se la considera el órgano central del sistema endocrino o glándula maestra.

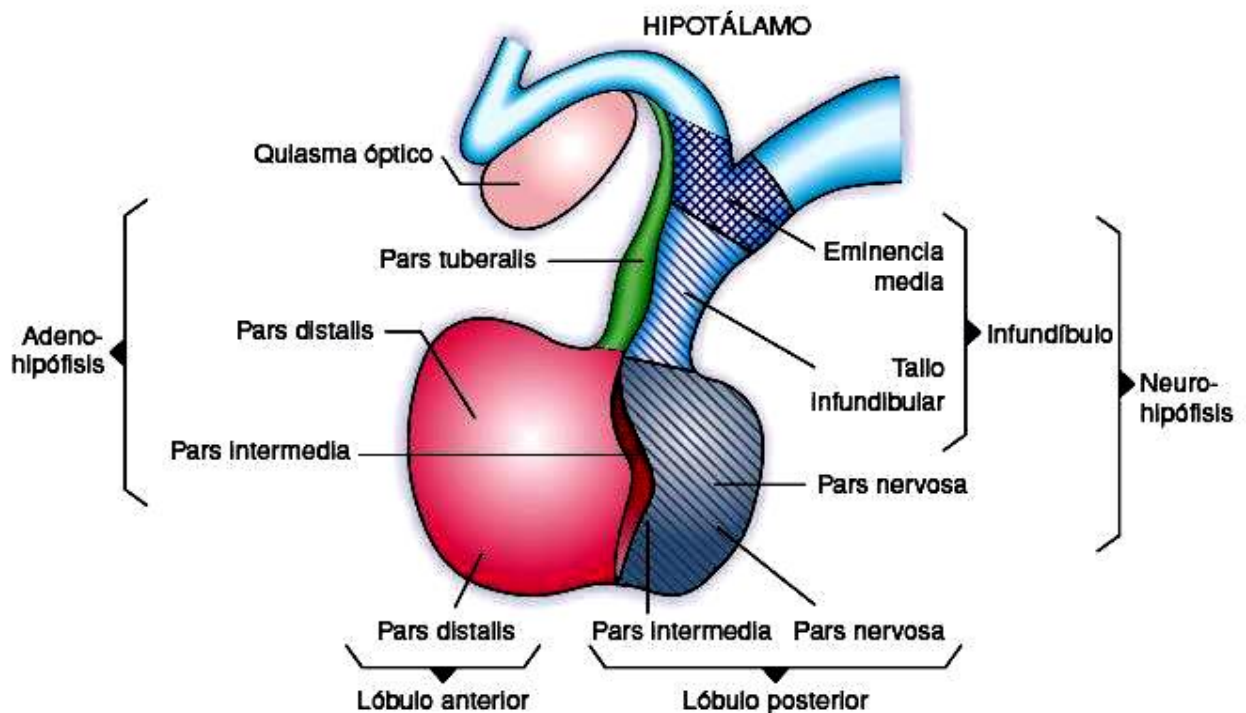


Figura 2. Esquema de glándula hipófisis con sus componentes anatómicos. Extraído de Histología y Embriología Humanas. Bases celulares y moleculares con orientación clínico-patológica, Eynard, Valentich y Rovasio (2016).

La *pars distalis* o lóbulo anterior, objeto de nuestro estudio, es la porción más voluminosa de la glándula (75%). Está delimitada por una cápsula de tejido conectivo denso y presenta un estroma de fibras reticulares, las que forman una red tridimensional que sostiene al parénquima glandular, compuesto de cordones de células epiteliales relacionados con capilares sanguíneos fenestrados. Esta porción hipofisaria es responsable de la síntesis y liberación de seis hormonas: prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona tirotrófica (TSH), adrenocorticotrofina (ACTH), hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH).

Estos diferentes productos hormonales son sintetizados por cinco poblaciones celulares secretoras altamente diferenciadas: células lactotropas, somatotropas, tirotropas, corticotropas y gonadotropas, las cuales son claramente identificadas, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), por las características morfológicas de sus gránulos secretorios, siendo además su identidad confirmada mediante técnicas inmunocitoquímicas (Kim y col., 1985; Orghero de Gaisan y col., 1997).

1.2. Tumores hipofisarios

Como principal coordinadora de la homeostasis del sistema endocrino, la hipófisis manifiesta fluctuaciones dinámicas y plásticas en respuesta a señales provenientes de la periferia y órganos centrales, así como también de las generadas a nivel local (Melmed, 2003). De esta manera, la glándula se adapta a los requerimientos hormonales y metabólicos de entornos en permanente cambio desencadenando la secreción hormonal y/o la proliferación celular de las diferentes poblaciones que componen el parénquima hipofisario (Levy, 2002; Taniguchi y col., 2002). Aunque la secreción hormonal trófica es controlada de manera precisa, son frecuentes las alteraciones en el crecimiento celular que pueden conducir al desarrollo hiperplásico y a la liberación de altos niveles hormonales, usualmente relacionados con la formación de adenomas (Asa y Ezzat, 2009; Chesnokova y Melmed, 2015).

Los adenomas hipofisarios son afecciones muy frecuentes en la población adulta. Estudios de autopsias e imágenes indican una prevalencia de 10 a 25%, valores que aumentan con la edad, afectando igualmente a ambos sexos (Asa y Ezzat, 2009). La inmensa mayoría de los adenomas hipofisarios permanecen clínicamente ocultos y estables en tamaño. A pesar de su alta prevalencia, los tumores hipofisarios son en su mayoría benignos y, aunque ocasionalmente pueden mostrar un crecimiento local agresivo, se desarrollan lentamente y fallan en el progreso hacia la malignidad (Chesnokova y Melmed, 2015; Mooi, 2009).

Alteraciones genéticas, estimulación hormonal sostenida, así como incrementos en la expresión de factores de crecimiento y de transcripción de proteínas involucradas en la transducción de señales, contribuyen en la génesis de adenomas hipofisarios (Melmed, 2003). A este respecto, existen dos principales hipótesis sobre la génesis del tumor hipofisario. Una de ellas sostiene que los adenomas surgirían a partir de la transformación en una única célula a causa de un evento mutacional que luego llevaría

a la proliferación celular bajo el efecto de las hormonas y factores de crecimiento originando un tumor monoclonal. La segunda hipótesis plantea que factores de crecimiento y hormonas hipotalámicas inducirían hiperplasia hipofisaria, en donde una mutación en una célula hiperplásica lleva a la formación de tumores.

Los mecanismos que explican por qué estos tumores raramente adquieren un perfil invasivo y metastásico no son totalmente claros, aún cuando sean activadas vías oncogénicas o bien cuando se inactiven vías supresoras tumorales. Estas particularidades de los adenomas hipofisarios han llevado a la hipótesis de que existirían procesos adicionales intrínsecos que actuarían como mecanismos de protección anti-proliferativo.

1.3. Interacción inmuno-endocrina a nivel hipofisario

Es ampliamente conocido que la asociación entre el sistema inmune y neuroendocrino, mediada a través de citoquinas y hormonas, resulta fundamental para superar de manera óptima eventos patológicos como la inflamación y la infección. (Besedovsky y del Rey, 1996; Malarkey y Mills, 2007). Además, se sabe que citoquinas producidas por el sistema inmune pueden afectar y modificar la secreción de células hipofisarias, y éstas a su vez, mediante mecanismos de retroalimentación, son capaces de modular la producción de citoquinas desde células inmunes. En esta interacción inmuno-endocrina adaptativa participan diversas citoquinas como interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina 6 (IL-6) entre otras (Besedovsky y del Rey, 1996; Renner y col., 2009).

En particular, IL-6, considerada citoquina «endocrina», ejerce una gran influencia sobre la actividad de la glándula hipófisis regulando la producción hormonal y la proliferación celular (Renner y col., 2009). Es un potente estimulador del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y ejerce un destacado rol en la interacción inmuno-endocrina en los procesos inflamatorios e infecciosos. Incrementos de TNF- α , IL-1 e IL-6 circulantes inducen un aumento sistémico de glucocorticoides por la estimulación combinada de los factores liberadores de corticotropinas (CRH), ACTH y glucocorticoides adrenérgicos (Chrousos, 1995). Esta suma de eventos se desencadena a fin de evitar mecanismos de autodestrucción inducidos por el sistema inmune, que podrían conducir al síndrome de shock séptico.

A nivel hipofisario, IL-6 está altamente asociada a la interacción inmuno-endocrina y se ha descrito que su expresión y efectos difieren en glándulas normales y en los

adenomas hipofisarios (Kurotani y col., 2001; Arzt, 2001). En hipófisis normal, IL-6 es producida casi exclusivamente por las células foliculo estrelladas (FS), un tipo celular no endócrino, cuya secreción es inducida por diferentes factores locales entre ellos TNF- α e IL-1, estimulando a su vez la síntesis y liberación de hormonas e inhibiendo la proliferación de las células endocrinas (Renner y col., 2009) (Figura 3).

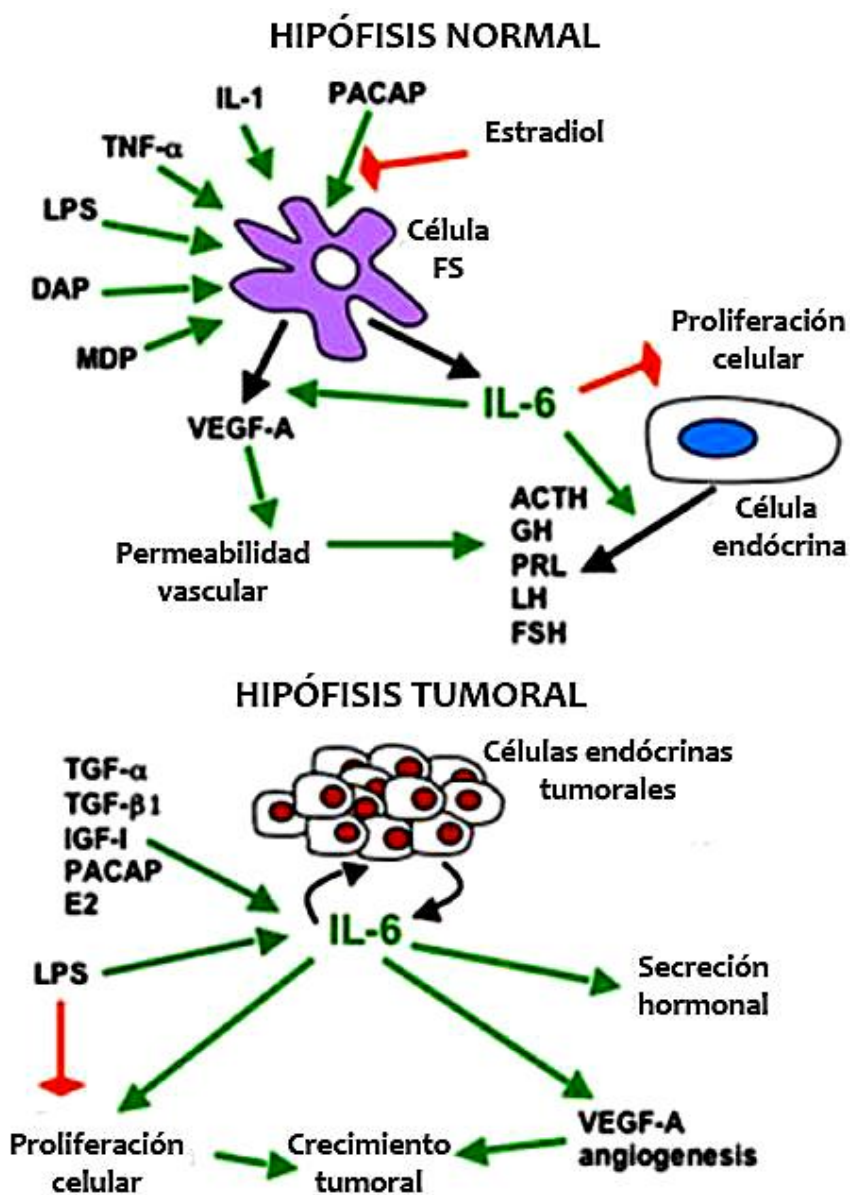


Figura 3. Contribución de IL-6 en la regulación de la función hipofisaria en contextos fisiológicos y tumorales. Adaptado de Renner y col., 2009.

Contrariamente, en un contexto tumoral la población de células FS es escasa y son las propias células tumorales endocrinas las que emergen como fuente adicional de IL-6 promoviendo la proliferación celular (Haedo y col., 2009) y la liberación de PRL y GH (Arzt y col., 1993). En estos adenomas hipofisarios, se ha descrito que las FS se localizan entre las zonas de tejido normal y tumoral (Yamashita y col., 2005) y se ha

postulado que la IL-6 secretada por las FS actuaría de manera paracrina promoviendo el desarrollo del adenoma (Haedo y col., 2009).

La producción de IL-6 intrahipofisaria puede ser también inducida por la activación del receptor del sistema inmune Toll-like 4 (TLR4) el cual ha sido bien caracterizado por su capacidad de reconocimiento al lipopolisacárido bacteriano (LPS), componente integral de la pared externa de bacterias Gram-negativas (Bosshart y Heinzelmann, 2007). A nivel hipofisario, TLR4 está localizado en células FS (Lohrer y col., 2000) y en corticotropas tumorales, y participa en la regulación de la proliferación celular de adenomas hipofisarios (Tichomirowa y col., 2005). En nuestro laboratorio demostramos por primera vez la presencia del receptor TLR4 funcional en células lactotropas normales e hiperplásicas cuya activación, inducida por LPS, afectó la proliferación celular solamente bajo un contexto de hiperplasia hipofisaria inducida por estrógeno (Sabatino y col., 2013). Estos resultados, permiten afirmar la existencia de una interacción LPS-TLR4 poniendo de relieve la importancia de la comunicación inmuno-endocrina a nivel hipofisario.

En suma, considerando que la fuente y acción de IL-6 intrahipofisaria dependerían tanto del estado fisiológico de la glándula como de los mecanismos intracelulares activados, la implicancia de esta citoquina sobre la fisiopatología de los adenomas de hipófisis es indudable pero controvertida.

2. Senescencia Celular: una barrera intrínseca a la tumorigénesis

La senescencia celular es un programa de transducción de señales que conduce a un arresto irreversible del ciclo, acompañado por un conjunto de cambios en el fenotipo celular (Shay y Roninson, 2004). Este mecanismo se diferencia del estado de quiescencia dado que, este último, consiste en un arresto reversible del ciclo celular. Ante la presencia de estímulos adecuados, la célula quiescente reanuda su entrada al ciclo (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

El mecanismo de senescencia celular fue descubierto hace más de cuatro décadas cuando Hayflick y col. (1965) observaron que las células en cultivo tenían un número finito de divisiones y que las mismas, una vez arrestadas, no crecían a pesar de la presencia de nutrientes y factores de crecimiento en el medio.

La senescencia ha sido descrita como un potente mecanismo regulador de la proliferación, y por lo tanto protector anti-tumoral, controlado por una red de genes

supresores de tumores (Caino y col., 2009) proceso que debe ser superado para desencadenar el desarrollo maligno (Collado y Serrano, 2010).

Determinadas características fenotípicas definen a las células senescentes. Éstas adquieren una morfología aplanada y de mayor tamaño, son a menudo vacuoladas y exhiben una mayor actividad de la enzima β -galactosidasa ácida, comúnmente asociada a la senescencia (Senescence Associated β galactosidase, SA- β -gal) (Katakura, 2006). La actividad SA- β -gal fue uno de los primeros biomarcadores descritos (Dimri y col., 1995) y es además, el más ampliamente utilizado y, por tanto, considerado el más útil para diferenciar células quiescentes de aquellas senescentes. La detección se realiza mediante la utilización de un sustrato cromogénico (X-Gal) a pH=6 específico (Kurz y col., 2000) tanto *in vivo* como *in vitro* y se sugiere que el aumento de su expresión es resultado del incremento en el contenido lisosomal que ocurre en las células senescentes (Lee y col., 2006). La SA- β -gal también ha sido detectada en distintos órganos envejecidos, sugiriendo que las células senescentes se acumulan en los tejidos con la edad (Melk y col., 2003; Pendergrass y col., 1999), así como también en tumores en estadios tempranos (Collado y col., 2005).

Asimismo, el proceso de senescencia puede ser desencadenado por diferentes tipos de estrés citológico, tanto intrínsecos como extrínsecos, como por ejemplo: daño del ADN, estrés oxidativo, disfunción de telómeros, quimioterapia, activación del supresor tumoral p53, entre otros (Ben-Porath y Weinberg, 2005; Collado y Serrano, 2010; Campisi y col., 2007; Prieur y Peepers, 2008; Adams, 2009) (Figura 4).

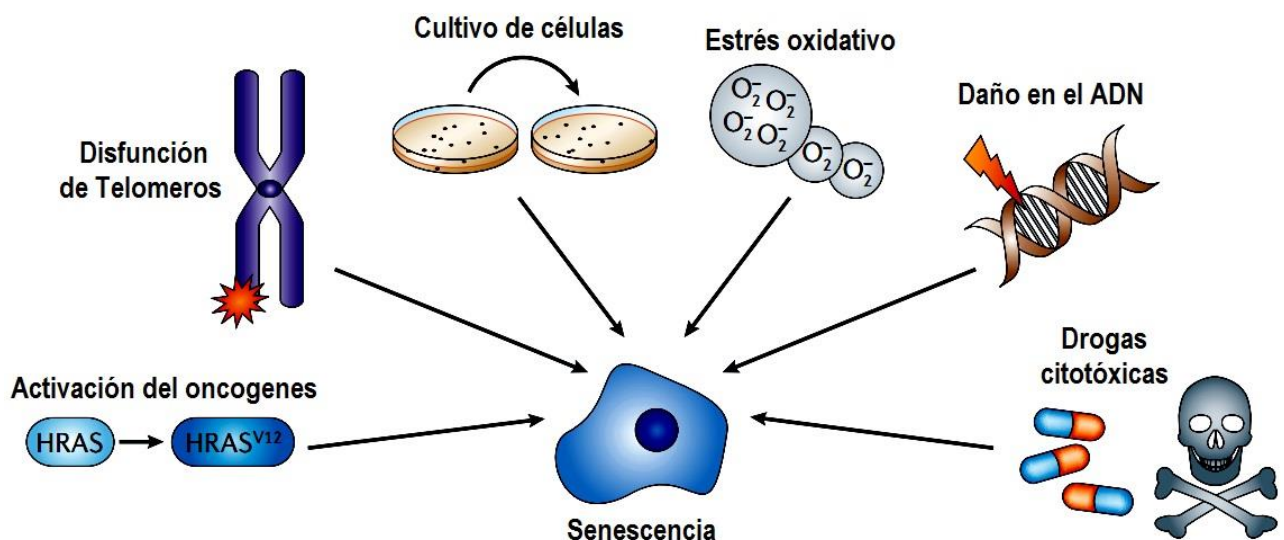


Figura 4. Estímulos inductores de senescencia celular. Frente a condiciones estresantes, diversos factores, muchos de los cuales están presentes en el ambiente tumoral, pueden desencadenar senescencia como mecanismo de autodefensa para prevenir la proliferación de células potencialmente dañadas. Extraído de Collado y Serrano, 2010.

Otro rasgo que caracteriza a las células senescentes es el de presentar una expresión incrementada de citoquinas pro-inflamatorias y quemoquinas (Bartek y col., 2008). Estos profundos cambios de expresión génica promueven el desarrollo de un complejo fenotipo secretor asociado a senescencia denominado SASP por sus siglas en inglés (senescence associated secretory phenotype), detectado *in vitro* e *in vivo* y estrechamente asociado a la activación del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) o C/EBP β (Coppe y col., 2010). Las proteínas SASP comprenden una amplia gama de factores de crecimiento, proteasas, quemoquinas y citoquinas incluyendo IL-6, IL-1, TGF β , IL-8, entre otras, que participan en la señalización intercelular de la senescencia, e interactúan a nivel de la membrana plasmática o en sus inmediaciones (Coppe y col., 2010; Kulman y col., 2008; Young y Narita, 2009).

La asociación entre la activación del transcriptoma inflamatorio y la regulación de la senescencia celular prematura sugiere que, no sólo factores celulares intrínsecos, sino también proteínas extracelulares y secretadas serían mediadores de senescencia las que, a su vez, favorecerían la comunicación de células senescentes con el medio ambiente (Rodier y Campisi, 2012) (Figura 5).

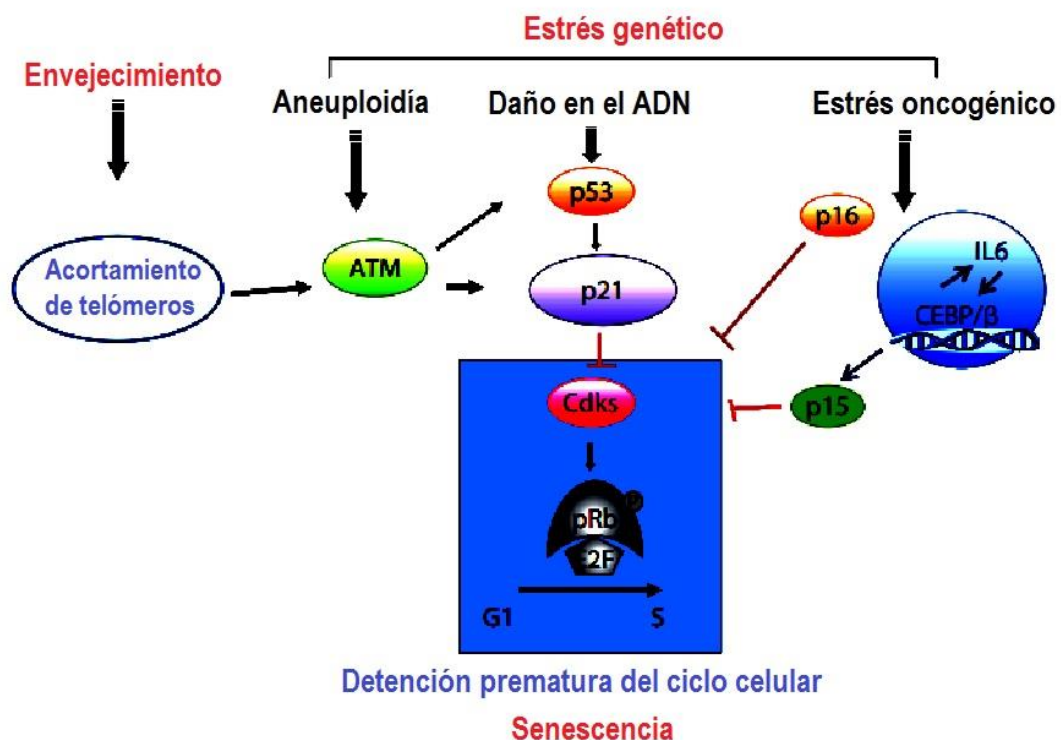


Figura 5. Diferentes caminos hacia la senescencia celular. Extraído de Chesnokova y col., 2010.

2.1. La senescencia y la red inflamatoria

Cada vez resulta más evidente que la senescencia presenta un fenotipo complejo con una variedad de efectos no autónomos. En las células senescentes se desencadena la activación de una respuesta inflamatoria, desarrollando un complejo fenotipo secretor asociado a senescencia (senescence associated secretory phenotype, SASP), *in vitro* e *in vivo*, el cual se asocia con la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) o C/EBP β (Coppe y col., 2010). Las proteínas SASP incluyen una amplia gama de factores de crecimiento, proteasas, quemoquinas y citoquinas incluyendo IL-6, IL-1, TGF β , IL-8, los que participan en la señalización intercelular de la senescencia, e interactúan a nivel de la membrana plasmática o en sus inmediaciones (Coppe y col., 2010; Kuilman y col., 2008; Young y Narita, 2009).

Los componentes de SASP pueden tener efectos benéficos o desfavorables dependiendo del contexto fisiológico (Figura 6). Dentro de los efectos beneficiosos se pueden incluir: la reparación del tejido, la posibilidad de que células dañadas comuniquen su estado comprometido al tejido circundante, el llamado de células del sistema inmune para la remoción, así como el reforzamiento de la respuesta supresora de tumores (Freund y col., 2010; Kuilman y Peeper, 2009). Por otra parte, entre los efectos deletéreos, se ha descrito que el SASP puede: promover la disrupción de la estructura normal del tejido, promover la angiogénesis, favorecer el envejecimiento del tejido comprometiendo el pool de células madres, estimular la proliferación y la adquisición de perfiles invasivos en células vecinas (Freund y col., 2010; Kuilman y Peeper, 2009). Debido a que el SASP es la consecuencia de daños genómicos y epigenómicos, se considera que la senescencia celular es un buen modelo para estudiar la respuesta celular al daño que puede promover señales de daño dentro y entre tejidos.

En este contexto, resulta relevante la participación de NF- κ B como factor transductor de señales para activar genes pro-inflamatorios, el cual también se encuentra implicado en la evolución de las injurias neoplásicas (Balkwill y Coussens 2004; Pikarsky y Ben-Neriah, 2006). NF- κ B es miembro de la familia de proteínas Rel y en la mayoría de las células está presente en el citoplasma en una forma inactiva a través de su asociación con miembros de la familia I κ B (Jeong y col., 2005). Una fosforilación rápida de I κ B por I κ B kinasa (IKK) resulta en posterior ubiquitinización y degradación proteolítica de I κ B, posibilitando que NF- κ B sea transportado al núcleo, para activar la transcripción de genes específicos a través de la unión con secuencias

promotoras (Jeong y col., 2005). Por una parte, se ha demostrado que NF- κ B actúa como modulador positivo del desarrollo y progresión tumoral (Courtois y Gilmore, 2006), aunque contradictoriamente, recientes evidencias en fibroblastos han postulado a N NF- κ B como factor clave para el mantenimiento de la senescencia regulando la respuesta al daño del ADN (DDR) (Wang y col., 2009).

Conforme lo expuesto, se ha postulado un modelo de supresión tumoral comandado por citoquinas en el cual, en las fases iniciales de transformación celular y expansión de la lesión, activación de DDR y la señalización de citoquinas operarían sinérgicamente para conformar una barrera que retrasa o previene la progresión del tumor mediante la senescencia (Bartek y col., 2008). Por lo tanto, defectos en la DDR y en las redes de señalización de citoquinas podrían inhabilitar esta barrera intrínseca, permitiendo la progresión de la lesión hacia un grado maligno (Acosta y Gil, 2009).

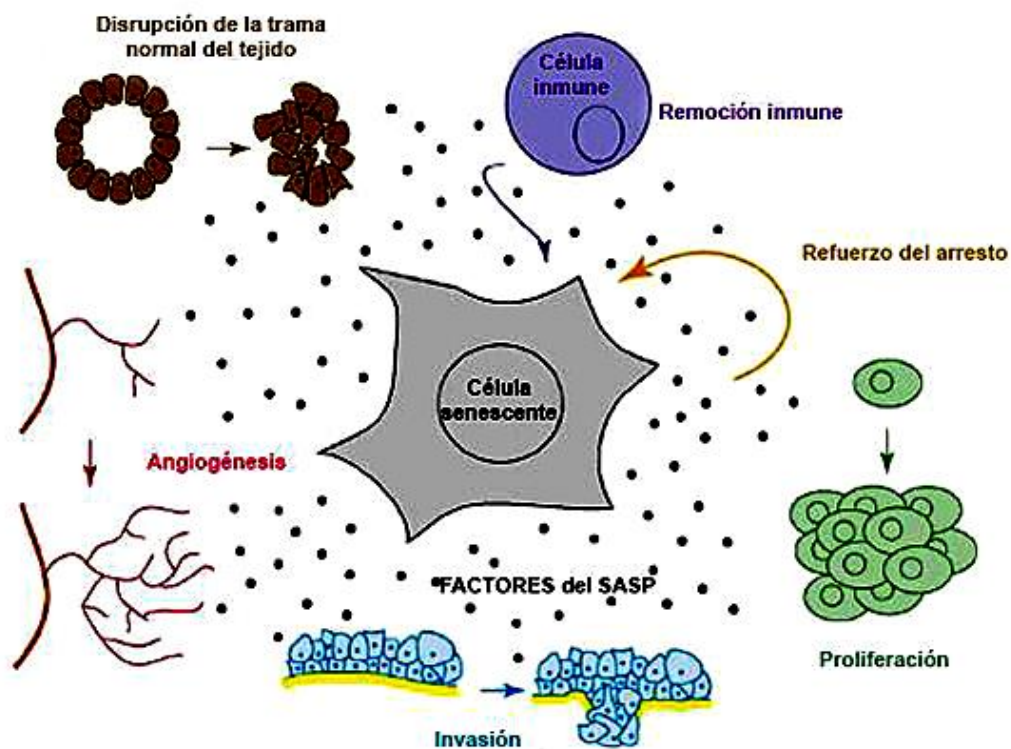


Figura 6. Esquema de múltiples efectos del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Adaptado de Trends in Molecular Medicine.

2.2. IL-6 y la senescencia celular hipofisaria

Investigaciones realizadas en fibroblastos humanos han demostrado que IL-6 resulta necesaria para la inducción y mantenimiento de la senescencia inducida por oncogenes, actuando de manera autocrina a través de sus receptores (Acosta y col., 2008; Kuilman y col., 2008). Estos autores han propuesto un modelo de doble-acción

de esta citoquina: por acción paracrina IL-6 estimularía la proliferación celular en tanto que por mecanismos autocrinos desencadenaría senescencia, en estrecha correlación con la activación de inhibidores de ciclinas como p15, p16 y p21. De esta manera las citoquinas ejercerían efectos pro-oncogénicos o anti-oncogénicos dependiendo del contexto intracelular.

Como se dijo anteriormente, los adenomas hipofisarios son generalmente benignos y exhiben una lenta tasa de crecimiento (Melmed, 2015). Precisamente, una de las principales incógnitas que aún persiste en la actualidad es conocer cuáles son los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el control del crecimiento hipofisario y en particular determinar el rol de la senescencia celular en la sorprendente naturaleza benigna de estas lesiones tumorales. Debido a que estos tumores manifiestan un crecimiento estable después de décadas de observación (Levy y Lightman, 2003) y que senescencia se desencadena en las primeras etapas de desarrollo de lesiones benignas, pero no en tumores malignos, este mecanismo celular ha sido propuesto como un proceso relevante en el control de crecimiento hipofisario (Arzt y col., 2009).

Las células hipofisarias normales están bajo el control autocrino/paracrino de varios factores de crecimiento. Se han descrito que cambios en los niveles de expresión y/o la función de estas moléculas contribuiría al desarrollo tumoral (Perez-Castro y col., 2012). De hecho niveles alterados de citoquinas y factores de crecimiento y sus correspondientes receptores, como el $TGF\alpha$ y β ; EGF, FGF, BMP-4 e IL-6/glicoproteína 130, han sido reportados en tumores pituitarios (Jones y col., 1994; Perez Castro y col., 2000; Paez-Pereda y col., 2003).

Como se mencionó previamente, IL-6 ejerce una gran influencia en la actividad de la glándula hipofisaria con un destacado rol en el proceso de senescencia celular (Renner y col., 2009). Si bien en numerosos tumores esta citoquina es considerada como un factor de crecimiento (Kamimura y col., 2003; Kurotani y col., 2001), existen antecedentes que sustentan su rol inhibidor de la proliferación de melanomas tempranos, aunque no de tardíos (Lu y Kerbel, 1993). Así, IL-6 tendría un efecto dual que recuerda al descrito para $TGF-\beta$, el cual restringe la proliferación de células no malignas, mientras que su sobreexpresión en células tumorales promueve la expansión y la metástasis (Derynck y col., 2001).

En el presente trabajo de Tesina se pretende profundizar el estudio de la regulación del proceso proliferativo hipofisario mediada a través de citoquinas en

hipófisis normales y estimuladas experimentalmente por estrógeno para el desarrollo tumoral hipofisario, con una especial atención en los efectos desencadenados por IL-6 sobre el control del crecimiento celular.

El esclarecimiento de algunos de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la regulación de la función hipofisaria resulta de gran interés ya que aportarán fundamentos para la comprensión de los complejos mecanismos que participan en la homeostasis hipofisaria y sus desequilibrios en la tumorigénesis de esta importante glándula endócrina.

HIPÓTESIS

Durante el desarrollo del tumor hipofisario experimental, se modifica la expresión y función de IL-6, desencadenando el proceso de senescencia celular para proteger a la glándula de una posible progresión tumoral.

OBJETIVO GENERAL

Investigar los efectos de IL-6 sobre la regulación de la proliferación y senescencia de células hipofisarias normales y tumorales en cultivo primario.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los efectos de IL-6 exógena sobre la proliferación y senescencia celular en cultivos primarios de hipófisis normales y tumorales inducidas experimentalmente.
2. Examinar *in vitro* la acción endógena o intracrina de IL-6, inducida por lipopolisacárido bacteriano LPS, sobre la proliferación y senescencia de células hipofisarias normales y tumorales.
3. Analizar las modificaciones de los niveles intracelulares de IL-6 y secreción de la citoquina con posterioridad al tratamiento con IL-6 o LPS. Identificar a nivel ultraestructural las poblaciones celulares que expresan IL-6.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas Wistar macho adultas de 250g de peso corporal, criadas en el bioterio del Centro de Microscopía Electrónica (INICSA-CONICET). El mantenimiento y cuidado de los animales de experimentación se realizó conforme a Guías Internacionales de Entrenamiento y Manejo de Animales de Laboratorio, publicadas por la Federación Universitaria para el cuidado de animales y el Comité Institucional Local de Cuidado Animal (Facultad de Ciencias Médicas, UNC; RHCD 674/09). El bioterio posee un ambiente de temperatura controlada (entre 20 y 25°C), con luz artificial, con fotoperíodo controlado de 12hs luz/12hs oscuridad, sin entrada de luz del exterior. La sala de cría posee recambio de aire, los animales tuvieron acceso ilimitado a agua y comida (Cargill, División Nutrición Animal, SACI, Córdoba). Los animales de experimentación fueron criados en grupos no mayores a 5 ratas por jaula (200cm²/animal), respetando el tamaño mínimo de las jaulas y las condiciones de cría estipuladas en el reglamento.

Modelos experimentales

El desarrollo del tumor hipofisario fue inducido mediante la implantación subcutánea de cápsulas de silástico (Dow Corning, Medical grade, Midland, MI, USA) conteniendo 10 mg de benzoato de estradiol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 40 días (E40) según antecedentes previos (Mukdsi y col., 2004; Sabatino y col., 2015). La estrogenización se efectuó bajo anestesia general tratándose a los animales con Ketamina (40-90mg/kg IP) y Xilacina (5-15mg/kg IP). Los animales del grupo control fueron implantados con cápsulas de silástico vacías. Cabe señalar que los tumores hipofisarios inducidos por estrógeno durante 40 días no alcanzaron los 7 mm de tamaño y los animales no mostraron signos de sufrimiento (los cuales fueron evaluados diariamente) tales como: disminución del consumo de agua y alimento; pérdida de peso rápida (entre el 15 y el 20%); hipotermia; respiración dificultosa acompañada de descarga nasal; parálisis de miembros posteriores; distensión abdominal o diarrea por 48 hs.

Dispersión y cultivo de células hipofisarias

El protocolo de disociación y cultivo celular empleado ha sido descrito previamente (De Paul y col., 1997). Brevemente, las adenohipófisis provenientes de animales controles y estrogenizados fueron extraídas y colocadas en medio de cultivo esencial mínimo (SMEM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Luego, las glándulas fueron cortadas en pequeños fragmentos e incubadas con 0,4% de tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en SMEM en agitación constante a 37°C durante 20 min. La actividad enzimática de la tripsina fue inhibida utilizando medio Dulbecco con suero fetal bovino 10% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) por 3 min en baño a 37°C. A continuación, se realizó la dispersión celular en forma mecánica con pipetas Pasteur tratadas con silicona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) de calibre decreciente para obtener una suspensión celular homogénea. La viabilidad celular fue analizada con Trypan Blue y se determinó que superara el 90%. Para la realización de ensayos posteriores de proliferación celular y de inmunofluorescencia, las células hipofisarias dispersas fueron sembradas sobre cubreobjetos (de 13mm) colocados en la base de placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, Nueva York, EE.UU.) a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Para otras técnicas, las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning, Nueva York, EE.UU.), a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en medio Dulbecco suplementado con suero a fin de favorecer la adhesión celular. Luego de 48h de cultivo, los medios fueron reemplazados por DMEM libre de suero y sin rojo fenol al que se suplementó con hidrocortisona (100mg/l), 3,3'-triyodotironina (400ng/l), transferencia (10mg/l) y selenito de sodio (5µg/l). Este medio fue reemplazado diariamente hasta la aplicación de los diferentes protocolos experimentales (Figura 7).

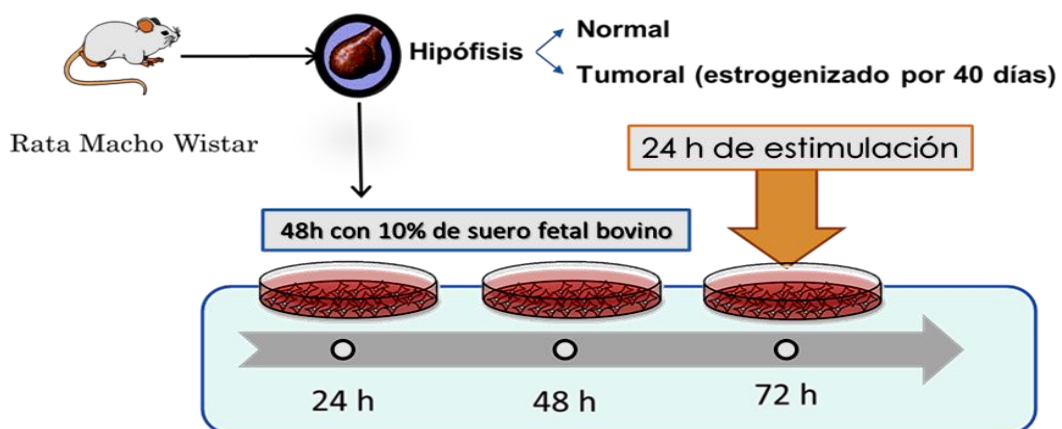


Figura 7. Esquema de protocolo experimental previo a los tratamientos *in vitro*.

Diseños experimentales

Efectos de IL-6 exógena sobre la proliferación y senescencia de células adenohipofisarias normales y tumorales

Con el fin de evaluar *in vitro* la acción directa de IL-6 sobre la proliferación y senescencia celular hipofisaria, cultivos primarios de glándulas normales y tumorales provenientes de animales controles y estrogenizados por 40 días respectivamente, fueron expuestos a IL-6 (1 y 10 ng/ml) por 24h según reportes previos (Onofri y col., 2004). Muestras controles fueron incubadas con medio de cultivo solo (Figura 8).

Con posterioridad a los tratamientos, se evaluaron los índices de proliferación celular y senescencia hipofisaria. El índice de proliferación celular se evaluó a través de la detección del marcador de proliferación celular Ki-67 mediante inmunocitoquímica. La senescencia hipofisaria se evaluó analizando la actividad enzimática de SA- β -gal en las monocapas celulares. Se cuantificó el número de células SA- β -gal y Ki67 positivas considerando un total de 500 células hipofisarias para cada uno de los grupos experimentales. A los fines del análisis estadístico, los ensayos fueron realizados por triplicado.

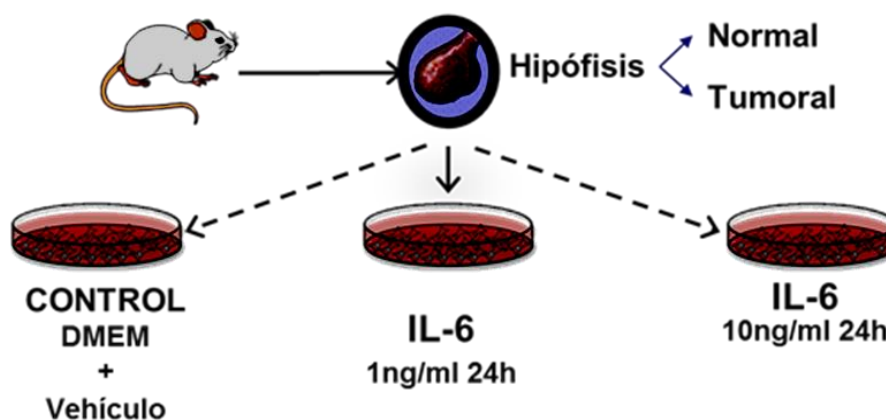


Figura 8. Esquema de diseño experimental para evaluación del efecto de IL-6 exógena sobre proliferación y senescencia celular de células hipofisarias de glándulas normales y tumorales.

Efectos de IL-6 endógena sobre la proliferación y senescencia celular en cultivos hipofisarios normales y tumorales

Con el objetivo de examinar la acción de IL-6 endógena *in vitro*, cultivos primarios de hipófisis normales y tumorales (E40) fueron desafiados con la endotoxina bacteriana LPS (0,1 μ g/ml) aplicada por 24 h en medio DMEM. Asimismo, con el objetivos de analizar si la acción de IL-6 es llevada cabo de manera intracrina o bien necesita ser

secretada para actuar, otros pocillos celulares fueron tratados con LPS en combinación con BAY 11-7082 (BAY, inhibidor de la translocación nuclear de NF- κ B; Sigma Aldrich) o con Brefeldin-A (BFA, inhibidor de la secreción; Sigma Aldrich) según antecedentes de la bibliografía (Eijo y col., 2011; Gavier y col., 1999; Schuerwegh y col., 2003). De este modo, se establecieron los siguientes grupos experimentales: Grupo Control: tratado con el vehículo; grupo LPS: LPS (0,1 μ g/ml) por 24h, grupo BAY (1 μ M) 24h, grupo BAY+LPS: BAY por 30min previos a estímulo de LPS 24h; grupo BFA: BFA (0,1 μ g/ml) 24h y grupo BFA+LPS: BFA por 1h previo al estímulo de LPS 24 h (Figura 9).

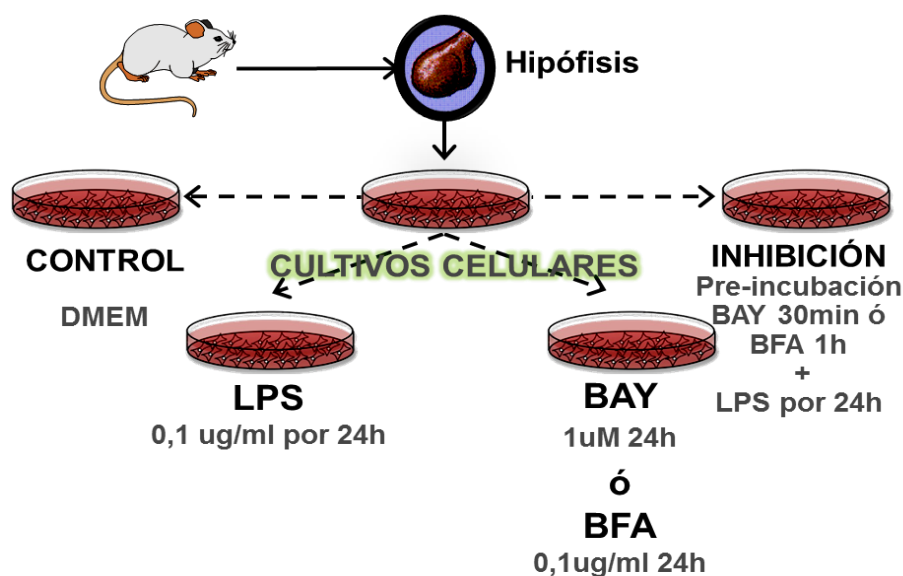


Figura 9. Esquema del diseño experimental para evaluación del efecto de IL-6 endógena y NF- κ B en respuesta a LPS sobre proliferación y senescencia celular de células hipofisarias normales y tumorales.

En forma paralela, se determinaron los niveles de IL-6 liberada al medio de cultivo mediante ELISA; la expresión intracelular de esta citoquina fue evaluada por inmunofluorescencia; la translocación nuclear del factor NF- κ B fue analizada por western blot, en tanto el número de células SA- β -gal y Ki67 positivas, para cada uno de los grupos experimentales, fue determinado por ensayos colorimétricos y por inmunocitoquímica respectivamente. Los ensayos mencionados fueron realizados por triplicado.

Evaluación de la proliferación celular mediante la expresión de Ki-67

Después de aplicados los tratamientos, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS por 30 min a TA, luego lavadas con PBS y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% por 10 min. A continuación, las células se incubaron con PBS-BSA al 5% m/v por 30 min a TA para bloquear sitios no específicos y luego se

expusieron al anticuerpo primario contra Ki67 (1:50; BD Pharmingen, Oxford, Reino Unido) incubado durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de lavar con PBS, las monocapas celulares fueron incubadas con un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de ratón (1:300; GE Healthcare; Buenos Aires, Argentina) por 1 h a 37°C. El revelado de la reacción se realizó utilizando el sistema ABC y diaminobencidina como cromógeno. Los controles se realizaron aplicando el mismo protocolo pero omitiendo el anticuerpo primario. Finalmente, las monocapas celulares adheridas a cubreobjetos fueron montadas con bálsamo de Canadá.

Con fines estadísticos, al menos 1000 células hipofisarias fueron examinadas por microscopía de luz en campos elegidos al azar a una magnificación de 400X. Se analizaron tres cubreobjetos para cada condición experimental, provenientes de tres experimentos independientes. El índice de inmunomarcación para Ki67 fue determinado utilizando el Software Image J (NIH, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) y el número de núcleos teñidos positivamente se registró en relación al número total de núcleos.

Detección citoquímica de tinción β -galactosidasa asociada a senescencia

La detección enzimática de SA- β -gal en células hipofisarias se realizó mediante el uso de un kit comercial (Sigma-Aldrich), uno de los métodos más extendidos para el estudio de senescencia celular (Dimri y col., 1995; Lee y col., 2006). Brevemente, las monocapas de cultivo celular fueron fijadas con una mezcla conteniendo 2% v/v de formaldehído y 0,2% v/v de glutaraldehído en PBS durante 7 min. Después del lavado, se añadió la solución de tinción de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las muestras se incubaron a 37°C durante 20 h en ambiente de humedad saturada. Luego, las muestras fueron montadas y examinadas bajo microscopio de campo claro y se fotografiaron a 100X, 200X o 400X. Sólo las células senescentes se tiñeron de color azul a pH 6,0. Con el fin de determinar el índice de células senescentes, las células en monocapas de cultivo celular fueron cuantificadas a partir de micrografías a 400X mediante el uso de software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Como control positivo de la reacción se emplearon secciones de riñón de rata aplicando el mismo protocolo y como control negativo, se emplearon las mismas secciones en las que se omitió la incubación con el sustrato. Con fines estadísticos, campos visuales elegidos al azar fueron fotografiados a 400X y un mínimo de 1000 células fueron contadas para todos los grupos experimentales. Los experimentos se realizaron por triplicado.

ELISA

Con el fin de cuantificar los niveles de IL-6 secretada por las células adenohipofisarias, 1 ml de medio de cultivo de cada pocillo fue colectado, centrifugado a 4°C a 400 g durante 15 min y almacenado a -20°C hasta el día del ensayo. La secreción fue determinada mediante el empleo de un kit comercial ELISA sandwich (Rat IL-6 Elisa set OpTEIA#550319, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizó la sensibilización de la placa inmovilizando el anticuerpo de captura en un soporte sólido; para ello se colocaron 100 µl del anticuerpo de captura (1:125) en una placa de 96 pocillos toda la noche a 4°C. Luego de lavar el exceso de anticuerpo de captura con PBS-Tween 20 0,5% v/v, se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas agregando 200 µl de una solución conteniendo PBS-suero fetal bovino 10% v/v por 1 h a 37°C. A continuación, se descartó la solución de bloqueo y se sembraron 100 µl de cada muestra por duplicado, previa centrifugación a 4000 g por 15 min a 4°C. La curva de calibración para IL-6 fue de 5000-100 pg/ml. Tanto las muestras como la curva de calibración se incubaron toda la noche a 4°C; luego de sucesivos lavados con PBS-Tween 20 0,5% v/v, se agregaron 100 µl de anticuerpo de detección (1:250) y se incubó por 1 h a 37°C. Después de lavar se realizó el revelado de la reacción incubando la placa con 100 µl de la solución enzimática a TA por 30 min; se lavó y se colocaron 100 µl de sustrato TMB por 15 min y luego se frenó la reacción agregando 50 µl de H₂SO₄ 4N. La medición de la absorbancia a 450 nm se realizó empleando un espectrofotómetro multicelda (Thermo Electric). El rango de sensibilidad estuvo comprendido entre 78–5000 pg/ml, la variación inter-ensayo fue del 75.4% en tanto la variación intra-ensayo fue del 72.8%.

Fraccionamiento subcelular

Extractos hipofisarios conteniendo fracciones nucleares y citosólicas fueron obtenidos de acuerdo a Ghisletti y colaboradores (2005) con modificaciones (Sabatino y col., 2013). Brevemente, las monocapas celulares fueron desprendidas de los pocillos empleando 0,2 ml de buffer de lisis hipotónico frío Tris-HCl 10 mM pH 7,8; conteniendo MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; KCl 10 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,1 mM; leupeptina 10 mg/ml y aprotinina 1 mg/ml durante 15 min a 4°C. Luego, los lisados celulares se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue considerado como extracto citosólico y se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su posterior cuantificación. A continuación, los pellets se resuspendieron en buffer de extracción hipertónico (tampón

hipotónico conteniendo NaCl 0,5 M), seguido por una breve sonicación. Luego, los extractos fueron centrifugados a 10.000 g durante 10min a 4°C y el sobrenadante fue designado como la fracción nuclear. Las alícuotas se almacenaron a -20°C hasta ser empleadas en ensayos de western blot. La concentración de proteínas totales fue determinada usando el kit Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad; Hercules, USA), utilizando albúmina de sérica bovina como estándar.

Análisis de la expresión proteica por western blotting

Las fracciones subcelulares provenientes de extractos hipofisarios fueron desnaturalizadas, corridas en gel de poliacrilamida al 12% (30µg/carril) y luego transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England). Con el objetivo de estimar los pesos moleculares correspondientes a las proteínas de estudio, se utilizó Full Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Life Science, Amersham, UK). Para evitar uniones inespecíficas las membranas fueron incubadas con buffer de bloqueo (PBS con 5% m/v de leche descremada y Tween 20 v/v 0,1%) a TA. Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios específicos: IL-6 (1:200); NF-κB (1:1000) y β-actina (1:1000). Luego, las membranas fueron lavadas en PBS/Tween 20 0,1% v/v e incubadas con anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa (1:2500; Jackson Immunoresearch Labs Inc., West Grove, PA, EE.UU.). La detección de la señal se realizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. La luz emitida fue capturada en Hyperfilm (Amersham) y se realizó análisis densitométrico utilizando el software Image J (NIH, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). La expresión proteica de β-actina se usó como control interno para confirmar la carga equivalente de proteína total en cada carril.

Análisis de expresión de IL-6 por inmunofluorescencia *in vitro*

Para estudiar la localización de IL-6 en células hipofisarias por inmunofluorescencia (IF), luego de aplicados los tratamientos, las monocapas celulares fueron fijadas en formaldehído al 4% v/v y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.25% v/v en PBS. Posteriormente las células se incubaron con PBS-BSA al 5% m/v por 1 h a fin de bloquear uniones inespecíficas previo a la incubación con anti-IL-6 (1:50) toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, las células fueron lavadas con PBS para

posteriormente ser expuestas al anticuerpo secundario (Alexa 488 IgG anti-ratón; 1:1000) durante 1h a 37°C. Por último, los cubreobjetos fueron montados utilizando Fluoromont (Calbiochem Merck, Darmstadt, Alemania). Para validar la especificidad de la inmunomarcación, se realizaron los controles aplicando el mismo protocolo, pero reemplazando el anticuerpo primario por 1% PBS-BSA. La fluorescencia se visualizó utilizando un microscopio Scanning Laser Confocal FluoView FV1000 (Olympus; Tokio, Japón) perteneciente al laboratorio de microscopía óptica de CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. El análisis de las imágenes de microscopía confocal usando el software FV10-ASW 1.6 Viewer.

Inmunocitoquímica ultraestructural

Con el fin de analizar las modificaciones ultraestructurales de las células adenohipofisarias normales y tumorales y evaluar la localización de IL-6, las glándulas fueron divididas en dos partes y procesadas para microscopía electrónica convencional y para inmunocitoquímica ultraestructural. Para el primer caso, las glándulas fueron fijadas en Karnovsky al 4% (Formol 4% -glutaraldehído 4% en buffer cacodilato 0.1M), post-fijadas con tetróxido de osmio al 1%, deshidratadas en series crecientes de acetonas y posteriormente incluidas la resina epóxica Araldita según protocolos estandarizados en el laboratorio (De Paul y col., 2009). Las muestras fueron cortadas con cuchilla de diamante empleando un ultramicrotomo JEOL JUM-7 obteniéndose secciones ultrafinas de 90nm que luego fueron contrastadas con acetato de uranilo y de citrato de plomo y examinadas en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss LEO 906-E.

La identificación de células endocrinas positivas para IL-6 y prolactina (PRL) fue realizada mediante inmunocitoquímica ultraestructural para lo cual las hipófisis fueron fijadas en Karnovsky al 1,5% (Formol 4%- glutaraldehído 1,5% en buffer cacodilato 0.1M), deshidratadas en una serie creciente de alcohol etílico e incluidas en la resina acrílica LR-White (London Resin Corporation, Berkshire, UK) omitiendo el tetróxido de osmio. Las inmunomarcaciones se realizaron según protocolos establecidos previamente (De Paul y col., 2011). Las secciones ultrafinas se incubaron en cámara húmeda por 24h a 4°C con anticuerpo anti IL-6 (1:50; Santa Cruz Biotechnology) y anti-PRL (1:1000; NIH). Posteriormente se expusieron a complejos IgG-oro coloidal de diferente tamaño (anti-mouse 15nm, 1:20; Electron Microscopy Sciences, USA) (anti-rabbit 5nm, 1:30; Sigma Aldrich). Con el fin de validar la especificidad de las

inmunomarcaciones se realizaron los siguientes controles: 1) reemplazo del anticuerpo primario por PBS-BSA 1% en PBS 0.1M, pH7.3; 2) reemplazo del anticuerpo primario suero pre-inmune seguido por la incubación con IgG 15 nm o 5nm. Las imágenes fueron adquiridas a través de la cámara Megaview III (Olympus, Center Valley, PA, USA).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo aplicando modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) y posteriormente las diferencias entre medias se analizaron mediante el Test de Fisher. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. Los datos se obtuvieron de 3 réplicas de tres experimentos independientes. Valores de $P < 0.05$ fueron considerado significativos.

RESULTADOS

Análisis ultraestructural de células hipofisarias de glándulas normales y tumorales inducidas por el tratamiento estrogénico sostenido

A nivel de microscopía electrónica de transmisión (MET) se evidenciaron importantes modificaciones en la biología ultraestructural de células tumorales, principalmente en el desarrollo de las organelas proteinopoyéticas involucradas en la síntesis de hormonas hipofisarias en comparación a las células provenientes de animales controles. Las glándulas de ratas macho controles mostraron una composición variada con la participación de las diferentes poblaciones celulares secretoras de hormonas. Las células somatotropas fueron la mayoría en la condición experimental control y las células lactotropas predominantes correspondieron a la subpoblación de células atípicas caracterizadas por la presencia de gránulos secretorios esféricos de 200-300nm de diámetro acumulados en el citoplasma celular (Figura 10).

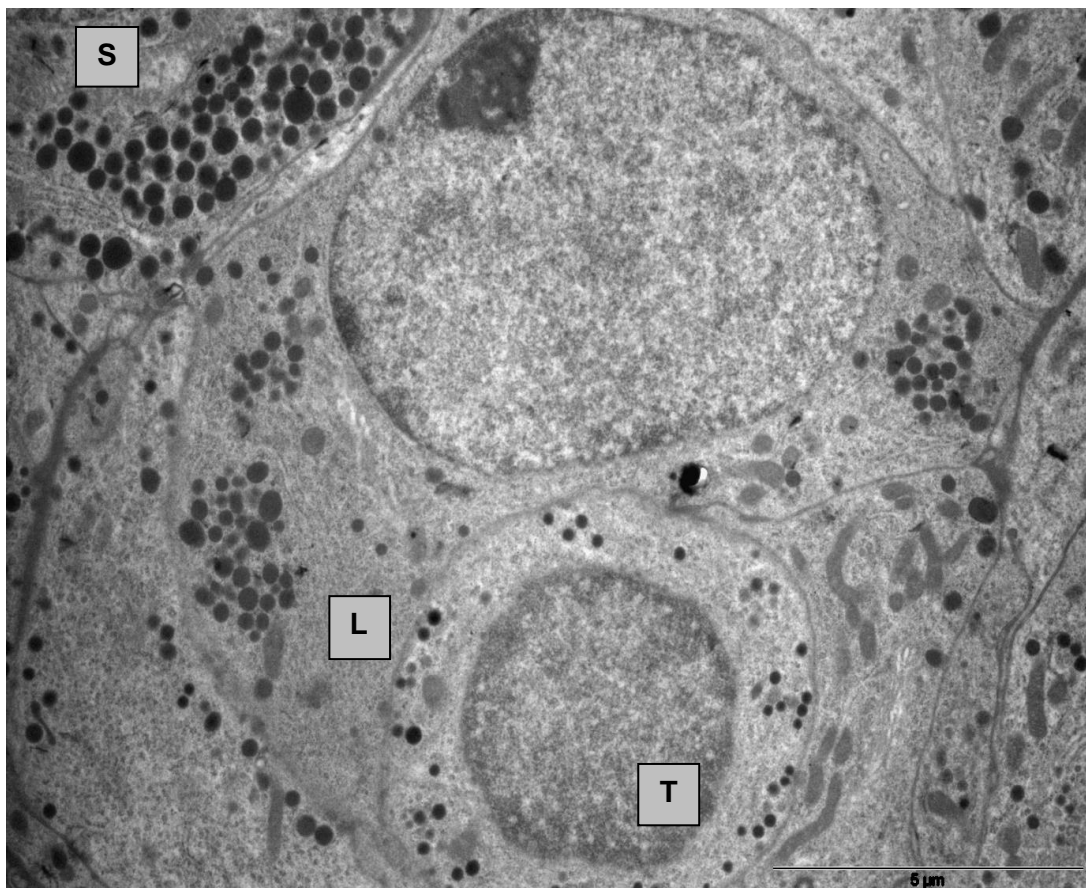


Figura 10. Análisis morfológico de la glándula hipofisaria de rata control. Se destaca la composición de diferentes tipos celulares en el parénquima hipofisario: células lactotropas (L), somatotropas (S), mayoritarias en la glándula control, y células tirotrópicas (T). Barra= 6 μ m

Luego del tratamiento hormonal sostenido por 40 días, se observó que las células lactotropas fueron la población celular predominante en el parénquima glandular siendo el fenotipo preponderante el correspondiente a una subpoblación de lactotropas típicas, metabólicamente más activas, las cuales exhibieron un notorio desarrollo de RER y complejo de Golgi (CG) con gránulos secretorios inmaduros asociados, producto de la estimulación estrogénica (Figura 11). Los escasos gránulos secretorios maduros presentaron un perfil polimórfico de 500-900 nm de diámetro, considerados los de mayor tamaño en la hipófisis los cuales fueron identificados mediante la técnica inmunocitoquímica y revelados mediante el empleo de anticuerpos secundarios asociados a complejos de oro coloidal (inset).

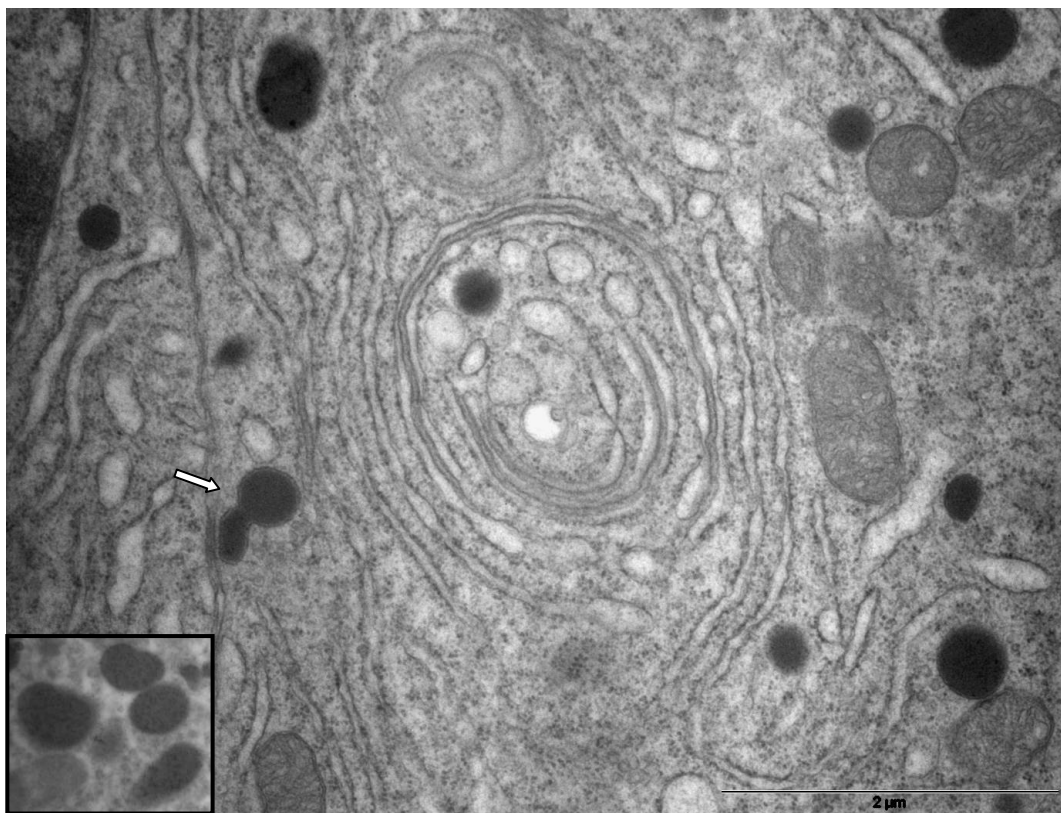


Figura 11. Célula lactotropa típica hipertrófica (E40) conteniendo escasos gránulos secretorios maduros grandes y polimórficos (500-900nm de diámetro) algunos próximos a la membrana plasmática donde serán liberados por exocitosis (flecha). Presenta un RER y complejo de Golgi (CG) altamente desarrollados que ocupan una amplia proporción del citoplasma celular. Barra=2μm. Inset: gránulos secretorios maduros exhibiendo inmunomarcación para PRL (oro coloidal de 5nm).

Considerando que hacía 40 días de desarrollo tumoral hipofisario se evidenciaron claras manifestaciones de los biomarcadores de senescencia celular (Sabatino y col., 2015), este período de tratamiento fue seleccionado para ejecutar los estudios *in vitro* cuyos resultados se refieren a continuación.

Dado que se ha sugerido que un pool de IL-6 autocrino producido por las mismas células senescentes intervendría sobre el surgimiento de este proceso de arresto celular, mientras que de manera paracrina IL-6 promovería la proliferación de células vecinas, favoreciendo la tumorigénesis (Kuilman y col., 2008), se propusieron dos estrategias experimentales para poder estudiar los efectos de IL-6 según su origen.

Los efectos de IL-6 exógena fueron a analizados mediante la incorporación de esta citoquina al medio de cultivo en tanto que su acción endógena se evaluó a través de la estimulación de su síntesis y secreción con el lipopolisacárido bacteriano (LPS).

Efectos de IL-6 exógena sobre la proliferación y senescencia celular en cultivos primarios de hipófisis normales y tumorales

Cultivos celulares primarios provenientes de glándulas normales y tumorales fueron expuestos a diferentes concentraciones de IL-6 (1 y 10 ng/ml) incorporada al medio durante 24 h. En paralelo se analizaron muestras controles sin el agregado de la citoquina. El índice de senescencia celular hipofisaria se evaluó en las monocapas celulares mediante la determinación de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). El índice de proliferación celular se determinó a través de la detección del marcador de proliferación celular Ki-67 mediante técnica inmunocitoquímica (método ABC).

Como se observa en la Figura 12, en cultivos hipofisarios de glándulas normales, IL-6 disminuyó el número de células SA- β -gal positivas con respecto al control de manera dosis-dependiente, poniendo de relieve que esta citoquina es capaz de intervenir en la senescencia hipofisaria basal. Asimismo, IL-6 provocó una disminución de la proliferación celular basal que también fue dosis-dependiente.

Sin embargo, en los cultivos primarios provenientes de glándulas tumorales (E40) el estímulo con IL-6 indujo un aumento de células que expresaron SA- β -gal ($p < 0,05$), resultado acompañado por una disminución en la proliferación celular detectada por Ki67. Por lo tanto, en el contexto tumoral hipofisario, la respuesta senescente muestra una susceptibilidad diferencial frente al estímulo con la citoquina respecto al normal, siendo IL-6 un factor que cooperaría en la regulación del crecimiento tumoral mediante el control de la proliferación celular.

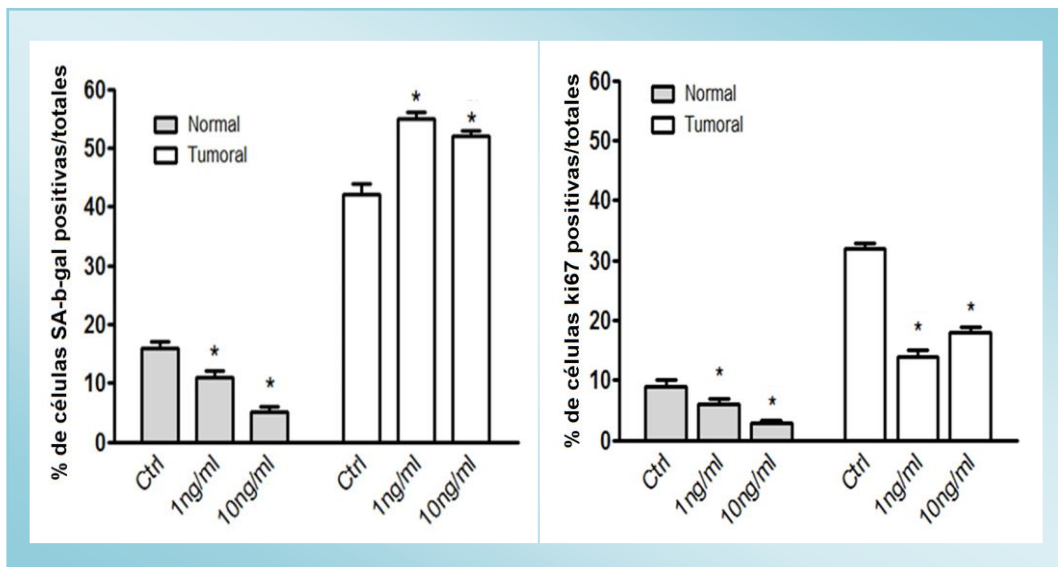


Figura 12. Efecto de IL-6 sobre la senescencia y proliferación celular en cultivos normales y tumorales. En condiciones normales IL-6 disminuyó tanto el número de células SA-β-gal positivas como la proliferación celular. En el contexto tumoral (E40) IL-6 indujo aumento de células que expresan SA-β-gal, acompañado por una disminución en la proliferación celular detectada por Ki67. Recuento del número células positivas para SA-β-gal o Ki67 sobre el total de células hipofisarias en cultivo primario tratadas por 24h con IL-6 (1 y 10 ng/ml). Media ± SEM (n=3). Test de Fischer, $p < 0,05$, *vs Ctrl respectivo.

Acción de IL-6 endógena, inducida LPS, sobre secreción de IL-6, la proliferación y senescencia de células hipofisarias normales e hiperplásicas.

Considerando que las células lactotropas constituyen la principal población celular del modelo tumoral utilizado para este estudio (Mukdsi y col., 2004) y que la presencia de TLR4 fue identificada en este tipo celular (Sabatino y col., 2013), mediante la estrategia del desafío de los cultivos celulares con LPS, se evaluó la acción endógena de IL-6 sobre la regulación de la proliferación y senescencia hipofisarias en el contexto del desarrollo tumoral.

Para inducir la expresión de IL-6 endógena, los cultivos hipofisarios normales y tumorales fueron desafiados con LPS (0,1 μg/ml; 24h). Con el fin de determinar si los efectos observados estuvieron relacionados a los factores secretados en respuesta al estímulo con LPS, los cultivos también fueron expuestos al inhibidor de la secreción Brefeldina A (BFA, 0,1 μg/ml) por 1 h previo al estímulo de LPS.

Por otro lado, para evaluar la contribución del factor de transcripción NF-κB en este fenómeno, los cultivos fueron adicionalmente expuestos a BAY (1 μM), inhibidor de la translocación de NF-κB, 30 minutos previos al desafío con LPS. Este diseño

experimental se aplicó según antecedentes previos de nuestro grupo y de otros (Eijo y col., 2011; Orgnero de Gaisan y col., 1997; Sabatino y col., 2013).

Igualmente, luego a los tratamientos, se cuantificó la concentración de IL-6 liberada al medio de cultivo mediante ELISA. Como se observa en la Figura 13, el estímulo con la toxina bacteriana fue capaz de inducir la secreción de IL-6, mostrando una respuesta mucho más pronunciada bajo contexto tumoral. Los inhibidores BAY y BFA disminuyeron significativamente los niveles de IL-6 secretada en respuesta a LPS sin modificar los niveles basales cuando se administraron individualmente (Figura 13).

El análisis de interacción entre el modelo de estudio (Normal-Tumoral) y los tratamientos con BFA o BAY y/o LPS, reveló la existencia de interacción entre ambos ($p < 0,001$, $F = 32,47$), indicando que los efectos de LPS y BFA o BAY esta influenciados por la condición de partida de la glándula.

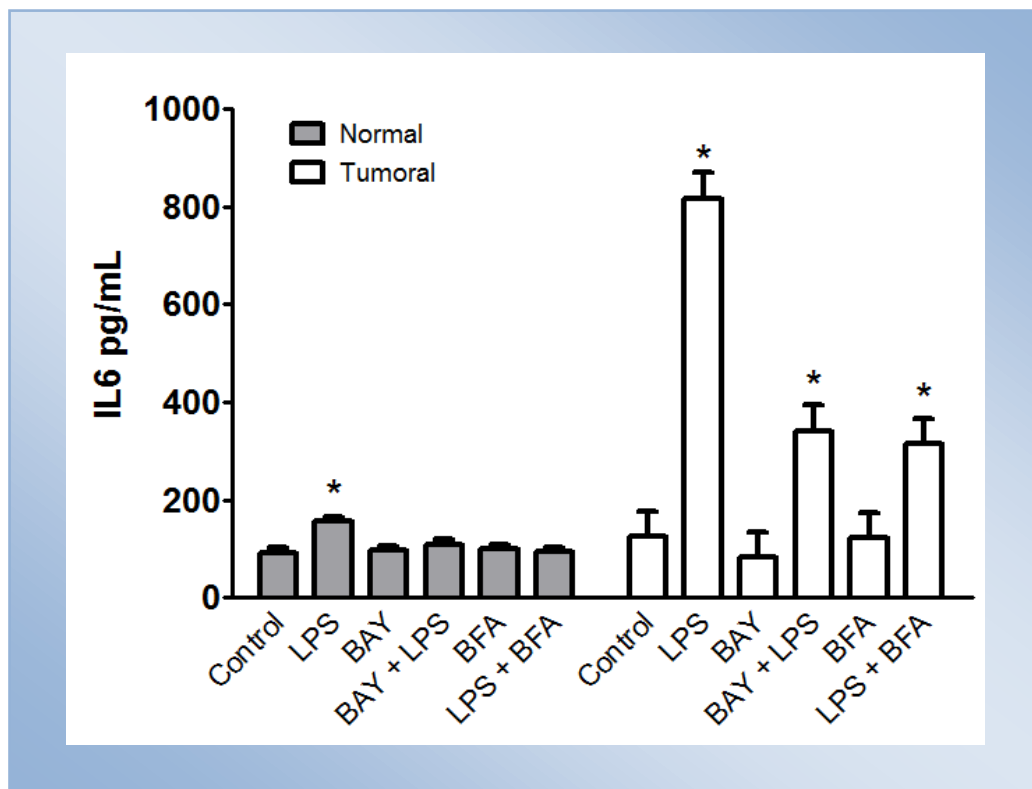


Figura 13. Secreción de IL-6. Células hipofisarias normales y tumorales fueron estimuladas con LPS,, solo o en combinación con BAY o BFA. La concentración de IL-6 secretada fue cuantificada por ELISA mediante espectrofotometría. Datos presentados como Media \pm SEM (n=3). Test de Fischer, $p < 0,05$, *vs Control respectivo.

La presencia de la citoquina a nivel intra-citoplasmática fue analizada por mediante IF, con posterioridad a los tratamientos aplicados. El desafío con LPS indujo un aumento en la inmunomarcación citoplasmática de IL-6. Además, el bloqueo del

transporte vesicular, mediado por el inhibidor BFA promovió la acumulación intracelular de IL-6, observándose un aumento en la inmunomarcación citoplasmática de la citoquina en cultivos estimulados con LPS o BFA (BFA+LPS) (Figura 14). Estos resultados mostraron su correlación con los niveles de secreción de la citoquina determinada mediante ELISA (Figura 13).

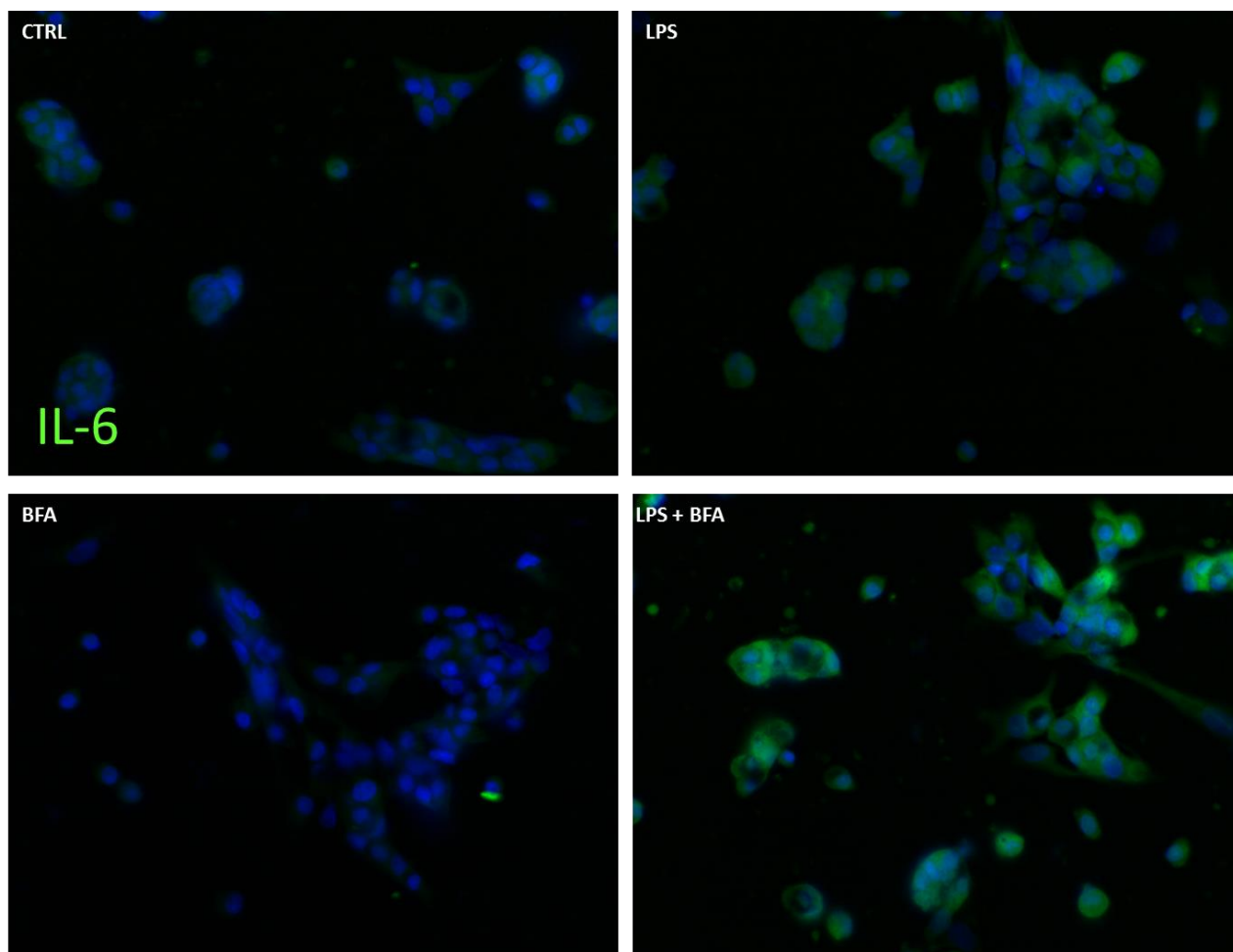


Figura 14. Expresión de IL-6 en cultivos hipofisarios estimulados con LPS por 24h solo o en combinación con BFA. Inmunodetección de IL-6 es visualizada en verde; núcleos celulares marcados con DAPI (azul) Se presentan micrografías representativas de tres experimentos independientes (400X).

Se profundizó el análisis del efecto de LPS, sobre la senescencia como sobre la proliferación celular hipofisarias. La primera mediante técnica citoquímica, mediante actividad de SA- β -gal, la segunda a través de la detección del marcador de proliferación celular Ki-67, mediante técnica inmunocitoquímica.

Como se observa en la Figura 15, el análisis del porcentaje de células SA- β -gal positivas en cultivos de hipófisis normales y tumorales luego de 24 h de tratamiento con LPS reveló que, ambos contextos experimentales, hubo aumento del número de

células senescentes. Por el contrario, LPS fue capaz de estimular la proliferación sólo en condiciones tumorales. Estos resultados sugieren que la acción de LPS puede inducir ambas respuestas: proliferativa y senescente en distintos escenarios.

Si bien la administración de BFA previo al estímulo con LPS, promovió el almacenamiento citosólico de IL-6 (Figura 14), la presencia de la citoquina no modificó el número de células senescentes (Figura 15). En tanto, BFA sola o en combinación con LPS inhibió casi completamente la proliferación celular basal (Figura 15). Asimismo, se observó que la inducción de senescencia celular en respuesta a LPS, tanto en contexto normal como tumoral, fue inhibida en presencia de BFA, lo que indicaría que esta respuesta requiere de la secreción de los factores al medio los cuales probablemente sean en su mayoría citoquinas pro-inflamatorias.

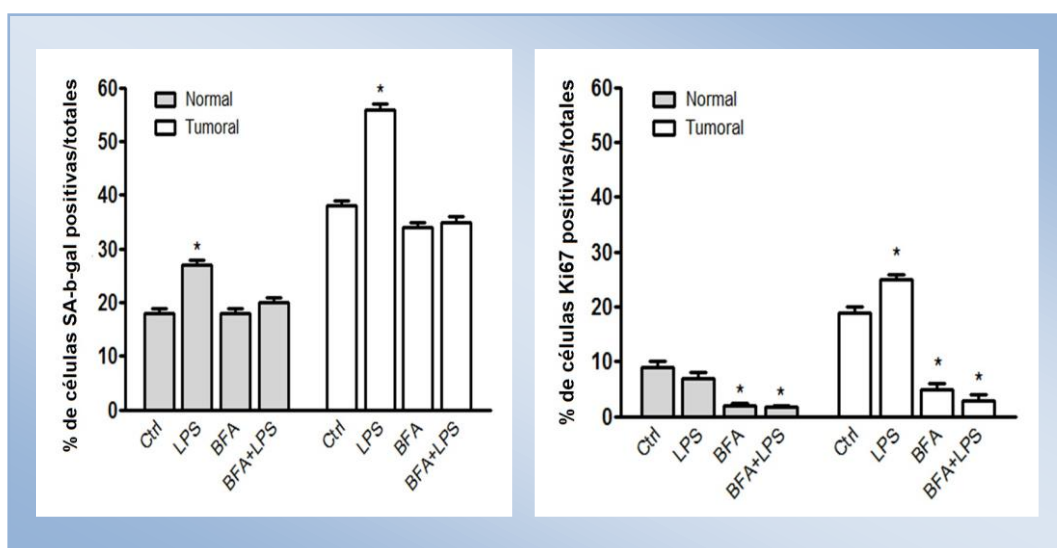


Figura 15. Efecto de LPS sobre la senescencia y proliferación celular en cultivos normales y tumorales. Recuento del número células positivas para SA-β-gal o Ki67 sobre el total de células hipofisarias en cultivo primario de glándulas hipofisarias normales y tumorales tratadas por 24h con LPS (0,1ug/ml) solo o en combinación el inhibidor de la secreción (BFA). Media±SEM (n=3). Test de Fischer, p<0,05, *vs Control.

Participación de NF-κB en la proliferación y senescencia hipofisarias

Es conocido el rol del NF-κB como activador de genes pro-inflamatorios y su participación en la evolución de las injurias tumorales debe subrayarse (Pikarsky y Ben-Neriah, 2006). Este factor de transcripción actúa como modulador positivo del desarrollo tumoral (Courtois y Gilmore, 2006), aunque también ha sido descrita su contribución en el mantenimiento de la senescencia regulando la respuesta al daño del ADN (DDR) (Wang y col., 2009).

En este trabajos, se evaluó el efecto de LPS, solo o en combinación con BAY (BAY+LPS) sobre la expresión de NF- κ B por Western blot a partir de extractos fraccionados (citoplasma y núcleo) (Figura 16). El nivel basal de translocación de NF- κ B en hipófisis tumorales fue mayor que la condición normal, concordando con resultados previos *in vivo* (Sabatino y col., 2015). Así también, LPS indujo la translocación nuclear de NF- κ B en ambos modelos experimentales.

Como era de esperar, el inhibidor BAY redujo la translocación nuclear de este factor de trascrición al núcleo en todas las condiciones. No obstante, dicha reducción fue parcial en el modelo BAY+LPS (Figura 16), lo que permite inferir que el tiempo de aplicación de BAY (30 min) previos al estímulo no fue suficientes para lograr la completa inhibición de la translocación de NF- κ B inducida por LPS.

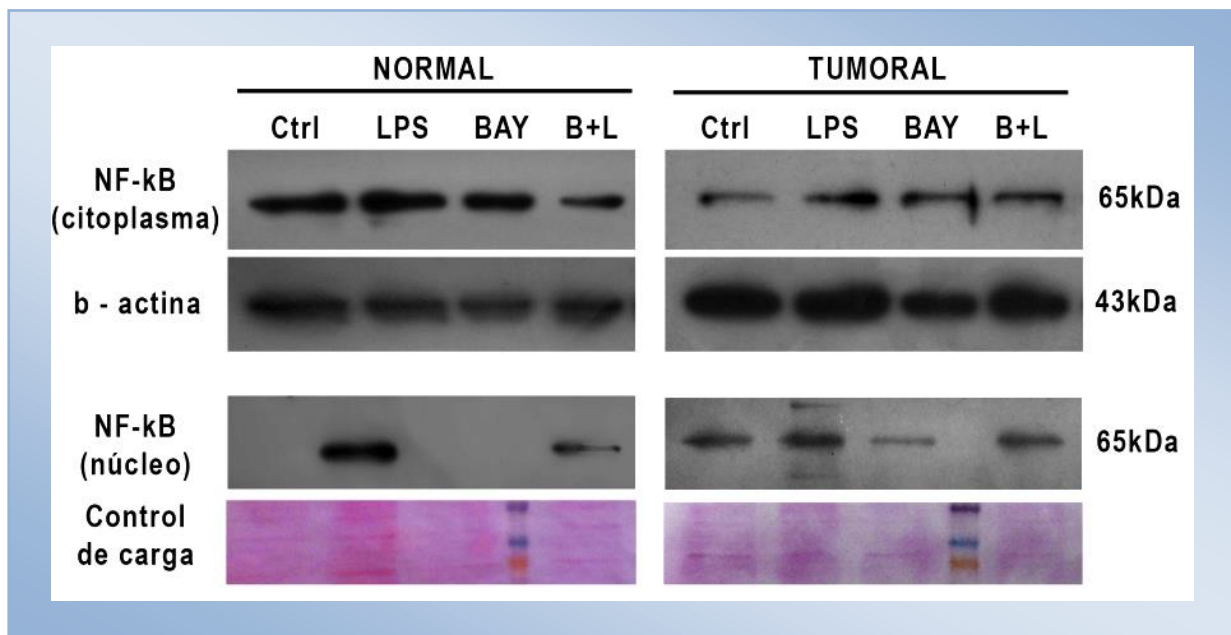


Figura 16. Expresión de NF- κ B en cultivos hipofisarios normales y tumorales. Las células hipofisarias fueron estimuladas con LPS por 24 h, solo o en combinación con el inhibidor de la translocación de NF- κ B (BAY). La expresión de β -actina y la tinción con Rojo Ponceau fueron empleados como control de carga para citoplasma y núcleo respectivamente. Se muestran membranas representativas de tres experimentos independientes.

Bajo este diseño experimental se evaluó también el efecto de BAY sobre la proliferación y senescencia celular hipofisarias. El bloqueo de NF- κ B inducido BAY indujo senescencia celular tanto en contextos normales como tumorales, acompañado también por la inhibición la proliferación celular basal (Figura 17). Este hallazgo sugiere que la acción de NF- κ B podría ser moduladora de la senescencia. Además, la acción de BAY junto con LPS indujo un importante aumento de la proliferación celular en

condiciones normales y tumorales, indicando que LPS sería capaz de estimular proliferación por vías alternativas a la activación de NF- κ B (Figura 17).

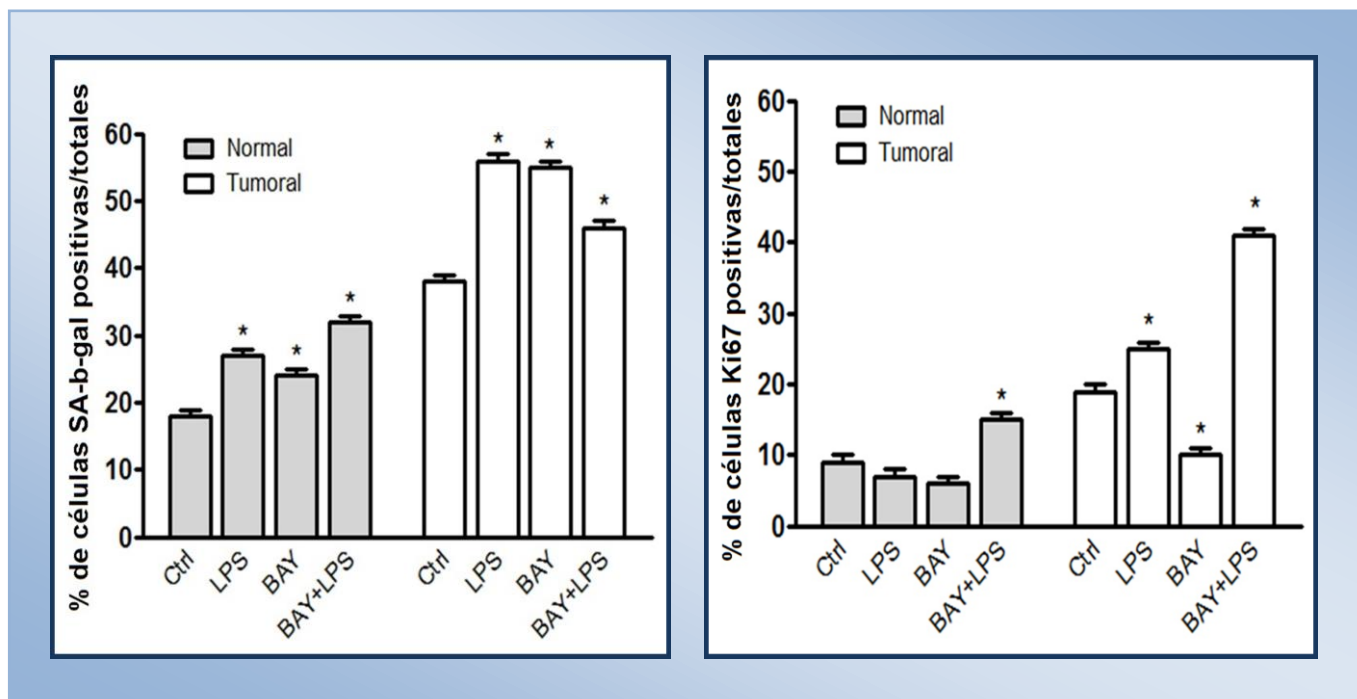


Figura 17. Efecto de LPS sobre la senescencia y proliferación celular en cultivos normales y tumorales. Recuento del número células positivas para SA- β -gal o Ki67 sobre el total de células hipofisarias normales y tumorales tratadas por 24 h con LPS, solo o en combinación con el inhibidor de la translocación de NF- κ B (BAY). Los resultados son presentados como las medias \pm SEM de los porcentajes para cada condición experimental. Fischer test, $p < 0,05$.

Localización subcelular de IL-6 en células hipofisarias normales y tumorales

Mediante la doble identificación inmunocitoquímica a nivel ultraestructural se detectó la expresión de IL-6 a nivel citoplasmático, particularmente localizada en organelas proteinopoyéticas y específicamente en retículo endoplasmático rugoso (oro coloidal de 15nm) de células lactotropas tumorales. Estas células endocrinas fueron identificadas a través de la expresión de la hormona prolactina, almacenada en gránulos secretorios pleomórficos maduros (oro 5nm) (Figuras 18).

Estos resultados permitirían suponer que, bajo condiciones tumorales, un mayor número de células secretoras de hormonas expresarían IL-6 indicando que las poblaciones endocrinas constituirían una fuente intrahipofisaria de la citoquina además de su clásica presencia en las células no hormonales FS.

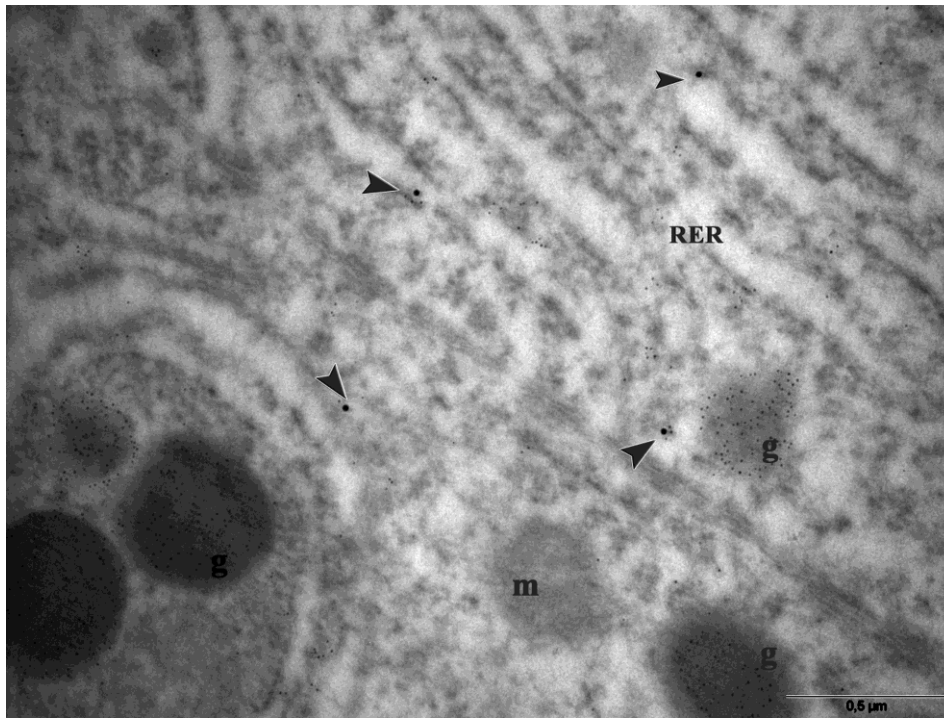


Figura 18. Micrografía electrónica de células lactotropa tumoral conteniendo gránulos secretores típicos (g) de 500-900nm de diámetro, que también expresan IL-6 asociado con RER. El contenido de PRL se identificó con partículas de oro de 5nm y la inmunoexpresión de IL-6 con partículas de oro de 15nm (cabeza de flecha). Barra = 0.5µm.

DISCUSIÓN

El presente trabajo estuvo enfocado en investigar la incidencia de IL-6 exógena y endógena sobre la regulación de la proliferación y senescencia de cultivos primarios de células hipofisarias normales y tumorales de rata.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar la participación de IL-6 en el control del crecimiento tumoral hipofisario. Esta citoquina fue capaz de reducir la proliferación e inducir senescencia en contextos tumorales, contribuyendo a la regulación negativa del crecimiento glandular. Asimismo, la activación del transcriptoma inflamatorio, inducida por LPS, influenció el surgimiento de senescencia demostrando que la participación de NF- κ B ejerció un rol central como modulador de la respuesta senescente en hipófisis tanto normal como tumoral.

Dada la importancia funcional de la glándula hipófisis en el organismo, la emergencia de la senescencia celular, una de las variadas respuestas tisulares frente a lesiones proliferativas, adquiere un rol destacado en la fisiopatogenia del tumor hipofisario a fin de regular su crecimiento descontrolado.

Todos los organismos superiores dependen críticamente de las hormonas que se secretan rítmicamente desde la hipófisis anterior. El funcionamiento apropiado de esta glándula maestra es controlado de modo dinámico por intrincados mecanismos de regulación que, en última instancia, determinan la fina coordinación de las células endocrinas excitables, todas ellas heterogéneamente distribuidas en el parénquima de la glándula. La producción y secreción hormonal hipofisaria están reguladas por la liberación e inhibición de factores de origen hipotalámico que acceden a la glándula a través de la circulación portal. A la regulación central ejercida por neuropéptidos, se le suma el control promovido por las hormonas de órganos endócrinos periféricos, tal el caso de los esteroides sexuales, destacándose el rol ejercido por el estrógeno. Esta hormona participa en la regulación de la proliferación de células hipofisarias cuyos efectos involucran múltiples mecanismos de acción tanto directos como indirectos (Sarkar, 2006) siendo ampliamente descripta su contribución en la génesis de adenomas hipofisarios (Melmed, 2003).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el tratamiento estrogénico sostenido es capaz de inducir la secreción de prolactina, además de promover el desarrollo tumoral (Mukdsi et al., 2004; Sabatino et al., 2013). Asimismo, el estrógeno promueve la expresión del ARNm de hormona luteinizante y folículo estimulante sin afectar la tasa mitótica de gonadotropas (Kanasaki y col., 2012). En tanto, son controversiales los

efectos del estrógeno sobre la población de tiotropas, las cuales dependerían tanto de las condiciones del microambiente, estado celular y grado de diferenciación, posiblemente asociado a la activación de diferentes vías de señalización (Malaguti y col., 2004). Las acciones estrogénicas sobre la población de células corticotropas, productoras de ACTH, estarían asociadas a la incapacidad de suprimir la secreción de esta hormona inducida por estrés, efectos que ocurren por la interacción del estrógeno con su receptor a nivel hipotalámico (Weiser y Handa, 2009).

Asimismo, cobra importancia el efecto inmunomodulador ejercido por el estrógeno sobre la síntesis de citoquinas implicadas en la regulación de la diferenciación, proliferación y fisiopatología hipofisarias (Arzt y col., 1999; Lang, 2004). En este sentido, se ha mencionado que los estrógenos modulan la síntesis de ciertas citoquinas en células hipofisarias endocrinas o no endocrinas (células foliculo estrelladas), dependiendo del contexto fisiológico (Renner y col., 2009). En este marco nos interesó profundizar el estudio de los efectos de IL-6 exógena sobre la proliferación y senescencia celular en cultivos primarios de hipófisis normales y tumorales inducidas experimentalmente por tratamiento sostenido con estrógeno *in vivo*. Además, se propuso examinar *in vitro* la acción endógena o intracrina de la citoquina, inducida por lipopolisacárido bacteriano LPS, sobre la proliferación y senescencia de células hipofisarias normales y tumorales; así como analizar las modificaciones de los niveles intracelulares de IL-6 y su secreción con posterioridad al tratamiento con IL-6 o LPS. El modelo experimental de desarrollo tumoral hipofisario empleado en el presente trabajo, fue utilizado en trabajos previos de nuestro laboratorio (Mukdsi y col., 2004; Sabatino y col., 2013; 2015). El mismo consistió en la inducción del tumor hipofisario en ratas cepa Wistar mediante la implantación subcutánea de cápsulas de silástico conteniendo benzoato de estradiol durante 40 días.

Es conocida la implicancia de IL-6 de origen intrahipofisaria sobre la fisiopatogenia y el desarrollo de los tumores de hipófisis. Esta citoquina ejerce efectos duales en la glándula hipofisaria, estimulando la síntesis y secreción de hormonas e inhibiendo la proliferación de células endocrinas normales (Renner y col., 2009), mientras que en tumores, estimula la proliferación celular y la producción de factores angiogénicos (Farnoud y col., 1994; Haedo y col., 2009; Hofler y col., 1984).

Los efectos divergentes de IL-6 podrían vincularse a sus acciones sobre la senescencia celular. En este sentido, Kuilman y colaboradores (2008) demostraron que IL-6 producida por las mismas células senescentes intervendría de forma autocrina en

el surgimiento de la senescencia, mientras que de manera paracrina IL-6 promovería la proliferación de células vecinas favoreciendo la tumorigénesis en estrecha correlación con la activación de inhibidores de ciclinas como p15, p16 y p21. De esta variedad de las acciones, en este trabajo se puso énfasis en evaluar aquellos aspectos relacionados con el balance del crecimiento de la glándula hipófisis en contextos normales y tumorales. Por ello, para caracterizar la participación de IL-6 en el desarrollo de tumores hipofisarios fue relevante determinar su rol sobre los procesos de proliferación y senescencia hipofisarias.

Nuestros resultados revelaron que IL-6 exógena disminuyó la proliferación celular tanto en condiciones normales, concordancia con estudios previos (Arzt y col., 1999; Renner y col., 2009), así como también en contextos tumorales, a la vez que mostró un efecto pro-senescente bajo en contexto tumoral. En conjunto, los datos permiten hipotetizar que, en durante el desarrollo tumoral, la mayor producción intrahipofisaria de IL-6 contribuiría a influenciar a las propias células endocrinas para desencadenar el proceso de senescencia celular durante el desarrollo tumoral, tanto mediante acción autocrina de las mismas células endócrinas como por mecanismos paracrinos desde la población de células folículo-estrelladas. Mediante doble inmunocitoquímica ultraestructural, pudimos demostramos que las poblaciones celulares endocrinas constituirían una fuente adicional de citoquinas en estadios avanzados de desarrollo tumoral, sugiriendo que estas últimas, particularmente las células lactotropas, serían capaces de producir la citoquina contribuyendo así al control del desarrollo del tumor hipofisario. Estos resultados nos llevan a sugerir que IL-6 sería capaz de promover un balance hacia procesos antiproliferativos, reforzando su acción como reguladora negativa de la proliferación celular en tumores hipofisarios.

La acción de IL-6 endógena, evaluada mediante el desafío con LPS, indujo la secreción de esta citoquina (Sabatino y col., 2013) a la vez que estimuló la senescencia celular, tanto en contextos normales como tumorales, reafirmando la participación de la red inflamatoria en la inducción de senescencia hipofisaria. Así también, no se detectaron diferencias en la capacidad de inducción de senescencia en relación al origen endógeno o exógeno de IL-6, en contraposición a lo descrito por Kuilman y colaboradores (2008). En línea con esta idea, mediante el bloqueo de la secreción de IL-6, demostramos que la inducción de senescencia mediada por el estímulo con LPS, fue activada por factores secretados al medio y no a través de mecanismos intracelulares intracrinos.

Si bien estudios recientes han señalado que LPS estimularía la senescencia celular a través de la producción de ROS, de la activación de la respuesta al daño del ADN y de la expresión del inhibidor de CKDs p16 (Feng, et al. 2014; Kim, et al. 2012; Yu, et al. 2012), nuestros resultados permiten concluir que la secreción de factores específicos, probablemente como parte del transcriptoma inflamatorio y componentes SASP, jugarían un rol destacado en la inducción de senescencia hipofisaria observada bajo las presentes condiciones experimentales.

Por otro lado, la estimulación mediada por LPS promovió también un aumento de la proliferación exclusivamente bajo el contexto de hipófisis tumorales. Estos resultados sugieren que la acción de LPS es mucho más compleja que la de IL-6 exógena, desencadenando ambas respuestas: proliferativa y senescente probablemente a través la activación de múltiples vías de señalización, como se reportó previamente (Sabatino y col., 2013).

El empleo de BFA, solo o en combinación con LPS, en cultivos primarios de hipófisis como estrategia para promover la acumulación intra-citoplasmática de IL-6, produjo una disminución en la proliferación basal tanto en condiciones normales como tumorales, efecto que ya había sido sugerido por algunos autores (Anadu y col., 2006; Rajamahanty y col., 2010). El efecto antimitogénico observado no estaría asociado con la inducción de senescencia celular, por tanto es posible que intervengan otros procesos biológicos alternativos a los analizados en este trabajo de Tesina.

En suma, este grupo de datos nos lleva a proponer que la citoquina IL-6 intrahipofisaria y el SASP serían responsables, al menos en parte, de la baja tasa de proliferación y de la naturaleza benigna de los tumores hipofisarios, mediante la regulación de la senescencia celular. Experimentos adicionales son necesarios para determinar la participación de CEBP/ β y otras citoquinas hipofisarias, incluyendo IL-11 o LIF, en la senescencia hipofisaria.

Otro de los protagonistas de estudio en el presente trabajo fue el factor de transcripción NF- κ B y su contribución en la regulación del crecimiento celular hipofisario. Este factor es ubicuo y activado por una variedad de estímulos como citoquinas pro-inflamatorias, factores de estrés ambientales y numerosas injurias celulares (Hoffmann y col., 2006). NF- κ B colabora en el control de los destinos celulares, incluyendo proliferación y apoptosis, regula la homeostasis tisular y contribuye en la regulación de las respuestas a estrés celular (Li y Stark, 2002). Asimismo, NF- κ B controla la actividad transcripcional de numerosos genes implicados en la regulación inmune, aunque que

también su rol es trascendental para la supervivencia, diferenciación y proliferación de las células no inmunes (Hoffmann y col., 2006) por lo que también ha sido involucrado en los aspectos de desarrollo tumoral y la metástasis (Ben-Neriah y Karin, 2011; Vallabhapurapu y Karin, 2009).

Si bien son numerosos los reportes demostrando sus acciones pro-oncogénicas, NF- κ B también ejerce un rol en respuestas anti-proliferativa bajo determinados contextos (Basseres y Baldwin 2006). En particular, ha sido vinculado a un gran número de genes asociados a senescencia (Chien y col., 2011) y se ha señalado que actuaría en un circuito de retroalimentación positiva con IL-6 amplificando la activación de la red inflamatoria que mantiene la senescencia celular (Ren y col., 2009). La potencial contribución de NF- κ B a la senescencia sigue siendo polémica. Algunos estudios sugieren un papel en la regulación del SASP, mientras que otros indican que la expresión incrementada de NF- κ B contribuye a evadir la senescencia (Acosta y col., 2008; Batsi y col., 2009; Rovillain y col., 2011; Wang y col., 2002).

En este trabajo, la inhibición de la translocación NF- κ B, mediada por BAY, fue capaz de inducir un aumento en la senescencia celular tanto en contextos normales y tumorales. Esto indicaría que NF- κ B ejercería un control del proceso de senescencia, o en otros términos, su falta de inducción basal generaría un estímulo estresor capaz de desencadenar senescencia. A propósito de esto, se ha demostrado que NF- κ B es capaz de retrasar el surgimiento de senescencia mediante el control de DDR (Batsi y col., 2009) y por lo tanto, en contextos tumorales, la reducción de su función acompañada por la activación de la respuesta al daño de ADN como reportamos in vivo (Sabatino y col., 2015), podría dar lugar al surgimiento de senescencia. En esta línea de ideas, en glioblastoma el bloqueo de la función de NF- κ B induce el surgimiento de senescencia mediante la disminución de la expresión de moléculas del progreso del ciclo celular (Nogueira y col., 2011), indicando que este factor de transcripción actúa modulando una amplia gama de respuestas celulares y su rol en senescencia puede ser diverso.

Además, el desafío con LPS en presencia de la inhibición de NF- κ B mostró notables aumentos en la proliferación, sugiriendo la activación de vías proliferativas alternativas en respuesta a la endotoxina, como Akt/PI3k o MAPK (Sabatino y col., 2013), lo cual sumado a la falta de inducción del SASP, podrían sobrepasar esta barrera intrínseca y llevar una mayor predisposición al desarrollo tumoral. La contribución de NF- κ B en la proliferación celular y en la tumorigénesis ha sido

extensamente estudiada. No obstante, los efectos de este factor de transcripción son muy variados y, al formar parte de una red integrada de vías de señalización, la interpretación directa de sus efectos es compleja (Oeckinghaus y col., 2011). Defectos en las redes de señalización vinculados con la acción de NF- κ B podrían inhabilitar esta barrera intrínseca anti-tumoral, permitiendo la progresión de lesiones proliferativas hacia un grado maligno (Acosta y Gil 2009). Estos hallazgos ponen de relevancia que el rol de NF- κ B no solo está en la modulación del fenotipo secretor pro-inflamatorio capaz de regular la proliferación y senescencia sino también como elemento central en la homeostasis celular hipofisaria.

En síntesis, nuestros hallazgos sugieren que NF- κ B tendría un rol relevante en la homeostasis celular hipofisaria dado que ejercería una función reguladora sobre la proliferación así como en la activación de la red inflamatoria capaz de modular la respuesta senescente, formando parte crucial del control del crecimiento hipofisario.

Igualmente, demostramos que IL-6 contribuye en la regulación de la proliferación y senescencia hipofisarias en contextos normales y tumorales, con la participación de NF- κ B como modulador de las respuestas a estrés celular. Sin duda la senescencia celular forma parte de las respuestas tisulares de la glándula hipofisaria frente a lesiones proliferativas y su rol adquiere relevancia en la fisiopatología del tumor hipofisario.

Futuros estudios que incluyan la adición exógena de citoquinas junto al bloqueo de NF- κ B en condiciones de estimulación mitogénica deberán ser realizados para clarificar de qué manera NF- κ B provoca estas respuestas.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró la incidencia de IL-6 en la regulación de la proliferación y senescencia hipofisarias, tanto en contextos normales como tumorales, con la participación de NF- κ B como modulador de las respuestas al estrés celular.

En conjunto, nuestros resultados permiten resaltar que los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la regulación de la función hipofisaria aportan fundamentos para la comprensión de los complejos mecanismos que participan en la homeostasis hipofisaria y sus desequilibrios en la tumorigénesis de la glándula hipófisis.

Investigar los efectos de IL-6 sobre la regulación de la proliferación y senescencia de células hipofisarias normales y tumorales en cultivo primario ha constituido el eje central del presente trabajo y se espera que los resultados obtenidos puedan contribuir al conocimiento de naturaleza benigna de los tumores hipofisarios y la regulación de los mecanismos que participan en la tumorigénesis hipofisaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Farnoud, M.R., Derome, .P, Peillon, F., Li, J.Y. Immunohistochemical localization of different laminin isoforms in human normal and adenomatous anterior pituitary. *Lab Invest* (in press). 1994.
- Hofler, H., Walter, G.F., Denk, H. Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol*, 65: 35-40, 1984.
- Li y Stark, 2002
- Rovillain, E., Mansfield, L., Caetano, C., Alvarez-Fernandez, M., Caballero, O.L., Medema, R.H., Hummerichm H. and Jat, P.S. Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. *Oncogene*, 30: 2356-2366, 2011.
- Batsi, C., Markopoulou, S., Vartholomatos, G., Georgiou, I., Kanavaros, P., Gorgoulis, V.G., Marcu, K.B. and Kolettas, E. Chronic NF-kappaB activation delays RasV12-induced premature senescence of human fibroblasts by suppressing the DNA damage checkpoint response. *Mech Ageing Dev*, 130: 409-419, 2009.
- Acosta, J.C. and Gil, J. A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? *Cancer Res.*, 69(6): 2167-2170, 2009.
- Acosta, J.C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., D'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E. and Gil, J. Chemokine signaling via the CXCR2-receptor reinforces senescence. *Cell*. 133: 1006-1018, 2008.
- Adams, P.D. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*, 36: 2-14, 2009.
- Arzt, E. gp130 cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuroendocrine pathways. *J Clin Invest*, 108(12): 1729-1733, 2001.
- Arzt, E., Buric, R., Stelzer, G., Stalla, J., Sauer, J., Renner, U. and Stalla, G.K. Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology*, 132: 459-467, 1993.
- Arzt, E., Chesnokova, V., Stalla, G.K. and Melmed, S. Pituitary adenoma growth: a model for cellular senescence and cytokine action. *Cell Cycle*, 8(5): 677-678, 2009.
- Arzt, E., Pereda, M.P., Castro, C.P., Pagotto, U., Renner, U. and Stalla, G.K. Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol*, 20: 71-95, 1999.

- Asa, S.L. and Ezzat, S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol.* 4: 97-126, 2009.
- Balkwill, F. and Coussens, L.M. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431(7007): 405-406, 2004.
- Bartek, J., Hodny, Z. and Lukas, J. Cytokine loops driving senescence. *Nat Cell Biol*, 10: 887-889, 2008.
- Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 961-976, 2005.
- Ben-Neriah, Y. and Karin, M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol*, 12: 715-723, 2011.
- Besedovsky, H.O. and del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 17: 64-102, 1996.
- Bosshart, H. and M. Heinzemann, Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin, *Ann N Y Acad Sci*, 1096: 1-17, 2007.
- Caino, M.C., J. Meshki, and Kazanietz, M.G. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. *Apoptosis*, 14(4): 392-408, 2009.
- Campisi, J. and D'adda Di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 729-740, 2007.
- Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120: 513-522, 2005.
- Chesnokova, V. and Melmed, S. Pituitary tumour-transforming gene (PTTG) and pituitary senescence. *Horm Res*, 71(2): 82-87, 2015.
- Chesnokova, V., Zonis, S., Ben-Shlomo, A., Wawrowsky, K. and Melmed, S. Molecular Mechanisms of Pituitary Adenoma Senescence. *New Molecular, Physiological and Clinical Aspects. Front Horm Res. Basel, Karger*, 38: 7-14, 2010.
- Chrousos, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*, 332: 1351-1362, 1995.
- Collado, M. and Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, 10: 51-57, 2010.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., Beach, D. and Serrano, M. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436: 642, 2005.
- Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Krtolica, A., Beausejour, C.M., Parrinello, S., Hodgson, J.G., Chin, K., Desprez, P.Y. and Campisi, J. A human-like senescence-

associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. PLoS One, 2010.

- Courtois, G. and Gilmore, T.D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 25(51): 6831-6843, 2006.

- De Paul, A.L., Attademo, A.M., Carón, R.W., Soaje, M., Torres, A.I., Jahn, G.A. and Celis, M.E. Neuropeptide glutamic-isoleucine (NEI) specifically stimulates the secretory activity of gonadotrophs in primary cultures of female rat pituitary cells. *Peptides*, 30(11): 2081-2087, 2009.

- De Paul, A.L., Gutiérrez, S., Sabatino, M.E., Mukdsi, J.H., Palmeri, C.M., Soaje, M., Petiti, J.P. and Torres, A.I. Epidermal growth factor induces a sexually dimorphic proliferative response of lactotroph cells through protein kinase C-ERK1/2-Pit-1 in vitro. *Exp Physiol.*, 96(2): 226-239, 2011.

- De Paul, A.L., Pons, P., AOKI, A. and Torres, A.I. Different behavior of lactotroph cells in response to Angiotensin II and Thyrotrophynreleasing hormone. *Cell Mol Neurobiol*, 17(2): 245-258, 1997.

- Derynck, R., Akhurst, R.J. and Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.*, 29:117-129, 2001.

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira Smith, O., and et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 92: 9363-9367, 1995.

- Eijo, G., Zarate, S., Jaita, G., Ferraris, J., Magri, M.L., Zaldivar, V., Radl, D., Boti, V., Pisera, D. and Seilicovich, A. Inhibition of nuclear factor-kappa B sensitises anterior pituitary cells to tumour necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced apoptosis, *J. Neuroendocrinol*, 23: 651-659, 2011.

- Eynard, A.R., Valentich, M.A. y Rovasio, R.A. *Histología y Embriología Humanas: Bases celulares y moleculares con orientación clínico-patológica*, 5ta Edición, 2016.

- Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.Y. and Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*, 16: 238-246, 2010.

- Gartner, L.P. y Hiatt, J.L. *Atlas Color de Histología*. McGraw-Hill Interamericana, México, 1998.

- Gavier, M.F., Aoki, A. and Orgnero de Gaisán, E. Prolactin secretory bypath exposed in cultured lactotrophs. *Histochem J.*, 31(10): 661-70, 1999.

- Ghisletti, S., Meda, C., Maggi, A. and Vegeto, E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol*, 25(8): 2957-2968, 2005.
- Haedo, M.R., Gerez, J., Fuertes, M., Giacomini, D., Paez-Pereda, M., Labeur, M., Renner, U., Stalla, G.K. and Arzt, E. Regulation of pituitary function by cytokines. *Horm Res*, 72: 266-274, 2009.
- Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Cell*, 37: 614-636, 1965.
- Hoffmann, A., Natoli, G. and Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 25: 6706-6716, 2006.
- Jeong, S.J., Jeong, S.J., Kim, H.J., Yang, Y.J., Seol, J.H., Jung, B.Y., Han, J.W., Lee, H.W. and Cho, E.J. Role of RNA polymerase II carboxy terminal domain phosphorylation in DNA damage response. *J Microbiol*, 43(6): 516-522, 2005.
- Jones, T.H., Daniels, M., James, R.A., Justice, S.K., McCorkle, R., Price, A., Kendall-Taylor, P. and Weetman, A.P. Production of bioactive and immunoreactive interleukin-6 (IL-6) and expression of IL-6 messenger ribonucleic acid by human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.*, 78: 180-187, 1994.
- Kamimura, D., Ishihara, K. and Hirano, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 149: 01-38, 2003.
- Kanasaki, H., Purwana, I.N., Mijiddorj, T., Sukhbaatar, U., Oride, A. and Miyazaki, K. Effects of estradiol and progesterone on gonadotropin LHbeta- and FSHbeta-subunit promoter activities in gonadotroph LbetaT2 cells. *Neuro Endocrinol Lett*, 33: 608-613, 2012.
- Katakura, Y. Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1076-1081, 2006.
- Kim, S.U., Shin, D.H. and Moretto G. Isolation, culture and cell-type identification of adult human pituitary cells. *Acta Neuropathol*, 68: 205-208, 1985.
- Kuilman, T. and Peeper, D.S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*, 9: 81-94, 2009.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J. and Peeper, D.S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133: 1019-1031, 2008.

- Kurotani, R., Yasuda, M., Oyama, K., Egashira, N., Sugaya, M., Teramoto, A. and Osamura, R.Y. Expression of interleukin-6, interleukin-6 receptor (gp80), and the receptor's signal-transducing subunit (gp130) in human normal pituitary glands and pituitary adenomas. *Mod Pathol*, 14: 791-797, 2001.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. Senescence-associated beta-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative aging of human endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 113, 3613-3622, 2000.
- Lang, T.J. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol*, 113: 224-230, 2004.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D. and Hwang, E.S. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5: 187-195, 2006.
- Levy, A. and Lightman, S. Molecular defects in the pathogenesis of pituitary tumours. *Front Neuroendocrinol*, 24: 94-127, 2003.
- Levy, A. Physiological implications of pituitary trophic activity. *J. Endocrinol*, 174(2): 147-55, 2002.
- Lohrer, P., Gloddek, J., Nagashima, A.C., Korali, Z., Hopfner, U., Pereda, M.P., Arzt, E., Stalla, G.K. and Renner, U. Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology*, 141: 4457-4465, 2000.
- Lu, C. and Kerbel, R.S. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J. Cell Biol.*, 120 (5): 1281-1288, 1993.
- Malaguti, A., Della Casa, C., Castorina, S., Martelli, A.M., Roti, E., Martino, E. and Toni, R. Molecular mechanisms for pituitary thyrotroph cell growth. *J Endocrinol Invest*, 27: 151-167, 2004.
- Malarkey, W.B. and Mills, P.J. Endocrinology: the active partner in PNI research. *Brain Behav Immun*, 21: 161-168, 2007.
- Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K.M., Grimm, P., Schmidt, B.M. and Halloran, P.F. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.*, 63: 2134-2143, 2003.
- Melmed, S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*, 112(11): 1603-1618, 2003.
- Melmed, S. Pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 44:1-9, 2015.

- Mooi, W.J. Oncogene-induced cellular senescence: causal factor in the growth arrest of pituitary microadenomas? *Horm Res*, 71(2): 78-81, 2009.
- Mukdsi, J.H., De Paul, A.L., Munoz, S., Aoki, A. and Torres, A.I. Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen. *Histochem Cell Biol*, 121: 453-462, 2004.
- Mukdsi, J.H., De Paul, A.L., Petiti, J.P., Gutierrez, S., Aoki, A. and Torres, A.I. Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas. *Acta Neuropathol*, 112: 491-501, 2006.
- Onofri, C., Carbia Nagashima, A., Schaaf, L., Feirer, M., Lohrer, P., Stummer, W., Berner, S., Chervin, A., Goldberg, V., Stalla, G.K., Renner, U. and Arzt, E. Estradiol stimulates vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in human lactotroph and lactosomatotroph pituitary adenomas, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 112: 18–23, 2004.
- Orgnero de Gaisan, E.M., Maldonado, C.A. and Aoki, A. Fate of degenerating lactotrophs in rat pituitary gland after interruption of lactation: a histochemical and immunocytochemical study. *Histochem J*, 25: 150-165, 1997.
- Paez-Pereda, M., Giacomini, D., Refojo, D., Nagashima, A.C., Hopfner, U., Grubler, Y., Chervin, A., Goldberg, V., Goya, R., Hentges, S.T., Low, M.J., Holsboer, F., Stalla G.K., et al. Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100: 1034-1039, 2003.
- Pendergrass, W.R., Lane, M.A., Bodkin, N.L., Hansen, B.C., Ingram, D.K., Roth, G.S., Yi, L., Bin, H. and Wolf, N.S. Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (*Macacamulatta*) *J. Cell Physiol*, 180: 123-130, 1999.
- Perez-Castro, C., Nagashima, A.C., Pereda, M.P., Goldberg, V., Chervin, A., Largent, P., Renner, U., Stalla, G.K. and Arzt, E. The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function and growth of lactosomatotropic and folliculostellate pituitary cell lines. *Endocrinology*, 141: 1746-1753, 2000.
- Perez-Castro, C., Renner, U., Haedo, M.R., Stalla, G.K. and Arzt, E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev.*, 92:1-38, 2012.
- Pikarsky, E. and Ben-Neriah, Y. NF-kappaB inhibition: a double-edged sword in cancer? *Eur J Cancer*, 42(6): 779-784, 2006.

- Prieur, A. and Peeper, D.S. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 20: 150-155, 2008.
- Rajamahanty, S., Alonzo, C., Aynehchi, S., Choudhury, M. and Konno, S. Growth inhibition of androgen-responsive prostate cancer cells with brefeldin A targeting cell cycle and androgen receptor. *Journal of Biomedical Science*, 17(5), 2010.
- Ren, J.L., Pan, J.S., Lu, Y.P., Sun, P. and J. Han. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cellular Signalling*, 21: 378-383, 2009.
- Renner, U., De Santana, E.C., Gerez, J., Frohlich, B., Haedo, M., Pereda, M.P., Onofri, C., Stalla, G.K. and Arzt, E. Intrapituitary expression and regulation of the gp130 cytokine interleukin-6 and its implication in pituitary physiology and pathophysiology. *Ann N.Y. Acad Sci*, 1153: 89-97, 2009.
- Renner, U., Pagotto, U., Arzt, E. and Stalla, G.K. 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: 515-532, 1996.
- Rodier, F. and Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *The journal of cell biology*, 192(4): 547-556, 2012.
- Sabatino M.E., Sosa L.V., Petiti J.P., Mukdsi J.H., Mascanfroni I.D., Pellizas C.G., Gutierrez S., Torres A.I. and De Paul A.L. Functional Toll-like receptor 4 expressed in lactotrophs mediates LPS-induced proliferation in experimental pituitary hyperplasia. *Experimental Cell Research*, 319: 3020-3034, 2013.
- Sabatino, M.E., Petiti, J.P., Sosa, L.V., Pérez, P.A., Gutiérrez, S., Leimgruber, C., Latini, A., Torres, A.I. and De Paul, A.I. Evidence of cellular senescence during the development of estrogen-induced pituitary tumors. *Endocrine-related cancer*, 22(3): 299-317, 2015.
- Sarkar, D.K. Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Front Horm Res*, 35: 32-49, 2006.
- Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S., Bridts, C.H. and Stevens, W.J. Comparison of intracellular cytokine production with extracellular cytokine levels using two flow cytometric techniques. *Cytometry B Clin Cytom*, 55(1): 52-58, 2003.
- Shay, J.W., and Roninson, I.B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, 23: 2919-2933, 2004.
- Taniguchi, Y., Yasutaka, S., Kominami, R. and Shinohara, H. Proliferation and differentiation of rat anterior pituitary cells. *Anat. Embryol (Berl)*, 206(1-2): 1-11, 2002.

- Tichomirowa, M., Theodoropoulou, M., Lohrer, P., Schaaf, L., Losa, M., Uhl, E., Lange, M., Arzt, E., Stalla, G.K. and Renner, U. Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) stimulates interleukin-6 production and inhibits growth of pituitary tumour cells expressing the toll-like receptor 4. *J Neuroendocrinol*, 17: 152-160, 2005.
- Vallabhapurapu, S. and Karin, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27: 693-733, 2009.
- Wang, J., Jacob, N.K., Ladner, K.J., Beg, A., Perko, J.D., Tanner, S.M., Liyanarachchi, S., Fishel, R. and Guttridge, D.C. RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. *EMBO Rep*, 10: 1272-1278, 2009.
- Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S & Sun P 2002 Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*, 22: 3389-3403, 2002.
- Weiser, M.J. and Handa, R.J. Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience*, 159: 883-895, 2009.
- Yamashita, M., Qian, Z.R., Sano, T., Horvath, E. and Kovacs, K. Immunohistochemical study on so-called follicular cells and folliculostellate cells in the human adenohypophysis. *Pathology International*, 55(4), 2005.
- Young, A.R.J. and Narita, M. SASP reflects senescence. *EMBO reports*, 10: 228-230, 2009.
- Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premssirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NFkappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev*, 25: 2125-2136, 2011.
- Nogueira, L., Ruiz-Ontanon, P., Vazquez-Barquero, A., Lafarga, M., Berciano, M.T., Aldaz, B., Grande, L., Casafont, I., Segura, V., Robles, E.F., et al. Blockade of the NFkappaB pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both in vitro and in vivo. *Oncogene*, 30: 3537-3548, 2011.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S. and Ghosh, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*, 12: 695-708, 2011.