



Expresión de PRL-3 y -1 en tumores pituitarios experimentales y humanos. Su asociación con proteínas reguladoras del ciclo celular

Gabriela Deisi Moyano Crespo.

Tesis (Doctor en Medicina y Cirugía) - - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2020.

Aprobada: 27 de abril de 2020

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>



Expresión de PRL-3 y -1 en tumores pituitarios experimentales y humanos. Su asociación con proteínas reguladoras del ciclo celular por Gabriela Deisi Moyano Crespo se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
CENTRO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

**EXPRESIÓN DE PRL-3 Y -1 EN TUMORES PITUITARIOS EXPERIMENTALES
Y HUMANOS.**

SU ASOCIACIÓN CON PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR

**Trabajo de Tesis para optar al
Título de Doctora en Medicina y Cirugía**

Gabriela Deisi Moyano Crespo
gabimoyano@gmail.com

Director:
Jorge Humberto Mukdsi

27 de Abril de 2020



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Director:

Prof. Dr. Jorge H. Mukdsi

Prof. Asociado del Centro de Microscopía Electrónica.

Facultad de Ciencias Médicas.

Universidad Nacional de Córdoba.

Integrantes:

Prof. Dra. Alicia Inés Torres

Prof. Titular del Centro de Microscopía Electrónica

Facultad de Ciencias Médicas.

Universidad Nacional de Córdoba.

Prof. Dra. Paula Szafryk de Mereshian

Jefe de Servicio de Endocrinología del Hospital Nacional de Clínicas

Coordinadora académica de la Carrera de Especialización en Endocrinología

Secretaria de Graduados en Ciencias de la Salud

Facultad de Ciencia Médicas - Universidad Nacional de Córdoba.

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Centro Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo con la reglamentación vigente en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Durante la ejecución, la autora fue Profesora Asistente del Centro de Microscopía Electrónica y contó con el apoyo financiero de subsidios del SECyT, CONICET, y FONCYT, otorgados al Centro de Microscopía Electrónica.

AGRADECIMIENTOS

A mi querido Prof. Dr. Jorge Mukdsi, por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto, dando los primeros pasos en la investigación básica y clínica. Por acompañarme con paciencia, contención y muchísima dedicación en esta etapa. Por su compromiso e inagotable energía en la dirección del presente Trabajo de Tesis Doctoral. Todas cualidades dignas de admiración. Gracias por creer en mí.

A la Prof. Dra. Alicia Torres por haberme abierto las puertas del Centro de Microscopia Electrónica brindándome la posibilidad de realizar este proyecto y por asesorarme como miembro de mi Comisión de Seguimiento en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A la Prof. Dra. Paula Mereshian, miembro de mi Comisión de Tesis Doctoral por su asesoramiento y corrección del manuscrito.

A mis queridas Dras. Herrero, Matsuzaki y Manrique por alentarme a seguir este camino, con incondicional apoyo, compañerismo y amistad, las cuales fueron fundamentales para poder desarrollar y terminar este proyecto.

A Laura compañera de equipo, por brindarme su amistad, compañerismo y estímulo, siempre con buena predisposición y optimismo.

A Pablo y Carolina G, compañeros y amigos que desde el primer momento estuvieron ahí para ayudarme en la mesada, transmitiéndome sus conocimientos y ayudándome a llevar a cabo distintas técnicas.

A Luciana García, aquella médica tesista full time, que me entendía hasta la médula cada vez que arrancaba con un protocolo, transmitiéndome sus conocimientos y experiencias.

A Silvina, Pablo y Jony compañeros de C18, sitio de trabajo y largas charlas, donde un par de mates y mil hipótesis solucionan todo.

A Juan y Flor, por sus atinados consejos, con quienes compartimos no solo proyectos e ideas, sino también lo difícil que es la obtención de muestras humanas, desde lo ético a lo burocrático.

A Liliana, Carolina L. y Vicky J., por socorrerme cada vez que algún problema técnico se presentaba.

A Nati y Sofi, siempre atentas y eficientes en cada necesidad. Gracias por brindarme su afecto y apoyo cada vez que los necesité.

A Nahuel, Vicky S, Mariana, Amado, Eze, Natacha, Erica, Franco y Vico, por sus consejos, aliento y charlas compartidas entre técnica y técnica, mates y pasillos.

A Lucia Artino, Tule y Piru, por su disposición cada vez que necesite del área de microtomía, atendiendo siempre con compromiso y amabilidad.

A la Prof. Dra. Silvina Gutiérrez, por su colaboración y atinados consejos en este trabajo de Tesis Doctoral.

A las Dras. Cristina Maldonado y Ana De Paul, por su interés en el desarrollo de este proyecto.

A todo el equipo de investigadores, becarios, tesistas, CPA y técnicos del CME, cada uno de ellos (los que están y los que se fueron) de distintas formas han colaborado para que este trabajo de Tesis Doctoral se lleve a cabo.

A mis amigas Pao, Inés, Romi y Noe, por su cariño y comprensión.

A mi familia por acompañarme siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCIÓN	14
<i>Epidemiología, clasificación y patogenia de adenomas hipofisarios</i>	14
<i>Las vías de transducción de señales y reguladores del ciclo celular de adenomas hipofisarios</i>	17
<i>Las Fosfatasas de Regeneración Hepática: generalidades, aspectos moleculares y funcionales</i>	22
<i>PRL-3</i>	30
<i>PRL-1</i>	32
OBJETIVOS	36
Objetivo General	36
Objetivos Específicos.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
<i>Diseño experimental básico</i>	37
<i>Diseño metodológico aplicado en adenomas hipofisarios humanos</i>	38
<i>Metodologías utilizadas en ambos diseños</i>	38
Análisis morfológico con microscopía fotónica.....	38
Caracterización ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión	39
Estudio inmunohistoquímico a nivel de microscopía fotónica de secciones en parafina.....	39
Estudio inmunocitoquímico a nivel de microscopía confocal.....	41
<i>Inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica de transmisión</i>	43
<i>Técnica de Western Blotting</i>	44
Análisis estadístico.....	46
RESULTADOS	47
<i>Caracterización del modelo experimental básico</i>	47
<i>Expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógenos</i>	48
Expresión de p-ERK en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógeno	48
<i>Expresión de PRL-3 en lesiones tumorales adenohipofisarias inducidas por estrógeno</i>	53
<i>Expresión de PRL-1 en lesiones tumorales adenohipofisarias inducidas por estrógeno</i>	54
Análisis de correlación de las Fosfatasas de Regeneración Hepática -1 y -3 con proteínas reguladoras del ciclo celular y ERKs	59

Adenomas hipofisarios humanos	59
<i>Datos clínicos-epidemiológicos de los adenomas hipofisarios humanos</i>	59
<i>Expresión de PRL-3 en adenomas hipofisarios humanos</i>	63
<i>Análisis de la expresión de PRL-3 en un grupo de adenomas lactotropos humanos</i>	64
<i>Expresión de PRL-1 en adenomas hipofisarios humanos</i>	64
<i>DISCUSIÓN</i>	67
<i>CONCLUSIONES</i>	82
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	83
<i>ANEXOS</i>	99

RESUMEN

Los adenomas hipofisarios son uno de los tumores intracraneales más frecuentes. Si bien son lesiones proliferativas benignas, pueden ser localmente agresivos y dar metástasis. Presentan una fisiopatología compleja que varía entre los diferentes tipos de adenoma. Diversos biomarcadores han sido utilizados para la evaluación clínico-patológica de los mismos. Sin embargo, ninguno de ellos puede predecir con precisión el comportamiento tumoral. En este marco el presente trabajo de Tesis Doctoral analizó la expresión de las Fosfatasa de Regeneración Hepática -3 (PRL-3) y -1 (PRL-1), dos oncoproteínas vinculadas al crecimiento tumoral y metastásico de diversas neoplasias.

Se utilizó un modelo experimental básico hiperplásico/adenomatoso lactotropo inducido por estrógenos en ratas macho de la cepa Fisher 344 y un grupo de adenomas hipofisarios humanos (n=64) de diversa estirpe celular.

En el modelo de adenoma lactotropo experimental se apreció un incremento de p53 y p21 con un máximo nivel de expresión a los 30d BE (estado adenomatoso), mostrando asociación entre sí, además de descenso de la fracción fosforilada de ERK1/2 en relación a la total. Consecuentemente en el modelo experimental utilizado se pondrían en marcha mecanismos contrarregulatorios de la proliferación celular.

PRL-3 y -1 se expresaron a nivel del adenoparénquima hiperplásico/adenomatoso, con una localización celular en membrana plasmática y citoplasma. Si bien, las mismas exhibieron un patrón de expresión diferencial a lo largo del desarrollo tumoral, no se demostró asociación entre ellas, ni con p53. Sin embargo, sí lo hicieron con p21 y en forma directa. En cuanto a las ERKs, estas mostraron solo relación inversamente proporcional con PRL-1. Estos hallazgos permiten inferir que las PRLs son moléculas que participarían en los mecanismos regulatorios del balance proliferativo de forma indirecta, modulando algunas de las moléculas anteriormente mencionadas.

En los adenomas hipofisarios humanos, se demostró una asociación entre la expresión de PRL-3 y el tamaño tumoral (macroadenomas), independientemente de la estirpe celular. Tomando en cuenta sólo los adenomas lactotropos, esta tendencia se mantuvo e incluso la expresión de la fosfatasa se observó en aquellos invasores. Estos hallazgos permitirían vincular en la patología tumoral hipofisaria a PRL-3 como un factor asociado no sólo al crecimiento tumoral, sino también a la capacidad invasiva/agresiva de algunas neoplasias neuroendocrinas hipofisaria. Un dato de significancia clínica fue que ningún adenoma hipofisario evidenció expresión para PRL-1, con lo cual sería solo la otra fosfatasa la que regularía vías y/o estimularía el crecimiento adenomatoso.

Este trabajo de investigación es el primero que muestra la expresión de PRL-3 en tumores hipofisarios humanos, por lo cual esta molécula podría ser candidata para tratamiento blanco, ya que existe evidencia que respalda el potencial de esta fosfatasa como “oncotarget” tumoral específico, siendo el PRL3-zumab un prometedor tratamiento para estos tumores.

ABSTRACT

Pituitary adenomas are the most frequent intracranial tumors. Although they are benign proliferative lesions, they can be locally aggressive and metastasize. They present a physiopathology that is related to the different types of adenoma. Several biomarkers have been used for the clinical-pathological evaluation. However, none of them can accurately predict the tumoral behavior. In this context we have analyzed the expression of Hepatic Regeneration Phosphatases -3 (PRL-3) and -1 (PRL-1), two oncoproteins linked to the tumor and metastatic growth of diverse neoplasms.

A basic hyperplastic/adenomatous experimental model, which have an increase of lactotroph cell, resulting in an experimental lactotroph adenoma, induced by estrogen in male Fischer 344 rats and a group of human pituitary adenomas (n = 64) of different cell line was used, as well.

In the experimental lactotroph adenoma model, an increase of p53 and p21 was observed with a maximum expression level at 30d BE (adenomatous state), showing association with each other, in addition the decrease in the phosphorylated fraction of ERK1/2 in relation to the total. Consequently, in the experimental lactotroph adenoma, counterregulatory mechanisms of cell proliferation would take place.

PRL-3 and -1 were expressed at the hyperplastic/adenomatous adenoparenchyma level, with a cellular location in the plasma membrane and cytoplasm. Although, they exhibited a differential expression pattern in the tumor development, no association was demonstrated between them, nor with p53. However, they have a direct association with p21. As for ERKs, these showed an inversely proportional relation only with PRL-1. These findings allow to infer that the PRLs are molecules that would participate in the regulatory mechanisms of the proliferative balance in an indirect way, modulating some of the aforementioned molecules.

In human pituitary adenomas, an association between the expression of PRL-3 and tumor size (macroadenomas), independently of the cell line was demonstrated. Taking into consideration only the lactotroph adenomas, this tendency was maintained and even the expression of the phosphates was observed in those invasive tumors. These findings would allow associate PRL-3 not only with tumor growth, but also with the invasive capacity of some pituitary neuroendocrine neoplasms. None of the pituitary adenoma evidenced PRL-1 expression, therefore only the other phosphatase would regulate pathways and / or stimulate adenomatous growth.

This research is the first to show the expression of PRL-3 in human pituitary tumors, therefore this molecule could be a candidate for therapy target, since there is evidence which supports the potential of this phosphatase as a specific tumor "oncotarget", being the PRL3-zumab a promising treatment for these tumors.

ABREVIATURAS

ABC: avidina-Biotina complex

ActRIB: Activin Receptor IB

AKT: serina treonina proteína quinasa

AP-1: proteína activadora 1

BDMA: acelerador dimetilaminobenceno

BE: benzoato de estradiol

Brg1: Brahma-related gene-1

°C: grado Celsius

C: control

CAAX: c: aminoácido prenilizado, a: aminoácido alifático, x: cualquier aminoácido

CDK: kinasa dependiente de ciclina

CKIs: inhibidores de kinasas dependiente de ciclinas

cm: centímetro

d: día

DAB diaminobencidina

DBP: diobutilftalato

DDSA: anhídrido dodecenilsuccínico

DKC1: Dyskerin

DSP: dual-specificity phosphatase

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERKs: extracellular signal-regulated kinases

FKBP8: FK506-binding protein 8

p-ERK: ERK fosforilada

t-ERK: ERK total

FGF4: factor de crecimiento fibroblástico 4

F344: ratas Fischer 344

g: gramo

GNAS: Genes para codificación de proteína G

Gs_α: Subunidad alfa de proteína G

h: hora
HRP: Horseradish Peroxidase
IgG: inmunoglobulina G
Ki67: proteína marcadora de proliferación celular
LR White: London Resin White
MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase
Mg: miligramo
min: minuto
mm: milímetro
mM: milimolar
MMP: metaloproteínasa de la matriz
n: número
nm: nanómetro
OMS: Organización Mundial de la Salud
p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1 o CDK-interacting protein 1
p53: proteína de 53 KDa, supresora tumoral
PBS-BSA: tampón fosfato salino–albúmina bovina
pH: potencial de hidrogeniones
PHP: phospho-histidin phosphatase
PI3K: fosfatidilinositol-3 quinasa
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PPP: phosphoprotein phosphatase
PPM: metal-ion-dependend protein phosphatase
PRL-1: phosphatase of regenerating liver-1
PRL-3: phosphatase of regenerating liver-3
PTP: Protein Tirosin Phosphatase
PTTG: Protein Pituitary Tumor-Transforming Gene
PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
r.p.m: revoluciones por minuto
RER: retículo endoplásmico rugoso

Rb: proteína del retinoblastoma
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
RMN: Resonancia magnética nuclear
s: segundo
SD: ratas Sprague-Dawley
SELPLG: ligando de P selectina
Ser: aminoácido serina
Smad2: small mothers against decantaplegic
Sp-1: specificity protein 1
Src: protooncogen del sarcoma
TBS: tampón buffer salino
TEM: transición epitelio-mesenquimática
TGF: factor de crecimiento transformante
Thr: aminoácido treonina
TRH: hormona liberadora de tirotrófina
Tyr: aminoácido tirosina
μg: microgramo
μm: micrómetro

INTRODUCCIÓN

Epidemiología, clasificación y patogenia de adenomas hipofisarios

Los adenomas hipofisarios son uno de los tumores intracraneales más frecuentes representado el 10 % de los mismos y el 90% de las lesiones intraselares (1), con una prevalencia de 1/1500 (2). Son lesiones proliferativas benignas, aunque algunas pueden crecer y ser agresivas localmente, llegando a presentar un comportamiento metastásico intracraneal (3). De los adenomas pituitarios, los adenomas lactotropos constituyen un tercio de todos ellos, siendo las neoplasias pituitarias funcionantes más comunes (4).

Tal como lo presenta Miermeister y col. (5) los primeros sistemas de clasificación se basaron en el tamaño tumoral (microadenomas <10 mm vs macroadenomas >10 mm) y características tintoriales con colorantes clásicos (acidófilos, basófilos y cromóforos). Luego, el análisis de la expresión hormonal permitió diferenciar los distintos subtipos y variantes (5).

La clasificación de 2017 revisada por la OMS, no solo tuvo en cuenta el contenido hormonal del tumor, sino que reconoció también el rol de los factores de transcripción (**Tabla 1**) en la diferenciación neoplásica acorde al linaje celular, la regulación de la producción de hormonas y la posible tumorigenesis del adenoma, dejando de lado la utilización rutinaria de la microscopia electrónica de transmisión, ya que la gran mayoría de estos tumores son clasificados mediante inmunohistoquímica (6).

En 2017, Asa y col. (7) propusieron una nueva terminología para los adenomas hipofisarios. La nueva denominación de tumores neuroendocrinos hipofisarios (PitNET en la sigla en inglés) que se basó en que la clásica diferenciación entre adenomas y carcinomas por la ausencia o presencia de diseminación metastásica y la pobre reproducibilidad del diagnóstico de adenomas atípicos basada en la detección de mitosis o expresión de p53 y Ki67, era según estos autores un tanto simplista y hasta errónea.

La patofisiología de los adenomas hipofisarios es compleja y varía entre los diferentes tipos de adenoma. Mediante el análisis de la inactivación del cromosoma X, se ha demostrado que estas neoplasias, resultan de la expansión clonal de células adenohipofisarias (8), mediante la participación de eventos genéticos y epigenéticos, estimulación hormonal,

sobreproducción de factores de crecimiento, desregulación de miARNs y participación de células madres (**Figura 1**), que promoverían el desarrollo y crecimiento tumoral (9).

Tabla 1: Clasificación de adenomas hipofisarios según OMS-2017

<i>Tipo de adenoma</i>	<i>Variante morfológica</i>	<i>Hormona</i>	<i>Factor de transcripción</i>
<i>Adenoma Somatotropo</i>			
	Densamente granulado	GH	Pit-1
	Escasamente granulado	GH	Pit-1
	Mamosomatotropo	GH+Prl	Pit-1; REa
	Mixto	GH+Prl	Pit-1, REa
<i>Adenoma Lactotropo</i>			
	Densamente granulado	Prl	Pit-1; REa
	Escasamente granulado	Prl	Pit-1, REa
	Adenoma de células stem	Prl, GH	Pit-1, REa
<i>Adenoma Tirotropo</i>		b-TSH	Pit-1, GATA2
<i>Adenoma Corticotropo</i>	Densamente granulado	ACTH	Tpit
	Escasamente granulado	ACTH	Tpit
	Adenoma de células de Crooke	ACTH	Tpit
<i>Adenoma Gonadotropo</i>		b-FSH, b-LH subunidad a	SF-1, GATA-2, REa
<i>Adenoma de células nulas</i>		Ninguna	Ningún
<i>Adenomas plurihormonales</i>	Adenoma Pit-1 positivo	GH+Prl+b-TSH	Pit-1
	Adenomas con combinaciones inmunohistoquímicas inusuales	Varias combinaciones	

GH: hormona de crecimiento; Prl: prolactina; b-TSH: beta tirotrófina; ACTH: hormona adrenocorticotrofina; b-FSH: beta hormona folículoestimulante; b-LH: beta hormona luteotrófica.

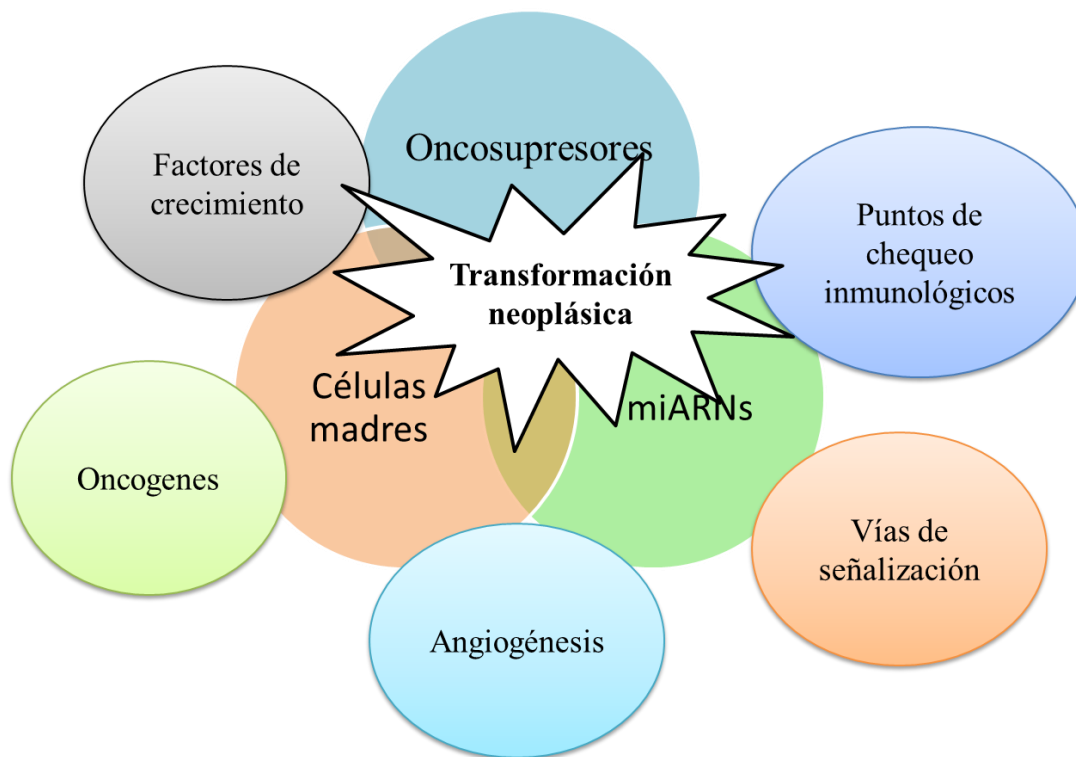


Figura 1: Esquema de la actual hipótesis de la patogénesis de los adenomas hipofisarios. Se destaca el interjuego de múltiples mecanismos que participarían del origen tumoral. (Modificado de Zatelli. Pituitary 21:130-137. 2018).

A continuación se realizará un análisis de los mecanismos patogénicos que Zatelli (9) revisa en relación para las diversas variantes de adenomas pituitarios:

➤ Adenomas lactotropos: en ratones transgénicos se ha demostrado la importancia de TGF- α como estimulador de múltiples hormonas hipofisarias. En adenomas agresivos el EGF induce la secreción de PRL además de estimular la expresión de su receptor. También la expresión de FGF4 ha sido implicada en el desarrollo del adenoma lactotrofo.

➤ Adenomas Somatotropos: en estos adenomas se ha demostrado mutaciones de activación del gen GNAS1, con la consiguiente activación constitutiva de la subunidad G α_s , incrementando la secreción de la hormona de crecimiento.

➤ Adenomas Corticotropos: mutaciones de DKC1 se han asociado con expresión disminuida y disfunción de p27. En estas neoplasias también se ha demostrado disminución de la expresión de Brg1. Finalmente se ha evidenciado alteraciones en los niveles de ciertos tipos de miARNs.

➤ Adenomas Gonadotropos: estos adenomas exhiben altos niveles del receptor de activina, lo que conduce a la tumorigénesis. Además un receptor truncado de activina (ActRIB), el cual no frena el crecimiento, ha sido puesto en evidencia en esta variante de tumor hipofisario.

➤ Adenomas Tirotropos: se suelen presentar en estados de hipotiroidismo crónico con la consecuente hipersecreción de TRH, lo que conduce a la hiperplasia de células tirotropas y posterior transformación neoplásica. También se ha demostrado mutaciones en el receptor de TRH con la consiguiente disminución de la unión del ligando.

Es claro, a partir de lo expuesto precedentemente, que cada tipo de adenoma presenta particularidades en sus mecanismos de origen (**Figura 2**), lo que da complejidad a la obtención de marcadores únicos para este grupo de adenomas tan disímil.

Los adenomas pituitarios a lo largo de los años han sido objeto de diferentes estudios y revisiones, buscando características propias y/o marcadores biológicos, que permitan predecir su comportamiento ayudando de esta manera al tratamiento y seguimiento del paciente.

Las vías de transducción de señales y reguladores del ciclo celular de adenomas hipofisarios

Numerosos biomarcadores, pertenecientes a la familia de proteínas transductoras de señales, factores de proliferación y angiogénicos así como reguladores del ciclo celular, son conocidos por tener algún valor pronóstico con respecto a criterios clínicos y radiológicos para el manejo del comportamiento impredecible de los tumores pituitarios (10).

Diversas vías de señalización originadas en la membrana celular con la participación de la cascada de fosforilación de MAPK (MEKs y ERKs) han sido objeto de estudio en diferentes tumores. La vía MAPK se halla ampliamente distribuida en múltiples células y tejidos, jugando un rol importante en la mediación de la supervivencia, proliferación, ciclo celular, apoptosis, migración e invasión, progresión y metástasis de diversos tumores (11, 12, 13).

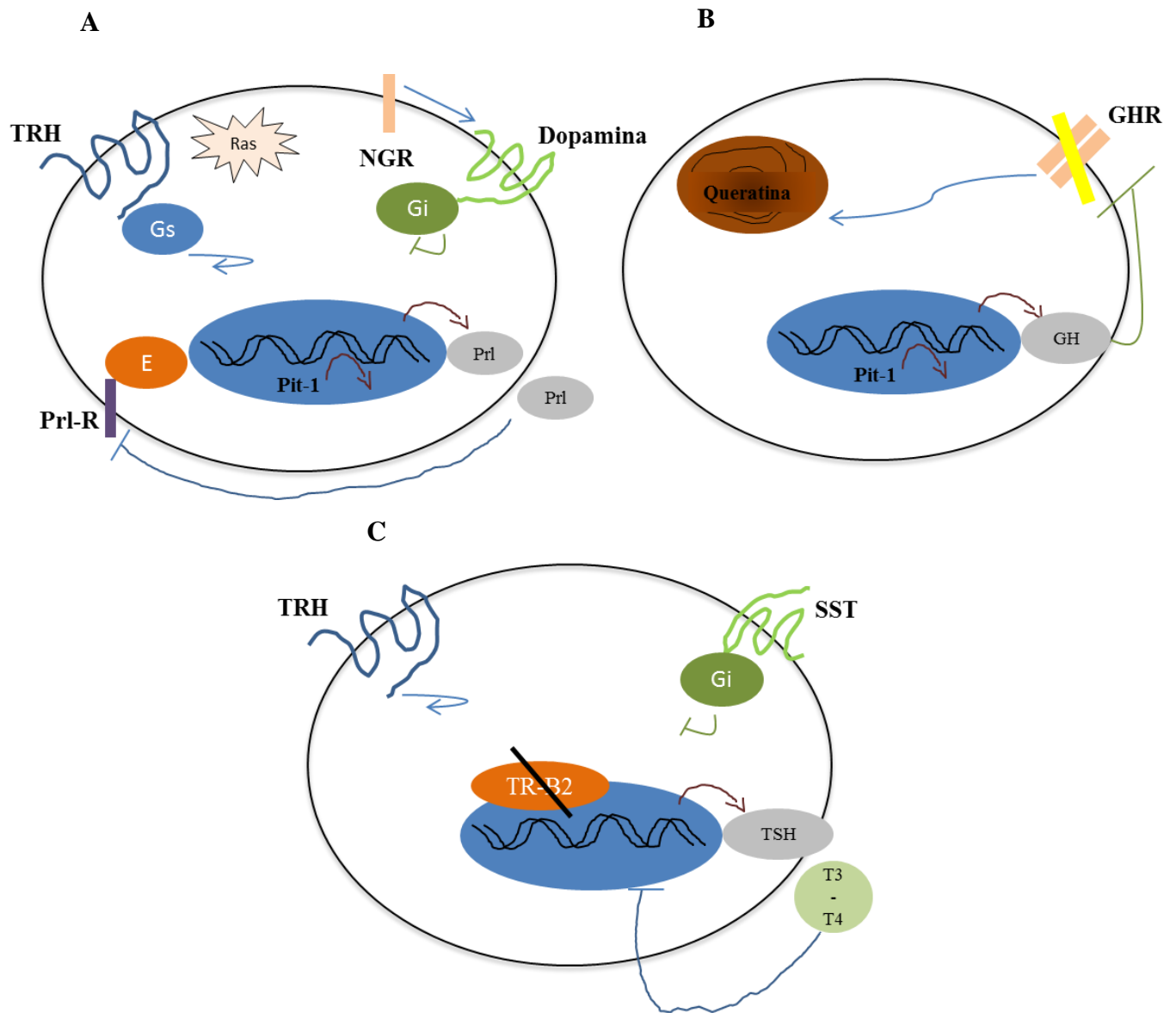


Figura 2: Esquemas representativos de la patogenia de tres tipos de adenomas hipofisarios. A-Adenoma lactotrofo. B-Adenoma somatotrofo escasamente granuloso. -C-Adenomas tirotrofos. (Modificado de Asa y Ezzat. Annu Rev Pathol 4:97-126. 2009).

Esta clásica vía de señalización es clave para la regulación de la traducción de factores involucrados en la proliferación celular en diversos tejidos y órganos (14), siendo ERK1 y ERK2 (ERK1/2) unas de las más conocidas y de las cuales se ha sugerido que tienen un papel clave en la cascada de señalización de RAF/MEK/ERK (15, 16, 17). Sin embargo, no está claro si la vía Raf/MEK/ERK juega un rol más crítico y central en los diferentes tipos de adenomas hipofisarios (18). En este sentido en modelos experimentales *in vitro* en células GH3B6, se ha demostrado que la activación de ERK1/2 participa en el incremento de

PKC α and PKC ϵ por esteroides de forbol conduciendo a la proliferación y progresión del ciclo celular (19).

En células de mamíferos, el ciclo celular es regulado por CDKs (20). La Ciclina D (D1, D2, y D3) activa CDK4 y CDK6 y facilita la progresión durante G1. Los complejos CDK2/ciclina E (E1 y E2) se activan al final de G1 y participan en la transición de G1 a S. Al final de la fase S y durante G2, la ciclina E es sustituida por ciclina A (A1, A2) para activar CDK2 y CDK1. Finalmente, el complejo CDK1/ciclina B (en su mayoría B1 y B2) favorece la progresión a través de G2 y el ingreso a la fase M.

La progresión del ciclo celular también está bajo el control de reguladores negativos, específicamente las familias de inhibidores CDK INK4 y Cip/Kip (21). La familia INK4, que incluye a p16, p15, p18, y p19, se une a CDK4/6/ciclina D, mientras que la familia Cip/Kip, constituida por p21, p27 y p57, se asocia a CDK2/ciclina E (22). Finalmente, la proteína supresora de tumores Rb regula negativamente la entrada en el ciclo celular y la progresión G1/S (23), mientras que PTTG, factor que fuera descrito en adenohipófisis, participa tanto en G1/S y como en la inestabilidad cromosómica (24, 25) (**Figura 1**).

Diversos modelos experimentales han sido utilizados en la comprensión de la participación de las proteínas reguladoras del ciclo celular en el desarrollo de adenomas hipofisarios.

Ratones knockout para inhibidores de CDK, incluyendo p18 y p27, presentan tumores pituitarios (26), mientras que los modelos knockout para p21/Rb (27), p27/Rb (28), p16/p18 (29), p27/ciclina E (30), p27/p18 (31), p21/p18 (32), y CDK4/p27 (33), exhiben un período de latencia acortado para la formación de tumores o incluso un incremento del tamaño de los adenomas hipofisarios. En tumores pituitarios humanos se han demostrado mutaciones de la línea germinal (34) así como subexpresión o metilación del ADN de los inhibidores de CDK (35).

En general, la tasa de recurrencia de una neoplasia depende no solo de la radicalidad de la resección, sino también de la actividad proliferativa del tumor. Esta actividad puede evaluarse utilizando p21, p27, Ki-67 y p53 como marcadores de proliferación y del ciclo celular (36).

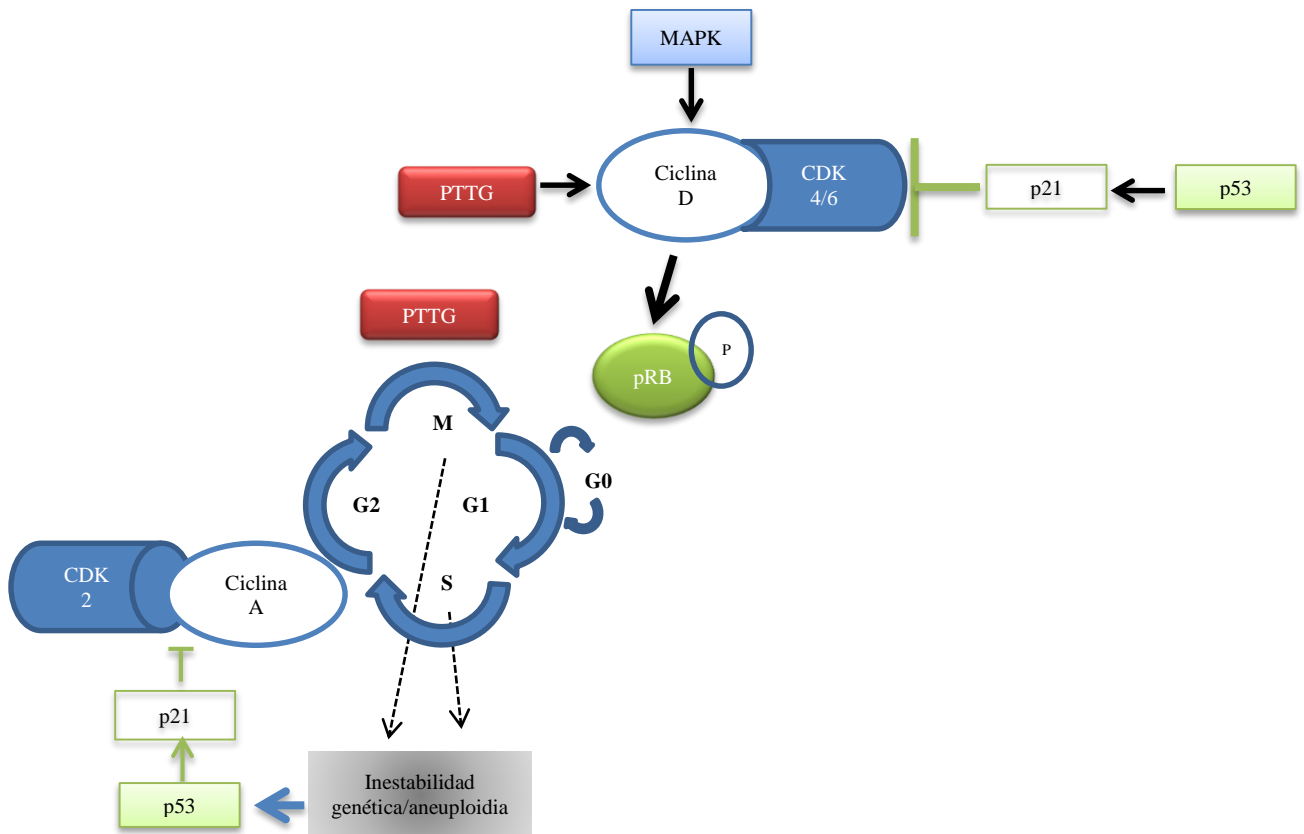


Figura 3: Esquema representativo de la interrelación de la vía MAPK y proteínas reguladoras del ciclo celular en adenomas hipofisarios. (Modificado de Jaffrain-Rea y col. *Endocr Relat Cancer* 20:753-66. 2013).

Dworakowska y col. demostraron la fosforilación de MEK1/2 y ERK1/2 en todos los histotipos de adenomas pituitarios, aunque la Ciclina D1 estuvo sobreexpresada solo en adenomas no funcionantes (37). Otro dato importante es el que demostraron recientemente Petiti y col. al comprobar que trastuzumab disminuye el crecimiento tumoral así como también la expresión de ERK1/2 y los reguladores del ciclo celular CCND1 y CDK4 en adenomas hipofisarios (38).

El supresor tumoral p53 actúa para prevenir el cáncer y tiene un rol en la estabilidad genómica activando las proteínas reparadoras de ADN y en conjunto con p21 induce arresto del ciclo celular, reparando de esta forma los errores genéticos (39). Otra importante función de p53 es iniciar la apoptosis cuando hay daño irreversible del DNA (40). Se ha sugerido que la mutación o alteraciones de la expresión de p53 se asocian a la patogenia de los diversos tumores (39). Del Basso De Caro y col., han demostrado la expresión de p53 solo en

carcinomas hipofisarios versus adenomas no invasivos (41). Sin embargo, no se ha definido correlación entre su grado de expresión y adenomas invasivos.

La proteína p21 es otro de los marcadores que participa en el ciclo celular, es conocida por contribuir a la regulación de la proliferación celular. Uno de los mecanismos más conocidos es la inhibición del complejo CDK-ciclina específica en la fase G1 y G2 (42). Este efecto inhibitorio de p21 en la progresión del ciclo celular, es tanto dependiente como independiente de p53 y se correlaciona con su localización nuclear (43). Sin embargo, también se ha demostrado que p21 participa en un tipo de muerte celular, la apoptosis, en donde la localización subcelular de la proteína ha mostrado ser crucial. En el citoplasma, p21 puede bloquear la activación de pro-caspasa 3 y quinasas inducidas por estrés, inhibiendo la apoptosis. Por el contrario, la localización nuclear de p21 favorecerá la aparición de apoptosis después del daño celular (44, 45).

En relación con los adenomas hipofisarios PetrMatoušek y col, evidenciaron que el crecimiento de los subtipos no funcionantes, se asocia con niveles altos de expresión de p21, p53 y Ki-67 (36). En adenomas lactotropos invasores Wei y col. han demostrado, una correlación negativa entre p21 y p27 con respecto a la invasividad tumoral (46).

La OMS en 2004 recomendaba analizar la expresión, en adenomas hipofisarios humanos, de los marcadores Ki-67 y p53. Sin embargo, el índice de Ki-67 para predecir la invasión del tumor es algo controvertido, ya que otros autores no han encontrado diferencias en la expresión de esta proteína nuclear en los adenomas de hipófisis invasores. Por otro lado p53, una proteína supresora de tumores, codificada por el gen TP53, juega un papel importante en la proliferación celular, apoptosis y estabilidad genómica. Su expresión ha sido vinculada al comportamiento agresivo de los tumores hipofisarios, pero otros resultados sugieren que p53 por sí solo no es un factor pronóstico independiente para determinar la agresividad de estas neoplasias. A esto se debe añadir que para otros autores estos marcadores junto con otros parámetros clínico-patológicos para valorar el pronóstico, varían dependiendo del tipo tumoral (2, 47).

Debido a estas controversias la OMS en 2017 concluyó que además de la tipificación tumoral, la valoración del potencial proliferativo por conteo mitótico e índice proliferativo y otros parámetros clínicos como la invasión tumoral (por estudios de RMN y/o impresión

intraoperatoria) es altamente recomendable en casos individuales para considerar adenomas clínicamente agresivos, dejando de lado el análisis de p53 (6).

Las Fosfatasas de Regeneración Hepática: generalidades, aspectos moleculares y funcionales

La fosforilación reversible de las proteínas representa un mecanismo clave en el control del desarrollo y función de organismos vivos, al punto que hasta un tercio de las proteínas eucariotas pueden ser fosforiladas. La familia de enzimas quinasas y proteínas fosfatasas generan acciones bioquímicamente opuestas y la fosforilación de los residuos de tirosina a lo largo de la evolución tomaron un lugar central en la multicelularidad de los seres vivos (48).

Las fosfatasas para residuos específicos de Ser y Thr fueron las primeras en ser identificadas en los estudios bioquímicos clásicos y actualmente incluye a las subfamilias PPP y PPM. A estas se agregaron aquellas que son específicas para residuos de Tyr y se conocen como PTP e incluyen dos subfamilias: las transmembrana (tipo receptores) y las citosólicas. Estas fosfatasas no solo contrabalancean los efectos de las quinasas de Tyr citosólicas y de receptores, sino que además, transmiten información desde las membranas plasmáticas. Al igual que las DSP, este grupo contiene residuos de cisteínas altamente conservados para sus acciones catalíticas. Finalmente, aunque menos conocidas se han descrito fosfatasas que actúan sobre residuos de His y que reciben el nombre de PHP (49). Esta clasificación queda resumida en la **Figura 4**.

Hace unos veinticinco años las primeras secuencias de las PTP comenzaron a ser desentrañadas y la lista actual contiene más de cien genes distintos dentro del genoma humano (50). Desde ese entonces no sólo se estableció su rol en vías de señalización intracelular sino también se demostró la participación de estas fosfatasas en diversas susceptibilidades para enfermedades humanas (51).

Tal como muestra la **Figura 5**, hasta el presente se han reconocido cinco clases de PTP, existiendo dentro de la clase I las PTP de especificidad dual (DUSP) que incluye al subgrupo de las Fosfatasas de Regeneración Hepática (PRLs).

Las PTP debe ser analizada como una familia de enzimas que funciona de manera coordinada con las proteínas tirosina quinasas en las vías de señalización que subyacen en un amplio espectro de procesos fisiológicos fundamentales (52). En este sentido es conocido

que la regulación anormal de la fosforilación de la tirosina o la desregulación de la fosforilación, dan como resultado enfermedades neoplásicas o no neoplásicas (53).

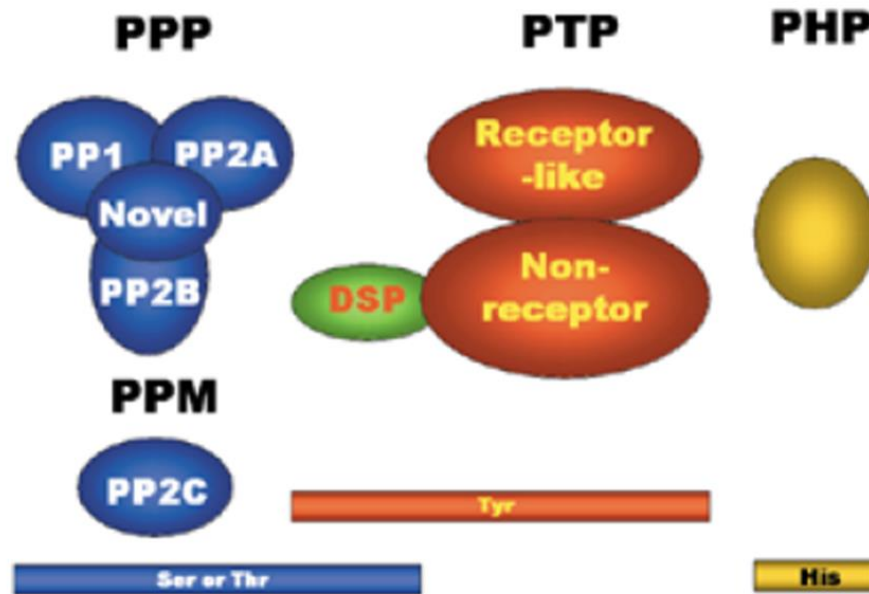


Figura 4: Familia de fosfatasas de proteínas. En el esquema se identifican los residuos aminoacídicos en los que cada tipo y subtipo ejerce su acción bioquímica. (Tomado de Dombrádi y col. EMBO reports 21:120-124. 2002).

Las DUSP no sólo eliminan grupos fosfato de las fosfo-tirosinas, sino que también catalizan la desfosforilación de residuos de fosfo-treonina y fosfo-serina en proteínas, tomando incluso como sustratos a fosfolípidos, carbohidratos fosforilados u oligonucleótidos (**Figura 6**) (53), (54).

PRLs son pequeños DUSP con actividades oncogénicas y metastásicas, preniladas en el extremo C-terminal que migran entre el núcleo, la membrana plasmática y las membranas internas. En general, las PRL están ampliamente distribuidas e inducidas a estimulación mitogénica y se sobreexpresan, como será mencionado en diversos cánceres humanos (55).

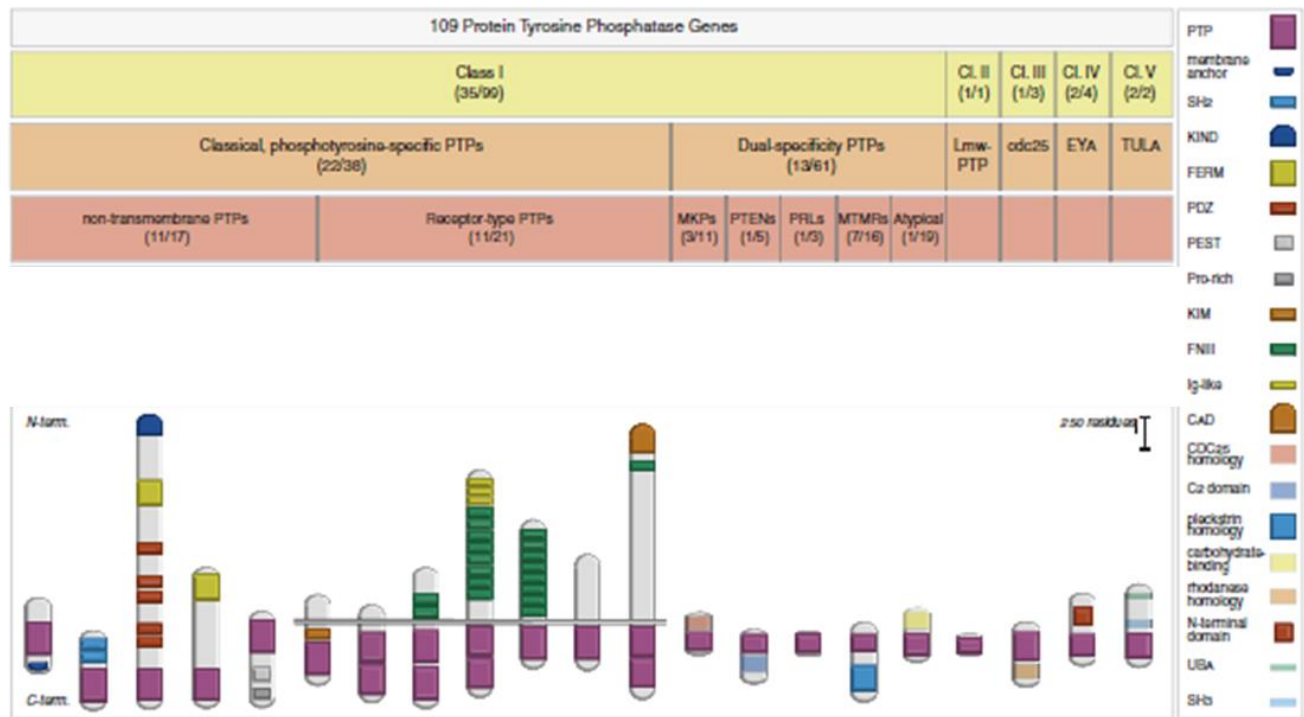


Figura 5: Miembro de familia de genes PTP asociados a patologías humanas. Se aprecian en el esquema las principales clases y subdivisiones. El panel de la derecha indica los dominios de cada uno de los tipos de proteínas. (Tomado de Hendriks y Pulido. *Biophysica Acta* 1832:1673-1696. 2013).

Las Fosfatasa de Regeneración Hepática [PRLs; también conocidas como la familia de la proteína tirosina fosfatasa tipo IVA (PTP4A)] se identificaron originalmente como genes de expresión inmediatos en el hígado durante su fase de regeneración frente a una noxa (55).

En los seres humanos, las PRLs son codificadas por diferentes cromosomas, donde PRL-1, -2 y -3 son transcritos a partir de la expresión de los loci cromosómicos 6q12, 1p35 y 8q24, respectivamente. Como se aprecia en la **Figura 7**, los genes de PRL-1 y -2 se expresan ubicuamente. Por otro lado, el gen de PRL-3 se expresa principalmente en músculo esquelético, cardíaco y, en menor medida, en la próstata. En los demás tejidos, hasta el presente, se ha demostrado baja expresión de esta fosfatasa (56).

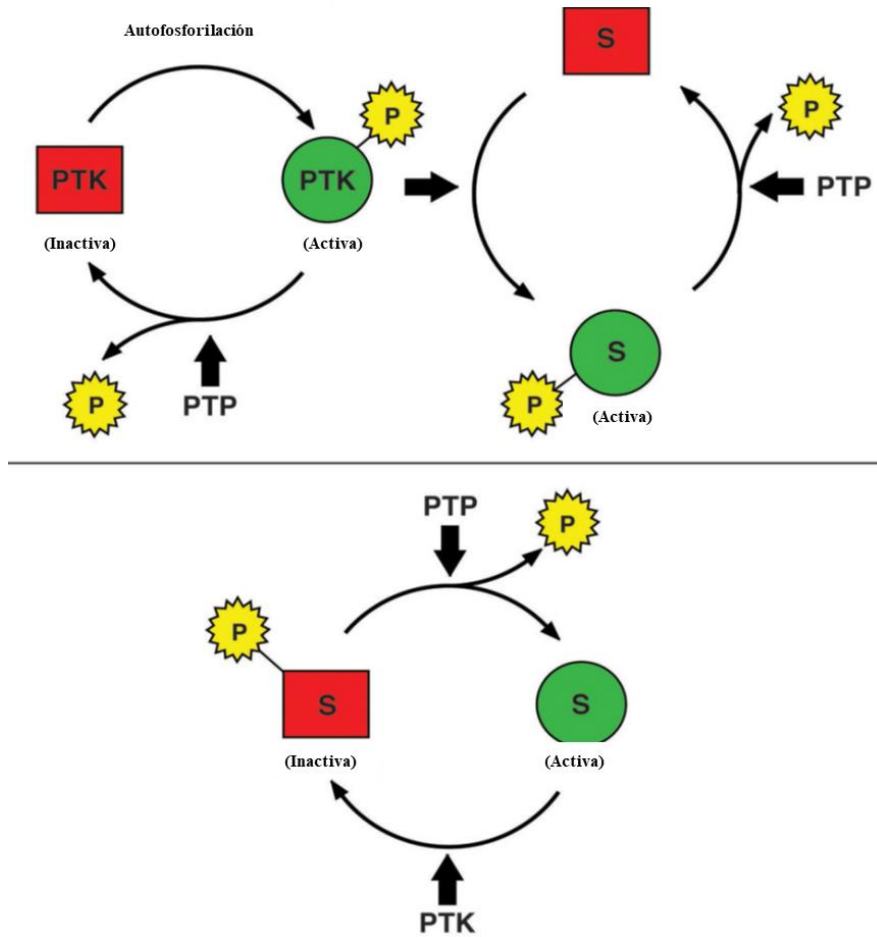


Figura 6: Función de señalización de PTP. Los miembros de esta familia de proteínas tienen el potencial de actuar negativamente en la regulación de señales por desfosforilación de sitios de autofosforilación de PTKs o fosforilación de sus blancos downstream (Panel superior). Además, las PTPs pueden jugar un rol positivo, por ejemplo por desfosforilar un sitio inhibitorio de una PTK, por lo tanto activando la quinasa, promoviendo fosforilación y señalización (Panel Inferior). PTKs: proteínas-tirosinas quinasa. (Modificado de Tonks. FEBS J 280:346-378. 2013).

Estas fosfatasas se expresan tanto en tejidos normales como patológicos de humanos y roedores. Si bien la expresión en tejido normal de humanos no está bien caracterizada, en roedores adultos PRL-1, -2 y -3 están predominantemente expresadas en músculo esquelético normal, mostrando PRL-1 niveles altos de expresión en cerebro y PRL-3 en corazón con niveles de expresión moderados (57). Aunque la expresión de las PRLs a menudo se correlaciona con la diferenciación terminal también se encuentran sobreexpresadas en células cancerosas (58).

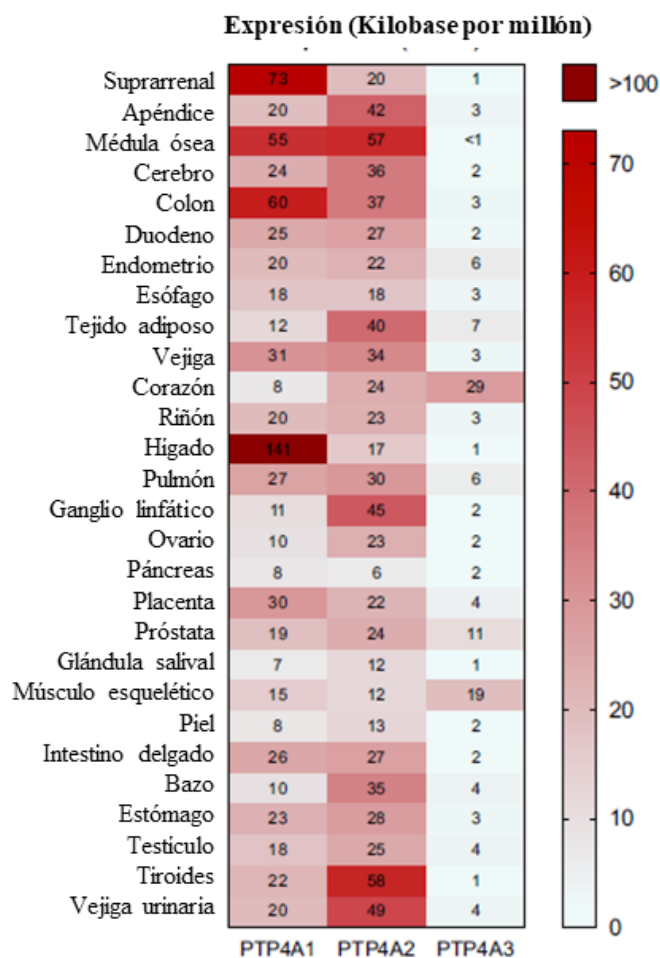


Figura 7: Expresión de los miembros de la familia de PRLs (PTP4A) en tejidos humanos. Este mapa muestra la expresión de los niveles de ARNm de cada PRLs. (Modificado de Hardy y col. The FEBS Journal 285:3886-3908. 2018).

Esta subfamilia de pequeñas proteínas (~22 kDa) (59), se hallan involucradas en numerosos eventos esenciales en células eucariotas, tales como la proliferación celular, migración (**Figura 8**), invasión, crecimiento y metástasis tumoral (60, 61) (**Figura 9**), habiendo sido propuestas como potenciales biomarcadores de la progresión de cáncer (62).

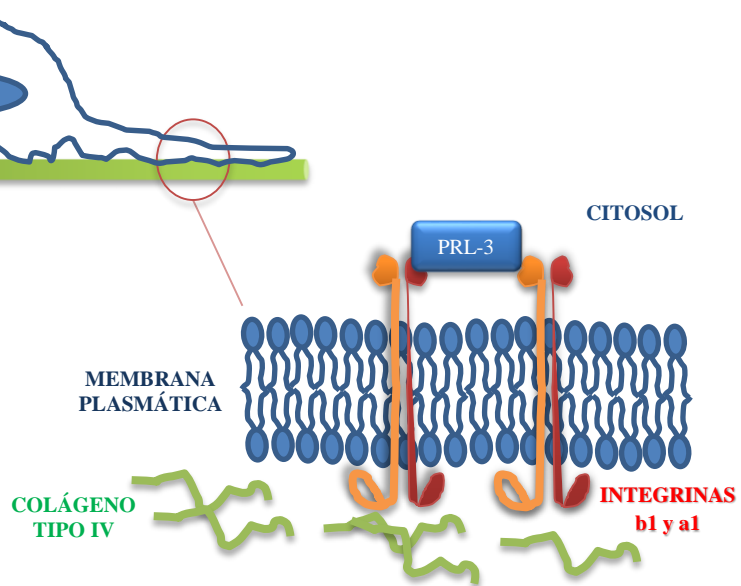


Figura 8: Esquema representativo de la interrelación de las fosfatasa PRL-3 con integrinas de contactos focales. (Modificado de Foy y col. *Experimental Cell Research* 353:88-99. 2017).

Estas PRLs son las únicas fosfatasas de la superfamilia de la PTP que llevan el motif CAAX y son farnesiladas *in vivo*, pudiendo ser también geranilgeraniladas *in vitro* (57, 58). La farnesilación y la geranilgeranilación son dos tipos de prenilación, llevadas a cabo por dos enzimas (farnesiltransferasa y geranilgeraniltransferasa). Este proceso es importante para la localización subcelular de las PRLs. El C-terminal y la farnesilación de las PRLs adquieren importancia como reguladores de la actividad catalítica de estas proteínas (62).

Las PRLs afectan a numerosas vías de señalización asociadas al crecimiento celular y desarrollo del cáncer encontrándolas como moduladoras de mecanismos comunes de vías señalización como son la activación de ERK1/2 o la regulación de los contactos de adhesión focal a través de p130Cas (63).

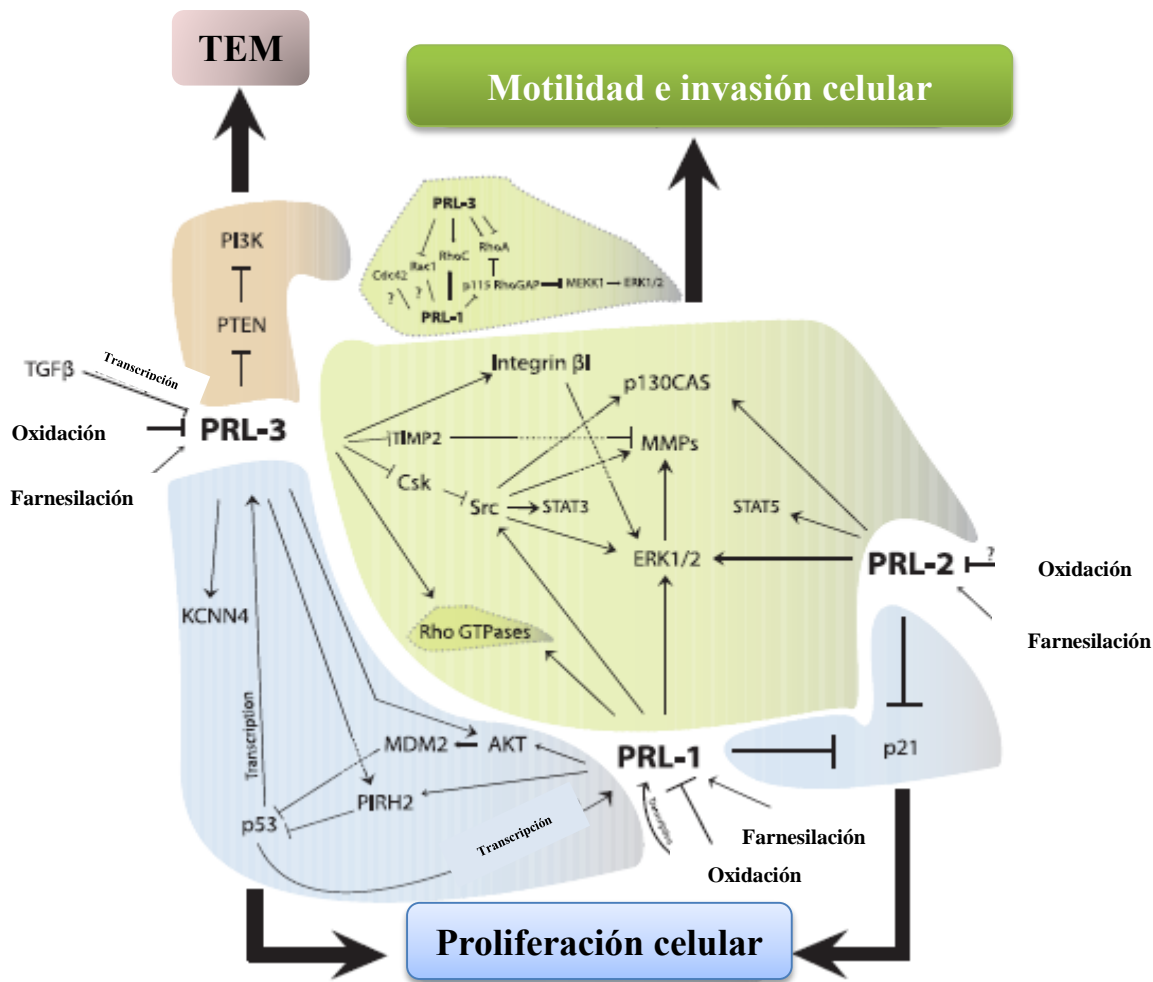


Figura 9: Esquema representativo de vías de señalización reguladas por las PRL-s (Modificado de Rios y col. FEBS Journal 280:505-524. 2013).

Las MMP están reguladas positivamente por PRL-1 y -3. La primera fosfatasa lo hace a través de Src/ERK1/2 aumentando la expresión de MMP2 y MMP9; en tanto PRL-3, a mediante integrina b1 o PI3K/Akt y ERK1/2 conduciendo a un incremento de MMP2 y MMP7; sin modificar los niveles de MMP9 (61).

Estas PRLs, se encuentran expresadas en numerosos tipos de neoplasias tal como lo muestra la **Figura 10**.

Si bien estas proteínas comparten similitudes estructurales y funcionales, presentan diferencias entre sí. En la presente Tesis de Doctorado se analizará la expresión de dos de ellas: PRL-3 y -1.

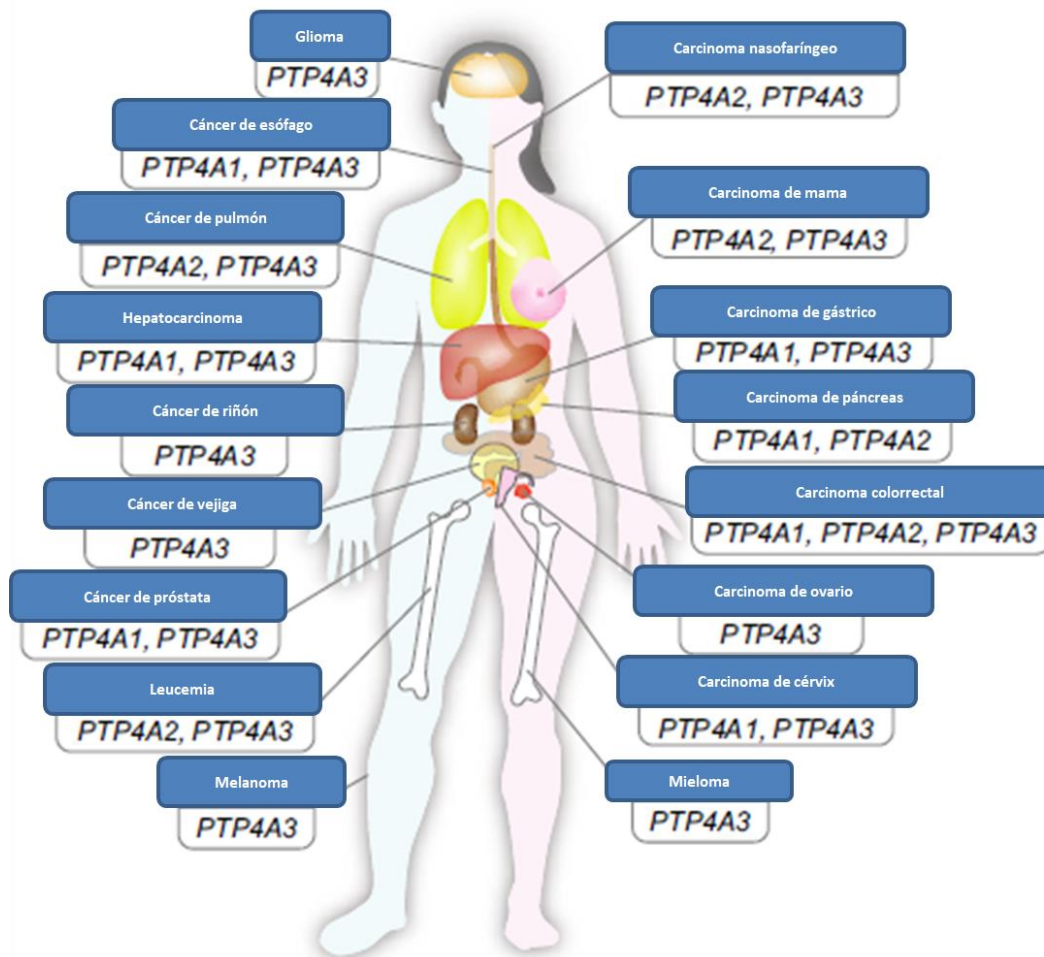


Figura 10: Sobreexpresión de los genes PRLs en el cáncer. Si bien se observa la presentación de los genes, estos se asocian con la expresión de los ARNm y las proteínas. (Modificado de Hardy y col. The FEBS Journal 285:3886-3908. 2018).

PRL-3

La PRL-3, es la más estudiada de las tres isoformas de las fosfatasa de regeneración hepática, encontrándose por primera vez sobreexpresada en metástasis hepática de cáncer de colon y no en tejido normal de este órgano, captando de esta manera la atención de investigadores y médicos clínicos (64). A partir del 2001 numerosas investigaciones han reportado su expresión en distintos tipos de cánceres humanos, como mama (65), esófago (66), estómago (67), ovario (68), endometrio (69) y malignidades hemáticas (70).

La expresión, localización y actividad de la proteína PRL-3 están reguladas por la transcripción, traducción y mecanismos postraduccionales, tal como lo representa la **Figura 11**. Todas estas vías reguladoras podrían estar coordinadas para garantizar una adecuada expresión intracelular. Alteraciones de cualquiera de estos mecanismos podrían contribuir a una mayor expresión de la fosfatasa y en consecuencia a la progresión del proceso neoplásico (62).

Las modificaciones postraduccionales de PRL-3 pueden modular su estabilidad así como afectar su distribución subcelular, actividad o interacción con otras proteínas (62). De esta manera se han descrito oxidación y reducciones en sitios catalíticos (71, 72), fosforilación (73) y ubiquitinación (74).

PRL-3 se inmunodetecta en citoplasma, aunque también puede presentar localización nuclear. Su localización está determinada por la adhesión del grupo farnesil a su extremo terminal, proceso que como se mencionara anteriormente se denomina farnesilación y mediante el cual se trasloca la proteína en la membrana plasmática, los endosomas tempranos (57) y el aparato de Golgi habiéndose demostrado que el uso de un inhibidor de la farnesilación conduce a la redistribución de la PRL-3 hacia el núcleo (75). Estos hallazgos sugieren que PRL-3 puede tener un rol diferente de acuerdo al compartimiento subcelular donde es detectada (62).

Numerosos reportes han implicado a PRL-3 como activador de vías involucradas en la proliferación, invasión y movilidad celular, como son PI3K/AKT (76), la proteína de tirosina quinasa Src (77), la familia de Rho GTPasas (78), la vía MAPK/ERK/MEK (79) y EGFR (78).

Un aspecto de suma importancia es que esta fosfatasa también podría mediar el mecanismo de transición epitelio-mesenquimática (TEM) (**Figura 9**) al regular a PTEN (80) o la familia de las cadherinas (81).

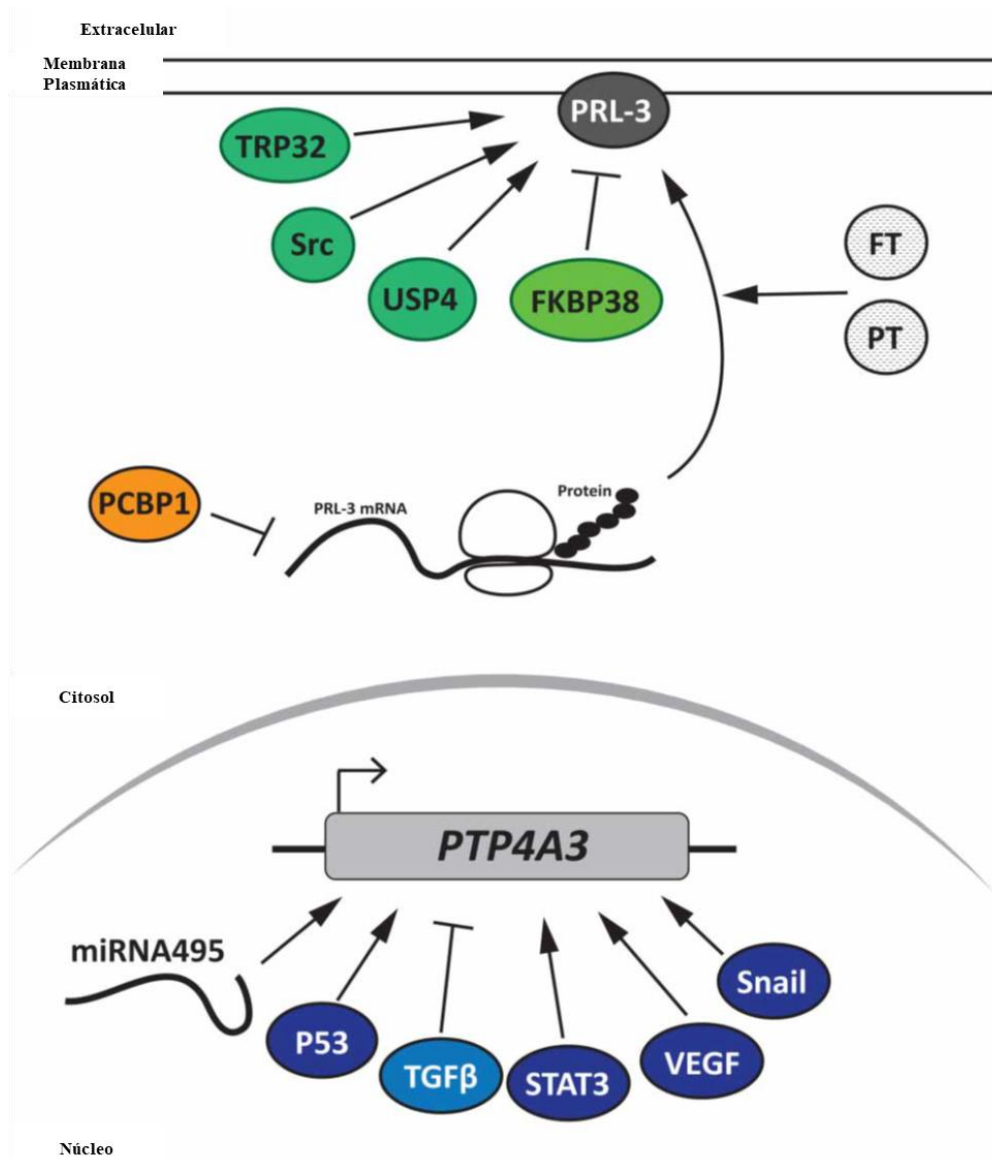


Figura 11: Representación esquemática de los diferentes reguladores de la PRL-3 a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. FT: Farnesilación. PT: Palmitoilación (Modificado de Rubio y Köhn. Biochemical Society Transactions 44:1305-1312. 2016).

A nivel transcripcional, el primer regulador de PRL-3 reportado fue p53 como un activador de la transcripción (82). Curiosamente, también se encontró que PRL-3 es un regulador positivo y negativo del ciclo celular de una manera dependiente de sus niveles de expresión, en relación con mecanismos que regulan los niveles de esta proteína (62). El TGF β ha sido identificado como un inhibidor de la transcripción de PRL-3, al mediar la unión de Smad2 y Smad3 al promotor de la fosfatasa en las células cancerosas. En este modelo propuesto, TGF β actúa como un supresor de tumores, y su pérdida conduciría a la sobreexpresión de PRL-3 y la progresión del cáncer (76). Previamente, PRL-3 se encontró fosforilada en células de cáncer de colon (73). Esta fosforilación es llevada a cabo por Src (83). PRL-3 activa Src inhibiendo su proteína reguladora tirosina quinasa, C-terminal Src quinasa. Entonces PRL-3 podría participar en un mecanismo de retroalimentación positiva para la activación de Src (62).

Además, se ha demostrado que PRL-3 aumenta la actividad de PI3K/AKT, MAPK/ERK en los distintos sistemas celulares (55). En este sentido se demostró que la PRL-3 promueve la activación de AKT en células de carcinoma colorrectal, con una regulación negativa concomitante en los niveles de expresión de proteínas del principal regulador negativo de la actividad de AKT, PTEN (80). Wang y col. sugieren que la PRL-3 también podría aumentar la fosforilación de AKT en células con mutaciones por pérdida de función de PTEN (84), lo que implica que PRL-3 también podría funcionar independientemente de PTEN. La cascada MAPK es una importante vía de traducción de señales desencadenada por la integrina β 1. PRL-3 aumenta los niveles de ERK1/2 (85), habiéndose demostrado que PRL-3 a través de la vía integrina β 1 en células de cáncer colon LoVo, lleva a la activación de la señal extracelular regulada por ERK 1/2 (86).

PRL-1

La PRL-1 de rata fue el primer miembro de esta familia en ser descrito en 1994, siendo su gen uno de los de respuesta temprana en el proceso de regeneración hepática (87).

Además, esta fosfatasa se expresa en células epiteliales de intestino de ratas y en algunas líneas celulares tumorales (62). En humanos se encuentra ampliamente distribuida en diferentes tejidos normales donde sus niveles son variables (59). También se detecta en altos niveles en metástasis ganglionares de adenocarcinomas (88) y en células de cáncer de páncreas (89) y de pulmón (90). Aunque primeramente fue reportada como una proteína

nuclear (87), preferentemente se localiza (similar a otras PRLs) en membrana plasmática y en membranas intracelulares como resultado de la farnesilación (57, 91).

Se ha encontrado que la actividad de la fosfatasa PRL-1 es necesaria para la progresión de las células a través de la mitosis, y que la sobreexpresión de PRL-1 en la célula conduce a una entrada acelerada en la fase S del ciclo celular (92). Además, aunque las tres enzimas PRL también se han vinculado a la transformación celular y la tumorigénesis, PRL-1 es necesaria en el crecimiento y proliferación de las células normales (93). La proliferación celular se rige en última instancia por las quinasas dependientes de ciclina (CDK) que se regulan por la concentración de ciclina, la fosforilación o los inhibidores de CDK (94). PRL-1 pueden aumentar la síntesis de ADN y la progresión del ciclo celular y afectar la expresión de ciclina y/o CKI, aumentando así la proliferación celular y/o disminuyendo la muerte celular (92).

Werner y col. demostraron que PRL-1 podrían regular el ciclo celular al modular los niveles de p21. Se observaron niveles significativamente más bajos de p21 en las líneas celulares que sobreexpresan PRL-1 en comparación con las células controles (92).

Estudios que vinculan PRL-1 a vías de transducción de señales han demostrado que esta fosfatasa indujo la activación Src y ERK1/2, para controlar la regulación transcripcional en más de MMPs, participando de esta manera en los mecanismos de angiogénesis (95). Finalmente, Min y col. reportaron que PRL-1 downregula p53 mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (96) contribuyendo al desarrollo tumoral a través de la inhibición de la apoptosis mediada por p53 (62).

Tal como muestra el esquema de la **Figura 12**, ambas fosfatasa que han sido analizadas en la presente Tesis de Doctorado participan como reguladoras de diversas vías de señalización en el mecanismo de la tumorigénesis.

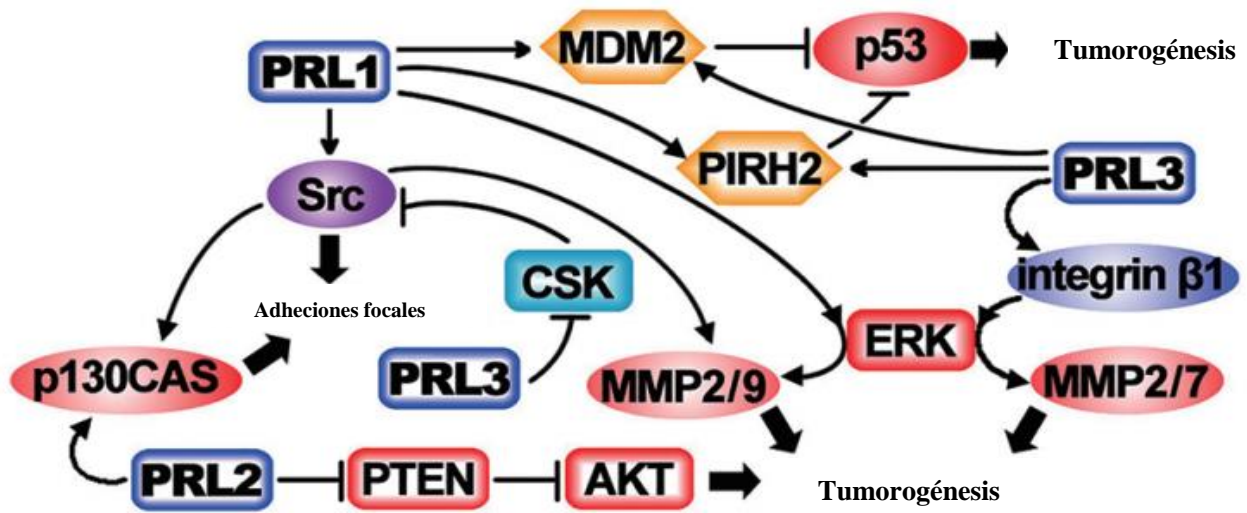


Figura 12: Vías de señalización fisiológicas/patológicas en las que se encuentran involucradas PRL1/2/3. Las flechas representan regulaciones positivas. Las barras en T representan desfosforilaciones además de indicar regulación negativa. (Modificado de He y col. Acta Pharmacol Sin 35:1227-1246. 2014).

Identificación de proteínas supresoras de las funciones oncogénicas de PRL-1 y PRL-3

Son escasos los reportes sobre las proteínas que se unen a la PRL, para regular su función, o que están reguladas por estas fosfatasas.

En 2016, Lee y col. (63) identificaron 12 proteínas que interactúan con PRL-1 o PRL-3 utilizando un sistema de dos híbridos de levadura. El interjuego molecular de estas 12 proteínas con las fosfatasas permitiría tanto una regulación positiva como negativa de las funciones de las PRL-1 y -3 o inclusive podrían ser reguladas por las propias fosfatasas

Entre las que demuestran mayor impacto en los mecanismos de supresión se encuentra FKBP8, la que suprime la actividad p53 mediada por PRL-3 y consecuentemente la proliferación celular, habiéndose demostrado incluso un efecto sobre PRL-1.

La segunda proteína que interactuaría con ambas fosfatasas es SELPLG inhibiendo la función tanto de PRL-1 y -3.

El interés de este trabajo de Tesis de Doctorado es el análisis de algunos de estos aspectos de la regulación de algunas de las PRLs.

Hipótesis

Las PRLs-1 y -3 se sobreexpresarían en procesos hiperplásicos/adenomatosos experimentales y en tumores hipofisarios humanos, siendo moduladoras de las moléculas reguladoras del ciclo celular p21 y p53 y de las proteínas ERKs.

OBJETIVOS

Objetivo General

Examinar si existe interrelación entre la expresión de las fosfatasa de regeneración hepática y de reguladores del ciclo celular en lesiones proliferativas adenohipofisarias.

Objetivos Específicos

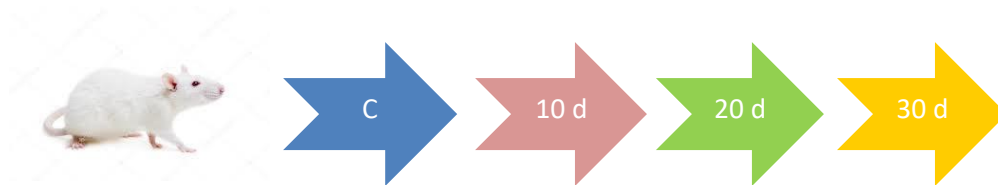
- Analizar cambios en la expresión de las fosfatasa PRL-1 y 3 durante la progresión del adenoma lactotrofo experimental.
- Caracterizar la localización subcelular y correlacionar la expresión de las fosfatasa PRL-1 y -3 con p21, p53 y ERKs en los adenoma lactotrofo experimental.
- Describir los principales hallazgos subcelular de diversas variantes de adenomas hipofisarios humanos.
- Determinar la expresión de las PRL-1 y -3 en adenomas hipofisarios de diversa estirpe celular con especial atención en adenomas lactotrofos.
- Asociar la expresión de las PRL-1 y 3 con los datos clínicos-epidemiológicos de los pacientes afectados por lesiones proliferativas adenohipofisarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente Tesis de Doctorado se organizó desde los aspectos metodológicos en dos tipos de diseño uno en animales de experimentación y otro en adenomas hipofisarios humanos.

Diseño experimental básico

Tal como se muestra el esquema para el diseño experimental básico se utilizaron ratas macho (200-250 g) de la cepa Fisher 344, las que se dividieron en cuatro grupos experimentales de acuerdo al tiempo de estimulación estrogénica, utilizando un n:108 de animales.



- C: Grupo control
- 10d: Grupo estrogenizado por 10 días con benzoato de estradiol
- 20d: Grupo estrogenizado por 20 días con benzoato de estradiol
- 30 d: Grupo estrogenizado por 30 días con benzoato de estradiol

A los fines de inducir tumores adenohipofisarios, animales intactos fueron tratados con BE (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) durante 10, 20 y 30 d. El estrógeno se implantó en la región dorsal subcutánea, mediante pastillas preparadas a mano mezclando FASTIX adhesivo y 30 mg de BE. Los animales controles fueron implantados con pastillas de FASTIX sin BE. Todas las ratas fueron criadas y alojadas en el bioterio del INICSA-FCM-UNC, bajo un fotoperiodo controlado, con acceso libre a agua y comida comercial para roedores.

Los animales se manejaron en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (97), contando el protocolo con la aprobación del CICUAL-FCM-UNC.

Cumplidos los tiempos de estimulación hormonal las ratas fueron decapitadas después de los 10 s de ser retiradas de sus cajas, a los fines de minimizar el estrés o estímulos externos. Luego se extrajeron las glándulas hipofisarias, de las cuales se separó

cuidadosamente adenohipófisis de neurohipófisis, siendo estudiadas las primeras con diferentes metodologías.

Diseño metodológico aplicado en adenomas hipofisarios humanos

Se diseñó un estudio retrospectivo, transversal, observacional, descriptivo y analítico, en el que se incluyeron macroadenomas, microadenomas, funcionantes y no funcionantes.

Fueron excluidas las lesiones tumorales selares que no fueron diagnosticadas por sus características histopatológicas como adenomas hipofisarios y que fueran sometidas a cirugía.

Los pacientes (n:64) se agruparon teniendo en cuenta su distribución por diagnóstico histopatológico, tamaño (macroadenomas y microadenomas), sexo (hombres y mujeres) y clínica.

El protocolo contó con la aprobación del CIEIS del Hospital Córdoba (Registro Nacional de Investigaciones en Salud N° CO000152- RENIS).

Metodologías utilizadas en ambos diseños

Análisis morfológico con microscopía fotónica

Cumplidos los tiempos de exposición al BE los animales (n:4) de los diferentes grupos experimentales fueron anestesiados con isoflurano al 5% (Forane, Baxter). Se corroboró la pérdida de la respuesta a reflejos doloroso (plantar y cola) y se procedió a decapitarlas para obtener las adenohipófisis. Algunos fragmentos se colocaron en una solución de formol al 4% para su posterior inclusión en parafina y otros en solución de Karnovsky 4% (formol 8% y glutaraldehído 4%) para el análisis ultraestructural. Las muestras incluidas en parafina fueron cortadas (micrótomo tipo Minot) con un espesor de 3 µm, desparafinadas, hidratadas y coloreadas con la técnica de H/E.

Otra de las metodologías utilizada en el modelo experimental básico y a los fines de demostrar la transformación adenomatosa, fue la técnica de reticulina de Gordon-Sweet (98).

Las muestras de adenomas hipofisarios humanos de diferentes estirpes celulares (n:64), fueron incluidas en parafina, coloreadas con H/E y diagnosticadas mediante las determinaciones inmunohistoquímicas de las diversas hormonas adenohipofisarias en el período de 2005 al 2017.

Caracterización ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión

Con el objetivo de analizar la morfología subcelular pequeños fragmentos tanto de ratas C, tratadas con BE (n:4) y adenomas humanos (n:13) se fijaron por inmersión en solución de Karnovsky al 4%, procesándose el material por la siguiente técnica:

-Lavado: tres lavados con agua bidestilada, de 10 min cada uno.

-Postfijación con tetróxido de osmio al 1%, a temperatura ambiente por 2 h, en rotor.

-Lavado con agua bidestilada.

-Deshidratación con acetona de graduación creciente 50%, 75% durante 5 min en cada una; 90% por 10 min y 100% destilada y deshidratada sobre tamiz molecular N° 3 (Merk) durante 15 min. Este paso se realiza a temperatura ambiente y en rotor.

-Inclusión en una mezcla de resinas epóxicas (medio de inclusión) compuesta de: Araldita 506, Epon, DDSA, DBP y BDMA.

La inclusión fue realizada de acuerdo con la siguiente metodología:

1-Infiltración en una mezcla de partes iguales del medio de inclusión y acetona 100% durante 3 h como mínimo.

2-Pre-inclusión en una mezcla completa de Epon/Araldita a temperatura ambiente durante 6-8 h.

3-Inclusión final: en Epon/Araldita a 60 °C durante 24 h.

Con posterioridad las muestras fueron cortadas con ultramicrotomo a un espesor de 80 nm y recolectadas en grillas de cobre para luego ser contrastadas con una solución de acetato de uranilo alcohólico a saturación (1 min), lavadas con agua bidestilada y expuestas finalmente a una solución de citrato de plomo por un lapso de 2 min, para ser observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Zeiss Leo 906.

Estudio inmunohistoquímico a nivel de microscopía fotónica de secciones en parafina

Con el material incluido en parafina tanto del modelo experimental básico (n:4) como los adenomas humanos (n:64), se realizaron inmunomarcaciones empleándose anticuerpos mono o policlonales para las proteínas PRL-3; PRL-1, Ki67.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS-BSA 1% empleándose las siguientes concentraciones:

-anti PRL-3 (anti-PTP4A3 ab82568, Abcam, USA): 1/70.

-anti PRL-1 (anti-PTP4A1 ab 180629, Abcam, USA): 1/200.

-anti Ki67 (CONFIRMTM anti-ki-67, Ventana Medical System, Tucson, Arizona, USA): 2 µg/ml, usado en adenomas humanos.

-anti Ki67 (anti-human ki-67, BD Pharmingen, USA) dilución 1/50, usado en ratas.

Se utilizaron como anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón biotinilado (dilución 1/130) (Vectastain ABC Kit-Vector Laboratories USA).

El amplificador de señal empleado fue el ABC (Vectastain ABC Kit-Vector Laboratories USA) y como revelador el cromógeno DAB (3,3'diaminobenzidina-tetrahydrochloride-Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Para demostrar la especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas, las secciones fueron incubadas con PBS-BSA 1%, en reemplazo de los anticuerpos primarios (control negativo) y se emplearon los siguientes controles de positividad:

-En rata:

Para PRL-3: tejido muscular cardíaco (**Figura 1**).

Para PRL-1: tejido placentario.

-En humanos:

Para PRL-3 y 1: adenocarcinoma de colon (**Figura 2**).

A continuación se detalla la técnica inmunohistoquímica aplicada:

- Desparafinización en tres xiloles y en etanoles de graduación decreciente e hidratación en agua destilada

- Recuperación antigénica

- Micro-ondas (potencia 800 W) en buffer citrato (pH 6), durante 30 s al 100% de potencia y posteriormente al 20% de potencia por 15 min.

- Lavado con PBS 1% y aspirar exceso de líquido.

- Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena

- H₂O₂ (Baker) al 3 % en metanol por 30 min.

- Lavado en PBS 1%: 2 lavados de 5 min cada uno.

- Bloqueo de uniones no específicas

- Con PBS-BSA 5%, temperatura ambiente por 30 min.

- Incubación con anticuerpo primario

- Toda la noche a 4 °C.

- Lavados con PBS 1%, 3 veces por 5 min cada uno.

- Sistema de revelado

- Anticuerpos secundarios utilizándose según corresponda, anti-conejo o anti-ratón biotinilado (dilución 1/130) diluidos en PBS-BSA 1% por 1 h a temperatura ambiente.

- PBS 1%: 3 lavados de 5 min cada uno.

- Sistema ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), en una dilución de 1/100 en PBS durante 30 min a temperatura ambiente.

- Lavados con PBS 1% por 5 min.

- DAB: 1 mg de DAB (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1,3 ml de Tris-Cl 0,2 M pH 7.6, al que se le agrego 1,2 µl de H₂O₂ 30%, antes de usar

- Contracoloración

- Hematoxilina durante 30 s.

- Deshidratación y Montaje

- Inmersión de los cortes en etanol de graduación creciente durante 2 min y dos pasajes en xilol de 2 min cada uno. Montaje con bálsamo sintético (DPX mountant for histology, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y cubre objeto.

En las secciones adenohipofisarias incluidas en parafina sometidas a inmunomarcación para las proteínas de interés, las células inmunoreactivas fueron observadas y analizadas en un microscopio Zeiss Axioskop 20. Se utilizó como criterio de positividad en los adenomas humanos, la siguiente gradación: 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (>76%).

Para demostrar la especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas, las secciones fueron incubadas con PBS-BSA 1%, en reemplazo de los anticuerpos primarios.

Estudio inmunocitoquímico a nivel de microscopía confocal

Muestras de adenohipófisis de los cuatro grupos experimentales (n:4) fueron incluidas en medio de montaje para congelación (CRYOPLAT, Biopack, Buenos Aires, Argentina) y congeladas a -20 °C.

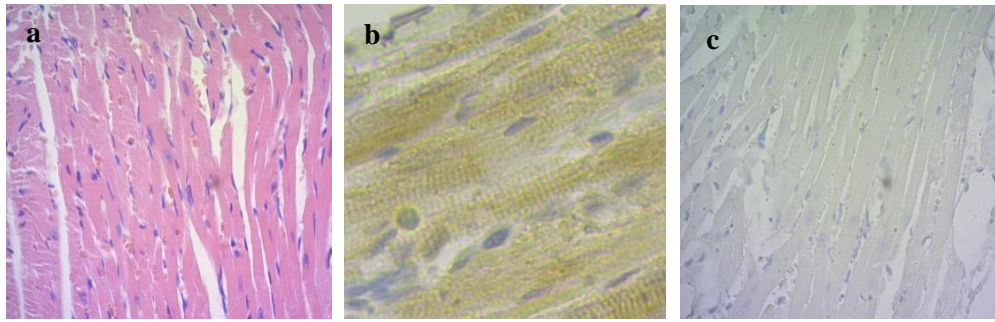


Figura 1: Tejido miocárdico de rata (a) utilizado como control positivo de la expresión de PRL-3 (b). c-Control negativo en miocardio murino con la omisión del antisuero primario. (a) Coloración de H/E. Magnificación original 400X.

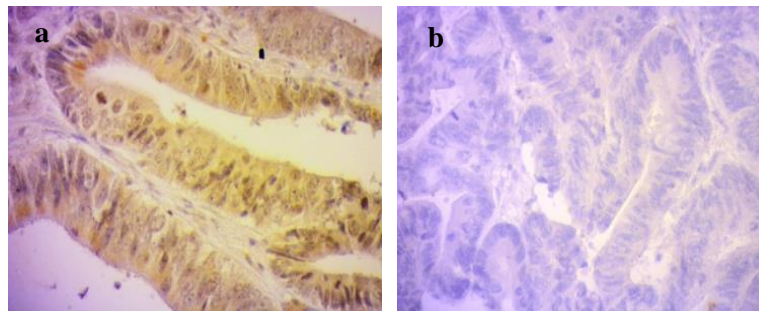


Figura 2: Adenocarcinoma de colon positivo para PRL-3 (a) y el control de especificidad (b) por incubación sin anticuerpo primario. Magnificación original 400X.

Luego se obtuvieron cortes en criostato, los cuales fueron sumergidos en metanol frío por 5 min, seguido de lavados en PBS 1% frío para luego bloquear las uniones inespecíficas mediante PBS-BSA 5% 30 min a 37 °C en cámara húmeda.

Posteriormente se incubaron las secciones con el anticuerpo primario anti PRL-3 (anti-PTP4A3 ab82568, Abcam, USA) en una dilución de 1/70 y anti PRL-1 (anti-PTP4A1 ab 180629, Abcam, USA) diluida en 1/200 en PBS-BSA 1%, durante la noche.

Luego de los lavados con PBS 1% y protegido de la luz, se procedió a incubar las secciones con el anticuerpo secundario, cabra anti-conejo IgG (H+L) conjugado Alexa Fluor ® 594 (Thermo SCIENTIFIC, USA) y cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado Alexa Fluor ® 488 (Thermo SCIENTIFIC, USA). Para ambos se usaron diluciones de 1/2000, durante 30 min en estufa a 37 °C y luego 30 min a temperatura ambiente. Para visualizar los núcleos celulares y luego de lavar las secciones con PBS 1%, estas se incubaron con DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindole D9542, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una dilución de

1mg/1ml y finalmente se montaron los cortes con Fluoromount™ (F4680, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dejándose secar por 24 h.

Las células inmunoreactivas fueron visualizadas con microscopio confocal de exploración laser FluoView FV1200 (Olympus, Tokio, Japón). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con software FV10-ASW 1.6 Viewer.

Inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica de transmisión

Fragmentos de adenohipofisis de rata (n:4) y adenomas humanos (n:4) fueron destinados a inmunomarcación para microscopía electrónica.

A-Procesamiento del material

La fijación para la inmunolocalización se realizó por inmersión con Karnovsky al 1,5 % en buffer cacodilato y la inclusión de los fragmentos adenohipofisarios fue llevada a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento:

-Deshidratación: etanol 50°, 70°, 90°; durante 15 min en cada uno a temperatura ambiente.

La preinclusión e inclusión se realizó en resina acrílica LR White (The London Resin Co. Ltd) de acuerdo al siguiente procedimiento.

-Preinclusión:

LR White-alcohol 90°: por 2 h.

LR White: por 30 min. Luego se realizó un cambio para dejarlo toda la noche.

Inclusión en LR White, en anaerobiosis a 49 °C +/- 2 durante 48 h, en cápsulas de gelatina.

B-Técnica inmunocitoquímica ultraestructural

Los fragmentos incluidos en LRW fueron seccionados en cortes semifinos (de 200 nm) que luego fueron teñidos con azul de toluidina, para seleccionar la zona de interés.

Posterior se obtuvieron cortes finos de 80 nm (color de interferencia dorado) con cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Jeol JUM-7. Los cortes se montaron en grillas de níquel.

El protocolo de las reacciones inmunocitoquímicas comprendió la siguiente secuencia:

-Bloqueo con PBS-BSA al 1%, por 15 min a temperatura ambiente.

-Incubación con anticuerpo primario; toda la noche a 4 °C.

anti PRL (prolactina): 1/1000

anti PRL-3: 1/50

anti PRL-1: 1/100

-Lavado con PBS.

-Incubación con anticuerpo secundario según corresponda, IgG-Goat-anticonejo, IgG-Goat-antiratón; conjugados con partículas de oro 15 nm (Aurion conventional gold regents), dilución 1/30, a 37 °C 1 h.

-Lavado con agua bidestilada.

-Coloración con solución acuosa saturada de acetato de uranilo por 30 s. Los cortes fueron examinados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906.

Técnica de Western Blotting

A-Separación electroforética de proteínas en base al peso molecular en condiciones desnaturizante de homogenatos hipofisarios.

A partir de las glándulas adenohipofisarias de los 4 grupos del modelo animal experimental (n:36) se determinaron los niveles de expresión de PRL-3, PRL-1, p53 (anti-p53 sc-6243, Santa Cruz), p21 (anti-p21 ab80633, Abcam, USA), ERK Total (ERK 1 sc-94 Santa Cruz, Biotechnology, INC) y ERK fosforilada (ERK1/2 197G2, Cell Signaling Technology) por la técnica de Western Blotting. Para la cual se obtuvieron extractos de proteínas mediante homogenización fría en buffer de lisis celular RIPA (con un coctel de inhibidores enzimáticos PMSF 2mM 16µg/ml, leupeptina 10µg/ml y aprotinina 10µg/ml), los lisados celulares fueron centrifugados a 15000 g durante 20 minutos a 4 °C para sedimentar el material insoluble y el sobrenadante se retiró, almacenándose en alícuotas congeladas a -20 o -80 °C para su posterior utilización. La concentración de proteínas se determinó mediante cuantificación, utilizando ensayo de Bradford y BSA como estándar. Seguido los extractos fueron calentados por 5 minutos a 95 °C en presencia de buffer muestra Leammli (SDS, Glicerol y β-mercapto-etanol) y las proteínas solubles separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12%. Donde se sembraron 100µg de proteína para la determinación de las moléculas de interés.

Para verificar el peso molecular de las proteínas de interés se utilizó un marcador de pesos moleculares All Blue (Precisión Plus ProteinTM Standards, #161-0373–BIO-RAD Laboratories, INC).

B- Transferencia e inmovilización a un soporte sólido

Completada la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham International.) con una dimensión similar al gel 8.2 cm x 5 cm x 1 mm.

C- Formación y detección del complejo antígeno-anticuerpo

-Bloqueo de sitios de uniones inespecífica con BSA al 5% TBS-Tween al 0,1% 1h en agitación a temperatura ambiente.

-Incubación con anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-Tween al 0,1%, toda la noche a 4°C en agitación.

PRL-3: 1/150

PRL-1: 1/1000

p53: 1/150

p21: 1/1000

tERK: 1/1000

pERK: 1/500

-Lavados con TBS-Tween al 0,1% por 15 min, en agitación a temperatura ambiente.

-Incubación con anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa (HRP) (Jackson, West Grove, PA, USA) anti-conejo dilución 1:2000 y anti-ratón dilución 1:4000 en TBS-Tween al 0,1%, según corresponda, por 1 h en agitación a temperatura ambiente.

-Lavado con TBS-Tween al 0,1%, por 15 min, en agitación.

-Incubación con reactivos de detección de Western blot ECL (Amersham, Buks, Reino Unido).

-Exposición de la membrana a una placa fotográfica (Kodak) para la detección de las señales quimioluminiscentes procedentes de los blots de las proteínas (Hyperfilm ECL Amersham).

-Revelado del anticuerpo secundario acoplado a HRP y fijación de la placa fotográfica (Kodak).

Para confirmar la carga equivalente de proteína total en cada carril y como control interno de la expresión proteica se utilizó β -actina (A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dilución 1/2000.

Las densidades de las bandas correspondientes a los resultados del Western blot fueron analizados con el programa Image J 1.47 software (National Institute of Health, USA).

Análisis estadístico

En los adenomas humanos se estudiaron las siguientes variables: distribución por género, tipo histológico, función y expresión de Ki67. Para analizar la asociación entre las variables se utilizó test de X^2 , considerándose p significativa $<0,05$.

Para el análisis de la expresión de las proteínas de interés en el modelo experimental básico se realizó mediante el test ANOVA-Fisher y el de correlación de lineal usando el coeficiente de Pearson para establecer relación entre las proteínas; PRL-3, PRL-1, p21, p53, ERK total y ERK fosforilada, considerándose p significativa <0.05 .

El análisis fue llevado acabo usando el software infostat (99).

RESULTADOS

Caracterización del modelo experimental básico

El estudio macroscópico de las adenohipófisis demostró un marcado incremento del tamaño glandular bajo la estimulación con BE, asociado al tiempo de efecto estrogénico (10d, 20d, 30d) (**Figura 1d, g, j**) en comparación con las glándulas de las ratas control (**Figura 1a**).

Las secciones histológicas coloreadas con H/E, evidenciaron en los diferentes tiempos de efecto hormonal, células epiteliales predominantemente acidófilas, con amplios citoplasmas, destacándose un predominio de figuras mitóticas a partir de los 20d BE (**Figura 1h**). Los ácinos se apreciaron inmersos en una extensa red de capilares dilatados y congestivos.

El análisis de la trama de reticulina, evaluada mediante la técnica de Gordon-Sweet, puso en evidencia cambios ostensibles de la misma, en relación con el tiempo de estímulo hormonal. A los 10d BE se observó distensión de la trama de reticulina con un incremento del tamaño acinar a expensas de la hipertrofia e hiperplasia celular (estadio hiperplásico) (**Figura 1f**). En las ratas tratadas por 20d se destacó la disrupción incompleta del sostén de fibras conectivas (**Figura 1i**), coincidente con lo que se caracterizó como un estado hiperplásico-adenomatoso. En el tiempo final analizado (30d BE) se apreciaron sectores glandulares con desaparición completa de las fibras de reticulina (**Figura 1l**) vinculable a la presencia de transformación adenomatosa.

El análisis del índice de proliferación celular en los tumores adenohipofisarios fue realizado mediante la determinación del porcentaje de células marcadas para Ki67 (**Figura 2**). Se identificó un aumento del número de células Ki67 positivas a partir de los 10d de acción estrogénica (Figura 2b), destacándose el pico proliferativo a los 20d del efecto hormonal (Figura 2A, B) ($p < 0,05$ 20d BE vs C y 10d BE) tiempo en el que se inició el estado hiperplásico/adenomatoso (Figura 1i). Cabe remarcar que de manera significativa la tasa proliferativa media descendió a valores similares al C a los 30d de efecto estrogénico ($p < 0,05$ ab vs c) (Figura 2B), momento en el que se advierte la desaparición de la trama de sostén.

La evaluación ultraestructural de las glándulas tumorales demostró un predominio de células lactotropas las que exhibieron hiperplasia de las organelas proteinopoyéticas, hallazgo más relevante cuanto mayor fue el tiempo de acción del benzotao de estradiol

(Figura 3). A los 30d BE se destacaron los citoplasmas distendidos con abundantes membranas de RER en disposición concéntrica (Figura 3d). El efecto estrogénico indujo un progresivo fenómeno de degranulación (Figura 3b, c, d), comparado a la clásica morfología de la células lactotropas observadas en ratas macho normales (Figura 3a). Otra particularidad observada a nivel subcelular fue la presencia a partir de los 20d de efecto hormonal, de células involutivas que mostraron marcada electrodensidad nuclear y citoplasmática (**Figura 4b, c**).

Con el objetivo de demostrar que las células en las que la estimulación hormonal indujo marcados cambios de la ultraestructura (Figura 3), se procedió a la inmunolocalización ultraestructural de prolactina (**Figura 5**). Mediante esta metodología se demostró la inmunoreactividad para la hormona a nivel de los gránulos intracitoplasmáticos. La especificidad de la inmunomarcada quedó demostrada por la presencia de elementos celulares cuyos gránulos no exhibieron partículas de oro coloidal (**Figura 5, asterisco**).

Expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógenos

En el modelo experimental se analizó, mediante la técnica de Western Blotting, la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular: p21 y p53 (**Figura 6**).

En relación a p21, luego del estímulo estrogénico, hubo un incremento progresivo lineal de la proteína comparado con el grupo C alcanzando los máximos niveles a los 30d BE (estado adenomatoso) ($p < 0,05$ vs C), sin observarse diferencias significativas entre los diferentes tiempos de acción hormonal. Un comportamiento similar se observó en la proteína p53 la que exhibió un marcado y significativo aumento de su expresión a los 10, 20 y 30 días de efecto estrogénico comparada con el grupo C ($p < 0,05$).

Expresión de p-ERK en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducida por estrógeno

Las ERKs tanto totales y como fosforiladas (p-ERK/t-ERK) fueron analizadas a lo largo del desarrollo tumoral hipofisarios. El análisis de la relación p-ERK/t-ERK demostró a los 30d BE un descenso de la fracción fosforilada en relación a la total ($p < 0,05$) (**Figura 6**).

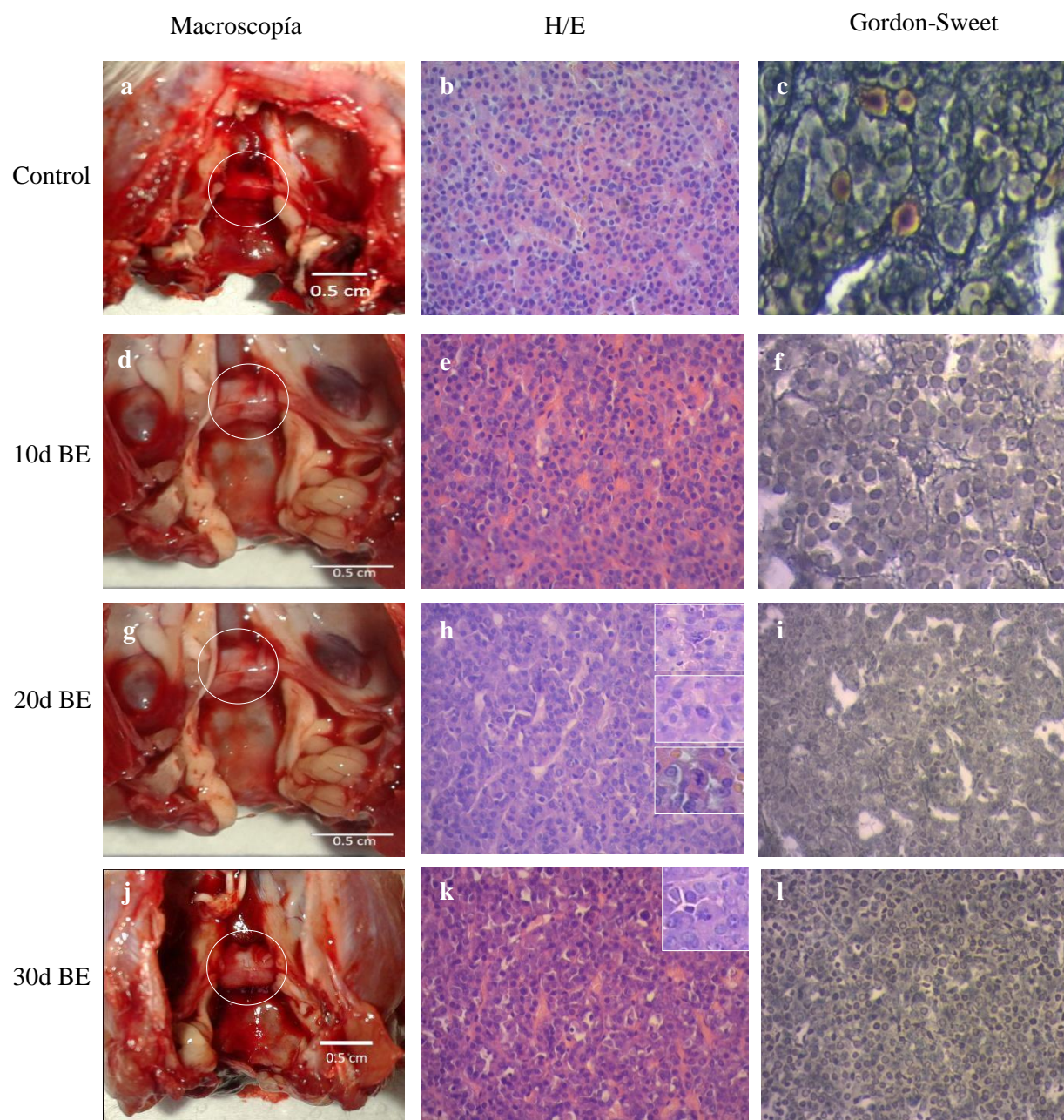


Figura 1: Tumores hiperplásicos/adenomatosos inducidos por estrógenos en adenohipófisis en ratas Fisher machos adultos. La estimulación estrogénica indujo un agrandamiento pituitario progresivo después de 10 (d), 20 (g) y 30 (j) días de tratamiento con BE. A los 20 d, hubo una actividad mitótica más notable (h) en comparación con C (b) y los otros tiempos de estimulación (e, k). Desde los 10d (f) a 30 d (l), fue evidente una expansión y/o pérdida de la red de reticulina con respecto a la glándula normal (c).

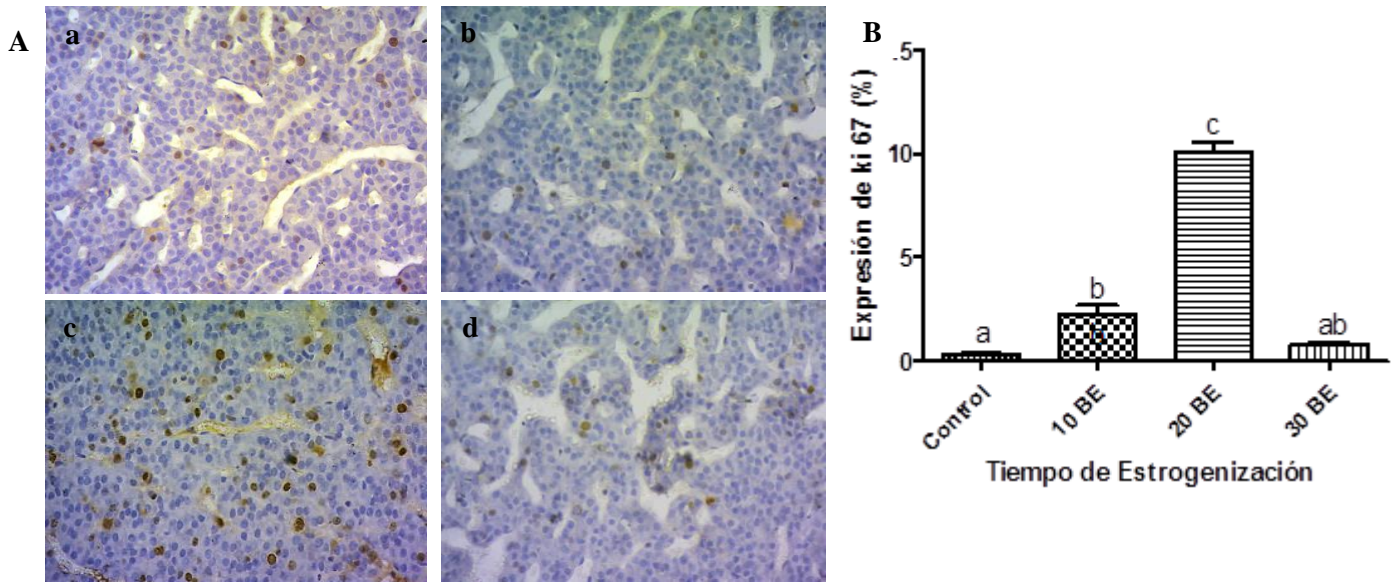


Figura 2: Inmunomarcación para Ki67 en lesiones proliferativas adenohipofisarias. **A)** Se destaca un pico proliferativo a los 20d (c) de efecto estrogénico respecto a los demás tiempos de estimulación hormonal (b: 10d y d: 30d) y al grupo C (a). **B)** El análisis estadístico del modelo hiperplásico/adenomatoso demuestra un significativo aumento de la expresión de ki67 a los 20d BE (Medias con diferente letras son estadísticamente significativas).

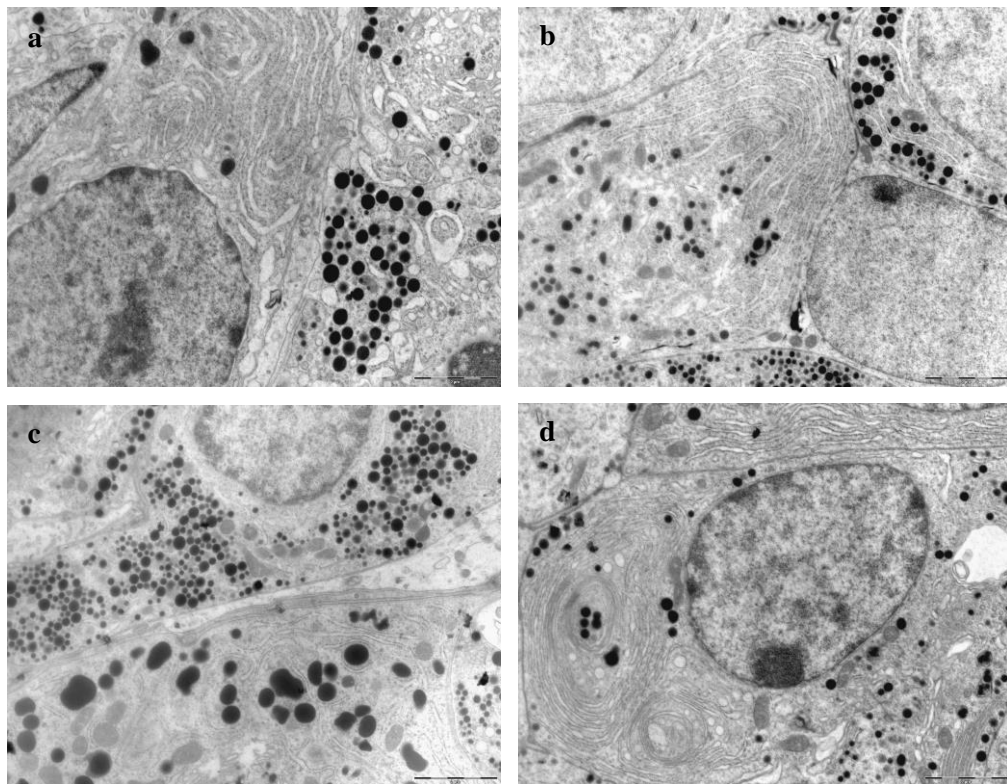


Figura 3: Cambios subcelulares de la población de células lactotropas en el modelo hiperplásico/adenomatoso. Se destaca una progresiva degranulación del citoplasma (b-d) acompañada de un fenómeno de hiperplasia del RER (d) respecto de los animales controles (a).

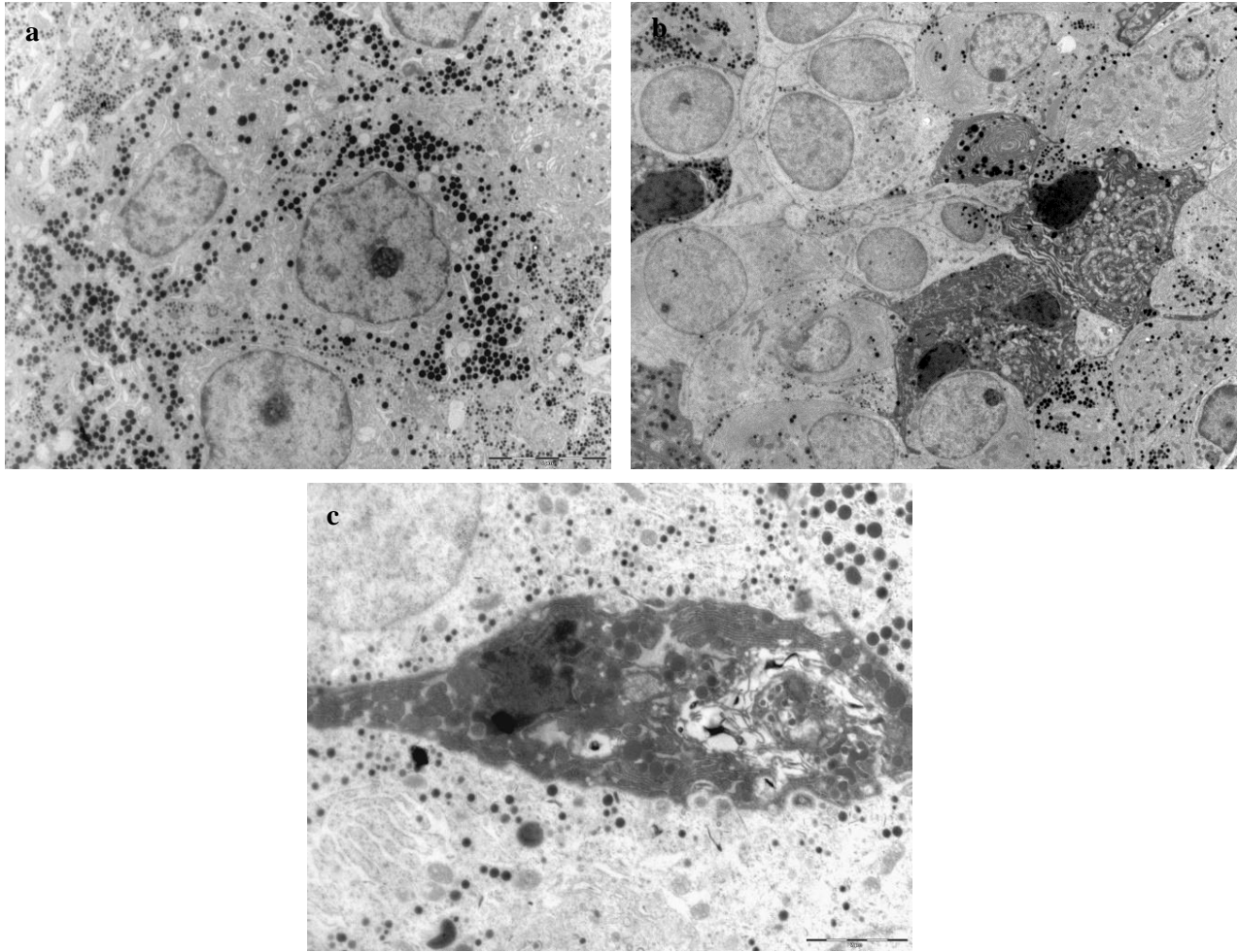


Figura 4: Población de células negras en tumores pituitarios inducidos por estrógenos. La estimulación hormonal (b, c) indujo células con citoplasmas marcadamente electrodensos, con dilatación de las organelas proteinopoyéticas en comparación a las adenohipófisis de los animales controles (a).

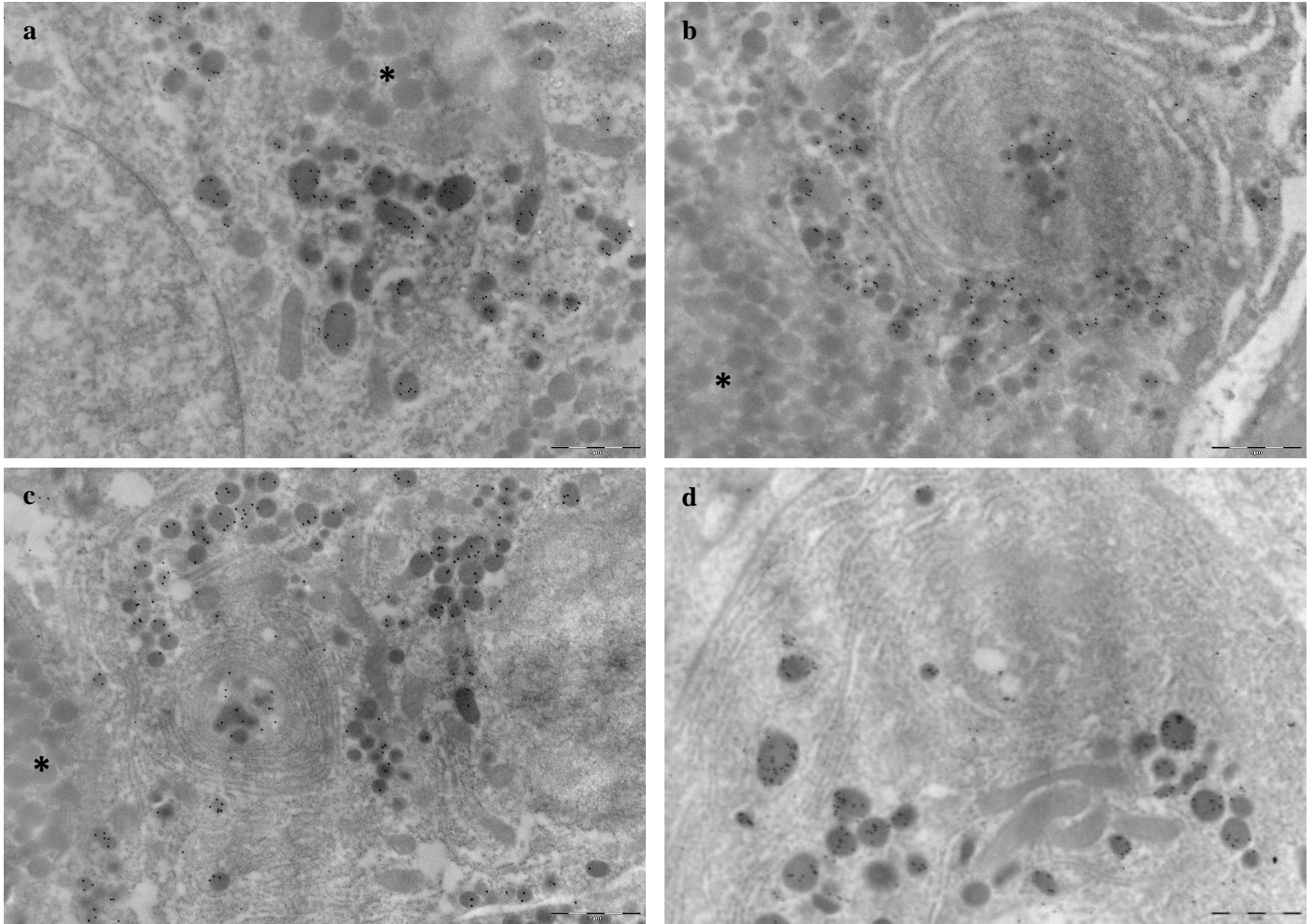


Figura 5: Inmunolocalización ultraestructural de prolactina. El oro coloidal marca la presencia de prolactina dentro de gránulos de secreción tanto en adenohipófisis de ratas controles (a) como en hipófisis hiperplásicas/adenomatosas (b, c y d). Se identifican además células negativas para la inmunolocalización de la hormona (asterisco).

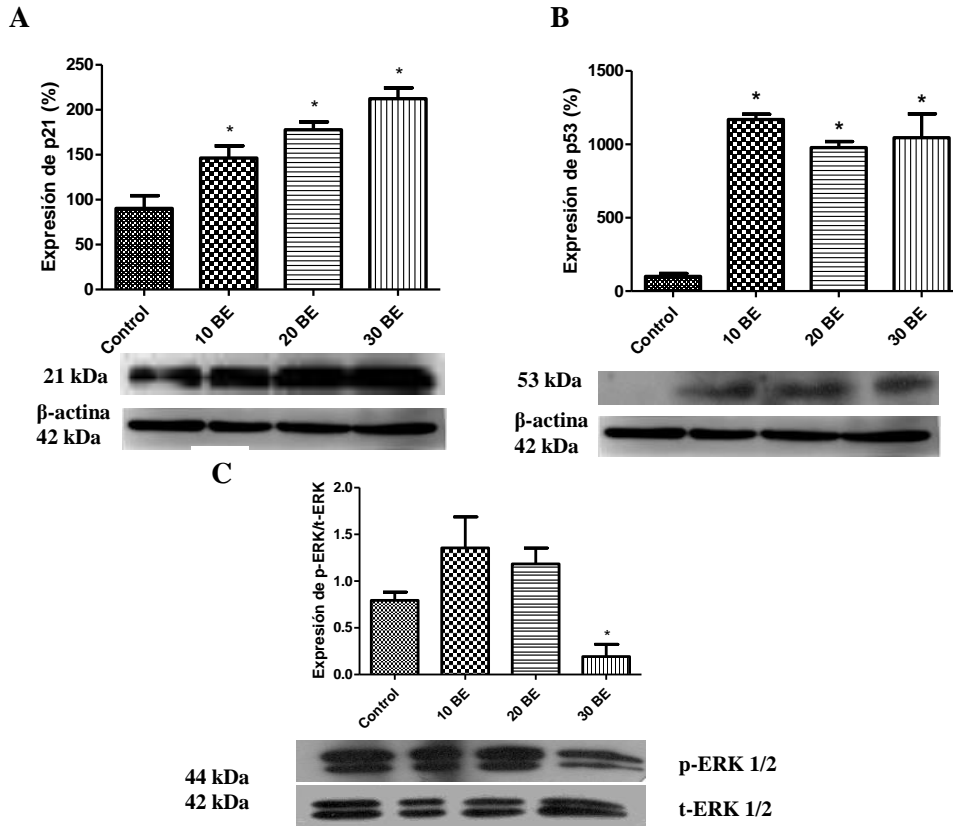


Figura 6: Análisis de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en lesiones proliferativas adenohipofisarias. Tanto p21 (A) como p53 (B) exhibieron un incremento sostenido y significativo a lo largo del desarrollo hiperplásico/adenomatoso, destacándose una caída de la p-ERK (C) a los 30d del estímulo hormonal. (* $p < 0,05$ vs 10 y 20 d BE).

Expresión de PRL-3 en lesiones tumorales adenohipofisarias inducidas por estrógeno

La proteína PRL-3 se inmunodetectó mediante inmunohistoquímica y/o inmunofluorescencia tanto en el grupo C como en los estimulados con BE (**Figura 7**), presentando una inmunolocalización predominantemente citoplasmática en los tiempos de efecto hormonal. La comparación de los diversos tiempos de acción estrogénica permitió demostrar que la expresión de la fosfatasa fue mayor a los 20d BE.

A los 20 y 30d de acción hormonal (**Inset Figura 7**) se identificó inmunomarcación para la proteína PRL-3 en la periferia celular, áreas posiblemente asociadas con la membrana plasmática de las células tumorales.

La inmunomarcación mediante inmunocitoquímica ultraestructural permitió corroborar la presencia de PRL-3 a nivel del citoplasma en relación a las organelas

proteínopoyéticas y asociada a membrana plasmática y posibles elementos de naturaleza endosómica (**Figura 8**). También se inmunodetectó asociada a cromatina nuclear particularmente en los tiempos de efecto hormonal.

Mediante Western Blotting (**Figura 9**) se evidenció un incremento significativo de la expresión de esta molécula a los 20d de efecto hormonal, tiempo en el que alcanzó los máximos niveles de expresión ($p < 0.05$ vs C, 10d y 30d). A los 30d BE la expresión disminuyó pero sin alcanzar los valores de 10d y del grupo C ($p < 0.05$ vs 10d and 20d BE).

Expresión de PRL-1 en lesiones tumorales adenohipofisarias inducidas por estrógeno

Mediante la técnica de inmunofluorescencia para PRL-1 se demostró inmunomarcación predominantemente en citoplasma y membranas plasmática de células del adenoparénquima de hipófisis hiperplásicas/adenomatosas en comparación con animales controles, donde la fosfatasa de interés no se inmunodetectó (**Figura 10A**).

En los homogenatos de adenohipófisis normal y tumoral la proteína PRL-1, mostró un incremento significativo con relación al tiempo de estimulación estrogénica (**Figura 10B**), alcanzando los niveles más altos de expresión a los 30d BE ($*p < 0,05$ vs C), tiempo asociado a la transformación adenomatosa (**Figura 11**) caracterizada por un bajo índice de proliferación celular (**Figura 2A-B**).

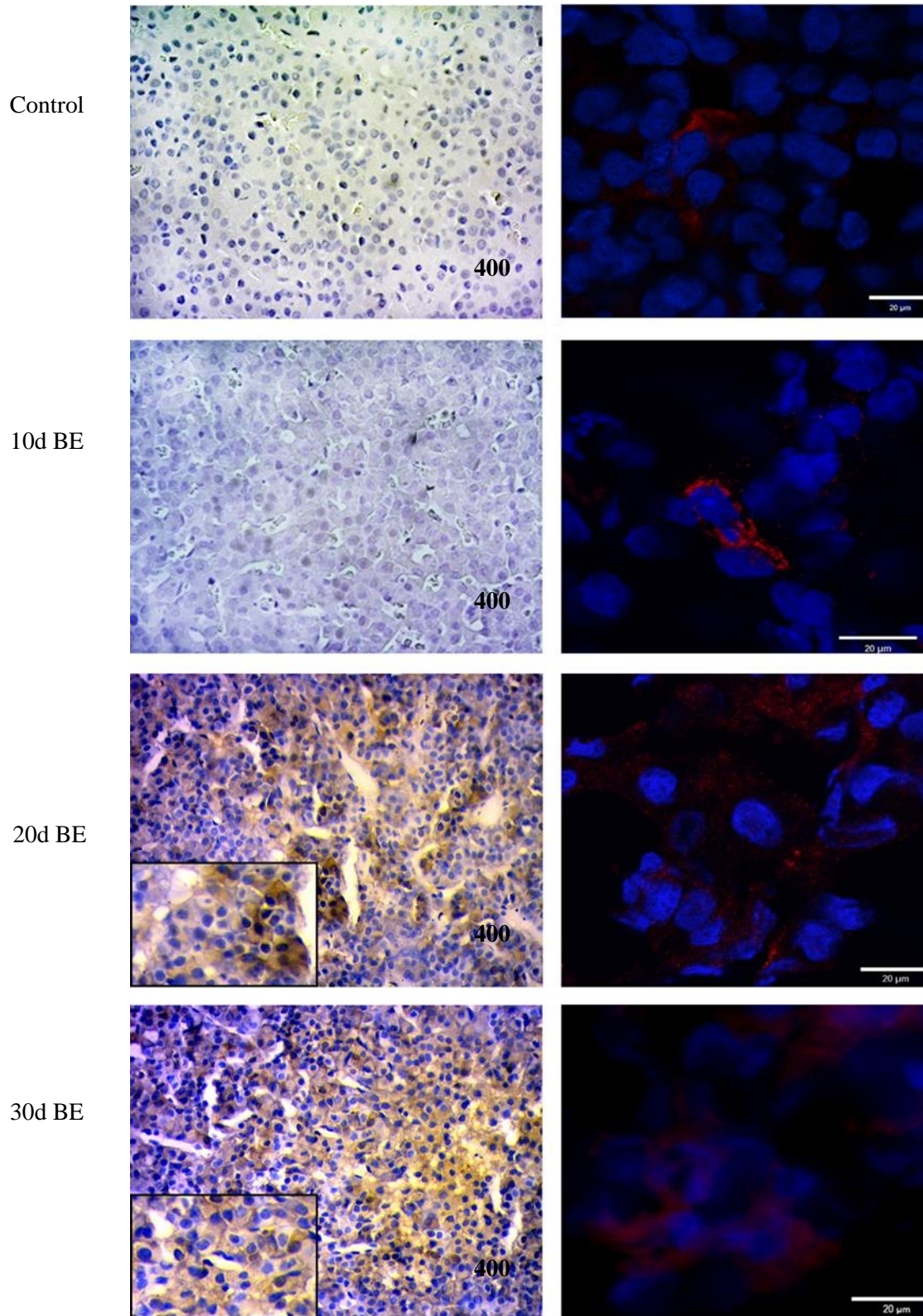


Figura 7: Inmunomarcación para PRL-3 en lesiones proliferativas adenohipofisarias experimentales. Se destaca un predominio de la inmunomarca a los 20 y 30d de efecto hormonal. En los inset de los 20 y 30 días de acción estrogénica se aprecia la inmunoreactividad en citoplasma y áreas periféricas de las células tumorales (flecha).

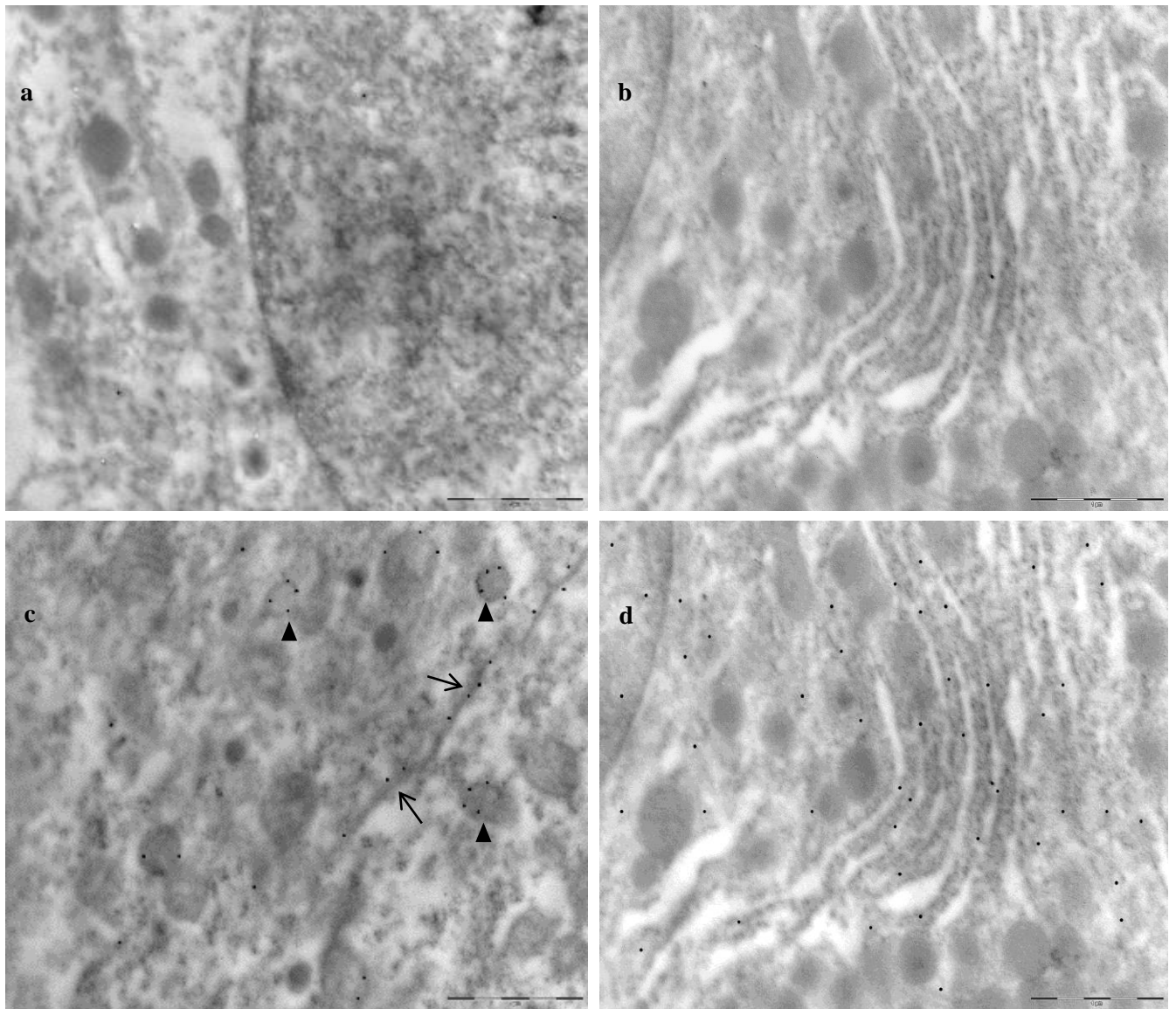


Figura 8: Inmunomarcación ultraestructural para PRL-3 en lesiones proliferativas adenohipofisarias experimentales. Se destaca la inmunolocalización de la fosfatasa a nivel de membranas plasmáticas (flecha) y elementos de posible naturaleza endosómica (cabeza de flecha) en ratas Fisher tratadas por 20d BE (c). A los 30d BE también se identifican partículas de oro coloidal a nivel de organelas proteinopoyéticas y núcleo (d). En el grupo control (a) y tratado 10d BE (b) no se observó inmunodetección para la fosfatasa mediante esta técnica.

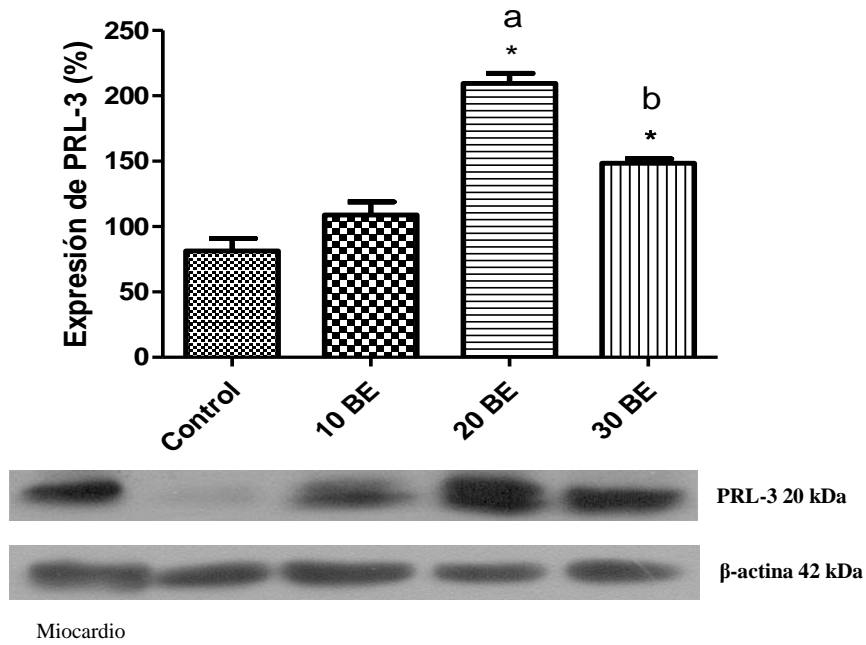


Figura 9: Determinación de los niveles de PRL-3 mediante Western Blotting. Se destaca un pico de la expresión de la fosfatasa a los 20 d de efecto hormonal, tiempo coincidente con el estado hiperplásico/adenomatoso (* $p < 0.05$ vs C y 10d BE; medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes).

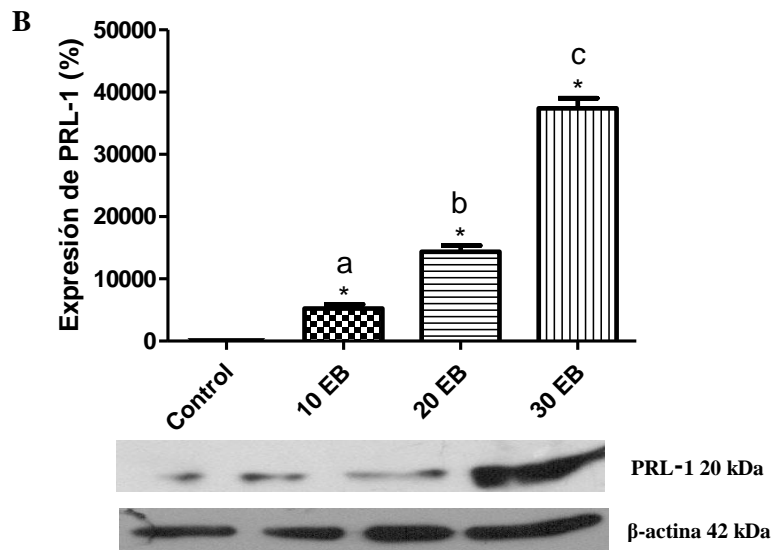
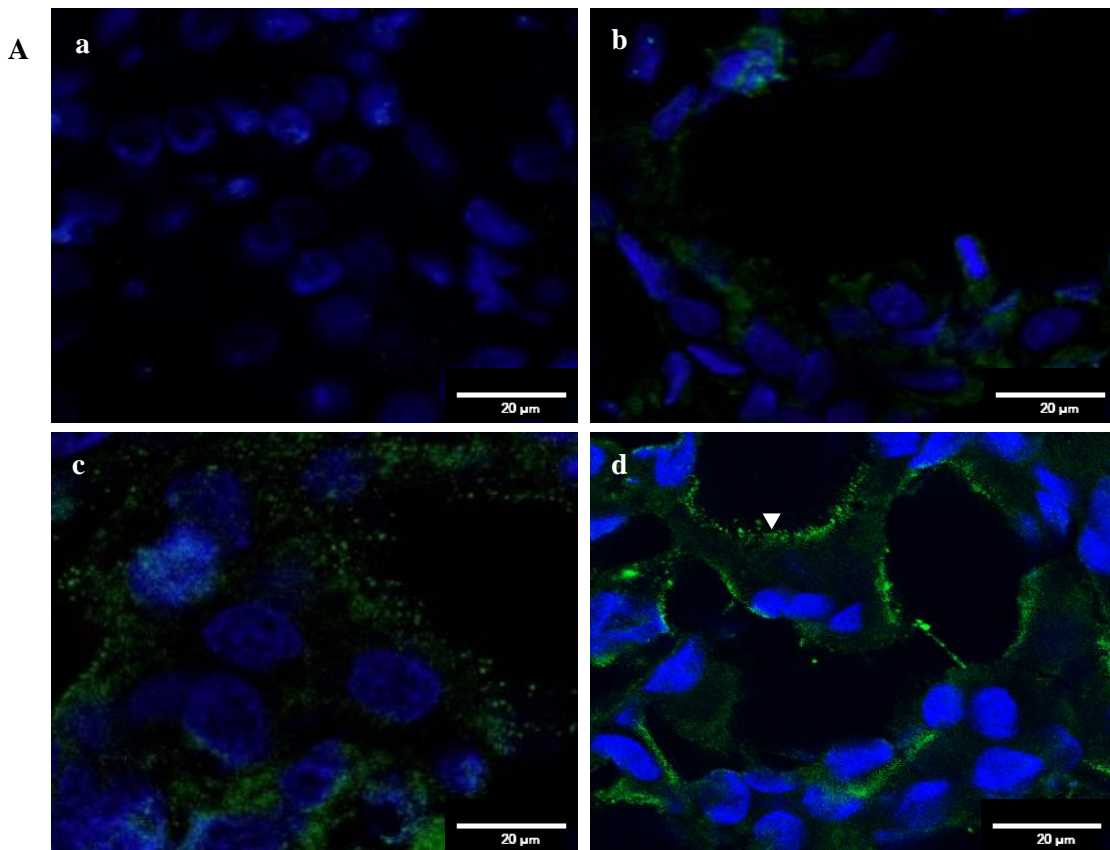


Figura 10: Análisis de la expresión de PRL-1 mediante inmunofluorescencia y Western Blotting. A- La fosfatasa se aprecia a nivel del citoplasma del adenoparénquima de ratas Fischer estimuladas con BE por 10d y 20d (b-c), destacándose su inmunolocalización en membranas plasmáticas a los 30d de efecto hormonal (d, cabeza de flecha). Se destaca la ausencia de inmunomarca en el grupo de animales controles (a). B- Se aprecia que PRL-1 exhibió un incremento progresivo a lo largo del tiempo de efecto hormonal, alcanzado los máximos niveles a los 30 días de efecto estrogénico (* $p < 0,05$ vs C y medias con letras distintas son estadísticamente diferentes).

Análisis de correlación de las Fosfatasas de Regeneración Hepática -1 y -3 con proteínas reguladoras del ciclo celular y ERKs

El análisis de correlación entre PRL-1 y -3, no mostraron asociación entre sí, ni con la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular p53 (Coeficiente de Pearson= 0.46; p 0.17).

Sin embargo ambas Fosfatasas de Regeneración Hepática exhibieron asociación con otras moléculas reguladoras del ciclo celular.

PRL-3 demostró una correlación lineal con p21 (Coeficiente de Pearson= 0,57; p= 0,05) sin que existiera asociación con ERKs (Coeficiente de Pearson entre PRL3 y t-ERK/p-ERK= 0,08 p=0,8).

En el análisis de PRL-1 se evidenció asociación de manera directamente proporcional con la proteína p21 (Coeficiente de Pearson= 0,86, p<0,05), mostrando además asociación con p-ERK/t-ERK (Coeficiente de Pearson= -0,64; p<0,05) destacándose que mientras la fosfatasa de interés incrementa a lo largo del desarrollo tumoral adenohipofisario la p-ERK disminuye a los 30d BE.

Adenomas hipofisarios humanos

Datos clínicos-epidemiológicos de los adenomas hipofisarios humanos

Del total de los adenomas obtenidos para el presente trabajo de Tesis Doctoral (n:64), la edad promedio de presentación fue a los 44,31±14,69 años (rango etario entre 20-74 años), siendo más frecuentes pacientes de sexo femenino (61%; n:39) que en pacientes de sexo masculino (39%; n:25). El 77% (n:49) fueron macroadenomas y representando los microadenomas el 23% (n:15) restante.

El 55% de los adenomas se clasificaron clínicamente como funcionantes (n:35) y el 45% (n:29) como no funcionantes. Histológicamente se apreciaron células con amplios citoplasmas y núcleos regulares en las secciones coloreadas con H/E adoptando diversos patrones morfológicos: sólido, papilar y trabecular (**Figura 11**).

Tomado en consideración la inmunoreactividad para las diversas hormonas adenohipofisarias del total de casos analizados a nivel histopatológico 25 fueron diagnosticados como adenomas gonadotropos, 12 casos adenomas corticotropos, 10 adenomas lactotropos, 8 adenomas somatotropos, 4 adenomas mammosomatotropos, 1

adenoma plurihormonal, 1 adenoma tirotrópico y 3 casos fueron negativos para expresión hormonal (**Figura 12**).

También se analizó la expresión de Ki67, observándose que el 45% (n:29) de los casos fue \geq a 3% y en el 55% (n:35) fue \leq a 3% (**Figura 13**).

Del total de adenomas humanos recolectados se pudo realizar estudio ultraestructural en un total de 6 de ellos, correspondientes como se muestra en la **Figura 14** a ejemplos de adenomas corticotropos densamente granulados, adenomas somatotropos escasamente granulados, adenomas gonadotropos y adenomas lactotropos.

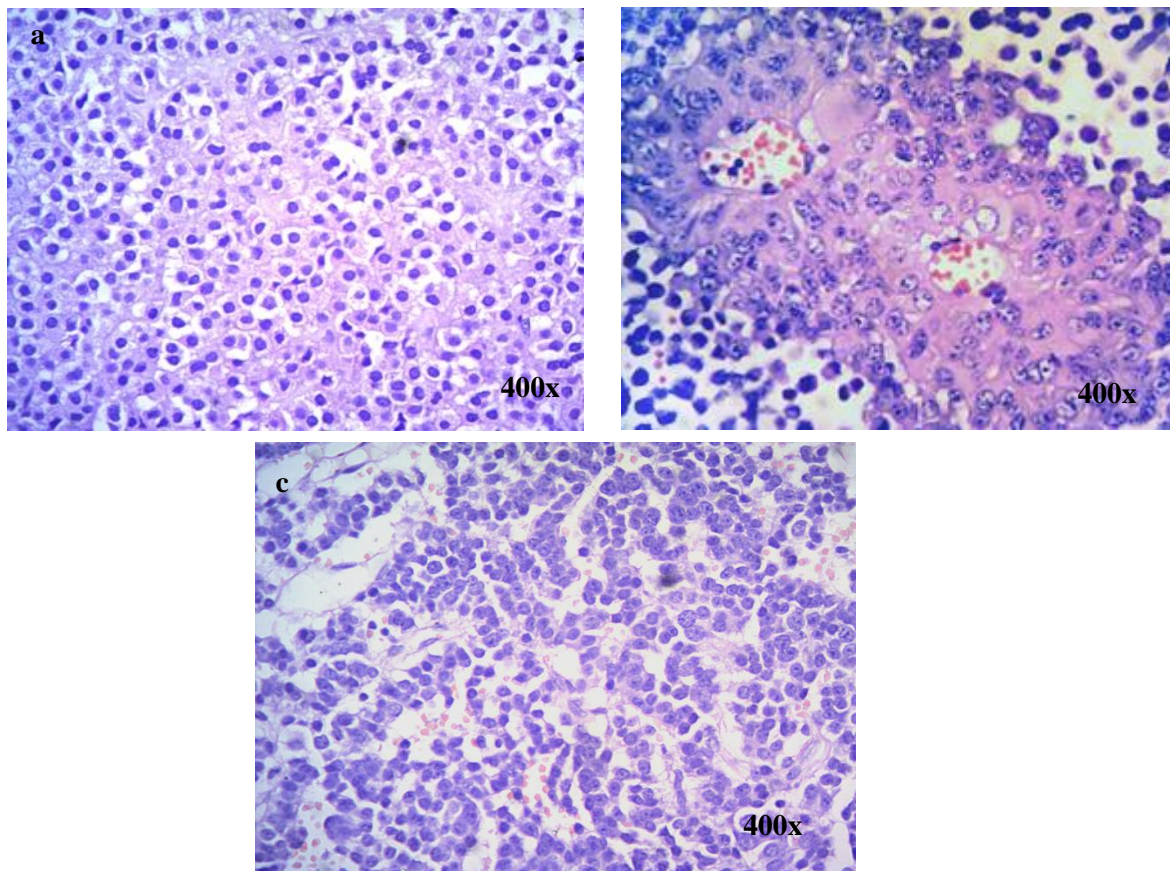


Figura 11: Patrones histomorfológicos de adenomas hipofisarios. Las células tumorales pueden adoptar diversos patrones, en sábanas monomorfas conformando un patrón sólido (a); estructuras papilares con ejes conectivos-vasculares (b) y cordones anastomosados conformando un aspecto trabecular (c).

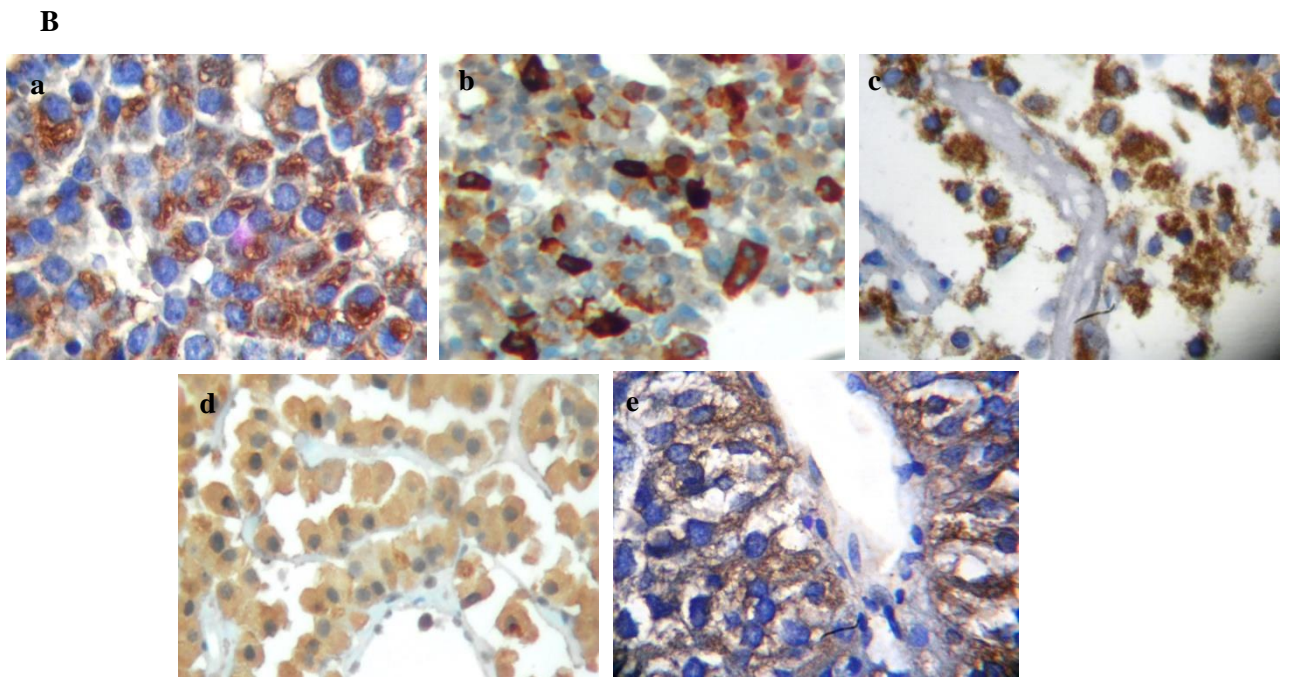
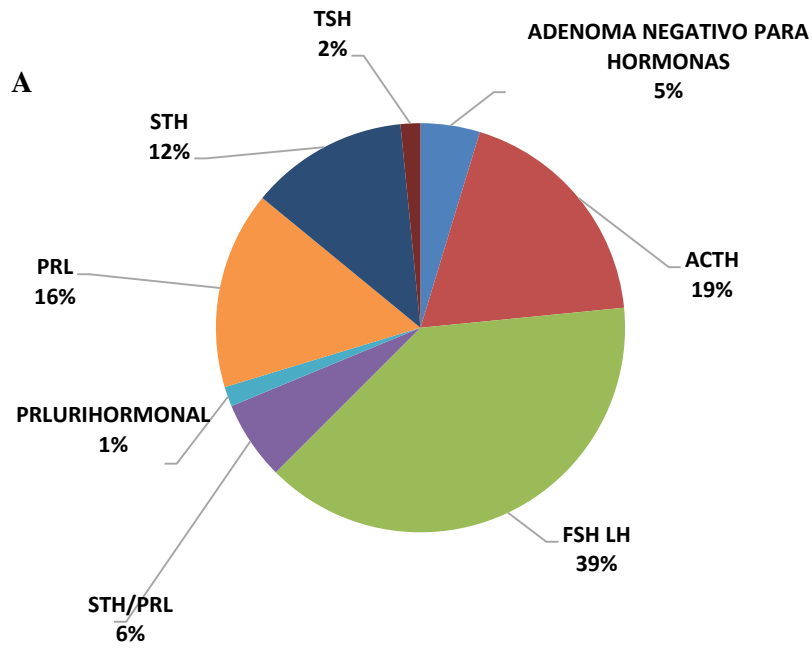


Figura 12: Adenomas hipofisario humanos. A-Gráfico que demuestra el porcentaje de cada tipo de adenoma analizados en el presente trabajo. B-Ejemplos de inmunomarcaciones de hormonas adenohipofisarias: a: prolactina; b: hormona de crecimiento; c: hormona luteotrófica; d: hormona adrenocorticotrófica; e: hormona tirotrófica. Magnificaciones originales 400X.

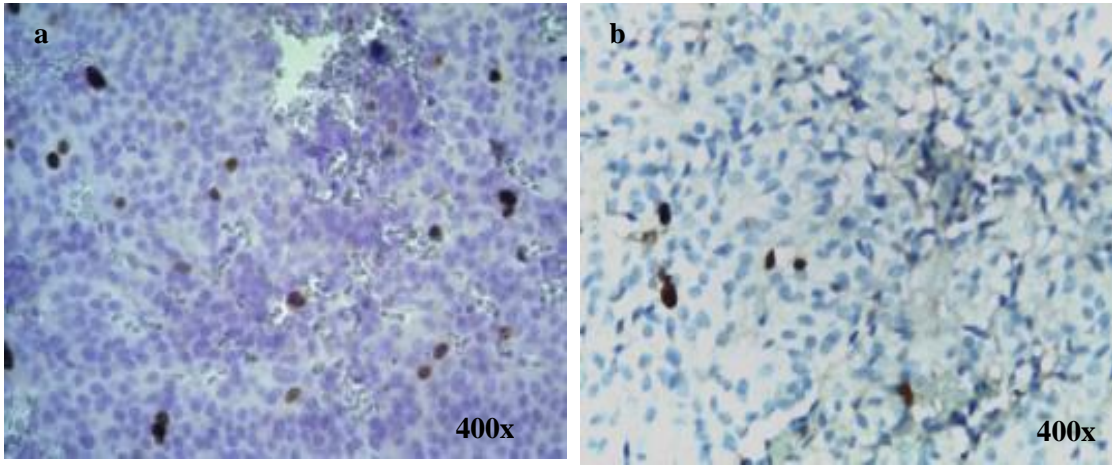
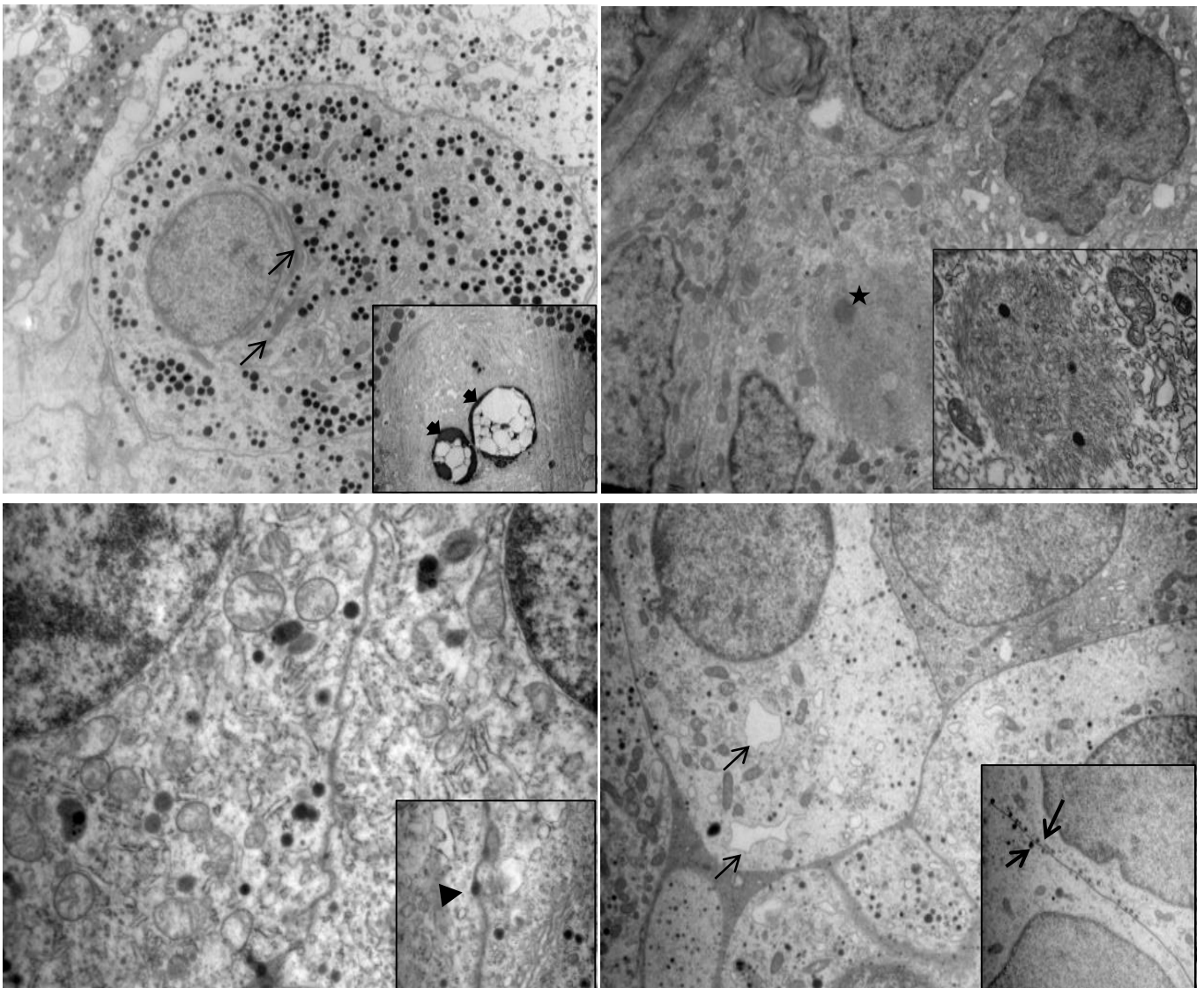


Figura 13: Inmunomarcación para Ki67 en ejemplos de adenomas hipofisarios. La microfotografía (a) corresponde a un adenoma con un índice de ki67 superior al 3% y en (b) se aprecia un bajo índice de proliferación.



Expresión de PRL-3 en adenomas hipofisarios humanos

El análisis de la expresión de PRL-3 en los 64 adenomas hipofisarios, demostró que el 50% fueron positivos para la proteína en estudio. Esta fosfatasa se inmunodetectó predominantemente a nivel citoplasmático (n:18) y en menor medida tanto en este compartimiento celular como nuclear (n:14) (**Figura 15**).

De estos 32 adenomas PRL-3 positivos, 26 (81%) macroadenomas (**Figura 15**) y 6 microadenomas (19%) expresaron significativamente PRL-3 (Test X^2 $p < 0,05$), siendo el 59% funcionantes y 41% restante no funcionantes.

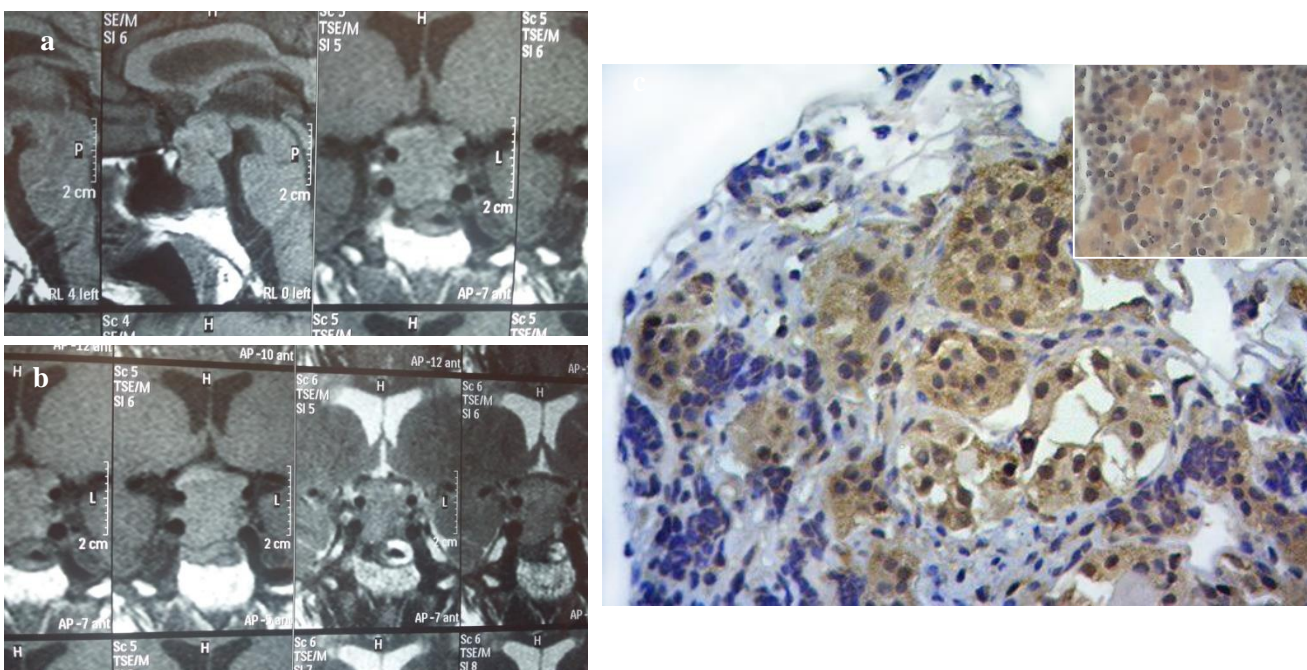


Figura 15: Inmunomarcación para PRL-3 en macro corticotropinoma. a-b- Observándose extensa lesión expansiva de aspecto tumoral, que refuerza de manera acentuada luego de la inyección con Gadolinio. c Se aprecia la expresión de la fosfatasa tanto a nivel citoplasmático como nuclear. Inset: inmunohistoquímica para hormona corticotrofina.

Figura 14. Hallazgos ultraestructurales en diferentes adenomas pituitarios humanos. (a) Corticotropinoma densamente granulado con gránulos secretorios de 200 a 300 nm y a nivel perinuclear haces de filamentos intermedios (flechas); (b) Adenoma somatotrofo escasamente granulado de núcleo irregular con acumulación esférica de filamentos intermedios (asterisco); (c) adenoma lactotrofo con algunos gránulos secretorios (Inset: secreción fuera de lugar); (d) adenoma no funcionante con pequeños gránulos de secreción y retículo endoplásmico rugoso dilatado (flecha). Magnificaciones originales 7400X.

Análisis de la expresión de PRL-3 en un grupo de adenomas lactotropos humanos

Con el objetivo de vincular los hallazgos del modelo experimental tumoral de células lactotropas con muestras de adenomas lactotropos humanos, se realizó un análisis más detallado en este grupo de tumores. Del total de los adenomas lactotropos (n:10) un 60% fueron positivos para PRL-3, siendo todos ellos macroadenomas, pudiéndose recabar el dato de invasión y/o recidiva en 4 de los 10 adenomas (**Tabla 1, Figura 16 a-c**).

Uno de ellos fue recidivante y evidenció una clara inmunoreactividad a nivel de las membranas plasmática tanto por IHQ fotónica como por ICQ ultraestructural (**Figura 16 d-e**).

Expresión de PRL-1 en adenomas hipofisarios humanos

El análisis de la expresión de esta fosfatasa arrojó datos de interés, particularmente en comparación con lo observado en el modelo experimental hiperplásico/adenomatoso.

Utilizando tanto la técnica de inmunocitoquímica por microscopía óptica como electrónica de transmisión no fue factible la determinación de esta proteína en el grupo de adenomas hipofisarios analizados (**Figura 17**). Cabe destacar que PRL-1 se expresó en los controles positivos usados, los que correspondieron a muestras de adenocarcinomas de colon (**Figura 17**).

Tabla 1: Datos clínicopatológicos de la serie de adenomas lactotropos.

SEXO	EDAD	INVASIÓN	TAMAÑO	KI 67 %	PRL-3 %
M	59	+	MACRO	8	10
F	30	Sin datos	MACRO	1	17
M	51	+	MACRO	1	14
M	27	Sin datos	MACRO	10	39
M	60	+/recidivante	MACRO	5	80
M	35	+	MACRO	5	50
F	20	(-)	MICRO	1	0
F	38	(-)	MICRO	1	0
F	31	(-)	MICRO	1	0
F	26	(-)	MICRO	1	0

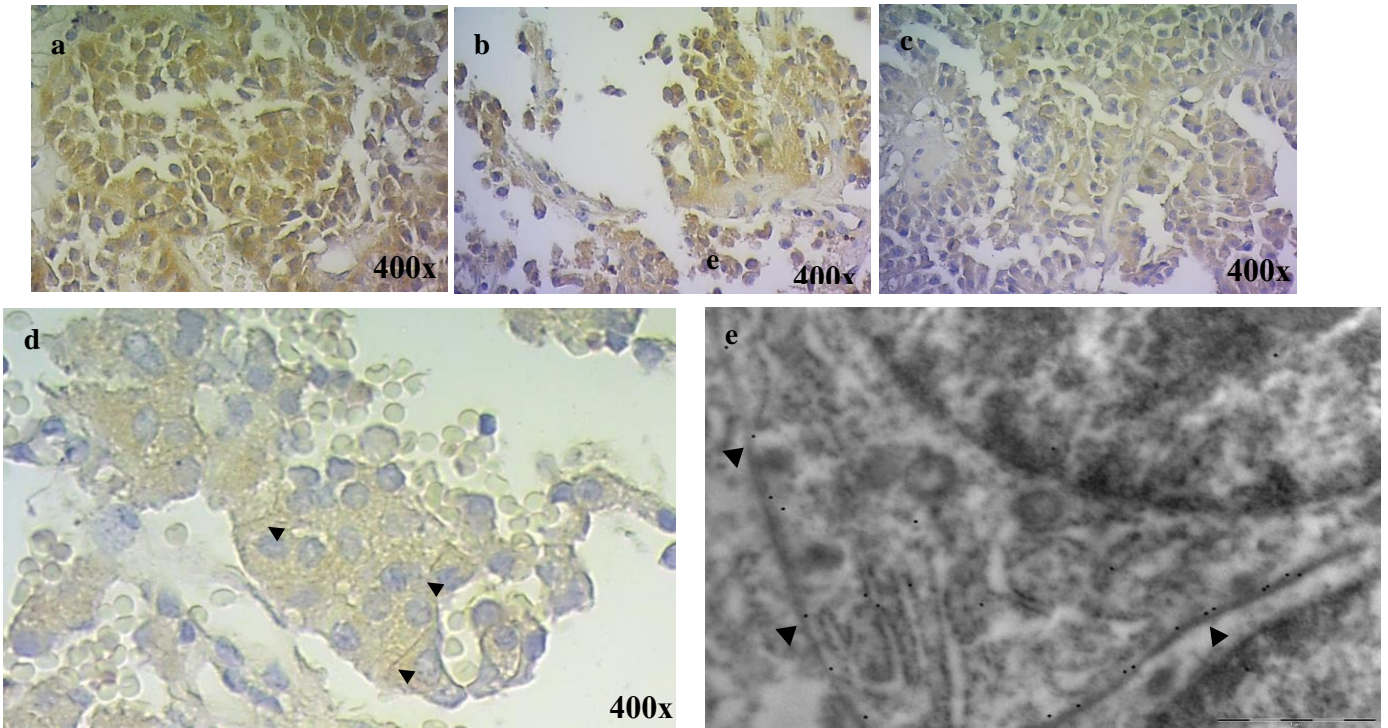


Figura 16: Inmunodetección de PRL-3 en adenomas lactotropos humanos. a-c: ejemplos de adenomas lactotropos PRL-3 positivos. d-e: inmunolocalización de PRL-3 mediante inmunocitoquímica fotónica (d) y electrónica (e) en un macroadenoma lactotropo invasor y recidivante. Se aprecia inmunopositividad de la fosfatasa a nivel de membrana plasmática (puntas de flecha).

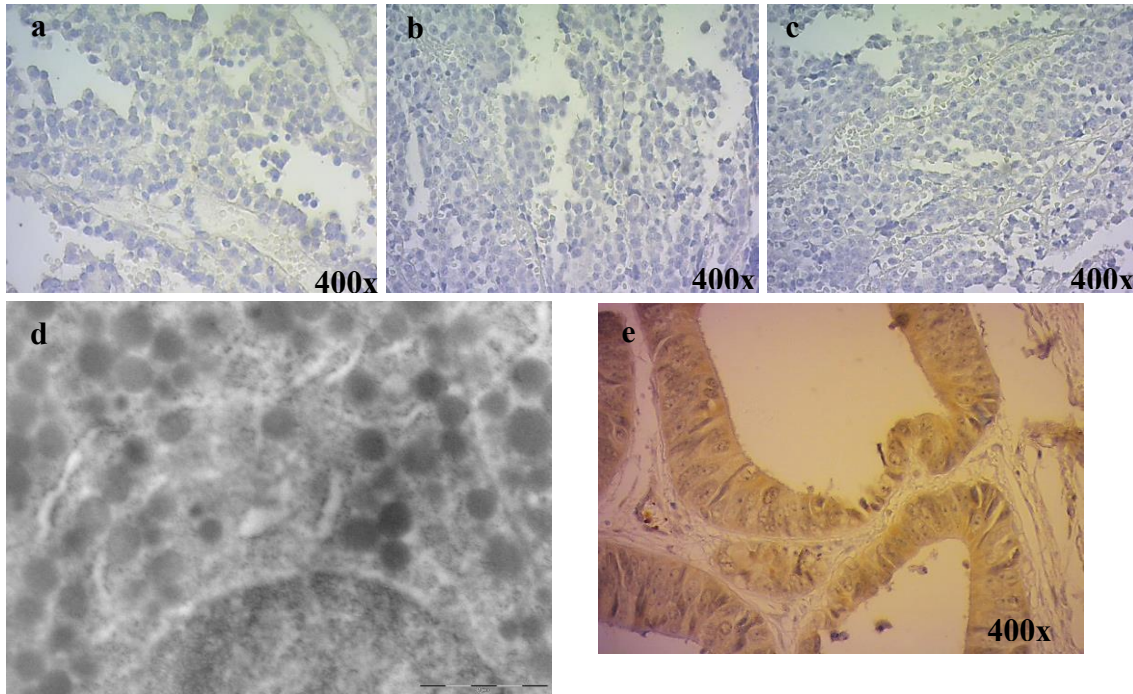


Figura 17: PRL-1 en adenomas hipofisarios humanos. Ejemplo de tres tumores (a-c) analizados mediante inmunohistoquímica de tejidos incluidos en parafina y uno en resina LR-White (d) donde se demuestra la ausencia de expresión de esta fosfatasa comparada con su inmunoreactividad en el adenocarcinoma de colon (e).

DISCUSIÓN

Los tumores de la glándula pituitaria representan aproximadamente el 15% de todos los tumores del cerebro, siendo por lejos los adenomas las neoplasias neuroendocrinas más frecuentes confinadas a la región selar (6). Estos tumores son proliferaciones con diferentes características histomorfológicas y comportamiento biológico, especialmente con respecto al tamaño tumoral, invasión y función endocrina (100). Similar a lo publicado en el último reporte de la OMS del año 2017 (101), en la serie de casos presentada en este trabajo de Tesis de Doctorado, más del 50% fueron macroadenomas (>10mm) y en un gran porcentaje no funcionantes (45%), con inmunoreactividad para LH (39%), a diferencia de lo reportado por Cámara Gómez (102) en su serie donde solo un 5% no exhibieron inmunotinción para hormonas. Estos adenomas negativos para hormonas, de acuerdo al último reporte de la OMS (6), no deben ser denominados como adenomas nulos, ya que para dicho término se debería realizar inmunomarcación para factores de transcripción, además del perfil hormonal inmunohistoquímico. Hasta el presente en nuestro medio por cuestiones fundamentalmente de índole económica, no se realizan en la práctica de rutina las inmunodeterminaciones de factores de transcripción recomendados por la OMS, por lo tanto se denominan como “adenomas negativos para inmunotinción hormonal”.

Otro dato epidemiológico importante de nuestra serie de casos fue el porcentaje de adenomas que inmunomarcaron para FSH/LH (39%), ACTH (19%), PRL (16%) y GH (12%). Debemos tener en cuenta que el presente estudio se basa en los casos que fueron a cirugía, y si bien provienen de 3 centros de referencia de la ciudad de Córdoba, se aprecian algunas diferencias con respecto a otras publicaciones en cuestión de frecuencia de ciertos subtipos histológicos. Trouillas y col. (2), demostraron en su serie de casos basados en datos inmunohistoquímicos, un predominio de inmunoreactividad para PRL, GH, FSH/LH y ACTH, en este orden de frecuencia. De igual manera la mayoría de las grandes series epidemiológicas reportadas ubican como la lesión adenohipofisaria más comúnmente diagnosticada a los adenomas lactotropos, seguida por los somatotropinomas y corticotropinomas (103, 104). Cecenarro y col. (105) reportaron en un análisis retrospectivo y descriptivo, llevado a cabo en la ciudad de Córdoba y en un total de 102 pacientes: 28% de adenomas lactotropos, 11.8% de adenomas somatotropos y solo un 6.2% de adenomas corticotropos. Tal como lo discuten estos autores (105) la discrepancia entre las diversas

series en cuanto a la incidencia de algún tipo de adenoma hipofisario podría deberse a que el reclutamiento de los pacientes en el presente trabajo de Tesis Doctoral procedió de instituciones públicas y privadas que son centro de derivación neuroquirúrgica y a la experticia del neurocirujano en el tratamiento específico de una variedad de lesión proliferativa versus otra.

Tomando en consideración los datos demográficos de edad y sexo de los pacientes afectados por estas lesiones proliferativas, en nuestra serie la edad promedio de presentación fue de 44 años predominando en individuos de sexo femenino. Gold (106) ha reportado una prevalencia a los 55 años de edad, la que disminuyó posteriormente. Por otra parte Mindermann y Wilson (107), han demostrado que cada subtipo tumoral presenta, entre un total de 2230 pacientes, una distribución diferente: durante la primer década de la vida, adenomas hipofisarios secretantes ACTH; entre las segunda y cuarta décadas, los adenomas lactotropos; y en la quinta y la novena décadas de vida predominaron los adenomas endocrinos inactivos. Sin embargo, tal como lo estableció Gold, la edad media general de presentación fue en la quinta década.

En relación con el sexo la mayoría de las publicaciones establecen, en coincidencia con nuestros hallazgos un predominio en mujeres (105, 108). En este sentido se puede plantear que esta diferencia podría ser debida a sesgos dependientes de la mayor propensión de las mujeres a consultar precozmente (105).

Un aspecto de importancia clínica es el tamaño tumoral de los adenomas hipofisarios. Este dato clínico es de gran relevancia en el área de la endocrinología, al punto que ha sido propuesto como uno de los parámetros de clasificación (109); recomendándose actualmente la dimensión máxima del tumor para su uso en oncología para evaluar el tamaño de la lesión y monitorear la respuesta al tratamiento (110). Tomando en consideración las dimensiones de los adenomas analizados en el presente trabajo de tesis, el 77% fueron macroadenomas. Este hallazgo a partir de los datos demográficos disponibles es coincidente con lo reportado en la literatura médica, donde se ha puntualizado que usualmente son macroadenomas, con excepción de los corticotropinomas (111).

Establecer la expresión de biomarcadores particulares en adenomas hipofisarios puede facilitar la toma de decisiones médicas después de la cirugía (112). Diversos biomarcadores han sido utilizados para la evaluación clínico-patológica de estas lesiones

tumorales, siendo utilizados en el diagnóstico, el pronóstico e incluso como blancos terapéuticos, sin embargo, ninguno de ellos puede predecir con precisión el comportamiento tumoral (47). Uno de ellos ha sido el índice de expresión de Ki67. Esta proteína es un antígeno nuclear expresado en las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular (113) y su índice de marcación es reconocido como indicador de proliferación celular. A largo de los años el punto de corte del índice de Ki67 con significación pronóstica en los adenomas pituitarios fue $>3\%$ (114), habiéndose asociado como marcador de invasividad (115); a pesar del hecho de que algunos estudios demostraron datos contradictorios (116, 117). Entre los 64 adenomas presentados en este trabajo de Tesis, el 45% de las lesiones proliferativas exhibió un índice $\geq 3\%$ y el 55% $\leq 3\%$. Este último dato es coincidente con lo reportado por López y col. (118). Sin embargo, Grimm y col. (119) recientemente han demostrado que el carácter invasivo de los adenomas hipofisarios no se correlaciona con un aumento del índice de Ki67, concluyendo que los parámetros de proliferación son independientes del tamaño del tumor en la presentación inicial, siendo sólo importante la expresión elevada de este marcador en tumores recurrentes.

Este dato de relevancia clínica abre paso a la búsqueda de nuevos marcadores en adenomas que pudieran ser blancos involucrados en la patogenia y/o terapéutica médica.

Si bien los modelos de roedores tienen limitaciones comprensibles, la utilización de los mismos ha proporcionado información importante sobre mecanismos celulares y moleculares que pueden alterarse en la pituitaria humana anormal. Tomando en consideración que los adenomas lactotropos son los tumores secretantes adenohipofisarios más frecuentes (120) los modelos de estimulación estrogénica siguen siendo adecuados para la investigación endocrinológica. Sin embargo, cabe resaltar el hecho de que las hormonas sexuales, como el estradiol, jugarían un papel más importante en los murinos que en los humanos. De hecho, se demostró que a diferencia de lo observado en ratas, los estrógenos tienen poco efecto sobre la liberación de PRL en humanos (121). Además, el estradiol ejerce efectos distintivos y específicos de cepa sobre la función de lactotropas en ratones y ratas (122). Además, el estradiol podría estar ejerciendo diferentes efectos permisivos para la acción de otros factores de crecimiento en el desarrollo del adenoma lactotrofo experimental. Los mecanismos subyacentes a las respuestas específicas de cepa y de género al estradiol siguen siendo en gran parte desconocidos, además de que otros factores de

crecimiento intrahipofisarios también podrían estar implicados en la patogenia de estos tumores (123).

Tomando en consideración que para muchos investigadores (124, 125) las ratas F344 son las más sensibles para desarrollar adenomas lactotropos experimentales, es que a los fines de analizar las moléculas de interés de esta Tesis, ratas macho de esta cepa, fueron utilizadas. Se procedió a la estrogenización de ratas adultas por 10, 20 y 30d. Weiner y col. en 1985 (126) al emplear la cepa antes mencionada y administrando estradiol por 10, 26 y 63d, han demostrado, al igual que en nuestro modelo experimental básico, un aumento del tamaño glandular hasta seis veces comparado al control. Estos datos han convertido a las ratas F344 en los animales de elección por su mayor sensibilidad para el estudio de adenomas lactotropos experimentales (124, 127).

Las ratas F344 estimuladas por 30d con BE, exhibieron pérdida de la trama reticular hipofisaria, hallazgo compatible con una transformación adenomatosa, de igual manera a la descrita por Mukdsi y col. (98) y Xu y col. (128) en ratas Wistar y SD estimuladas por 60d y 120d, respectivamente.

Un aspecto que resulta de interés es como se desarrollan estas lesiones proliferativas inducidas por estrógenos. Diversas líneas de investigación han descubierto que la exposición al estradiol conduce a la formación de adenomas lactotropos a través de eventos orquestados que involucran a los receptores D2 de dopamina (129) e isoformas TGF- β y sus receptores (38). En este interjuego de factores estimulantes TGF- β y b-FGF interactuarían para facilitar la comunicación entre las lactotropas y las células folículo-estrelladas, necesarias para la acción mitogénica del estradiol (130). Finalmente, la señalización downstream que gobierna la proliferación de células lactotropas implica la activación de la ruta dependiente de la MAP quinasa (131).

En este sentido en el modelo experimental básico se demostró el máximo incremento del índice de proliferación a los 20d de acción estrogénica respecto a los demás tiempos de efecto hormonal y al control.

Es ampliamente conocido que el ciclo celular en mamíferos es regulado por proteínas quinasas, entre las que se encuentran las CDK, críticas en la transición a través de las diferentes etapas del ciclo (20). La actividad de las CDK es modulada por fluctuaciones en la concentración celular de ciclinas y CKIs. En este último grupo se han descripto dos

familias y dentro de la llamada familia Cip/Kip se encuentra la proteína p21. En el modelo experimental analizado en el presente trabajo de Tesis se apreció un incremento progresivo y significativo de la proteína p21 la que presentó un incremento progresivo alcanzando los máximos niveles a los 30d de acción del BE, tiempo coincidente con el desarrollo adenomatoso. Se ha planteado que las proteínas Cip/Kip preferentemente inhiben CDK2 y CDK1 (132). En este sentido en modelos murinos que combinan mutantes para Cdk4 R24C, p21-null, y p27-null, existiría una cooperación de estas moléculas en el desarrollo tumoral (133). A este mecanismo en el que por ausencia de p21 se favorece el desarrollo adenomatoso, la pregunta sería ¿el incremento de esta CKI observado en ratas estimuladas con BE es sólo para frenar del ciclo celular? Hasta el presente se ha implicado también la participación del eje p21/p53 en el mecanismo de senescencia celular (134). Si bien en las ratas F344 no se analizaron fracciones subcelulares para evidenciar cambios en la relación citoplasmática/nuclear de p21/p53, los resultados son concordantes con los descritos en los cambios de los niveles de expresión por Sabatino y col. (134). Estos tomados en conjunto permitirían hipotetizar que en el modelo experimental del adenoma lactotrofo inducido por estrógenos se podrían en marcha mecanismos de freno en la proliferación que explicaría la baja incidencia de adenomas invasores en la población humana. Con proyección a la clínica endocrinológica Dong y col. (48) en una serie de adenomas lactotrofos humanos demostraron que p21 se encuentra sobreexpresada en adenomas no invasivos versus los invasivos, otorgando a este regulador del ciclo celular una función en el mecanismo invasión y migración celular.

La otra proteína relacionada con el control de la proliferación celular, cuya expresión fue analizada en el presente trabajo fue p53. Este supresor tumoral inhibe la progresión del ciclo celular y la fosforilación de la proteína Rb (135). Las adenohipófisis con 10, 20 y 30d de estímulo con BE exhibieron un incremento sostenido y significativo de esta proteína, la que presentó niveles prácticamente indetectables en los animales controles. En un modelo experimental básico similar de tumores adenohipofisarios pero en la cepa Wistar, Sabatino y col. (134) observaron un incremento de esta molécula a los 10 y 20d de efecto hormonal, pero a diferencia de los hallazgos descritos en esta tesis, p53 descendió a los 40d de acción hormonal. Si bien la función de p53 está vinculada a su localización subcelular (136), Sabatino y col. (134) detectaron mediante la técnica de fraccionamiento su localización

principalmente en el compartimento citoplasmático. Sin embargo, no se puede obviar que el modelo de adenomas lactotropos experimental se basa en el efecto crónico del BE sobre la glándula pituitaria. En este sentido Molinari y col. (137), describieron que el estradiol induce inactivación de p53, redistribuyéndolo al citosol, siendo este evento necesario para la proliferación de células inducidas por estrógeno. Sin embargo Deng y col. (138) evidenciaron que ratones knock-out para p53 y p21 no son propensos a las etapas iniciales del desarrollo tumoral, lo que sugiere que las funciones de p53 en la inducción de la detención del ciclo celular y la senescencia no contribuyen significativamente a la supresión del tumor. En este sentido pudimos demostrar que en los tumores hipofisarios inducidos por BE existe una correlación entre las proteínas p21 y p53, las cuales aumentan de forma lineal. Quizás este evento sea producto de la acumulación de estas moléculas en citoplasma, donde participan múltiples proteínas como parte de un complejo mecanismo de regulación (4, 11, 17).

Otro de los aspectos de relevancia molecular en la patogenia de los adenomas hipofisarios es la participación de diversas vías de señalización. Entre estas la de las ERKs es una de más estudiadas, existiendo sin embargo, resultados contradictorios ya que los efectos sobre proliferación versus diferenciación dependerían del tiempo de activación de estas señales (139). Cabe además remarcar que las ERKs catalizan la fosforilación de una amplia variedad de efectores proteicos downstream que incluyen quinasas, fosfatasa y factores de transcripción (139). Si bien a los 10d y 20d de efecto hormonal hubo un aumento de la expresión de la fracción fosforilada, dicho incremento no fue significativo respecto al grupo control. Sin embargo, en el estado adenomatoso (30d BE) se destacó un significativo descenso de la proteína alcanzando valores inferiores incluso al observado en el grupo de ratas sin estimulación estrogénica. Chaturvedi y Sarkar (140) han demostrado, en líneas de células lactotropas, que la activación de las ERK por cortos tiempos (24 a 96 h) incrementa la proliferación celular; en tanto otras líneas de investigación han puesto de manifiesto que en la línea celular GH3 y en modelos murino de xenoinjerto la activación por 7d disminuye la tumorigenicidad y aumenta la diferenciación hacia un fenotipo lactotropo (141). Debe ser tenido en cuenta que la activación de las ERKs es un proceso complejo como para atribuir en las condiciones experimentales analizadas *in vivo*, a un único factor participante de la puesta en marcha de esta cascada de señalización. En este contexto no puede ser obviado el

efecto de los estrógenos sobre las ERKs. Watson y col. (142) demostraron que los estrógenos, pueden activar de manera potente múltiples señales, generando respuestas funcionales en células hipofisarias. Estos autores comprobaron en ensayos *in vitro* que los estrógenos, generan fosforilación de ERK, con períodos de aparente desfosforilación entre los períodos de activación. Las activaciones sostenidas de ERK, a menudo se han relacionado con la capacidad de las células para proliferar (143) por lo que podríamos vincular este efecto al incremento de la tasa proliferativa observado a los 20d de efecto hormonal. Sin embargo, la presencia de una caída de los niveles de pERK a lo 30d podría vincularse a lo establecido por Watson y col. quienes proponen que las células tumorales alcanzarían un fenotipo terminal diferenciado de células lactotropas tras ser sometidas a los efectos proliferativos hormonales (142).

Hasta aquí hemos demostrado la complejidad de algunos mecanismos que participan en la generación de procesos proliferativos de lactotropas inducidos por estrógenos. El análisis de la **Figura 1** permite comprender de manera resumida los hallazgos moleculares que caracterizaron al modelo hiperplásico/adenomatoso.

Habiendo discutido las particularidades demográficas y patológicas de los adenomas hipofisarios humanos y algunas de las características moleculares del adenoma lactotrofo experimental, se abordarán y confrontarán con la bibliografía actual los resultados en relación con las PRL-3 y -1.

Cabe recordar que las PRLs, son proteínas tirosino fosfatasas con capacidad de fosforilación reversible, las cuales juegan un rol importante en la regulación, proliferación, diferenciación celular, desarrollo y función de los tejidos y organismos (144). Luego del descubrimiento de estas enzimas, las mismas prontamente se convirtieron en un foco de interés debido a su asociación con el mecanismo de metástasis tumoral (61, 145). Estas proteínas se encuentran expresadas en distintos tejidos normales y patológicos tanto de ratas como humanos (146).

El análisis de PRL-1 y PRL-3 en el presente trabajo de Tesis Doctoral puso por primera vez en evidencia que estas fosfatasas se hallan expresadas a nivel pituitario de ratas Fischer 344 tanto en condiciones normales como a lo largo del desarrollo tumoral inducido por BE.

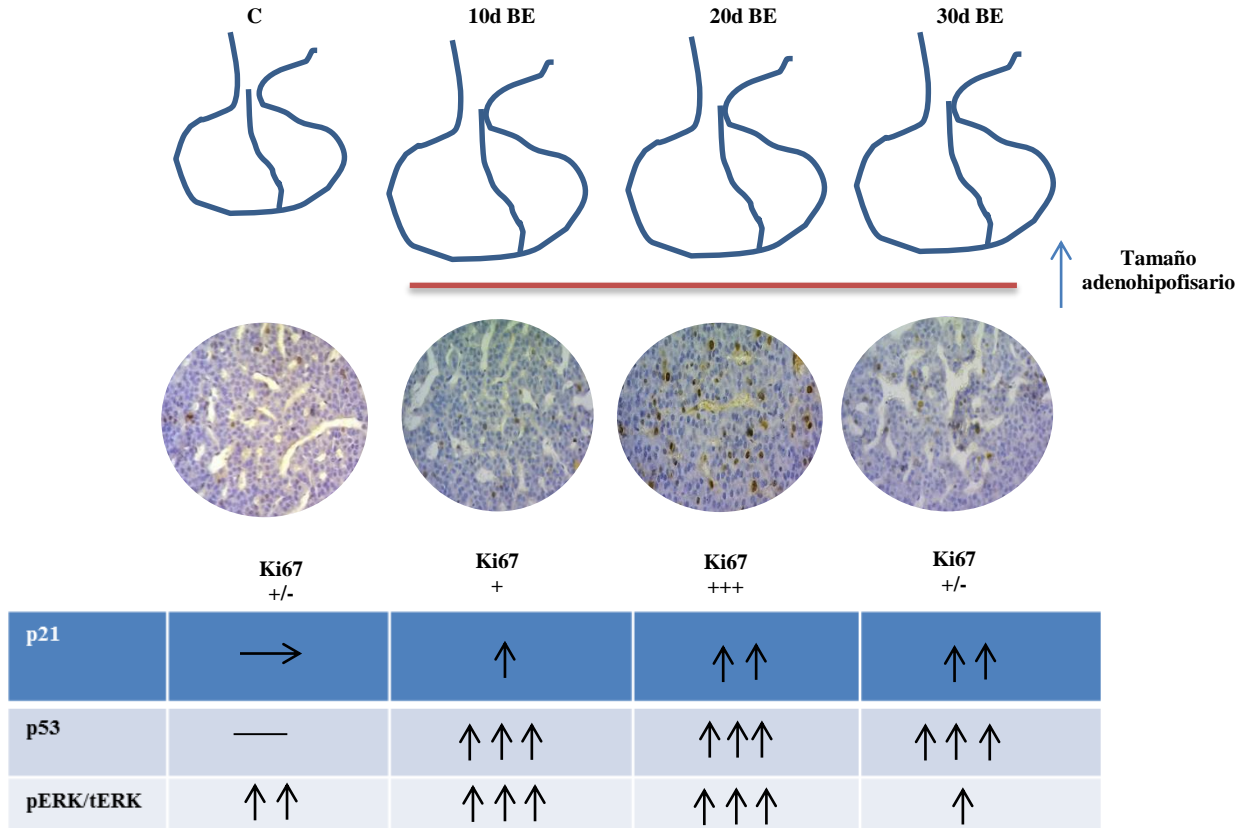


Figura 1: Esquema de los hallazgos patológicos y moleculares de lesiones proliferativas experimentales inducidas por la administración de benzoato de estradiol a ratas macho cepa F344. (Propia autoría).

Cuando PRL-3 está expresada en bajos niveles en un tejido epitelial normal, ha sido vinculada a la diferenciación celular terminal y parece ser importante para garantizar la progresión del ciclo celular al facilitar la transición de G1/S (69, 147). La presencia de una expresión basal en adenohipófisis podría estar vinculada a mecanismos regulatorios que mantienen a la glándula normal bajo controles de freno del ciclo celular, que como se pudo apreciar exhibe una baja tasa de proliferación. Diferente fue la respuesta de estas fosfatasa cuando los animales fueron estimulados hormonalmente.

Cuando se evaluó la PRL-3 en tumores hipofisarios experimentales, se identificó diferencias de sus niveles de expresión a lo largo del desarrollo del adenoma lactotropo, lo que probablemente esté relacionado con las vías implicadas en el crecimiento tumoral, tal como lo menciona Soni y col. (148). El análisis de la localización subcelular de la PRL-3 en el modelo experimental inducido por estrógenos reveló inmunoreactividad para la fosfatasa tanto a nivel nuclear como citoplasmático a partir de los 10d BE, etapa en la que solo se identificó un estado de hiperplasia de la población de lactotropas. Sin embargo, los más altos niveles de PRL-3 se identificaron en el estado inicial del desarrollo adenomatoso, el que fue coincidente con los 20d de efecto hormonal. Estos hallazgos experimentales permiten inferir que la PRL-3 también podría desempeñar un papel en las etapas tempranas de la tumorigénesis hipofisaria y el crecimiento tumoral, como lo han hipotetizado tanto Song y col. (149) y Gahelha y col. (100).

Un dato relevante observado en el modelo experimental fue encontrar una disminución de los niveles de PRL-3 a 30d BE (la etapa de pleno desarrollo adenomatoso), con respecto a los 20d BE (etapa hiperplásica/adenomatoso), pero manteniéndose por encima de los niveles de expresión encontrados en control y 10d BE. A los 30d BE, se observó que el índice Ki67 también disminuyó, con respecto a lo observado a los 20d BE, siendo sus niveles similares a 10d EB. Con respecto a este evento, se sabe que una disminución de los niveles de expresión de PRL-3 conduce a la detención del ciclo celular mediante el aumento de la expresión de p53 a través de la quinasa 2 dependiente de ciclina (83).

No menos importante fue la demostración de un aumento progresivo de p21, molécula que alcanzó los niveles de expresión más altos a 30d BE (estado adenomatoso), Así, en los adenomas lactotropos inducidos por BE, las proteínas PRL-3 y p21 evidenciaron diferentes patrones de expresión. Empleando un estudio estadístico asociativo, pudimos demostrar una correlación entre ambas moléculas a 20d BE. En este tiempo de efecto hormonal, hubo otros dos eventos de posible significado patogénico: el nivel más alto de proliferación celular y una disrupción focal de la red de reticulina, como evidencia de una incipiente transformación adenomatosa sobre un fondo hiperplásico. Georgakilas y col. (150) observaron que p21 aumenta en respuesta a los factores de estrés celulares que activan los puntos de control del ciclo celular principalmente a través de la unión directa a ciclinas y CDK, hasta que se haya realizado la reparación. Dependiendo del contexto celular, su expresión puede promover o

inhibir la tumorigénesis, lo que representa un punto de control potencial para señales de múltiples factores (151). Estas observaciones muestran que los mecanismos reguladores de la proliferación (130) pueden desempeñar un papel en el equilibrio del estado proliferativo adenohipofisario hacia una baja tasa de división como se evidencia a los 30d de tratamiento estrogénico, independientemente del hecho de que en este momento se observó una transformación adenomatosa con una masa tumoral igual o mayor que a los 20d BE. Dong y col. (46) en un grupo de adenomas lactotropos humanos han demostrado, una correlación negativa entre p21 y el grado de invasividad tumoral (a menor expresión de p21 mayor invasión). Este aspecto obtenido desde la investigación clínica se podría vincular con la particularidad evidenciada en nuestro modelo experimental en donde el hecho de que p21 incremente en el estado adenomatoso sería uno de los frenos a la posible capacidad proliferativa/invasiva celular que caracteriza a este modelo tumoral, donde se ha postulado que esta ciclina presenta mecanismos regulatorios dependiente o independientes de p53 (152). En nuestro modelo experimental el análisis de la expresión de p53, mostró un marcado incremento en los tiempos de estimulación con respecto al control, demostrándose asociación con p21, probablemente por la acumulación de estas dos proteínas en citoplasma, localización en la cual estarían inactivas, evento que promovería el aumento de la masa tumoral. Por otro lado, en el modelo murino, p53 no evidenció relación con PRL-3. Estos hallazgos nos lleva a hipotetizar que el mecanismo de acción de p21 en la glándula hiperplásica/adenomatosa a los 20d BE podría estar regulado por PRL-3, inactivándola y acumulándose en citoplasma, favoreciendo el crecimiento tumoral, independientemente de la regulación de p53.

Si bien Zhao y col.(82) sostienen que PRL-3 aumenta los niveles de ERK1/2, en el modelo de adenoma lactotropo experimental no se demostró asociación estadística entre estas moléculas, sin embargo ambas descendieron en sus niveles de expresión a los 30d BE, lo que nos permitiría hipotetizar la puesta en marcha de mecanismos que intentan frenar el incremento del tamaño tumoral evidenciado por el plateau proliferativo apreciado en el estado adenomatoso, abriendo además, la alternativa de que tanto PRL-3 como las ERKs jugarían un papel en la diferenciación terminal de los tejidos (61). Rios y col (61), por otro lado postula, que PRL-3, llevaría a la fosforilación de ERK1/2. Nosotros no solo observamos el descenso p-ERK a los 30d BE, sino también el de PRL-3. Evento que nos llevó a pensar,

que quizás el descenso de PRL-3, lleve a una disminución de la fosforilación de ERK1/2, produciendo el descenso de la fracción fosforilada. Si bien no encontramos asociación entre PRL-3 y ERK1/2, estos estudios no son suficientes para descartar la posibilidad de que estas proteínas estén reguladas por otras moléculas intervinientes en el mecanismo de regulación de la proliferación celular, recordando que a los 30d BE el índice de proliferación también descende. Más allá de lo que se ha observado en otros modelos (134) en el que el proceso de desarrollo hiperplásico/adenomatoso estos tumores pueden entrar en un plateau donde los valores de índice de proliferación bajan sin alcanzar los de control. Además debemos tener en cuenta el rol que podría estar jugando la diferenciación terminal de los tejidos tanto para PRL-3 y ERKs, como se mencionó anteriormente. Por otro lado Cao y col. (153) demostraron *in vitro*, que el knockdown para PRL-3 suprime la expresión de ERK1/2, impidiendo la invasión y migración celular. Este evento apoyaría la evidencia sobre los bajos niveles de Ki67 evidenciado a los 30d BE en los adenomas lactotrofos experimentales en este trabajo de Tesis Doctoral.

El comportamiento de la expresión de PRL-1 fue similar al descrito para la otra fosfatasa a lo largo del desarrollo hiperplásico/adenomatoso, demostrándose un incremento creciente y significativo conforme avanzó el tiempo de estimulación estrogénica. Un dato relevante fue que no hubo asociación estadística entre ambas fosfatasas lo que permite inferir que PRL-1 participaría en la regulación de la patogénesis tumoral de forma independiente a PRL-3. Consistente con previas observaciones (57) en el modelo hiperplásico/adenomatoso PRL-1 estuvo asociada a membrana plasmática, dato particularmente relevante a los 30 d de estímulo con BE, tiempo de los máximos niveles de expresión de la fosfatasa.

Cuando se analizó la relación entre esta PRL-1 y ERK1/2, se demostró una correlación inversa entre ambas, donde un aumento de PRL-1 llevaría al descenso de los niveles pERK, tal como lo demostráramos en nuestro modelo experimental. A diferencia de lo evidenciado a nivel pituitario, Luo y col. (95) observaron que PRL-1 induce la activación de Src y ERK1/2, regulando en más la transcripción de las MMPs mediante la activación de los factores de transcripción AP-1 y Sp-1. Hasta el presente no se demostrado que PRL-1 sea un regulador negativo de ERK1/2 y si bien en esta Tesis de Doctorado solo se puede hablar de una asociación y no de una directa relación causa efecto, Wang y col. demostraron en

otros sistemas biológicos, que estas fosfatasa pueden ser reguladoras negativas de esta vía de señalización (154).

A diferencia de lo reportados por Min y col. (96) y Rios y col. (61) quienes determinaron la relación regulatoria entre PRL-1 y p53, contribuyendo de esta manera al desarrollo tumoral inhibiendo la apoptosis mediada por p53, en el modelo hiperplásico/adenomatosos hipofisario no se demostró asociación entre estas dos proteínas. Sin embargo sí se identificó una asociación entre PRL-1 con p21. Si bien serían necesarios mayores estudios a nivel molecular esta relación podría ser un punto de partida para postular que PRL-1 estaría promoviendo la progresión tumoral a expensas de p21. Werner y col. (92), postularon que PRL-1 podrían regular el ciclo celular al modular los niveles de p21. En este punto Blagosklonny (44) y Savio y col. (45) postularon que la actividad de p21 va a depender del compartimiento subcelular donde se localice. En este sentido su incremento de expresión a nivel nuclear conlleva al arresto celular mientras que su aumento en citoplasma puede conducir a la inhibición de la apoptosis, quizás mediada por p53. Este hecho no es de menor importancia habida cuenta de la baja tasa de este tipo de muerte que ha sido reportado en los modelos de proliferación adenohipofisaria inducidos por hormonas esteroideas (155, 156).

Hasta aquí podemos mencionar que ambas fosfatasa incrementaron significativamente a los largo del desarrollo tumoral inducido por BE, presentando ambas correlación con el regulador p21. Sin embargo, fue PRL-1 la fosfatasa que se asoció de manera inversa a p-ERK, recordando que esta descendió a los 30 d BE, mientras que PRL-1 incremento sus niveles. Estos datos tomados en conjunto abren la posibilidad de que las PRLs en nuestro modelo experimental serían reguladoras de moléculas claves que frenarían el fenómeno proliferativo inducido por estrógenos (**Figura 2**).

Un capítulo aparte merece el análisis realizado mediante la técnica de inmunohistoquímica de la expresión de PRL-3 y PRL-1 en el grupo de adenomas hipofisarios humanos, ya mostró resultados que podrían ser considerados relevantes para la para la clínica endocrinológica.

En este sentido se destacó que sólo la primera Fosfatasa de Regeneración Hepática se inmunomarcó en las lesiones proliferativas adenohipofisarias analizadas. La búsqueda de una posible explicación del porqué PRL-1 no fue inmunodetectada podría radicar tal como lo

expresan Hardy y col. (146) en los mecanismos de estabilidad y degradación de esta proteína, los que impactarían drásticamente en sus niveles de expresión.

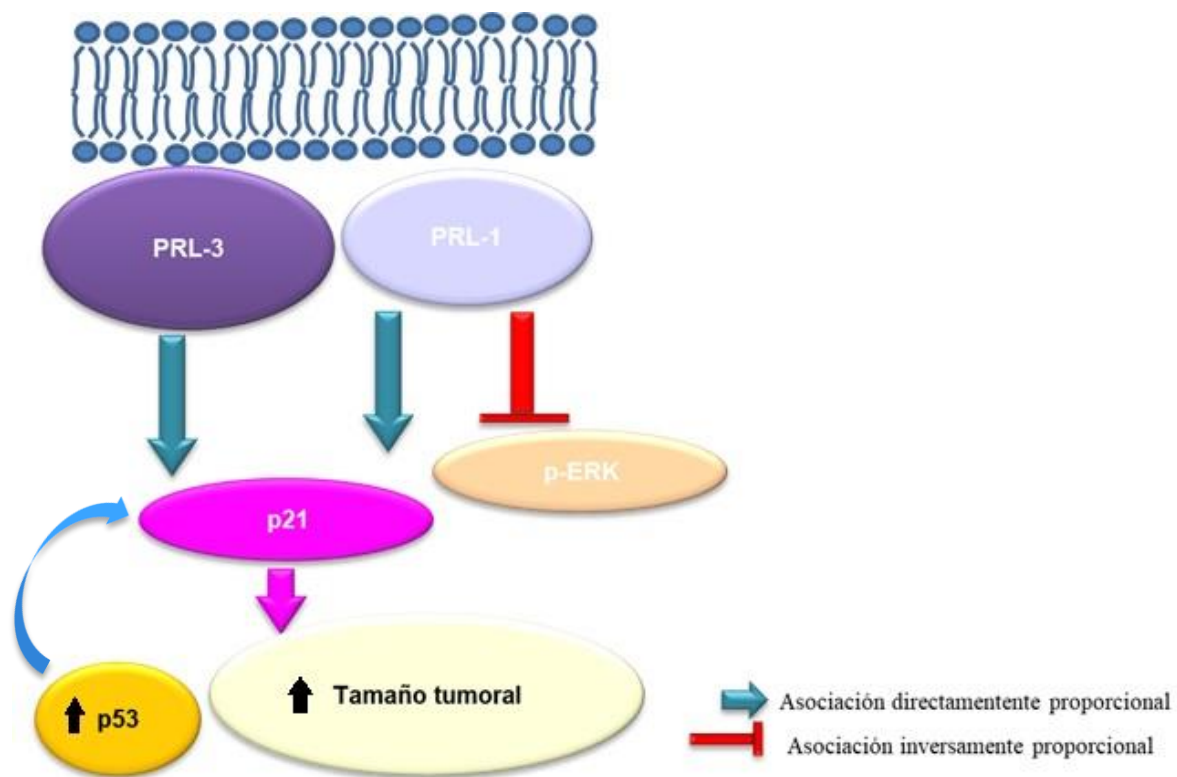


Figura 2: Esquema que simplifica los hallazgos concernientes a PRL-1 y PRL-3 en lesiones proliferativas hipofisarias experimentales. (Propia autoría).

A diferencia de la PRL-1, PRL-3 fue positiva en el cincuenta por ciento de las lesiones proliferativas, con una asociación a los macroadenomas, independientemente de la secreción hormonal o del índice de Ki67. Recientemente Trouillas y col. (2) y Raverot y col. (109) han destacado la importancia de tener en cuenta no solo un único aspecto de los adenomas humanos ya sea el anatómo-patológico o el clínico-imagenológico, sino un conjunto que incluya tanto de las características propias del tumor (tipo histológico, índice de proliferación, invasión, etc.) como los parámetros clínicos-imagenológicos en casos individuales para considerar adenomas clínicamente agresivos y/o recidivantes. Estos

antecedentes más el debate que en la patología humana hipofisaria se abrió en torno a la utilidad del Ki67 (157). Enfatiza la necesidad de la búsqueda nuevos marcadores. Consecuentemente, el dato de la expresión de PRL-3 en estos tumores podría ser vinculada como a un factor pronóstico clínico-imagenológico (macroadenomas) independiente de la expresión del marcador de proliferación celular antes mencionado.

Este dato de la asociación entre la expresión de PRL-3 y tamaño tumoral se corroboró también en el subgrupo de adenomas lactotropos analizados en el presente trabajo. Gari y col. (158) y Slørdahl y col. (159) reconocen al gen de PRL-3 como asociado al crecimiento en algunos tipos tumorales, llevando a presuponer que también podría actuar en la glándula pituitaria humana como un promotor del aumento de la masa adenomatosa. Por lo tanto, también consideramos que nuestro hallazgo ha identificado un nuevo campo en la patología hipofisaria, en el que un grupo de macroadenomas con PRL-3 sobreexpresado podría constituir un posible objetivo terapéutico para nuevos tratamientos con el propósito de reducir el tamaño tumoral y quizás también como una terapia adyuvante postoperatoria para prevenir la recurrencia (160).

En un adenoma lactotrofo gigante recurrente se pudo evidenciar una clara inmunoreactividad para PRL-3 en la membrana plasmática y en estructuras vesiculares intracitoplasmáticas, en coincidencia con los reportado por Zeng y col. quienes demostraron que las estructuras vesiculares descritas corresponden a endosomas (57). Rubio y col. han informado que la localización intracelular de la PRL-3 depende de ciertas modificaciones moleculares, en particular la farnezilación (62). Dado que las proteínas preniladas pueden realizar ciclos entre los grupos asociados a la membrana y su versiones solubles, se piensa que la proteína PRL-3 está asociada de alguna manera a la membrana, con el dominio catalítico orientado al citoplasma o nucleoplasma participando probablemente en la regulación de las vías de señalización intracelular involucradas en el crecimiento celular (149). Para complejizar el efecto de PRL-3 en adenomas humanos se debe pensar que la misma puede ser incluso reguladora del microambiente tumoral hipofisario. Esto se basa en que Soni y col. (148) demostraron que esta fosfatasa se correlaciona con la expresión de varias metaloproteinasas -enzimas incrementadas en lesiones proliferativas adenohipofisarias (161)-, sugiriendo que esta PRL podría participar en la génesis tumoral y progresión neoplásica. Finalmente, un dato no menos relevante es que la angiogénesis de los

adenomas hipofisarios (162), promovida por el VEGF (163), (164), sería incluso un blanco del efecto de PRL-3 (165).

Sin embargo, los sustratos exactos y los mecanismos moleculares de la acción de la PRL-3 en los adenomas hipofisarios humanos siguen siendo esquivos, pese a lo cual nuestros hallazgos revelan que esta fosfatasa a nivel hipofisario podría desempeñar un papel importante en el desarrollo tumoral.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis Doctoral es el primero en demostrar que:

- PRL-1 y PRL-3 se sobreexpresan en el adenoparénquima hiperplásico/adenomatoso experimental, con una localización tanto en membrana plasmática como en citoplasma (posibles vesículas endosómicas).
- Ambas fosfatasas no presentan asociación estadísticas ni entre sí ni con p53 durante el desarrollo del adenoma lactotrofo experimental.
- Tanto PRL-1 como PRL-3 muestran una asociación directa positiva con p21.
- Sólo PRL-1 presenta una correlación inversa con pERK-tERK en el desarrollo hiperplásico/adenomatoso.
- Estos hallazgos permiten concluir que durante el desarrollo hiperplásico/adenomatoso inducido por estrógenos las PRL-1 y -3 son moléculas que participarían en la regulación del desbalance proliferativo, modulando algunas de las moléculas anteriormente mencionadas.
- En el grupo de adenomas hipofisarios humanos, sólo PRL-3 mostró expresión y asociación con el tamaño tumoral independientemente de la estirpe celular.

Este trabajo de investigación es el primero que muestra la expresión de PRL-3 en tumores hipofisarios, considerando esta molécula como candidata para tratamiento blanco (target therapy), ya que existe evidencia que respalda el potencial de esta fosfatasa como “oncotarget” tumor específico, siendo PRL3-zumab un prometedor tratamiento para estos tumores.

BIBLIOGRAFIA

- 1) McDowell BD, Wallace RB, Carnahan RM, Chrischilles EA, Lynch CF, Schlechte JA. Demographic differences in incidence for pituitary adenoma. *Pituitary*. 2011 Mar;14(1):23-30.
- 2) Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Viennet G, Bonneville JF, Assaker R, Auger C, Brue T, Cornelius A, Dufour H, Jouanneau E, François P, Galland F, Mougel F, Chapuis F, Villeneuve L, Muraige CA, Figarella-Branger D, Raverot G; members of HYPOPRONOS, Barlier A, Bernier M, Bonnet F, Borson-Chazot F, Brassier G, Caulet-Maugendre S, Chabre O, Chanson P, Cottier JF, Delemer B, Delgrange E, Di Tommaso L, Eimer S, Gaillard S, Jan M, Girard JJ, Lapras V, Loiseau H, Passagia JG, Patey M, Penfornis A, Poirier JY, Perrin G, Tabarin A. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol*. 2013 Jul;126(1):123-35.
- 3) Asa SL, Ezzat S. Aggressive Pituitary Tumors or Localized Pituitary Carcinomas: Defining Pituitary Tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2016 Mar;11(2):149-162.
- 4) Tirosh A, Shimon I. Current approach to treatments for prolactinomas. *Minerva Endocrinol*. 2016 Sep;41(3):316-23.
- 5) Miermeister CP, Petersenn S, Buchfelder M, Fahlbusch R, Lüdecke DK, Hölsken A, Bergmann M, Knappe UJ, Hans VH, Flitsch J, Saeger W, Buslei R. Histological criteria for atypical pituitary adenomas - data from the German pituitary adenoma registry suggests modifications. *Acta Neuropathol Commun*. 2015 Aug 19;3:50.
- 6) Mete O, Lopes MB. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*. 2017 Sep;28(3):228-243.
- 7) Asa SL, Casar-Borota O, Chanson P, Delgrange E, Earls P, Ezzat S, Grossman A, Ikeda H, Inoshita N, Karavitaki N, Korbonits M, Laws ER Jr, Lopes MB, Maartens N, McCutcheon IE, Mete O, Nishioka H, Raverot G, Roncaroli F, Saeger W, Syro LV, Vasiljevic A, Villa C, Wierinckx A, Trouillas J; attendees of 14th Meeting of the International Pituitary Pathology Club, Annecy, France, November 2016. From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal. *Endocr Relat Cancer*. 2017 Apr;24(4):C5-C8.

- 8) Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Dec;71(6):1427-33.
- 9) Zatelli MC. Pathogenesis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary.* 2018 Apr;21(2):130-137.
- 10) Melmed S. Pituitary medicine from discovery to patient-focused outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 Mar;101(3):769-77.
- 11) Riverso M, Montagnani V, Stecca B. KLF4 is regulated by RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth. *Oncogene.* 2017 Jun;36(23):3322-3333.
- 12) Buchegger K, Silva R, López J, Ili C, Araya JC, Leal P, Brebi P, Riquelme I, Roa JC. The ERK/MAPK pathway is overexpressed and activated in gallbladder cancer. *Pathol Res Pract.* 2017 May;213(5):476-482.
- 13) Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem.* 2016 Feb; 15(109):314-41.
- 14) Roovers K, Assoian RK. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays.* 2000 Sep;22(9):818-26.
- 15) Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2435-44.
- 16) Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007 May;26(22):3100-12.
- 17) Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene.* 2007 May; 26(22):3240-53.
- 18) Dworakowska D, Grossman AB. The pathophysiology of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 Oct;23(5):525-41.
- 19) Petiti JP, Gutiérrez S, De Paul AL, Andreoli V, Palmeri CM, Sosa Ldel V, Bocco JL, Torres AI. GH3B6 pituitary tumor cell proliferation is mediated by PKC α and PKC ϵ via ERK 1/2-dependent pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(2):135-46.
- 20) Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005 Nov;30(11):630-41.

- 21) Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66.
- 22) Bilodeau S, Roussel-Gervais A, Drouin J. Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells. *Mol Cell Biol*. 2009 Apr;29(7):1895-908.
- 23) Dannenberg JH, van Rossum A, Schuijff L, te Riele H. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev*. 2000 Dec;14(23):3051-64.
- 24) Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997 Apr;11(4):433-41.
- 25) Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene*. 2007 Aug; 26(38):5596-605.
- 26) Bilodeau S, Roussel-Gervais A, Drouin J. Distinct developmental roles of cell cycle inhibitors p57Kip2 and p27Kip1 distinguish pituitary progenitor cell cycle exit from cell cycle reentry of differentiated cells. *Mol Cell Biol*. 2009 Apr;29(7):1895-908.
- 27) Brugarolas J, Bronson RT, Jacks T. p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells. *J Cell Biol*. 1998 Apr; 141(2):503-14.
- 28) Park MS, Rosai J, Nguyen HT, Capodiceci P, Cordon-Cardo C, Koff A. p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May; 96(11):6382-7.
- 29) Ramsey MR, Krishnamurthy J, Pei XH, Torrice C, Lin W, Carrasco DR, Ligon KL, Xiong Y, Sharpless NE. Expression of p16Ink4a compensates for p18Ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues. *Cancer Res*. 2007 May; 67(10):4732-41.
- 30) Roussel-Gervais A, Bilodeau S, Vallette S, Berthelet F, Lacroix A, Figarella-Branger D, Brue T, Drouin J. Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 2010 Sep; 24(9):1835-45.
- 31) Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, Chen-Kiang S, Su L, Xiong Y. CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev*. 1998 Sep; 12(18):2899-911.

- 32) Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity. *Mol Cell Biol* 2000 Aug; 20(16):6147-58.
- 33) Sotillo R, Renner O, Dubus P, Ruiz-Cabello J, Martín-Caballero J, Barbacid M, Carnero A, Malumbres M. Cooperation between Cdk4 and p27kip1 in tumor development: a preclinical model to evaluate cell cycle inhibitors with therapeutic activity. *Cancer Res.* 2005 May; 65(9):3846-52.
- 34) Agarwal SK, Mateo CM, Marx SJ. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May; 94(5):1826-34.
- 35) Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, Ota T, Komine C, Yokoyama T, Fukushima T. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 May; 64(5):398-403.
- 36) Matoušek P, Buzrla P, Reguli Š, Krajča J, Dvořáčková J, Lipina R. Factors that predict the growth of residual nonfunctional pituitary adenomas: correlations between relapse and cell cycle markers. *Biomed Res Int.* 2018 Jul; 2018:1-9.
- 37) Dworakowska D, Wlodek E, Leontiou CA, Igreja S, Cakir M, Teng M, Prodromou N, Góth MI, Grozinsky-Glasberg S, Gueorguiev M, Kola B, Korbonits M, Grossman AB. Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Dec; 16(4):1329-38.
- 38) Petiti JP, Sosa LDV, Picech F, Moyano Crespo GD, Arevalo Rojas JZ, Pérez PA, Guido CB, Leimgruber C, Sabatino ME, García P, Bengio V, Papalini FR, Estario P, Bernhard C, Villarreal M, Gutiérrez S, De Paul AL, Mukdsi JH, Torres AI. Trastuzumab inhibits pituitary tumor cell growth modulating the TGFB/SMAD2/3 pathway. *Endocr Relat Cancer.* 2018 Oct; 25(10):837-52.
- 39) Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 2015 Jan; 356(2 Pt A):197-203.
- 40) Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res.* 2015 Dec; 75(23):5001-7.

- 41) Del Basso De Caro M, Solari D, Pagliuca F, Villa A, Guadagno E, Cavallo LM, Colao A, Pettinato G, Cappabianca P. Atypical pituitary adenomas: clinical characteristics and role of ki-67 and p53 in prognostic and therapeutic evaluation. A series of 50 patients. *Neurosurg Rev.* 2017 Jan; 40(1):105-14.
- 42) Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun; 9(6):400-14.
- 43) Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2016 Jun;42:63-71.
- 44) Blagosklonny MV. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins?. *Cell Cycle.* 2002 Nov-Dec; 1(6):391-3.
- 45) Savio M, Coppa T, Cazzalini O, Perucca P, Necchi D, Nardo T, Stivala LA, Prospero E. Degradation of p21CDKN1A after DNA damage is independent of type of lesion, and is not required for DNA repair. *DNA Repair (Amst).* 2009 Jul; 8(7):778-85.
- 46) Dong W, Li J, Liu Q, Liu C, Li C, Song G, Zhu H, Gao H, Zhang Y. P21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} are correlated with the development and invasion of prolactinoma. *J Neurooncol.* 2018 Feb; 136(3):485-94.
- 47) Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2012 Aug; 49(2):R69-78.
- 48) Lim WA, Pawson T. Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell.* 2010 Sep; 142(5):661-7.
- 49) Dombrádi V, Krieglstein J, Klumpp S. Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep.* 2002 Feb ;3(2):120-4.
- 50) Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from housekeeping enzymes to master-regulators of signal transduction. *FEBS J.* 2013 Jan; 280 (2):346-78.
- 51) Hendriks WJ, Elson A, Harroch S, Pulido R, Stoker A, den Hertog J. Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS J.* 2013Jan; 280(2):708-30.
- 52) Zhang ZY, Zhou B, Xie L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2002 Feb-Mar; 93(2-3):307-17.
- 53) Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 2004 Jun; 117(6):699-711.

- 54) Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, Tonks NK, Moller NP. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J*. 2008 Jan; 18 (1):8-30.
- 55) Al-Aidaros AQ, Zeng Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis. *J Cell Biochem*. 2010 Dec; 111(5):1087-98.
- 56) Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Feb; 13(2):397-406.
- 57) Zeng Q, Si X, Horstmann H, Xu Y, Hong W, Pallen CJ. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem*. 2000 Jul; 275(28):21444-52.
- 58) Si X, Zeng Q, Ng CH, Hong W, Pallen CJ. Interaction of farnesylated PRL-2, a protein-tyrosine phosphatase, with the beta-subunit of geranylgeranyltransferase II. *J Biol Chem*. 2001 Aug; 276(35):32875-82.
- 59) Dumauld CM, Sandusky GE, Soo HW, Werner SR, Crowell PL, Randall SK. Tissue-specific alterations of PRL-1 and PRL-2 expression in cancer. *Am J Transl Res*. 2012; 4(1):83-101.
- 60) Campbell AM, Zhang ZY. Phosphatase of regenerating liver: a novel target for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2014 May; 18(5):555-69.
- 61) Rios P, Li X, Köhn M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *FEBS J*. 2013 Jan; 280(2):505-24.
- 62) Rubio T, Köhn M. Regulatory mechanisms of phosphatase of regenerating liver (PRL)-3. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct; 44(5):1305-12.
- 63) Lee JD, Jung H, Min SH. Identification of proteins suppressing the functions of oncogenic phosphatase of regenerating liver 1 and 3. *Exp Ther Med*. 2016 Nov; 12(5):2974-82.

- 64) Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*. 2001 Nov; 294(5545):1343-6
- 65) Wang L, Peng L, Dong B, Kong L, Meng L, Yan L, Xie Y, Shou C. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome. *Ann Oncol*. 2006 Oct; 17(10):1517-22.
- 66) Lou X, Liu Y, Lei JY, Li H. Overexpression of phosphatase regenerating liver 3 in oesophageal squamous cell carcinoma associated with metastasis and its comparison with phosphatase regenerating liver 1. *Cell Biol Int*. 2012 Aug; 36(8):759-63.
- 67) Miskad UA, Semba S, Kato H, Yokozaki H. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology*. 2004; 71(4):176-84.
- 68) Polato F, Codegani A, Fruscio R, Perego P, Mangioni C, Saha S, Bardelli A, Broggin M. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct; 11(19 Pt 1):6835-9.
- 69) Guzińska-Ustymowicz K, Kiśluk J, Terlikowski SJ, Pryczynicz A, Niewiarowska K, Ustymowicz M, Hawryluk M, Południewski M, Kemon A. Expression of phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) in endometrioid cancer and lymph nodes metastases. *Adv Med Sci*. 2013; 58(2):221-6.
- 70) Qu S, Liu B, Guo X, Shi H, Zhou M, Li L, Yang S, Tong X, Wang H. Independent oncogenic and therapeutic significance of phosphatase PRL-3 in FLT3-ITD-negative acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2014 Jul; 120(14):2130-41.
- 71) Ishii T, Funato, Y, Miki, H. Thioredoxin-related protein 32 (TRP32) specifically reduces oxidized phosphatase of regenerating liver (PRL). *J Biol Chem*. 2013 Mar; 288(10):7263-70.
- 72) Peters GH, Frimurer TM, Olsen OH. Electrostatic evaluation of the signature motif (H/V)CX5R(S/T) in protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry*. 1998 Apr; 37(16):5383-93.
- 73) Fiordalisi JJ, Dewar BJ, Graves LM, Madigan JP, Cox AD. Src-mediated phosphorylation of the tyrosine phosphatase PRL-3 is required for PRL-3 promotion of Rho activation, motility and invasion. *PLoS One*. 2013 May; 8(5):e64309.

- 74) Choi MS, Min SH, Jung H, Lee JD, Lee TH, Lee HK, Yoo OJ. The essential role of FKBP38 in regulating phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) protein stability. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar; 406(11); 305-9.
- 75) Krndija D, Münzberg C, Maass U, Hafner M, Adler G, Kestler HA, Seufferlein T, Oswald F, von Wichert G. The phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) promotes cell migration through Arf-activity-dependent stimulation of integrin α 5 recycling. *J Cell Sci*. 2012 Aug; 125(Pt 16):3883-92.
- 76) Jiang Y, Liu XQ, Rajput A, Geng L, Ongchin M, Zeng Q, Taylor GS, Wang J. Phosphatase PRL-3 is a direct regulatory target of TGFbeta in colon cancer metastasis. *Cancer Res*. 2011 Jan; 71(1):234-44.
- 77) Liang F, Liang J, Wang WQ, Sun JP, Udho E, Zhang ZY. PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *J Biol Chem*. 2007 Feb; 282(8):5413-9.
- 78) Al-Aidaros AQ, Yuen HF, Guo K, Zhang SD, Chung TH, Chng WJ, Zeng Q. Metastasis-associated PRL-3 induces EGFR activation and addiction in cancer cells. *J Clin Invest*. 2013 Aug; 123(8):3459-71.
- 79) Ming J, Liu N, Gu Y, Qiu X, Wang EH. PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer. *Pathology*. 2009 Feb; 41(2):118-26.
- 80) Wang H, Quah SY, Dong JM, Manser E, Tang JP, Zeng Q. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2007 Apr; 67(7):2922-6.
- 81) Prczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Niewiarowska K, Cepowicz D, Kemon A. PRL-3 and E-cadherin show mutual interactions and participate in lymph node metastasis formation in gastric cancer. *Tumour Biol*. 2014 Jul; 35(7):6587-92.
- 82) Basak S, Jacobs SB, Krieg AJ, Pathak N, Zeng Q, Kaldis P, Giaccia AJ, Attardi LD. The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol Cell*. 2008 May; 30(3):303-14.
- 83) Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J*. 1999 May; 18(9):2459-71.

- 84) Wang H, Vardy LA, Tan CP, Loo JM, Guo K, Li J, Lim SG, Zhou J, Chng WJ, Ng SB, Li HX, Zeng Q. PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase. *Cancer Cell*. 2010 Jul; 18(1):52-62.
- 85) Zhao WB, Wang X. Phosphatases of regenerating liver: a novel target in human solid tumors. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Aug; 121(15):1469-74.
- 86) Peng L, Xing X, Li W, Qu L, Meng L, Lian S, Jiang B, Wu J, Shou C. PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin beta1-ERK1/2 and-MMP2 signaling. *Mol Cancer*. 2009 Nov; 24(8):1-13.
- 87) Diamond RH, Cressman DE, Laz TM, Abrams CS, Taub R. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol*. 1994 Jun; 14(6):3752-62.
- 88) Wang Y, Li ZF, He J, Li YL, Zhu GB, Zhang LH, Li YL. Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Oct; 22(10):1179-84.
- 89) Stephens B, Han H, Hostetter G, Demeure MJ, Von Hoff DD. Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jan; 7(1):202-10.
- 90) Achiwa H, Lazo JS. PRL-1 tyrosine phosphatase regulates c-Src levels, adherence, and invasion in human lung cancer cells. *Cancer Res*. 2007 Jan 15; 67(2):643-50.
- 91) Dursina B, Reents R, Delon C, Wu Y, Kulharia M, Thutewohl M, Veligodsky A, Kalinin A, Evstifeev V, Ciobanu D, Szedlacsek SE, Waldmann H, Goody RS, Alexandrov K. Identification and specificity profiling of protein prenyltransferase inhibitors using new fluorescent phosphoisoprenoids. *J Am Chem Soc*. 2006 Mar; 128(9):2822-35.
- 92) Werner SR, Lee PA, DeCamp MW, Crowell DN, Randall SK, Crowell PL. Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett*. 2003 Dec; 202(2):201-11.
- 93) Sun JP, Luo Y, Yu X, Wang WQ, Zhou B, Liang F, Zhang ZY. Phosphatase activity, trimerization, and the C-terminal polybasic region are all required for PRL1-mediated cell growth and migration. *J Biol Chem*. 2007 Sep; 282(39):29043-51.

- 94) Obaya AJ, Sedivy JM. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jan; 59(1):126-42.
- 95) Luo Y, Liang F, Zhang ZY. PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways. *Biochemistry.* 2009 Mar; 48(8):1838-46.
- 96) Min SH, Kim DM, Heo YS, Kim YI, Kim HM, Kim J, Han YM, Kim IC, Yoo OJ. New p53 target phosphatase of regenerating liver 1 (PRL-1) downregulates p53. *Oncogene.* 2009 Jan; 28(4):545-54.
- 97) NIH publicación no. 85-23, revisado 1996.
- 98) Mukdsi JH, De Paul AL, Petit JP, Gutiérrez S, Aoki A, Torres AI. Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas. *Acta Neuropathol.* 2006 Oct; 112(4):491-501.
- 99) Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: URL <http://www.infostat.com.ar>.
- 100) Gadelha MR, Wildemberg LE, Bronstein MD, Gatto F, Ferone D. Somatostatin receptor ligands in the treatment of acromegaly. *Pituitary.* 2017 Feb; 20(1):100-8.
- 101) Inoshita N, Nishioka H. The 2017 WHO classification of pituitary adenoma: overview and comments. *Brain Tumor Pathol.* 2018 Apr; 35(2):51-6.
- 102) Cámara Gómez R. Tumores hipofisarios no funcionantes: actualización 2012. *Endocrinología y Nutrición.* Marzo 2014; 61(3):121-172.
- 103) Oruçkaptan HH, Senmevsim O, Ozcan OE, Ozgen T. Pituitary adenomas: results of 684 surgically treated patients and review of the literature. *Surg Neurol.* 2000 Mar; 53(3):211-9.
- 104) Khamseh ME, Mohajeri Tehrani MR, Mousavi Z, Malek M, Imani M, Hoshangian Tehrani N, Ghorbani M, Akbari H, Sarvghadi F, Amouzegar A, Esfahanian F, Hashemi Madani N, Emami Z. Iran Pituitary Tumor Registry: Description of the Program and Initial Results. *Arch Iran Med.* 2017 Dec; 20(12):746-51.
- 105) Cecenarro LA, Rodrigo Fanton ET, Estario P, Papalini RF, Estario MÉ. Pituitary tumors: 10 years of experience. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2015; 72(1):32-8.

- 106) Gold EB. Epidemiology of pituitary adenomas. *Epidemiol Rev.* 1981;3:163-83.
- 107) Mindermann T, Wilson Ch. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology.* 1994 Sep; 41(3):359-64.
- 108) Aflorei ED, Korbonits MEpidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2014 May; 117(3):379-94.
- 109) Raverot G, Vasiljevic A, Jouanneau E, Trouillas J. A Prognostic clinicopathologic classification of pituitary endocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Mar; 44(1):11-8.
- 110) Davies BM, Carr E, Soh C, Gnanalingham KK. Assessing size of pituitary adenomas: a comparison of qualitative and quantitative methods on MR. *Acta Neurochir (Wien).* 2016 Apr; 158(4):677-83.
- 111) Osamura RY, Kajiya H, Takei M, Egashira N, Tobita M, Takekoshi S, Teramoto A. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol.* 2008 Sep; 130(3): 495-507.
- 112) Gruppetta M, Formosa R, Falzon S, Ariff Scicluna S, Falzon E, Degeatano J, Vassallo J. Expression of cell cycle regulators and biomarkers of proliferation and regrowth in human pituitary adenomas. *Pituitary.* 2017 Jun; 20(3):358-71.
- 113) Knosp E, Kitz K, Perneczky A: Proliferation activity in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery.* 1989 Dec; 25(6):927-30.
- 114) Kim JS, Lee YS, Jung MJ, Hong YK. The Predictive Value of Pathologic Features in Pituitary Adenoma and Correlation with Pituitary Adenoma Recurrence. *J Pathol Transl Med.* 2016 Nov; 50(6):419-25.
- 115) Sadeghipour A, Mahouzi L, Salem MM, Ebrahim-Nejad S, Asadi-Lari M, Radfar A, Filip I, Babaheidarian P. Ki67 labeling correlated with invasion but not with recurrence. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017 May/June; 25(5):341-45.
- 116) Gandour-Edwards R, Kapadia SB, Janecka IP, Martinez AJ, Barnes L. Biologic markers of invasive pituitary adenomas involving the sphenoid sinus. *Mod Pathol.* 1995 Feb; 8(2):160-4.
- 117) Yarman S, Kurtulmus N, Canbolat A, Bayindir C, Bilgic B, Ince N. Expression of Ki-67, p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) concomitantly in growth

- hormonesecreting pituitary adenomas; which one has a role in tumor behavior? *Neuro Endocrinol Lett.* 2010; 31(6):823-8.
- 118) Aranda López IF, Niveiro de Jaime M, Peiró Cabrera G, Alenda González C, Picó Alfonso A. Adenoma hipofisario: estudio de la actividad proliferativa con Ki-67. *Rev Esp Patol.* Octubre-Diciembre 2007; 40(4):225-31.
- 119) Grimm F, Maurus R, Beschorner R, Naros G, Stanojevic M, Gugel I, Giese S, Bier G, Bender B, Honegger J. Ki-67 labeling index and expression of p53 are non-predictive for invasiveness and tumor size in functional and nonfunctional pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien).* 2019 Apr. Epub ahead of print.
- 120) Ciccarelli A, Daly AF, Beckers A. The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary.* 2005;8(1):3-6.
- 121) Ben Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001 Dec; 22(6):724-63.
- 122) Sinha YN, Gilligan TA. Estrogen in high doses inhibits perphenazine-induced prolactin release. *Endocrinology.* 1982 Jan; 110(1):126-30.
- 123) Recouvreux MV, Faraoni EY, Camilletti MA, Ratner L, Abeledo-Machado A, Rulli SB, Díaz-Torga G. Sex differences in the pituitary TGF β 1 system: The role of TGF β 1 in prolactinoma development. *Front Neuroendocrinol.* 2018 Jul; 50:118-22.
- 124) Eljarmak D, Lis M, Cantin M, Carriere PD, Collu R. Effects of chronic bromocriptine treatment of an estrone-induced, prolactin-secreting rat pituitary adenoma. *Horm Res* 1985; 21(3):160-67.
- 125) Stepien H, Grochal M, Zielinski KW, Mucha S, Kunert-Radek J, Kulig A, Stawowy A, Pisarek H. Inhibitory effects of fumagillin and its analogue TNP-470 on the function, morphology and angiogenesis of an oestrogen-induced prolactinoma in Fischer 344 rats. *J Endocrinol.* 1996 Jul; 150(1):99-106.
- 126) Weiner RI, Elias KA, Monnet F: The role of vascular changes in the etiology of prolactin-secreting anterior pituitary tumors; in MacLeod RM, Thorner MO, Scapagnini U (eds): *Prolactin. Basic and Clinical Correlates.* Fidia Reserch Series, Padova, Liviana, 1985, vol 1, pp 641-653.
- 127) Fukuoka H, Odelia Cooper, Jun Mizutani, Yunguang Tong, Song-Guang Ren, Serguei Bannykh, Shlomo Melmed. HER2/ErbB2 receptor signaling in rat and human

- prolactinoma cells: Strategy for targeted prolactinoma therapy. *Mol Endocrinol*. 2011 Jan; 25(1):92-103.
- 128) Xu RK, Wu XM, Di AK, Xu JN, Pang CS, Pang SF. Pituitary prolactin-secreting tumor formation: recent developments. *Biol Signals Recept*. 2000 Jan-Feb; 9(1):1-20.
- 129) Gao Z, Cai L, Lu J, Wang C, Li Q, Chen J, Song X, Chen X, Zhan, Zheng W, Su Z. Expression of Stem Cell Markers and Dopamine D2 Receptors in Human and Rat Prolactinomas. *Med Sci Monit*. 2017 Apr; 23:1827-33.
- 130) Sarkar DK. Genesis of prolactinomas: studies using estrogen-treated animals. *Front Horm Res*. 2006; 35:32-49.
- 131) Booth AK, Gutierrez-Hartmann A. Signaling pathways regulating pituitary lactotrope homeostasis and tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 846:37-59.
- 132) Cerqueira A, Martín A, Symonds CE, Odajima J, Dubus P, Barbacid M, Santamaría D. Genetic characterization of the role of the Cip/Kip family of proteins as cyclin-dependent kinase inhibitors and assembly factors. *Mol Cell Biol*. 2014 Apr; 34(8):1452-9.
- 133) Quereda V, Porlan E, Cañamero M, Dubus P, Malumbres M. An essential role for Ink4 and Cip/Kip cell-cycle inhibitors in preventing replicative stress. *Cell Death Differ*. 2016 Mar; 23(3):430-41.
- 134) Sabatino ME, Petiti JP, Sosa Ldel V, Pérez PA, Gutiérrez S, Leimgruber C, Latini A, Torres AI, De Paul AL. Evidence of cellular senescence during the development of estrogen-induced pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Jun; 22(3):299-317.
- 135) Vogelstein B., Kinzler K.W. P53 function and dysfunction. *Cell*. 1992 Aug; 70(4):523-26.
- 136) Reed SM, Quelle DE. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers (Basel)*. 2014 Dec; 7(1):30-69.
- 137) Molinari AM, Bontempo P, Schiavone EM, Tortora V, Verdicchio MA, Napolitano M, Nola E, Moncharmont B, Medici N, Nigro V, Armetta I, Abbondanza C, Puca GA. Estradiol induces functional inactivation of p53 by intracellular redistribution. *Cancer Res*. 2000 May; 60(10):2594-7.

- 138) Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*. 1995 Aug; 82(4):675-84.
- 139) Roof AK, Gutierrez-Hartmann A. Consider the context: Ras/ERK and PI3K/AKT/mTOR signaling outcomes are pituitary cell type-specific. *Mol Cell Endocrinol*. 2018 Mar; 463:87-96.
- 140) Chaturvedi K, Sarkar DK. Mediation of basic fibroblast growth factor-induced lactotropic cell proliferation by Src-Ras-mitogen-activated protein kinase p44/42 signaling. *Endocrinology*. 2005 Apr; 146(4):1948-55.
- 141) Booth A, Trudeau T, Gomez C, Lucia MS, Gutierrez-Hartmann A. Persistent ERK/MAPK activation promotes lactotrope differentiation and diminishes tumorigenic phenotype. *Mol. Endocrinol*. 2014 Dec; 28(14):1999-2011.
- 142) Watson CS, Jeng YJ, Kochukov MY. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *FASEB J*. 2008 Sep; 22(9):3328-36.
- 143) English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res*. 1999 Nov; 253(1):255-70.
- 144) Marques P, Korbonits M. Genetic aspects of pituitary adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017 Jun; 46(2): 335-74.
- 145) Xing X, Lian S, Hu Y, Li Z, Zhang L, Wen X, Du H, Jia Y, Zheng Z, Meng L, Shou C, Ji J. Phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) is associated with metastasis and poor prognosis in gastric carcinoma. *J Transl Med*. 2013 Dec; 11(13): 309-18.
- 146) Hardy S, Kostantin E, Hatzihristidis T, Zolotarov Y, Uetani N, Tremblay ML. Physiological and oncogenic roles of the PRL phosphatases. *FEBS J*. 2018 Nov; 285(21):3886-3908.
- 147) Guzińska-Ustymowicz K, Kiśluk J, Terlikowski SJ, Poczynicz A, Niewiarowska K, Ustymowicz M, Hawryluk M, Południewski M, Kemona A. Expression of phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) in endometrioid cancer and lymph nodes metastases. *Adv Med Sci*. 2013; 58(2):221-6.

- 148) Soni P, Husain N, Chandra A, Ojha BK, Bhatt ML, Gupta RK. Do phosphatase of regenerating liver-3, matrix metalloproteinases-2, matrix metalloproteinases-9, and epidermal growth factor receptor-1 predict response to therapy and survival in Glioblastoma multiforme?. *Indian J Pathol Microbiol.* 2016 Jul-Sep; 59(3):287-93.
- 149) Song R, Qian F, Li YP, Sheng X, Cao SX, Xu Q. Phosphatase of regenerating liver-3 localizes to cyto-membrane and is required for B16F1 melanoma cell metastasis in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2009; 4(2):e4450
- 150) Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: a two-faced genome guardian. *Trends Mol Med.* 2017 Apr; 23(4):310-9.
- 151) Parveen A, Akash MS, Rehman K, Kyunn WW. Dual role of p21 in the progression of cancer and its treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2016; 26(1):49-62.
- 152) Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair.* 2016 June; 42:63-71.
- 153) Cao Y, Tu Y, Mei J, Li Z, Jie Z, Xu S, Xu L, Wang S, Xiong Y. RNAi-mediated knockdown of PRL-3 inhibits cell invasion and downregulates ERK 1/2 expression in the human gastric cancer cell line, SGC-7901. *Mol Med Rep.* 2013 Jun; 7(6):1805-11.
- 154) Wang Y, Lazo JS. Metastasis-associated phosphatase PRL-2 regulates tumor cell migration and invasion. *Oncogene.* 2012 Feb; 31(7):818-27.
- 155) Kulig E, Jin L, Qian X, Horvath E, Kovacs K, Stefanescu L, Scheithauer BW, Lloyd RV. Apoptosis in nontumorous and neoplastic human pituitaries: expression of the Bcl-2 family of proteins. *Am J Pathol.* 1999 Mar; 154(3):767-74.
- 156) Aoki MP, Maldonado CA, Aoki. Apoptotic and non-apoptotic cell death in hormone-dependent glands. *Cell Tissue Res.* 1998 Mar; 291(3):571-4.
- 157) Sav A, Rotondo F, Syro LV, Scheithauer BW, Kovacs K.. Biomarkers of pituitary neoplasms. *Anticancer Res.* 2012; 32(11):4639-54.
- 158) Gari HH, DeGala GD, Ray R, Lucia MS, Lambert JR. PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion properties critical for cell migration and invasion. *Cancer Lett.* 2016 Oct; 380(2):505-12.
- 159) Slørdahl TS, Abdollahi P, Vandsemb EN, Rampa C, Misund K, Baranowska KA, Westhryn M, Waage A, Rø TB, Børset M. The phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-

- 3) is important for IL-6-mediated survival of myeloma cells. *Oncotarget*. 2016 May; 7(19):27295-306.
- 160) Thura M, Al-Aidaros AQO, Yong WP, Kono K, Gupta A, Lin YB, Mimura K, Thiery JP, Goh BC, Tan P, Soo R, Hong CW, Wang L, Lin SJ, Chen E, Rha SY, Chung HC, Li J, Nandi S, Yuen HF, Zhang SD, Guan YK, So J, Zeng Q. PRL3-zumab, a first-in-class humanized antibody for cancer therapy. *JCI Insight*. 2016 Jun; 16(9):1-15.
- 161) Guo H, Sun Z, Wei J, Xiang Y, Qiu L, Guo L, Zhao W, Xu Z, Mao J. Expressions of Matrix Metalloproteinases-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Pituitary Adenomas and Their Relationships with Prognosis. *Cancer Biother Radiopharm*. 2019 Feb; 34(1):1-6.
- 162) Cristina C, Luque GM, Demarchi G, Lopez Vicchi F, Zubeldia-Brenner L, Perez Millan MI, Perrone S, Ornstein AM, Lacau-Mengido IM, Berner SI, Becu-Villalobos D. Angiogenesis in pituitary adenomas: human studies and new mutant mouse models. *Int J Endocrinol*. 2014 Nov; 2014:1-11.
- 163) Mukdsi JH, De Paul AL, Gutiérrez S, Roth FD, Aoki A, Torres AI. Subcellular localisation of VEGF in different pituitary cells. Changes of its expression in oestrogen induced prolactinomas. *J Mol Histol*. 2005 Oct; 36(8-9):447-54.
- 164) Alfer J, Neulen J, Gaumann A. Lactotrophs: the new and major source for VEGF secretion and the influence of ECM on rat pituitary function in vitro. *Oncol Rep*. 2015 May; 33(5):2129-34.
- 165) Xu J, Cao S, Wang L, Xu R, Chen G, Xu Q. VEGF promotes the transcription of the human PRL-3 gene in HUVEC through transcription factor MEF2C. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27165.

ANEXOS

Resultados de la presente Tesis fueron presentados y publicados en los siguientes eventos científicos:

-Adenomas hipofisarios humanos: sus particularidades ultraestructurales. Moyano Crespo G, Estario P, Estario ME, Torres A, Mukdsi J. XXXV Jornadas Científico-Culturales de Patólogos y Citopatólogos de la Provincia de Córdoba. SAPYCC 2015

-Expresión de PRL-3 en lesiones proliferativas adenohipofisarias inducidas por estrógenos: su implicancia en el desarrollo tumoral pituitario. Moyano Crespo G, Guido C, Pérez JP, Torres A, Mukdsi J. JIC 2016

-PRL-3 expression in human pituitary adenomas and prolactinoma experimental model: a possible role in tumoral development. Moyano G, Guido C, Pérez P, Gutiérrez S, Picech F, Petiti J, Torres A, Mukdsi J. Reunión Conjunta de Sociedades de Biomedicina. Buenos Aire. SAIC 2017.

-PRL-3 expression in human pituitary adenomas and experimental evidences of its participation in prolactinoma tumorigenesis. Moyano Crespo G, Pérez PA, Guido C, Cecenarro L, Berhard C, Bengiό V, Papalini F, Estario P, Gutiérrez S, Petiti JP, Torres AI, Mukdsi JH. SEMCO 2017. Trabajo ganador del Premio.

-PRL-1 expression in a prolactinoma experimental model: a possible role in the tumoral development. Moyano Crespo G, Guido C, Pérez P, Cecenarro L, Gutiérrez S, Picech F, Petiti J, Torres A, Mukdsi J. SAIC 2018.

-Association of PTP4A3 expression and tumour size in functioning pituitary adenoma: a descriptive study. Gabriela Deisi Moyano Crespo, Laura Anahí Cecenarro, Pablo Perez, Carolina Guido, Liliana del Valle Sosa, Celina Berhard, Laura Rosana Aballay, Silvina Gutiérrez, Juan Pablo Petiti, Alicia Torres, Jorge Mukdsi. Journal of Clinical Pathology 2020;0:1–4. doi:10.1136/jclinpath-2020-206728

2017

medicina

BUENOS AIRES VOL. 77 Supl. I - 2017

MEDICINA

Medicina 77, Supl. I, págs. 1-420



1032) PRL-3 EXPRESSION IN HUMAN PITUITARY ADENOMAS AND PROLACTINOMA EXPERIMENTAL MODEL: A POSSIBLE ROLE IN THE TUMORAL DEVELOPMENT

Gabriela Deisi Moyano Crespo, Carolina Guido, Pablo A. Pérez, Silvina Gutiérrez, Florencia Picech, Juan P. Petiti, Alicia I. Torres, Jorge H. Mukdsi
Centro de Microscopía Electrónica

PRL-3 (phosphatase of regenerating liver 3) is a subclass of protein tyrosine phosphatases involved in proliferation, migration, invasion and growth tumor, and have been proposed as potential biomarkers of tumor progression. Our aim was to investigate whether PRL-3 is expressed in pituitary human tumor lesions evaluating its presence and correlating with some clinical-pathological parameters. Besides with the objective to analyze a possible PRL-3 participation in pituitary tumorigenesis, this phosphatase and p21 were evaluated in a lactotroph tumoral experimental model. We analyzed PRL-3 in 46 human pituitary adenomas and Fisher male rats treated with estradiol benzoate (EB) during 10, 20 and 30 days (n: 9) were used. Normal human (n: 2) and rats (n: 3) pituitaries were use as control group (CG). Immunohistochemical technique was applied at photonic and electronic level and a semiquantitative study by western blot was used. Statistic analyzes: χ^2 for the variables: size, function and ki67 in human adenomas. Anova-Fisher and correlate analyze in the experimental model. From the total human adenomas, PRL-3 was expressed in 22 out of 46 with immunolocalization predominantly in cytoplasmic level. Interestingly at ultrastructural level some tumors exhibited phosphatase immunolocalization at plasma membrane. There was a positive relation with tumor size (macroadenomas, $\chi^2 p < 0.0001$). Comparing to normal pituitary gland, PRL-3 showed as significant increase in secreting as well as non-secreting tumors. PRL-3 in experimental prolactinoma showed a significant increase at 20 d EB (hyperplastic/adenomatous state), demonstrating a lineal correlation with p21 ($r=0,57$). At 30 d EB (adenomatous state) PRL-3 expression decreased without reaching the levels observed in the CG. Our investigation is the first to show PRL-3 expression in human adenomas predominantly in macroadenomas and its involving at the early phases of the pituitary adenomatous development.

Keywords: Pituitary adenoma, Immunohistochemistry, PRL-3, p21, western blot



**Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba
(SEMCO)
Diciembre de 2017**

CERTIFICA

Que el trabajo Científico

**PRL-3 expression in human pituitary adenomas and
experimental evidences of its participation in prolactinoma
tumorigenesis**

**Moyano Crespo G1, Pérez PA1, Guido C1, Cecenaro L1, Berhard C2, Bengió V3,
Papalini F4, Estario P5, Gutiérrez S1, Petiti JP1, Torres A11, Mukdsi JH1**

- 1-Centro de Microscopía Electrónica-INSCA-CONICET. Córdoba. Argentina
- 2-Servicio de Patología-Clinica Reina Fabiola. Córdoba. Argentina
- 3-Servicio de Patología-Hospital Córdoba. Córdoba. Argentina
- 4-Servicio de Neurocirugía-Hospital Córdoba. Córdoba. Argentina
- 5-Servicio de Endocrinología-Hospital Córdoba. Córdoba. Argentina

**Ha Obtenido el Premio MEJOR TRABAJO DE INVESTIGACION
AREA BASICA -CLINICA
en el marco de las XIX JORNADAS CIENTÍFICAS ANUALES
Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba.**


Dra. María Eugenia Estario
Secretaria SEMCO


Dra. Patricia Dagilioni
Vice-Presidente SEMCO


Dr. Eduardo Caffari
Presidente SEMCO.

2018

medicina

BUENOS AIRES VOL. 78 Supl. III - 2018

MEDICINA



Volumen 78, Supl. III, págs. 1-4073

(629) PRL-1 EXPRESSION IN A PROLACTINOMA EXPERIMENTAL**MODEL: A POSSIBLE ROLE IN THE TUMORAL DEVELOPMENT**

Gabriela Moyano Crespo¹, Carolina Guido¹, Pablo Pérez¹, Laura Cecenaro¹, Florencia Picech¹, Juan Pablo Petiti¹, Alicia Ines Torres¹, Jorge Mukdsi¹ ¹Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET, Fac.de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba


PRL-1 (phosphatase of regenerating liver 1) is a subclass of protein tyrosine phosphatases involved in proliferation, migration, invasion and growth tumor, and have been proposed as potential biomarkers of tumor progression. Our aim was to investigate whether PRL-1 is expressed in a lactotroph tumoral experimental model and analyze its correlation with the cell cycle regulatory protein p21, during the pituitary tumorigenesis. To accomplish this objectives Fisher male rats were treated with estradiol benzoate (EB) during 10, 20 and 30 days (d) to induce an experimental pituitary tumor (n: 9). As control group (C) normal pituitary glands (n: 3) were used. The subcelular localization was visualized using immunocytochemical techniques (confocal and electron microscopy). A semiquantitative study by western blot (WB) was used. Statistic analyzes: Anova-Fisher and correlation analyze ($p < 0,05$). At electron microscopy and confocal level, tumors exhibited PRL-1 immunolocalization predominantly in cytoplasmic level. By WB PRL-1 showed a significant increase during prolactinoma development, reaching the highest level at 30d and demonstrating a lineal correlation with p21 ($r = 0,86$ $p < 0,05$). At this time of the experimental model with also visualized an increase of the proliferat1032) PRL-3 EXPRESSION IN HUMAN

PITUITARY ADENOMAS**AND PROLACTINOMA EXPERIMENTAL MODEL: A POSSIBLE ROLE IN THE TUMORAL DEVELOPMENT**

Gabriela Deisi Moyano Crespo, Carolina Guido, Pablo A.

Pérez, Silvina Gutiérrez, Florencia Picech, Juan P. Petiti, Aliciaive index (ki 67). Our investigation is the first to show PRL-1 expression in a lactotroph tumoral experimental model correlated with p21 protein. This finding would imply the existence of others possibles counterregulatory mechanisms of proliferation during the prolactinoma development.

Association of PTP4A3 expression and tumour size in functioning pituitary adenoma: a descriptive study

Gabriela Deisi Moyano Crespo,¹ Laura Anahí Cecenarro,¹ Pablo Perez,¹ Carolina Guido,¹ Liliana del Valle Sosa,¹ Celina Berhard,² Laura Rosana Aballay,³ Silvina Gutiérrez,¹ Juan Pablo Petiti,¹ Alicia Torres,¹ Jorge Mukdsi ¹

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), Centro de Microscopia Electronica-Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

²Servicio de Patología, Universidad Católica de Córdoba Clínica Universitaria Reina Fabiola, Córdoba, Argentina

³Centro de Investigación en Nutrición Humana (CenINH), Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Médicas, Córdoba, Argentina

Correspondence to

Dr Jorge Mukdsi, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), Centro de Microscopia Electronica-Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; mukdsijorge@gmail.com

Received 6 May 2020

Revised 9 June 2020

Accepted 10 June 2020

ABSTRACT

Background PTP4A3 is a subclass of a protein tyrosine phosphatase super family and is expressed in a range of epithelial neoplasms. We evaluated PTP4A3 expression and its association with clinicopathological parameters in different types of functioning pituitary adenomas.

Methods A total of 34 functioning pituitary adenomas samples were evaluated in this observational study. PTP4A3 expression was examined by immunohistochemical staining, and, possible correlations between PTP4A3 and some clinicopathological variables were investigated.

Results PTP4A3 was expressed in 19 out of 34 tumours (55%), at the cytoplasmic level of tumorous cells.

Moreover, there was significant association ($p=0.042$) between PTP4A3 expression and tumorous size.

Conclusions PTP4A3 was expressed in more than half of the tumours analysed, with there being a significant association with the tumorous size of functioning adenomas. This allows to speculate that PTP4A3 may regulate tumour growth, although further investigations are necessary to determine if this phosphatase can serve as a biomarker or used as a therapeutic target in pituitary macroadenomas.

cytoskeleton remodelling, epithelial-mesenchymal transition, motility and invasion.⁹ Moreover, PTP4A3 is a growth-associated protein in some tumorous types, with many studies having identified PTP4A3 to be a marker of tumour progression in different neoplasms.^{10–13} Although an increased PTP4A3 expression, both at the mRNA and protein level, has been reported in several solid tumours, its expression in functioning pituitary adenomas has not yet been investigated.

Recently, a humanised antibody, PRL-3-zumab, was shown to inhibit PTP4A3-positive cancer cells *in vivo*, and thus this represents a feasible approach for antitumour immunotherapy.¹⁴ Taking into consideration this finding and that new therapeutic targets in functioning pituitary adenomas are required for improved endocrinological treatments, we performed an observational descriptive study of PTP4A3 expression in 34 functioning pituitary adenomas and investigated possible associations with some clinicopathological parameters.

METHODS

Patients and samples

A transsphenoidal surgery was performed on all sellar tumours, and the inclusion and exclusion criteria are shown in [box 1](#).

An observational, descriptive and retrospective study of normal pituitary glands ($n=2$; 30 min postmortem, aged 25–45 years, patients with no evidence of endocrine or histological abnormalities) and functioning pituitary adenomas of 34 adults (aged 20–64 years) was conducted at the Centro de Microscopia Electrónica-INICSA-Conicet.

Patients had undergone surgery at Hospital Córdoba, Sanatorio Allende or Clínica Reina Fabiola, Córdoba, Argentina between the years 2004 and 2015. These institutions performed the clinical diagnosis and reticulín staining, hormone analysis and Ki67 immunohistochemistry characterisation, and also provided the samples in paraffin blocks.

The following data were collected: sex, age, tumorous size (macroadenoma/microadenoma), invasion, previous medical treatment, histopathology, hormone staining and Ki67 labelling index ([table 1](#)).

Immunohistochemical staining

Sections 3 μ m thick were obtained from 34 functional pituitary adenomas and processed for immunohistochemistry. Briefly, the samples were

BACKGROUND

The pituitary adenomas are one of the most frequent intracranial tumours, accounting for 10% of these and also 90% of intrasellar lesions with a prevalence of 1/1500, with approximately half of these tumours being functioning (46%–64%).^{1–3} Although pituitary adenomas are histologically benign, some may grow and become locally aggressive, resulting in a shortened lifespan.^{4–5} Different types of functioning pituitary adenomas are currently treated by medical therapies such as dopamine and somatostatin agonists, surgery or radiotherapy. However, these treatments are not entirely satisfactory and patients can fail to respond to traditional approaches.⁶

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are a large family of enzymes that catalyse the removal of phosphate groups attached to the tyrosine residues on their substrates, and are essential for regulating a myriad of cellular processes.⁷ In the tumorous pituitary gland, classical PTPs are considered to be cell growth regulators.⁸ Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3, also known as PRL-3) belongs to this group and has been implicated in the control of cell cycle, survival, angiogenesis, adhesion,



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Moyano Crespo GD, Cecenarro LA, Perez P, et al. *J Clin Pathol* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/jclinpath-2020-206728

Box 1 Patient inclusion and exclusion criteria

Patient inclusion criteria

- ▶ Female and male patients older than 18 years of age.
- ▶ Functioning pituitary adenomas.
- ▶ Availability of clinical data (previous medical treatment, tumorous size, tumorous invasion).
- ▶ Availability of immunolabelling report of adenohipophyseal hormones and Ki67.

Patient exclusion criteria

- ▶ Sellar non-pituitary adenomas (neuronal and paraneuronal tumours; mesenchymal tumours; germ cell tumours; haematological tumours; secondary tumours).
- ▶ Non-functioning pituitary adenomas.

deparaffinised in xylene and hydrated in alcohols, and the sections were heated in a microwave for 15 min in a citrate buffer (pH 6.0). Next, the sections were incubated first with hydrogen peroxide 0.5% solution in methanol to block endogenous peroxidase, and then with PTP4A3 rabbit polyclonal antibody (Abcam to anti-PTP4A3 ab82568, USA, 1/70) overnight at 4°C, and

finally with biotinylated antirabbit antibody with ABC complex (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). The reaction was detected using DAB as chromogen (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Positive controls for PTP4A3 were performed in human colon adenocarcinoma, with negative controls carried out by omitting the primary antibody incubation. The number of positively stained cells in the human adenomas was determined in 10 random fields at $\times 400$ magnification. The total number of positive cells as a proportion of the number of cells in the field of vision was used to assign positive or negative values. If the percentage of positive cells was $\leq 10\%$, this was recorded as '0'; a percentage of between 11% and 25% was assigned '+'; a value of 26%–50% was recorded as '++'; a percentage of 51%–75% was assigned '+++' and finally, a value $>76\%$ was recorded as '++++'.

Western blot analysis

Protein extracts (50 μg) from two normal pituitary and three functioning pituitary adenomas (non-invasive corticotroph macroadenoma, invasive somatotroph macroadenoma and invasive lactotroph macroadenoma) were separated in a polyacrylamide gel (Sigma-Aldrich), transferred to a nitrocellulose

Table 1 Clinical variables and pathological parameters

Case	Gender	Age	Size	Invasion	Previous medical treatment	Histopathology	Hormone IHC	Ki67 %
1	M	59	M	Yes	Naïve to treatment	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	8
2	M	51	M	Yes	Naïve to treatment	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	1
3	F	30	M	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	1
4	M	27	M	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	10
5	M	35	M	Yes	Naïve to treatment	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	5
6	M	60	M	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	5
7	F	20	m	NA	Resistant	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	1
8	F	38	m	NA	Resistant	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	1
9	F	31	m	NA	Resistant	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	1
10	F	26	m	NA	Resistant	Sparsely granulated lactotroph adenoma	PRL	1
11	M	57	M	NA	Naïve to treatment	Densely granulated somatotroph adenoma	STH	2
12	F	33	M	Yes	Naïve to treatment	Densely granulated somatotroph adenoma	STH	1
13	F	64	M	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated somatotroph adenoma	STH	0
14	F	49	M	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated somatotroph adenoma	STH	1
15	M	29	M	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated somatotroph adenoma	STH	3
16	F	58	m	NA	Naïve to treatment	Densely granulated somatotroph adenoma	STH	3
17	M	37	m	NA	Naïve to treatment	Sparsely granulated somatotroph adenoma	STH	2
18	F	35	M	NA	Naïve to treatment	Mammomatotroph adenoma	STH/PRL	4
19	M	28	M	NA	Naïve to treatment	Mammomatotroph adenoma	SHT/PRL	2
20	M	53	m	NA	Naïve to treatment	Mammomatotroph adenoma	SHT/PRL	5
21	F	41	m	NA	Naïve to treatment	Mammomatotroph adenoma	STH/PRL	1
22	M	32	m	No	Naïve to treatment	Thyrotroph adenoma	TSH	5
23	M	35	M	Yes	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	1
24	F	32	M	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	5
25	F	62	M	Yes	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	2
26	F	51	M	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	3
27	F	31	M	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	2
28	F	41	M	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	2
29	F	55	m	No	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	0
30	F	23	m	No	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	3
31	M	30	m	No	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	3
32	F	21	m	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	1
33	F	25	m	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	7
34	F	38	m	NA	Naïve to treatment	Densely granulated corticotroph adenoma	ACTH	1

Gender: M: male, F: female; size: M: macroadenoma, m: microadenoma.

ACTH, adrenocorticotrophic hormone; IHC, immunohistochemistry; NA, not available; PRL, prolactin; STH, somatotroph hormone; TSH, thyrotroph hormone.

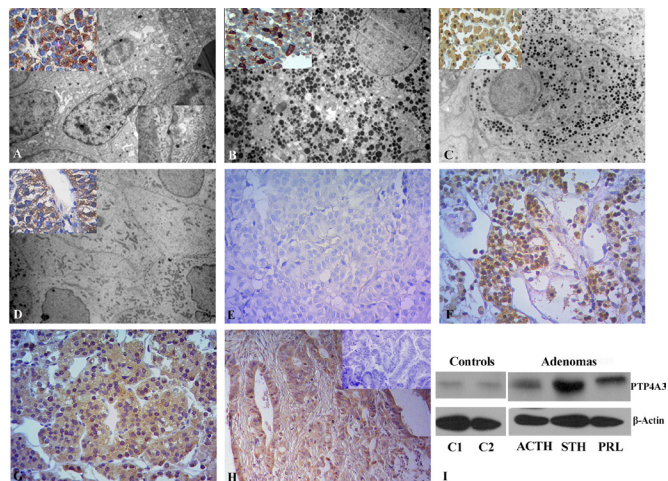


Figure 1 Ultrastructure and hormone immunolabelling in lactotroph (A), somatotroph (B), corticotroph (C) and tirotroph (D) adenomas. (E) Negative control of protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) immunolabelling in pituitary adenomas; (F) PTP4A3 expression, mainly localised in the cytoplasm ($\times 400$, magnification). (G) +++PTP4A3 expression, (H) positive PTP4A3 control in colon cancer sample. Inset: negative control omitting primary antibody. (I) PTP4A3 semi-quantitative analysis in normal gland and different pituitary adenomas. ACTH, adrenocorticotrophic hormone; PRL, prolactin; PTP4A3, protein tyrosine phosphatase 4A3; STH, somatotroph hormone.

membrane (Amersham International) and the non-specific binding was blocked with phosphate-buffered saline 5% non-fat dried milk at room temperature. The membranes were then rinsed and incubated overnight with anti-PTP4A3 (Abcam to anti-PTP4A3 ab82568, USA) (1:166) or anti- β -actin (1:4000; Sigma-Aldrich). The blots were incubated with HPRT-conjugated bovine anti-goat (1:2500; Santa Cruz Biotechnology), goat anti-mouse (1:2500, Jackson ImmunoResearch) or goat anti-rabbit secondary antibodies (1:5000, BioRad). The membranes were thoroughly rinsed in Tris-buffered saline 0.1% Tween 20, and the HPRT-coupled secondary antibody was revealed using enhanced chemiluminescence western blot analysis detection reagents (GE Healthcare), with the emitted light captured on Hyperfilm (GE Healthcare).

Statistical analyses

Data were presented as mean (SD) for continuous data or for frequency and percentages (categorical data). We estimated the 95% CI for the main quantitative variables. The T-test was used to compare PTP4A3 and the Ki67 labelling index between tumorous sizes (macroadenoma vs microadenoma). The Fisher's exact test was used to assess an association between invasion and tumour size, a p value < 0.05 was considered to be statistically significant for all the analyses. The statistical analysis was performed using the Stata 15.1 statistical package.¹⁵

RESULTS

PTP4A3 expression in functional pituitary adenomas

Pituitary adenomas were characterised by the H&E stain, immunohistochemistry hormone determination and transmission electron microscopy (figure 1A–D). In this cohort, 59% of patients were female, with the mean (SD) age being 39 (12.96) years.

The clinicopathological findings revealed that there were 29% lactotroph cell adenomas, 20% somatotroph adenomas, 11% mammosomatotropic adenomas, 35% corticotroph cell

Table 2 PTP4A3 expression in pituitary adenomas

Adenoma	n	Neg	1+	2+	3+	4+
PRL	10	5	2	2	0	1
GH	11	4	3	4	0	1
TSH	1	1	0	0	0	0
ACTH	12	5	0	5	0	2

ACTH, adrenocorticotrophic hormone; GH, growth hormone; PRL, prolactin; PTP4A3, protein tyrosine phosphatase 4A3; TSH, tirotroph hormone.

adenomas and 3% tirotroph cell adenomas (figure 1). Of the above, 56% were macroadenomas and 44% microadenomas. As four of the lactotroph cell adenomas were resistant to previous medical treatment (dopamine agonist), these were treated surgically.

The mean (SD) of the Ki67 index was 2.68 (0.39); 95% CI 11.88 to 3.48. Sixty-eight per cent of the adenomas revealed a Ki67 index $\leq 3\%$, with the Ki67 index being independent of tumour size ($p > 0.05$). Unfortunately, the presence or absence of invasion could only be determined in 10 out of 34 functional pituitary adenomas.

The PTP4A3 expression in 34 functioning pituitary adenomas was determined by immunohistochemistry, with the mean (SD) of PTP4A3 being 23.02857 (4.72); 95% CI 13.42 to 32.62. As shown in figure 1F–G, PRL-3 protein was mainly localised in the cytoplasm, which sometimes occurred as granulated loci in the strongly positive samples. According to the criteria, the PTP4A3-positive expression rate was 64% in the adenoma group (table 2). The semi-quantitative phosphatase analysis showed that there was a higher expression of PTP4A3 in proliferative pituitary lesions than in normal glands (figure 1I). However, there was only a significant and greater difference found for PTP4A3 between pituitary macroadenomas and microadenomas ($p = 0.042$) (table 3). Finally, for the adenoma pituitary lineage cells, the PTP4A3 expression was similar in the PRL-somatotroph hormone-tirotroph hormone (54%) lineage and adrenocorticotrophic hormone lineage (58%).

Table 3 Relationship of PTP4A3-positive expression and pituitary adenomas clinicopathological features

Clinical data	n	PRL-3-positive expression	
		Positive (cases)	Percentage (%)
Age (years)			
>55	9	3	33.33
<55	25	16	64
Gender			
Men	13	8	61.53
Women	21	11	52.38
Adenoma			
PRL	10	5	50
GH	11	7	63.63
TSH	1	0	0
ACTH	12	7	58.33
Tumorous size			
Macro	19	13	68.42
Micro	15	6	40

ACTH, adrenocorticotrophic hormone; GH, growth hormone; PTP4A3, protein tyrosine phosphatase 4A3; TSH, tirotroph hormone.

DISCUSSION

Functioning pituitary tumours are benign proliferations with different biological characteristics and behaviours, especially with regard to tumour size and invasion.⁴ Similar to other series reported, in our cohort 59% of patients were female, but the mean age was about 39 years lower than for other studies.³ Women were predominant and at an earlier age and most markedly for corticotroph tumours, as was previously reported.³

We conducted an observational descriptive study to evaluate PTP4A3 expression in the normal pituitary gland and in a functioning adenoma cohort. This phosphatase is in normal tissue mainly expressed in the heart, skeletal muscle and to a lesser extent in the prostate.¹⁶ PTP4A3 also shows low basal levels in the human normal pituitary gland in agreement with the fact that phosphatase is expressed at low levels in other normal human epithelial tissue.¹⁶ However, this PTP has largely unknown physiological cellular functions, although it has been associated with terminal cell differentiation as well as appearing to be important in ensuring cell cycle progression by facilitating G1S transition.^{16 17}

In our investigation, 19 out of 34 functioning pituitary adenomas exhibited detectable immunolabelling of PTP4A3, with 26%–50% of the immunopositive cells occurring in more than half of PTP4A3-positive adenomas. One important point was that 63.63% of somatotroph adenomas, 58.33% of corticotroph adenomas and 50% of lactotroph adenomas were PTP4A3-positive tumours. To date, few pituitary investigations have reported PTPs' expression. It has been proposed that the 'classical PTPs', namely SHP-1, SHP-2, and DEP-1/PTPn, play a pivotal role in SRIF/SRL-mediated control of cell growth, and seem to be activated by ligand-binding to all the different SST subtypes. Cells transfected with the individual somatostatin receptor (SSTR) subtypes have demonstrated that all the five SSTRs are able to induce PTP activity.^{8 18} However, we report for first time a PTP4A3 increased expression in a group of different cell lineage pituitary adenomas. Although no substrate has yet been clearly identified for the PTPs, a few have been suggested for PTP4A3, such as the PI3K-Akt pathway, although the direct mechanism involved still remains unclear.¹⁹

Monsalves *et al* suggested that the pituitary adenoma growth rate is influenced by various patient-specific and tumour-specific characteristics, such as age, sex, specific subtype, hormonal activity and immunohistochemical profile, including the mind-bomb homolog 1 labelling index status.²⁰ Here, we demonstrated that there was significant difference between PTP4A3 expression and pituitary adenoma size, thereby revealing a possible new molecule that may regulate tumour growth, at least in some adenomas. We also consider that our findings have identified a new concept in pituitary pathology, in which a group of PTP4A3-positive macroadenomas could be a potential therapy target for new treatments to reduce the tumorous size, and may be also used as a postoperative adjuvant therapy to prevent

recurrence.¹⁴ Although we cannot extrapolate the results to fit the entire population (inclusive bias), a further multicentre study with a large sample size should be conducted, to determine if PTP4A3 immunostaining could also be used to identify potential patients as a PRL-3-zumab target.

Handling editor Runjan Chetty.

Acknowledgements The authors would like to thank native speaker Dr Paul Hobson for editing the English language of the manuscript.

Contributors All authors contributed to the design of the study, writing or critical review of the manuscript, analysis and interpretation of data. All agreed to submission of the manuscript.

Funding This work was supported by La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (ANPCyT-FONCYT-PICT 2014-2555), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET-PIP-Res #154/2014) and Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC Res # 313/2016).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Obtained.

Ethics approval CIEIS del Hospital Córdoba (Registro Nacional de Investigaciones en Salud N° CO000152 (RENIS)).

Provenance and peer review Not commissioned; internally peer reviewed.

ORCID iD

Jorge Mukdsi <http://orcid.org/0000-0003-2178-6842>

REFERENCES

- McDowell BD, Wallace RB, Carnahan RM, *et al*. Demographic differences in incidence for pituitary adenoma. *Pituitary* 2011;14:23–30.
- Trouillas J, Roy P, Sturm N, *et al*. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol* 2013;126:123–35.
- Mete O, Cintosun A, Pressman I, *et al*. Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Mod Pathol* 2018;31:900–9.
- Asa SL, Ezzat S. Aggressive pituitary tumors or localized pituitary carcinomas: defining pituitary tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2016;11:149–62.
- Lopes MBS. Pathology of prolactinomas: any predictive value? *Pituitary* 2020;23:3–8.
- Davis JR, Farrell WE, Clayton RN. Pituitary tumours. *Reproduction* 2001;121:363–71.
- Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:833–46.
- Florio T. Molecular mechanisms of the antiproliferative activity of somatostatin receptors (SSTRs) in neuroendocrine tumors. *Front Biosci* 2008;13:806–40.
- Duciel L, Monraz Gomez LC, Kondratova M, *et al*. The phosphatase PRL-3 is involved in key steps of cancer metastasis. *J Mol Biol* 2019;431:3056–67.
- Hardy S, Kostantin E, Hatzihristidis T, *et al*. Physiological and oncogenic roles of the PRL phosphatases. *Febs J* 2018;285:3886–908.
- Guzińska-Ustymowicz K, Kiśluk J, Terlikowski SJ, *et al*. Expression of phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) in endometrioid cancer and lymph nodes metastases. *Adv Med Sci* 2013;58:221–6.
- Song R, Qian F, Li Y-P, *et al*. Phosphatase of regenerating liver-3 localizes to cytoplasmic membrane and is required for B16F1 melanoma cell metastasis in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009;4:e4450.
- Soni P, Husain N, Chandra A, *et al*. Do phosphatase of regenerating liver-3, matrix metalloproteinases-2, matrix metalloproteinases-9, and epidermal growth factor receptor-1 predict response to therapy and survival in glioblastoma multiforme? *Indian J Pathol Microbiol* 2016;59:287–93.
- Thura M, Al-Aidaros AQO, Yong WP, *et al*. PRL3-zumab, a first-in-class humanized antibody for cancer therapy. *JCI Insight* 2016;1:1–15.
- Stata 15. *Stata statistical software: release 15*. College Station, Texas, USA: StataCorp LLC, 2017.
- Rios P, Li X, Köhn M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *Febs J* 2013;280:505–24.
- Wei M, Korotkov KV, Blackburn JS. Targeting phosphatases of regenerating liver (PRLs) in cancer. *Pharmacol Ther* 2018;190:128–38.
- Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, *et al*. Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:121–31.
- Qu S, Liu B, Guo X, *et al*. Independent oncogenic and therapeutic significance of phosphatase PRL-3 in FLT3-ITD-negative acute myeloid leukemia. *Cancer* 2014;120:2130–41.
- Monsalves E, Larjani S, Loyola Godoy B, *et al*. Growth patterns of pituitary adenomas and histopathological correlates. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1330–8.

Take home messages

- ▶ Protein tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) is expressed in the normal pituitary gland.
- ▶ Overexpression of PTP4A3 was observed in a series of 19 patients with pituitary adenomas, with phosphatase expression occurring in the PRL-growth hormone-trotroph hormone lineage and adrenocorticotrophic hormone lineage cells.
- ▶ There was a significant difference between PTP4A3 expression in pituitary macroadenomas versus microadenomas.