

Universidad de Salamanca  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía e Histología Humanas  
Instituto de Neurociencias de Castilla y León  
Laboratorio de Neuroanatomía Humana, y Neuroendocrinología  
Experimental



**Expresión del Coactivador de Receptor Estrogénico AIB1 en los Prolactinomas Humanos y su correlación con la expresión de Aromatasa, Receptor estrogénico y proteína p53.**

Carmen Hernández Iglesias

Salamanca, 2008

José CARRETERO GONZÁLEZ, Catedrático de Embriología y Anatomía Humana, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y Jerónimo HERNADEZ HERNANDEZ, Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, en su calidad de Directores del trabajo de Tesis Doctoral,

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado:

*Expresión del Coactivador de Receptor Estrogénico AIB1 en los Prolactinomas Humanos y su correlación con la expresión de Aromatasa, Receptor estrogénico y proteína p53.*

Ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Lda. Dña. *Carmen Hernández Iglesias*, en el laboratorio de Neuroanatomía Humana y Neuroendocrinología Experimental del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, ubicado en el Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Que, a nuestro entender, el trabajo reúne los requisitos suficientes de experimentalidad, originalidad e interés científico y aplicativo como para ser presentado y defendido como trabajo de Tesis Doctoral.

Y, para que así conste, firman la presente en Salamanca a 15 de Noviembre de 2008.

José Carretero González

Jerónimo Hernández Hernández

## Indice

<b>PRÓLOGO</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
Regulación paracrina extragonadal de los esteroides gonadales. La aromatasa P450. ....	10
Aromatasa hipofisaria. Adenomas hipofisarios. ....	15
Prolactina.....	16
Evidencias de la presencia de la Aromatasa en la hipófisis. ....	17
Los coactivadores de receptores estrogénicos. AIB-1 .....	19
<b>HIPÓTESIS DEL ESTUDIO</b> .....	<b>22</b>
Prolactinomas y su Patogénesis. ....	23
Diseño Experimental. ....	28
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
Muestras y procesado de las mismas. ....	30
Determinación de los niveles basales de prolactina. ....	30
Inmunocitoquímica.....	30
Anticuerpos empleados.....	31
Protocolo utilizado .....	31
Especificidad del anticuerpo antiaromatasa. ....	31
Clasificación de los tumores.....	32
Obtención del anticuerpo anti-aromatasa humana. ....	32
Western Blotting .....	32
Análisis densitométrico.....	33
Estadística.....	34
Sujetos de estudio. ....	34
Variables a contemplar.....	34
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
Evidencia de la presencia de Aromatasa en la Hipófisis Humana.....	36
Diagnóstico analítico de los Prolactinomas. ....	38
Niveles séricos de Prolactina. ....	38
Western blotting de Aromatasa en los Prolactinomas Humanos. ....	40
Inmunocitoquímica.....	42
Adenomas positivos a Prolactina.....	42
Inmunocitoquímica.....	43
Inmunocitoquímica.....	44
Adenomas positivos a la Aromatasa .....	44
Inmunocitoquímica.....	45
Inmunocitoquímica.....	46
Adenomas positivos al Receptor Estrogénico $\alpha$ .....	46
Adenomas positivos al Coactivador del Receptor Estrogénico, AIB1. ....	50
Inmunocitoquímica.....	55
Inmunocitoquímica.....	56
Localización de p53. ....	56
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>60</b>
Comentarios en relación con la metodología empleada. ....	61
Comentarios en relación con los resultados obtenidos.....	67
Prolactinomas y Aromatasa.....	67

Receptor estrogénico $\alpha$ . .....	68
Coactivador estrogénico AIB1. ....	69
Proteína p53. ....	71
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>75</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>77</b>

## **Prólogo**

Mi relación con esta cátedra comenzó hace ya muchos años cuando inicié la carrera de Medicina. Fueron mis primeros profesores los que me pusieron en contacto con el cuerpo humano, con la anatomía, que es la base para poder ejercer mi profesión como cirujano ginecológico y comprender el funcionamiento del cuerpo.

Mi primera colaboración con el departamento de Anatomía fue como jefe de mesa, y desde allí cuando empezaba a vivir y a aprender lo que desde mi infancia buscaba; encontré a los maestros que me explicaban la anatomía con las diferentes funciones que el cuerpo debe realizar. Desde entonces y con la visión anatómica como base, fui curso a curso entendiendo la importancia del conocimiento y que la investigación es necesaria para la formación continuada de un clínico que espera ser algo más que un "práctico".

Posteriormente, realicé mis cursos de doctorado mientras comenzaba mi formación especializada, lejos de Salamanca y de la cátedra en la que me sentía tan agusto.

Aunque con la dificultad de la distancia pero con la idea de la investigación, se mantuvo cierta colaboración y de ésta surgió la posibilidad de realizar mi tesis doctoral.

Gracias al empeño, al trabajo conjunto y grandes dosis de ayuda se ha ido materializado: de una serie de ideas, más o menos coherentes, a una tesis doctoral.

## **Agradecimientos**

Es para mi un motivo de satisfacción poder expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado de una o de otra forma en la realización de este trabajo.

He de dejar constancia de mi gratitud y respeto a los Profesores, D. José Carretero González, Director de este trabajo, siempre dispuesto a ayudar y colaborar y al Profesor D. Jerónimo Hernández Hernández, mi padre y también director de este trabajo, por sus consejos y su constante preocupación.

He de agradecer también al Prof. D. Ricardo Vázquez Rodríguez, Catedrático de Anatomía, por su amable y sincera colaboración.

Al Dr. José Manuel Repollés Escada, Jefe de Servicio de Ginecología del Hospital Ramón y Cajal y a todos los compañeros de mi hospital por su ayuda y apoyo en todo momento en el tiempo que he desarrollado este trabajo.

Al Prof. D. Juan Luis Lanchares Jefe de Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico de Salamanca y al resto de miembros del servicio por ponerme en contacto con el mundo de la ginecología mientras fui alumna interna del Departamento.

Al Prof. D. Pedro de la Fuente y al Prof. D. José Manuel Hernández y a todos los compañeros el Hospital Universitario "12 de Octubre" por todo lo que me enseñaron, académica y personalmente, durante los años de mi estancia de formación como Residente en Obstetricia y Ginecología.

A mi marido D. Ignacio Cueto Hernández por su paciencia y apoyo constante en estos años.

A toda mi familia por su cariño y apoyo incondicional.

Mi más sincero agradecimiento y gratitud a todos por haber hecho posible la realización de este trabajo.



## **Introducción**

## Regulación paracrina extragonadal de los esteroides gonadales. La aromatasa P450.

Modelos en animales experimentales que incluyen mutaciones naturales en el gen de la aromatasa o ratones knockouts para la aromatasa o para el receptor estrogénico, cuya característica principal es la insuficiencia estrogénica, han permitido comprobar que los estrógenos poseen efectos fisiológicos que no guardan relación con la reproducción, que se dan en machos y en hembras, y que afectan a diferentes aparatos y sistemas, como: el sistema nervioso, el hueso, el aparato cardiovascular, el hígado, el tejido adiposo y, en general, la homeostasis energética (Lubahn y col., 1993; Smith y col., 1994; Krege y col., 1998; Fisher y col., 1998; Couse y col., 1999; Dupont y col., 2000; Jones y col., 2000; Simpson y col., 2005).

La mayoría de estos efectos no se deben a los estrógenos circulantes, sino a los estrógenos sintetizados en órganos diferentes a las gónadas y, en muchas ocasiones, sin relación con el aparato reproductor, como la mama, el cerebro, el hueso o el endotelio vascular; donde actúan de forma paracrina o autocrina.

La síntesis estrogénica no gonadal depende de la existencia de una fuente androgénica circulante, la testosterona o de fuentes locales, ya que las células son capaces de producir testosterona a partir del colesterol libre, la androstendiona, la DHEA o la DHEAS circulantes.

La testosterona puede actuar directamente sobre un receptor androgénico, convertirse por actuación de la 5- $\alpha$ -reductasa en dihidroepiandrosterona que también actúa sobre un receptor androgénico, o bien, por actuación de la aromatasa, convertirse a estradiol que actúa sobre un receptor estrogénico.

Ambos, testosterona y estradiol pueden salir de la célula y, tras reducirse, circular como metabolitos en tasas superiores a los que cabría esperar analizando las tasas de los esteroides activos circulantes.

La importancia y la complejidad de estos procesos se pone de manifiesto si se consideran hechos demostrados como:

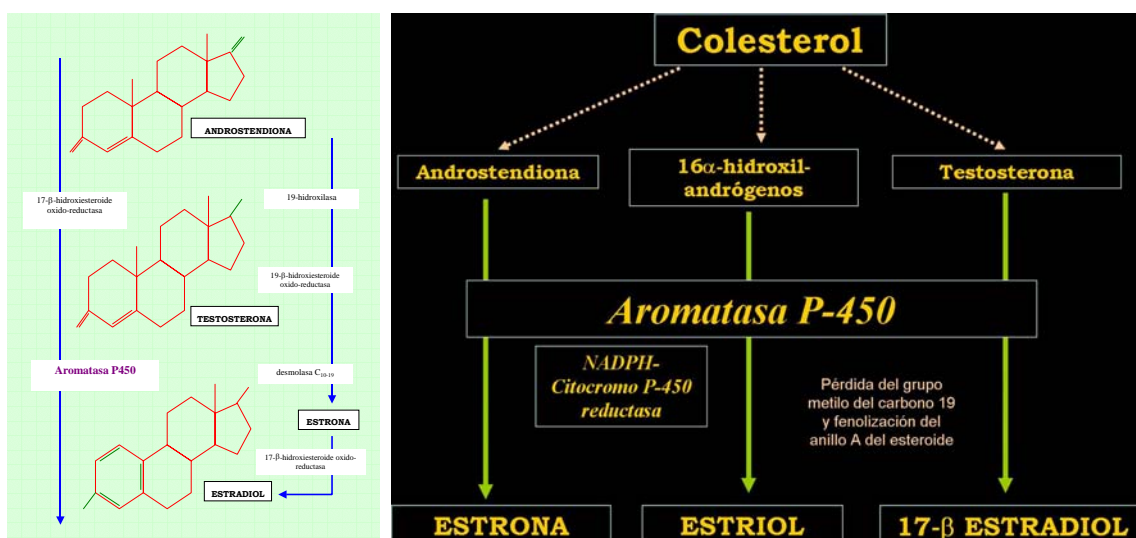
- ✓ Las mujeres y los varones producen cantidades semejantes de testosterona y estradiol y ambos esteroides juegan papeles fisiológicos importantes en los dos sexos.
- ✓ Mientras que en las mujeres premenopáusicas la mayoría de la testosterona se forma, actúa y se metaboliza en tejidos diana específicos, en los varones, la testosterona circula como una hormona procedente del testículo principalmente y actúa de forma global. Por tanto, en la mujer la testosterona actúa de forma paracrina, mientras que, en el varón, lo hace de forma endocrina.
- ✓ Al contrario, en los varones, la mayoría del estradiol se forma, actúa y metaboliza en tejidos diana, mientras que, en la mujer premenopáusica, el estradiol circula como una hormona y actúa globalmente.

- ✓ En las mujeres postmenopáusicas, tanto la testosterona como el estradiol se forman, actúan y metabolizan localmente.

Las acciones locales de los estrógenos son variadas:

- ✓ Su síntesis en el cerebro, el hígado, el músculo y el tejido adiposo les hace ser importantes reguladores de la homeostasis energética del organismo, actuando en sinergismo con leptina, adiponectina, resistina y cortisol o corticosterona, hasta el extremo de que su carencia da lugar al desarrollo de un síndrome metabólico (Simpson y col., 2005).
- ✓ Son importantes reguladores del desarrollo y el crecimiento de la mama, pudiendo, en algunos tipos de tumor, jugar un papel relevante en la carcinogénesis mamaria (McGuire y col., 1975; Tekmal y Santen, 1999). En particular, en los cánceres de mama estrógeno dependientes, en mujeres postmenopáusicas, el aumento en la expresión de la aromatasa mamaria da lugar a un aumento en el contenido estrogénico de la glándula, que es independiente del descenso de las tasas estrogénicas plasmáticas (Miller, 1991) y, altamente dependiente de la presencia del receptor estrogénico  $\alpha$  (Tekmal y col., 2005).
- ✓ Los niveles estrogénicos elevados, localmente, afectan a la expresión de genes involucrados en la regulación del crecimiento celular justificando los efectos mitogénicos de los estrógenos y su contribución a la aparición de hiperplasias y displasias en la mama (Tekmal y col., 1996; Kirma y col., 2001).

En todos estos efectos locales de los estrógenos, juega un papel fundamental la aromatasa (Miller, 1991; Tekmal y col., 1996; Fowler y col., 2000; Gill y col., 2000; Kirma y col., 2001; Mandava y col., 2001).



Rutas metabólicas de la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos.

La aromatasa es el enzima que convierte los andrógenos-C19 a estrógenos-C18. En diversos tejidos de nuestro organismo, las células son capaces de obtener distintos compuestos androgénicos a partir del colesterol captado de la sangre y, mediado por la aromatasa, fenolizar el anillo A del núcleo

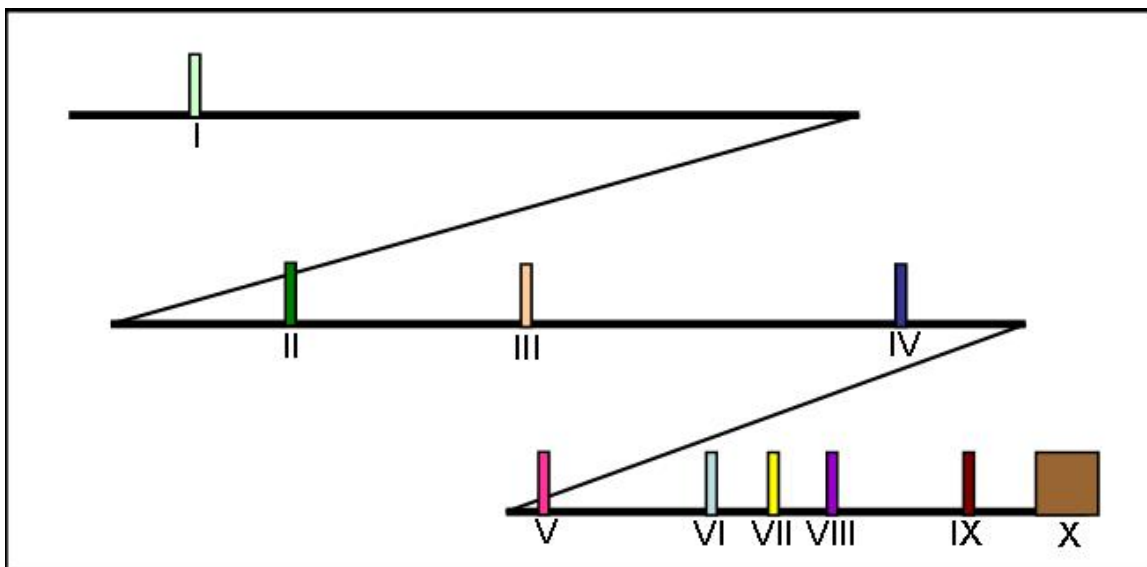
ciclopentano perhidrofenantreno (proceso que se conoce como aromatización, por el olor característico que produce la fenolización), lo que, unido a la pérdida del grupo metilo del carbono 19, transforma los andrógenos en estrógenos.

La aromatasa es un miembro de la superfamilia del citocromo P450 y resulta de la transcripción de gen CYP19. También es conocida como mono-oxigenasa microsomal o como estrógeno sintetasa.

La familia de proteínas citocromo P450 son mono-oxigenasas que catalizan muchas reacciones implicadas en el metabolismo de drogas y la síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos.

La aromatasa P450 se localiza en el retículo endoplásmico y cataliza los últimos pasos en la síntesis de estrógenos mediante tres hidroxilaciones sucesivas del anillo A de los andrógenos.

El gen que codifica la síntesis de la aromatasa se localiza en el cromosoma 19 y está formado por 10 exones, de los cuales el primero, aunque se transcribe al mRNA, no se traslada a la proteína final. El terminal 5' y parte del exón 1 y del intrón 1 tienen lugares de unión para distintos complejos, como por ejemplo el complejo glucocorticoides y su receptor.



Representación esquemática del gen de la aromatasa en la que se indica la posición del sus 10 exones, separados por 9 intrones.

La transcripción del gen puede originar dos variantes, en la variante 1 no se produce la transcripción del exón 2a y, como resultado, el transcrito tienen un UTR 5' más corto que el transcrito de la variante 2. La proteína resultante de ambos transcritos es idéntica.

Las mutaciones en este gen pueden dar lugar a aumentos o descensos en la actividad de la aromatasa. Los fenotipos asociados sugieren que los estrógenos resultantes participan como hormonas sexuales y en el crecimiento y diferenciación celular, tisular u orgánico. La transcripción del gen puede dar

lugar a transcritos aberrantes como ocurre en la deficiencia de aromatas placentaria en la que los transcritos de RNA contienen un fragmento de 87 bp y codifican moléculas anormales de aromatas con 29 residuos aa. más que la secuencia normal. Este hecho se debe a mutaciones, generalmente pequeñas del gen, en el caso de la deficiencia placentaria de aromatas, la secuencia GT del intrón 6 está mutada a GC, en el punto de unión entre el exón 6 y el intrón 6 debida a una enfermedad hereditaria autosómica a partir de padres heterocigotos para esta mutación (Harada y col., 1992a,b, 1993).

En la especie humana, el primer exón no se traslada. El análisis del lugar de inicio de la transcripción del mRNA puso de manifiesto la existencia de tres posibilidades de residuos G consecutivos. La secuencia incluye un elemento regulador del cAMP, un lugar AP1 para la actuación de la protein-kinasa C y un lugar de unión para glucocorticoides, dentro del exón 1 (Means y col., 1989). La transcripción normal del gen da lugar a un transcrito de casi 3 Kb cuya secuencia en la especie humana es:

```

1      GCGGTGTCAGAAACCCTGTGGTGAAATTCAGCCTGTGGATTCCAGAAATTTGGAGTGTT
61     TTGGGGGAAAAATCCGCACACACAAAAGCAACATTTGGAAATCCCTGTGGACTCTAAAT
121    GCCCCTCTGAGGTCAAGGAACACAAGATGGTTTTGGAAATGCTGAACCCGATACATTAT
181    AACATCACCAGCATCGTGCTGAAGCCATGCCTGCTGCCACCATGCCAGTCTGCTCCTC
241    ACTGGCCTTTTTCTCTTGGTGTGGAATTATGAGGGCACATCCTCAATACCAGTCTGGC
301    TACTGCATGGGAATTGGACCCCTCATCTCCCACGGCAGATTCCTGTGGATGGGGATCGGC
361    AGTGCCTGCAACTACTACAACCGGTATATGGAGAATTCATGCGAGTCTGGATCTCTGGA
421    GAGGAAACACTCATTATCAGCAAGTCTCAAGTATGTTCCACATAATGAAGCACAATCAT
481    TACAGCTCTCGATTCCGCGCAGCAAACCTGGGCTGCAGTGCATCGGTATGCATGAGAAAGG
541    ATCATATTTAAACAACATCCAGAGCTCTGAAAAACAACCTCGACCCTCTTTATGAAAGG
601    CTGTCAGGCCCCCGCCTTGTTCGTATGGTACAGTCTGTGCTGAATCCCTCAAAACACAT
661    CTGGACAGGTTGGAGGAGGTGACCAATGAATCGGGCTATGTGGACGTGTTGACCCTCTG
721    CGTCGTGTCATGCTGGACACCTTAACACGCTCTTCTTGAGGATCCCTTTGGACGAAAGT
781    GCTATCGTGGTTAAATCCAAGTTATTTGATGCATGGCAAGCTCCTCATCAAACCA
841    GACATCTTCTTTAAGATTTCTTGGCTATACAAAAAGTATGAGAAGTCTGTCAAGGATTTG
901    AAAGATGCCATAGAAGTTCTGATAGCAGAAAAAGACGAGGATTTCCACAGAAGAGAAA
961    CTGGAAGAATGTATGGACTTTGCCACTGAGTTGATTTTAGCAGAGAAACGTGGTGACCTG
1021   ACAAGAGAGAATGTGAACCAGTGCATATTGAAATGCTGATCGCAGTCTGACACCATG
1081   TCTGTCTCTTGTCTTCTCATGCTATTTCTATTGCAAAGCACCTAATGTTGAAGAGGCA
1141   ATAATAAAGGAAATCCAGACTGTTATTGGTGAGAGAGACATAAAGATTGATGATATACAA
1201   AATTAAGAGTGATGAAAACTTCATTTATGAGAGCATGCGGTACCAGCCTGTCTGTGGAC
1261   TTGGTTCATGCGCAAAGCCTTAGAAGATGATGTAATCGATGGCTACCCAGTAAAAAGGGG
1321   ACAACATTTATCCTGAATATTGGAAGGATGCACAGACTCGAGTTTTTCCCCAACCCAA
1381   GAATTTACTCTTGAAAAATTTGCAAAGAATGTTCCCTTATAGGTAATTTAGCCATTTGGC
1441   TTTGGGCCCCCGTGGCTGTGCAGGAAAGTACATCGCCATGGTGATGATGAAAGCCATCCTC
1501   GTTACACTTCTGAGACGATTCCACGTGAAGACATTGCAAGGACAGTGTGTTGAGAGCATA
1561   CAGAAGATACACGACTTGTCTTGCACCCAGATGAGACTAAAAACATGCTGGAATGATC
1621   TTTACCCCAAGAACTCAGACAGGTGCTGGAACACTAGAGAAGGCTGCTCAGTACCCAC
1681   TCTGGAGCATTCTCATCAGTAGTTCACATACAAATCATCCATCCTTGCCAAATAGTGTCA
1741   TCCTCACAGTGAACACTCAGTGGCCATGGCATTATAGGCATACCTCCTATGGGTTGT
1801   CACCAAGCTAGGTGCTATTTGTATCTGCTCCTGTTACACCAGAGAAACCAGGCTACAAG
1861   AGAAAAAGCAGAGGCCAAGAGTTTGAGGGAGAAATAGTCGGTGAAGAAACCGTATCCATA
1921   AAGACCCGATTCCACCAAATGTGCTTTGAGAAGGATAGGCCTCATTAAACAAAATGTATG
1981   TCTGGTTCCCCAGTAGAGCTCTACTGCTCAACCCAAGGGGATTTTATGTCTGGGCGAG
2041   AAACACTCAAGTTGATTAGAAAGACCAGGCCAATGTCAGGGTACCTGGGGCCAAACCCAC
2101   CTGCTAGTGTGAATTAAGTACTTTAATTTTGTCTGTGGAGGTGAAAAAGCAACATT
2161   CATAGTCTTTGGAGAAATGCTTAGAAATTCAGCATTGACCCTTGCTGTGAATTAAGCCC
2221   AATTAATCCTGTTTGTCTACATATGATCTGTCTGTGGCAAAAAGTTAATCAGAGGAAAT
2281   TCTTTCCAGTCTGTGATTTATGCCTCAGCCACTGCCTGTGCTACAATTCATTGTGTT
2341   ACCTGTAGATTGAGTAATACAACTATATATAATCATCAAGTAATACAACTAATTTAG
2401   TAATGATGCTGGGTTAAGTATTATAGGCCCTGTGCTGCTGTGAGAAAAAAAATTTTACA
2461   TGATGCACTTCAAATTCAAATAAAAAATCCTTTTGGCATGTTCCCAATTTTGGCTTAGCTCA
2521   ATTAGTGTGGCTAACCAAGAGATAACTGTAATGTGACATTGATTTGCTCTTACTACAGC
2581   TTCAGTATTGGGGGAGGAAAAAGTCCCAACCCAATGGGCTCAAACTTCTAAGGGGTACTC
2641   CTCTCATCCCCCTATCCTTCTCCCTCGACATTTTCTCCCTCTTCTTCCCATGACCCCAA
2701   AGCCAAGGGCAACAGATCAGTAAAGAACGTGGTCAAGTAGAACCCCTGAAGATTTTTT
2761   AATCCTACCTCAAAATTTAACAGTTACCTGAGAGATTTAACATTATCTAGTTCAATGAAT
2821   CATTGTATGTGGTTCATGGATAAATGACACCTTGGAAATTCGCTTTCTAAAGGAAATCAA
2881   ATGAATGGAGGAACCTTCCAAACACCCTTACTTGTGTTATATAGCCAAATAACTATC

```

2941 TCTACTGAATGTCATTGAAAACTAAAAATTAACCTATTACAAATAGGT

La traslación del mRNA da lugar a una proteína con un peso molecular de 57.752 Kb, formada por 503 residuos aa., cuya secuencia es:

```
1      mvlemlnpih ynitsivpea mpaatmpvll ltglflvwn yegtssipgp gycmgigpli
61     shgrflwmgi gsacnyynrv ygefmrwvis geetliisks ssmfhimkhn hyssrfgskl
121    glqcigmhek giufnnnpel wktrpffmk alsppglvrm vtvaeslkt hldrleevtn
181    esgyvdvltl lrrvmltdsn tflriplde saivvkiqgy fdawqallik pdiffkiswl
241    ykkyeksvkd lkdaievlia ekrrristee kleecmdfat elilaekrgd ltrenvnqci
301    lemliapdt msvslffmlf liakhpvnee aiikeiqtvi gerdikiddi qklkvmenfi
361    yesmryqpvv dlvmrkaled dvidgypvkk gtniilnigr mhrleffpkp neftlenfak
421    nvpyryfqpfgfgprgcagk yiamvmmkai lvtllrrfhv ktlqgqcves iqkihdlsh
481    pdetknmlem iftrnsdrc leh
```

(PubMed-Protein, n° de acceso: NP000094)

Los residuos 48-485 son los que la definen como una proteína perteneciente a la familia del citocromo P450 y el residuo 437 es el "heme binding site".

La expresión del gen CYP19 está regulada por promotores específicos del tejido que producen, de forma alternativa, exones 5'-no trasladados.

Se han descrito varios promotores para la expresión de la aromatasa:

En la placenta, los promotores son el P-I.1 y el P-I.2 (Mahendroo y col., 1993; Means y col., 2005).

En el tejido adiposo los promotores son el P-I.3 y el P-I.4, de los que el P-I.4 se expresa en el tejido adiposo de la mama (Mahendroo y col., 1993). Los mismos autores demostraron que, dependiendo del ambiente hormonal, principalmente glucocorticoides y de la activación por cAMP, el promotor P-II podría participar en la expresión de la aromatasa en el tejido adiposo.

En el ovario la expresión de aromatasa está regida por el promotor P-II (Simpsons y col., 1994), principalmente en el cuerpo lúteo (Means y col., 2005); si bien, en determinadas especies, también participan otros promotores como el I.3 en humanos (Jenkins y col., 1993) o el I.r en el conejo (Bouraima y col., 2001).

La participación de los promotores está inducida por agentes extra e intracelulares, por ejemplo, en las células de la granulosa ovárica la expresión del CYP19 se induce por la actuación de FSH y LH a través del cAMP (Fitzpatrick y Richards, 1994; Andrieu y col., 2006).

### **Aromatasa hipofisaria. Adenomas hipofisarios.**

Es bien conocido que la hipófisis sufre cambios dinámicos con la edad, dependiendo del estado endocrino general. Pero además, es una glándula sexualmente dimórfica porque:

- ✓ Los porcentajes de los distintos tipos de células glandulares son diferentes dependiendo del sexo.
- ✓ La secreción de las hormonas hipofisarias sigue ritmos o patrones bastantes constantes, pero que son distintos en los machos que en las hembras.

- ✓ Las respuestas a los reguladores endocrinos también son diferentes de un sexo a otro.
- ✓ Además, la hipófisis es la encargada de la regulación de los ciclos gonadales y gran parte de sus células responden de forma específica a los estrógenos.

El estradiol es un esteroide gonadal que actúa como agente regulador del sistema endocrino actuando sobre la hipófisis y también sobre el hipotálamo, de forma que ejerce un mecanismo de feed back regulador sobre las hormonas gonadotropas FSH y LH, principalmente inhibidor.

Desde los años 70, se sabe que el estradiol estimula la síntesis y liberación de prolactina, estimula la proliferación de las células productoras de dicha hormona e, incluso, se pueden generar prolactinomas inducidos mediante el tratamiento crónico con estradiol.

En nuestro laboratorio demostramos que, además, estimulaba la secreción de VIP hipofisario (Vázquez Perfecto, 1994) y modifica el patrón sexual secretor de GH (Carretero y col., 1990). Al margen de variar otros factores reguladores hipofisarios, como la galanina, demostrado por otros autores (Ponchon y col., 2000).

### **Prolactina.**

En relación con nuestro estudio, de todas las hormonas hipofisarias nos interesa principalmente la prolactina. Esta hormona se sintetiza bajo la influencia del estradiol, es de naturaleza proteica encargada de la regulación de la lactación, que participa en la regulación del eje hipotálamo-hipofisogonadal, tiene un leve efecto somatotropo e interviene en la regulación del sistema inmune.

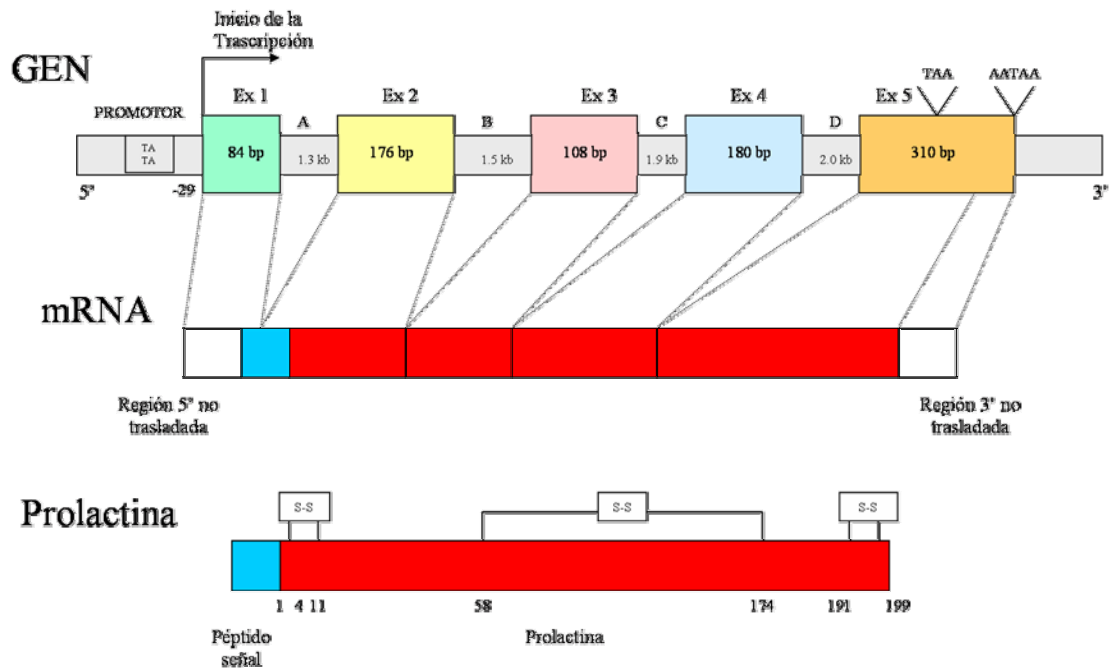
Su síntesis se realiza, principalmente, en las células lactotropas de la hipófisis y, como el resto de las hormonas hipofisarias, es liberada a los vasos hipofisarios para ejercer sus acciones a distancia.

La síntesis de prolactina está codificada por el gen de la prolactina situado en el cromosoma 6 en el hombre y en el cromosoma 17 en la rata.

Es un gen de unos 10kb de longitud que contiene 5 exones separados por 4 grandes intrones.

De la molécula de pre-prolactina que se forma, el péptido señal que deriva de la mitad 3' del exón 1 y del tercio 5' del segundo. El resto, que constituye la propia molécula hormonal, deriva de los dos tercios 3' del exón 2 (aa. 1-40), el exón 3 (aa. 41-76), el exón 4 (aa. 77-136) y los dos tercios 5' del exón 5 (aa. 137-199).





Representación del gen, mRNA y proteína de la prolactina en la especie humana.

### Evidencias de la presencia de la Aromatasa en la hipófisis.

Empleando un anticuerpo anti Aromatasa P450 altamente específico, cedido por el Prof. Hutchinson (Cambridge, Reino Unido), en nuestro laboratorio se ha demostrado, in vivo e in vitro, la expresión inmunocitoquímica de la aromatasa P450 en la hipófisis de la rata. Esta localización del enzima es diferente de un sexo al otro (Carretero y col., 1999a).

Además, mediante inmunocitoquímica, previamente a nuestro estudio, también en nuestro laboratorio, se demostró que las células positivas al enzima se evidencian a partir del día 17 del desarrollo embrionario, siendo más marcadas y numerosas desde el día 19 hasta el parto (Carretero y col., 1999b). Postnatalmente, es a partir de la pubertad, en torno a los 21 días de edad, cuando comienzan a marcarse las diferencias entre machos y hembras (Carretero y col., 2003). El mayor número de células reactivas que se observa por inmunocitoquímica se corresponde con una mayor concentración del enzima como se demostró mediante western blotting.

Junto a ello, se comprobó que las hipófisis no tumorales de ratas viejas no expresan el enzima (Carretero y col., 1998a), lo que podría ser una característica de la evolución postnatal del enzima en respuesta a un déficit de la secreción de testosterona, poco probable, o a la aromatización periférica de la testosterona en el periodo senil (Harman y Tsitouras, 1980). También podría perderse la capacidad de síntesis glandular, ya que es

conocido que con la edad, la producción de hormonas hipofisarias decae de una manera significativa y lo mismo podría ocurrir con los enzimas que participan en la síntesis hormonal.

La actuación de la aromatasa hipofisaria tiene sentido funcional siempre y cuando la hipófisis posea los receptores estrogénicos necesarios para la actuación del esteroide. La literatura recoge bien como la hipófisis presenta receptores estrogénicos, principalmente del tipo alfa.

Ya que el estradiol es capaz de inducir la aparición de prolactinomas en tratamientos crónicos, a partir de 1998 nuestro laboratorio comenzó a analizar si la producción hipofisaria de estradiol por actuación de la aromatasa guardaba o no relación con la aparición de prolactinomas espontáneos. Interrogante que adquiriría una especial relevancia si se considera, como hemos comentado anteriormente, que la hipófisis no tumoral de ratas mayores de 24 meses apenas presenta células positivas a la aromatasa y, la cantidad de enzima presente en la hipófisis en el western blotting, es mucho menor que la observada en los animales adultos.

Los tumores hipofisarios no metastáticos son el problema tumoral intracraneal más frecuente en el adulto, junto con los meningiomas. Aunque hay variaciones en la prevalencia dependiendo de las series estudiadas, se ha descrito que del 10 al 23% de los tumores intracraneales son tumores hipofisarios originados a partir de células glandulares (Molitch y Russell, 1990).

La incidencia de estos tumores se acentúa con la edad, de manera que, en roedores viejos su incidencia es muy alta y en la especie humana existen estadísticas estadounidenses que cifran en un 35% los casos de incidencia, no diagnosticada, en autopsias por encima de 75 años (Berkvens y col., 1980; McComb y col., 1984; Herzog y Schlote, 1992).

De todos los tumores hipofisarios, los prolactinomas son los más frecuentes, llegando en algunas series de roedores hasta el 80% (Meites, 1982; Sarkar y col., 1982).

Como resultado de los estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, se sabe que la hipófisis tumoral de ratas viejas, al contrario de lo que ocurre en las no tumorales, produce aromatasa. Casi el 70% de los adenomas hipofisarios presentan células positivas, independientemente de los tipos anatomopatológicos de los tumores. Lo más importante a este respecto es que se demostró que el 100% de los prolactinomas puros espontáneos en ratas viejas expresan el enzima. Lo que sugiere que la producción local de estradiol por acción de la aromatasa podría estar implicada en la génesis de los



Representación tridimensional de la estructura de AIB-1

prolactinomas (Carretero y col., 2002).

### Los coactivadores de receptores estrogénicos. AIB-1

Algunas proteínas, conocidas como coactivadores, han sido identificadas e implicadas en los mecanismos de activación transcripcional de los receptores estrogénicos, de manera que ahora se las considera importantes moduladores de los efectos hormonales en los órganos diana (Misiti y col., 1998; Nagy y col., 1999; Shang y col., 2000; Leo and Chen, 2000).

La proteína AIB-1, también conocida como SRC-3, RAC-3, ACTR, NCoA3, TRAM1 y p/CIP, es un coactivador del receptor estrogénico perteneciente a la familia de la proteína p160.

EL empaquetamiento del DNA en forma de nucleosomas es un efectivo sistema para mantener organizada la cromatina dentro del núcleo; sin embargo, esto supone serios problemas para que se lleven a cabo algunos procesos intranucleares de gran importancia para el funcionamiento de la célula como la transcripción de genes o la replicación del genoma o del DNA total.

Estos procesos intranucleares pueden llevarse a cabo con una reestructuración de la cromatina, lo que es posible gracias a la actuación de un grupo de enzimas llamados remodeladores de la cromatina.

Hay dos grupos de remodeladores: los complejos dependientes de ATP y los enzimas catalizadores de las modificaciones post-traduccionales en histonas.

Una de las familias de enzimas remodeladores de la cromatina más conocida es la familia de la proteína p160. La familia de p160 está formada por 3 miembros conocidos: SRC-1, TIF2 (SRC-2) y AIB1 (SRC-3).

AIB1 se identificó inicialmente como un gen que se sobre-expresa en el amplicón 20q, comúnmente activado en el cáncer de mama y de ovario. Es uno de los tres miembros de la familia de p160 cuya implicación en el cáncer está plenamente demostrada, habiéndose comprobado su sobre-expresión en cánceres no ginecológicos, como el cáncer gástrico (Sakakura y col., 2000) el de páncreas (Ghadmi y col., 1999) de hígado (Wang y col., 2002b) y de colon (Xie y col., 2005).

Como el resto de los miembros de la familia de p160, AIB1 interacciona con receptores nucleares y, además, puede interactuar con el factor de transcripción c-myc (Zhang y col., 2004).

El gen que codifica a AIB-1 en la rata se localiza en el cromosoma 3 y su secuencia es la siguiente (acceso PubMed XP 001072953):

```
1 mslglessld platesrkrk lpcdapgqgl vysgekwrrre qeskyieela elisanlsdi
61 dnfnvkdpc ailketvrqi rqikeygkti ssdddvqkad vsstggqvid kdsigppllq
121 aldgflfvn rdgnivfse nvtqylqykq edlvntsvys ilheqdrkdf lkhvpkstvn
181 gvswtnenqr qkshftncrm lmkthdiled tnapetrqr yetmqcfals qpramleege
241 dlqccmicva rrvttdrpfp sspesfith dlsgkvvnid tnslrssmrp gfedtirrci
301 qrffslndgq swsqkrhyqe ayihghaetp vyrflsladgt ivsaqtkskl frnptndrh
361 gfvstflqr eqngcrpnpn pvgqgirppa agcgmslsps qsvqmlgsrt ygvadpsntg
421 qmagarygas ssvasltpgq slqspssyqs nsyglmssp phgspglgpn qqnimisprn
481 rgspkmarshq fspaagvhsp mgssgntgsh sfsssslsal qaisevgvts llstlsspgp
```

541 kldnsnmmni nqpskassqd sksplglyce qnpvessvcp snsrhdpsdk enkensgeas  
601 etprgplek ghkklqllt cssddrghss ltinspldsnc kdssisvtsp sgvsstsga  
661 vsstsnmhgs llqekhrlh kllqngnsa evakitaeat gkdtststasg gegsvrqq  
721 spkkkennal lryllrdp sdvlakelqp qadggdskls qcscstnpss gqekdpkikt  
781 easeevsgdl dnldailgd tssdfynspt ngshpgakqq mfagpssgl rspqpvqsvr  
841 ppynralsld spsvsvgsvp vknvsafpvl pkqpilagnp rmmndsqenyg anmggpnrnv  
901 pvnptsssgd wglansrasr meplassplg raggdysaal prpalgssgp tlprsnrlp  
961 garptlqpp qqqqqqqqq qqqqqqqmlq mragevpmgm gvspypavp snqpgswpeg  
1021 mlsmeqgphg aqnrpllrns ldellgppsn pegqsderal ldqhltilsn tdatgleid  
1081 ralpipelvs qgqaleskqd vfgqeaavm mdqkaalygq typaqgpplq ggfhlgqsp  
1141 slnsmmqs qqsflpqlg hprasmvrpr tntpkqlrmq lqrlqgqqf lnqsrqalem  
1201 kmesptgaav mrpmlqsqaf fnaqmaaqqk relmnhhlq qrmammmsqp qpqafpppn  
1261 vtaspsmdgv lagsampqap pqqfpyatny gmgqqpepaf grgssppsam mssrmgpsqn  
1321 amvqhptap myqssemkgw psgnlarns fpqqqfapqa npaaynmvvhm nssgshlgqm  
1381 tmtmpmmsgm pmgpdqkyc

Su transcripción da lugar a la proteína cuya secuencia aminoácida es:

IIRRCIQRFSLNDGQSWSQKRHYQEAYIHGHAETPVYRFLAD  
GTIVSAQTKSKLFRNPVTNDRHGFVSTHFLQREQNGCRPNPILQDKGIRPPAAGCGMS  
LSPSQSVQMLGSRTYGVADPSNTGQMAGARYGASSVAVSLTPGQSLQSPSSYQNSYQ  
LNMSSPPHGSPLGPNQONIMISPRNRGSPKMASHQFSPAAGVHSPMGSSGNTGSHSF  
SSSSLALQAISEGVTSLSTLSSPGPKLDNSPNMNIQPSKASSQDSKSPGLGLYCE  
QNPVESSVCPNSRDPPVTKENKENSGEASETPRGPLESKGHKLLQLLTCSSDDRGH  
SSLTNSPLDSNCKDSSISVTSVSGVSSSTSGAVSSTSNMHGSLQEKHRLHKLQNG  
NSPAEVAKITAEATGKDTSTASGGEGSVXQEQLSPXKKNALLRYLLDRDDPSDVL  
AKELQPQADGGDSKLSQCSCXTNPSSGQEKDPKIKTEEVSGDLNLDAILGDLTSSDF  
YNSPTNGSHPGAKQQMFAQPSLGLRSPQPVQSVRPPYNRALSLSVSVGSPVPPVKN  
VSAFPVLPKQPILAGNPRMMSQENYGANMGGPNRNVPNPTSSSGDWGLANSRASRM  
EPLASSPLGRAGGDYSAALPRPALGSSGPTLPLRSNRLPGARPTLMLQMRAGEVPMGM  
GVSPYPAVPSNQPGSWPEGMLSMEQGPHGAQNRPLLRNSLDELGPPSNPEGQSDER  
ALLDQLHTLLSNTDGTGLEIDRALGIPELVSQQALESKQDVFQGEAAVMMDQKAA  
LYGQTYPAQGPPPLQGGFHLQGGQSPSLNSMMSQISQQGSFPLQGLHPRASMVRPRTNTP  
KQLRMQLQQRLLQGGQFLNQSRQALEMKMESPTGAAVMRPMLQSQAFFNAQMAAQQR  
ELMNHHLQQRMMAMMMSQPQAFSPPPNVTASPSMDGVLGASAMPQAPPQQFPYATN  
YGMGQPPPEPAFGRGSSPPSAMSRRMGPSONAMVQHPQTAPMYQSSEMKGWPSGNLAR  
NGSFPQQQFAPQANPAAYNMVHMNSSGSHLGQMTMTPMPSGMPMGPDPQKYC

En la especie humana, el gen de AIB1 se encuentra en el cromosoma 20 (región q12). Su transcripción se realiza en el sentido centrómero a telómero, a lo largo de más de 155 kilobases que conforman 23 exones.

La proteína AIB1 está formada por 1424 aminoácidos con un peso molecular de 155kDa y una movilidad electroforética de unos 180 kDa.

Mediante northern blot se ha demostrado la expresión del gen de AIB1 en muchos órganos y tejidos, como: útero, hipófisis, placenta, riñón, páncreas, pulmón, cerebro, hígado, corazón, mama y testículo; mientras que mediante inmunocitoquímica se ha localizado la proteína principalmente en células epiteliales de la mama, los ovocitos, el epitelio vaginal, los hepatocitos, las fibras musculares lisas, los vasos sanguíneos los oviductos y el hipocampo (Xu y col., 2000).

La proteína AIB1 codificada tiene un 50% de similitud de secuencia con SRC-1 y un 55% con TIF2, y una identidad del 43% con SRC-1 y del 48% con TIF2 (Xu y Li, 2003). Al igual que los otros miembros de la familia de p160, AIB1 presenta un dominio bHLH/PAS en la zona amino-terminal (Huang y col., 1993), siete dominios LXXLL repartidos por toda su secuencia (Torchia y col., 1997) y dos dominios de activación de transcripción AD1 y AD2 en su extremo carboxi-terminal, que son responsables de la interacción con coactivadores generales de la transcripción como CBP/p300 (Li y col., 2000).

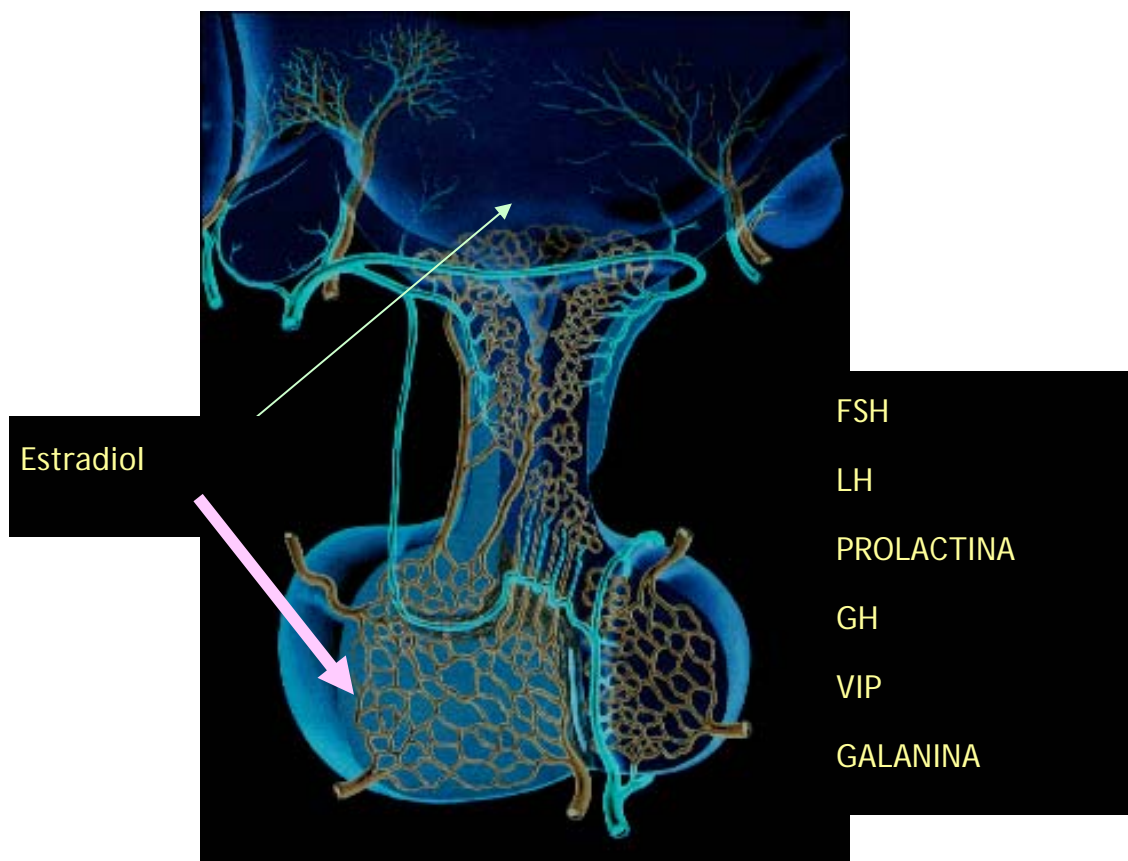
AIB1 resulta esencial en el desarrollo y el crecimiento normal, la pubertad, el funcionamiento del aparato genital femenino y en la morfogénesis de la mama (Xu y col., 2000).

AIB-1 es necesario para que las células normales y las tumorales entren en la fase S del ciclo celular, controlando la expresión de genes importantes en la iniciación de la replicación del DNA, entre los que se encuentran: cdc6, cdc25A, MCM7, ciclina E y Cdk2 (Louie y col., 2006).

AIB-1 ha adquirido una gran relevancia al conocerse que las distintas respuestas a los esteroides sexuales, que se producen en los tumores hormono-dependientes, están fuertemente influidas por las cantidades relativas de las proteínas coactivadores como AIB-1 (Hudelist y col., 2003).

**Hipótesis del estudio.**

El estradiol es un esteroide gonadal que actúa como agente regulador del sistema endocrino actuando sobre la hipófisis y también sobre el hipotálamo, de forma que ejerce un mecanismo de feed back regulador, principalmente inhibitor, sobre las hormonas gonadotropas FSH y LH. Pero además, desde los años 70 se sabe que el estradiol estimula la síntesis y liberación de prolactina, estimula la proliferación de las células productoras de dicha hormona e, incluso, se pueden generar prolactinomas inducidos mediante el tratamiento crónico con estradiol. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que, además estimulaba la secreción de VIP hipofisario y modifica el patrón sexual secretor de GH. Al margen de variar otros factores reguladores hipofisarios, como la galanina.



### Prolactinomas y su patogénesis.

Las primeras descripciones de un síndrome que asociaba galactorrea con amenorrea datan de principios de los años treinta (Ahumada y Del Castillo, 1932; Krestin, 1932).

Los prolactinomas han sido considerados como el adenoma hipofisario secretor de hormonas más frecuente tanto en series de autopsia como en series quirúrgicas (Horvath y Kovacs, 1991).

En general, clínicamente los prolactinomas se clasifican de acuerdo a su tamaño, de forma que en la especie humana se considera microadenoma a un tumor de menos de 10mm de diámetro y un macroadenoma al que sobrepasa esa medida, existiendo además el macroadenoma supraselar que sobrepasa los límites de la silla turca.

EL grado de invasión y el tamaño del tumor son importantes en clínica, ya que el tumor supraselar de grado III o grado IV de Hardy (1973) al invadir estructura óseas vecinas de forma focal o difusa, presenta resistencia al tratamiento médico farmacológico y dificulta, sobre todo en los de grado IV, el tratamiento quirúrgico.

La conclusión que se obtiene después de analizar múltiples publicaciones sobre la incidencia de los adenomas hipofisarios es que del 5 al 10% de la población adulta presenta un microprolactinoma (Susman, 1933; Sommers, 1959; McCormick y Halmi, 1971; Landolt, 1980; Mosca y col., 1980; Parent y col., 1981; Muhr y col., 1981; Von Schwezinger y Warzok, 1982; Coulon y col., 1983; Siquiera y Guembarovski, 1984; Abd El-Hamid y col., 1988; Sano y col., 1993; Teramoto y col., 1994).

EL hecho de que un porcentaje mínimo de microprolactinomas se transformen en macroadenomas (Molitch, 2002) y que los microadenomas son más resistentes al tratamiento con agonistas dopaminérgicos que los macroprolactinomas (Spada y col., 1983; Serri y col., 1983) sugiere que puedan ser dos entidades nosológicas diferentes o, al menos, tener diferente patogénesis, si bien los macroadenomas han sido previamente microadenomas.

Existen muchas hipótesis sobre la patogénesis de los prolactinomas, aunque ninguna de ellas es totalmente convincente.

Se ha planteado que un defecto primario hipotalámico en la regulación de prolactina, tal como un defecto en el tono dopaminérgico, podría ser la causa o al menos facilitar el crecimiento de este tipo de tumores (Fine y Frohman, 1978; Van Loon, 1978). También se ha discutido si el defecto del tono dopaminérgico es un fallo funcional (Fine y Frohman, 1978) o se debe a una alteración en la sensibilidad de las células lactotropas a la dopamina ya que se ha postulado que los estrógenos inducen una alteración en la irrigación de la hipófisis (Elias y Weiner, 1984).

La hipótesis del fallo funcional se basaba en el defecto de la respuesta a L-dopa tras la administración de carbidopa (Fine y Frohman, 1978) pero posteriormente se demostró que esto era reversible (Molitch, 1982; Barbarino y col., 1982).

También podría deberse a un descenso en las cantidades de dopamina que llega hasta la hipófisis, si el sistema porta hipofisario estuviera modificado por



la presencia de arterias que aportan más sangre a la hipófisis y diluirían la cantidad de dopamina que llega al tumor (Schetchter y col., 1988); sin embargo, las hipófisis normales presentan arterias terminales sin que se desarrollen tumores (Gorczyca y Hardy, 1987); incluso hay autores que defienden que la hipófisis no tumoral o los prolactinomas no presentan arterias terminales (Erroi y col., 1986).

Los resultados obtenidos en los estudios sobre la sensibilidad de los prolactinomas a la acción dopaminérgica son conflictivos por presentar resultados contradictorios (Reschini y col., 1980; Bansal y col., 1981; Serri y col., 1983; Martin y col., 1984; Ho y col., 1984; 1986). Una posibilidad a este respecto podría ser un descenso en el número de receptores de alta afinidad a dopamina que presentan los prolactinomas con respecto a la hipófisis no tumoral (Bression y col., 1980).

También se ha planteado que los cambios hipotalámicos son secundarios a los tumores y que los tumores son en realidad desórdenes intrínsecos de la hipófisis.

El hecho de que, en la mayoría de los pacientes, la dinámica de la secreción de prolactina se normalice después de la resección del tumor, sugiere que la mayoría de los pacientes con prolactinomas tienen un sistema hipotalámico regulador dentro de parámetros de normalidad (Reichlin y Molitch, 1984; Rodman y col., 1984) y que posibles anomalías en respuestas a secretagogos, se deben más al feed back derivado de la hiperprolactinemia del tumor que activa al sistema dopaminérgico hipotalámico y a las características intrínsecas de las células tumorales que a un desajuste del sistema regulador hipotalámico.

Los estudios realizados con biología molecular han demostrado, hasta la fecha, que los prolactinomas se originan a partir de una célula alterada que acaba desarrollando el tumor, lo que se conoce como monoclonalidad del tumor, (Herman y col., 1990; Jacoby y col., 1990) lo que no excluye la posibilidad de que exista un papel hipotalámico facilitando el desarrollo del tumor a partir de la célula alterada (Herman y col., 1990).

Con el empleo de las técnicas de biología molecular, se han analizado las posibles mutaciones específicas que podrían estar implicadas en la génesis y desarrollo de los prolactinomas.

En la literatura se han analizado las mutaciones en la pérdida de función de los receptores  $D_2$  (Friedman y col., 1994), mutaciones activadoras del receptor de TRH (Faccenda y col., 1996; Yamada y col., 1997) o mutaciones de las proteínas G que asocian al receptor  $D_2$  con la adenilato ciclasa (Barlier y col., 1997; Oyesiku y col., 1997), sin que en ninguno de los casos se pudiera demostrar la existencia de tales mutaciones ni su relación con el desarrollo de prolactinomas.

Existen descensos en las proteínas  $G_{i2\alpha}$  en algunos prolactinomas resistentes a la bromocriptina (Barlier y col., 1997) y descensos en la isoforma corta del receptor  $D_2$  que podría implicar una disminución en la inhibición de la

adenilato ciclasa (Caccavelli y col., 1994). Pero esos prolactinomas tan sólo constituyen del 8 al 15% de los prolactinomas.

Hay dos factores de transcripción de gran importancia en la diferenciación y proliferación de las células lactotropas, el Pit-1 y el Prop-1. Sin embargo, aunque ambos se expresan en los prolactinomas (Asa y col., 1993; Yamada y col., 1996; Sanno y col., 1996; Ikuyama y col., 1998; Nakamura y col., 1999), no se han encontrado mutaciones o alteraciones para ninguno de los dos (Pelligrini-Bouiller y col., 1997; Nakamujra y col., 1999).

También se han estudiado múltiples oncogenes y alteraciones en genes supresores de tumores, sin que se hayan encontrado evidencias de amplificación o redistribución de *N-ras*, *H-ras*, *K-ras*, *myc II*, *N-myc*, *c-myc*, *Myb*, *blc1*, *h-SF1*, *p16*, *p27*, *p53*, *sea*, *nm23* o *c-fos* (Boggild y col., 1994; Pei y col., 1994; Woloschak y col., 1994; Cai y col., 1994; Clayton y col., 1997; Shimon y col., 1997).

En definitiva, la mayoría de los prolactinomas surgen como una enfermedad intrínseca de la hipófisis y no como resultado de una disfunción hipotalámica, sin que se conozcan bien las mutaciones somáticas específicas que dan como resultado la aparición de los prolactinomas.

Por otro lado, los tumores hipofisarios y, en particular, los prolactinomas son tumores hormono-dependientes. Se sabe que el estradiol induce hiperplasia hipofisaria y prolactinomas después de tratamientos crónicos (McEuen y col., 1936; Clifton y Meyer, 1956; Clifton y Furth, 1961; Wingrave y col., 1980; Phelps and Hymer, 1983; Gooren y col., 1988; Molitch, 2001; Heany y col., 2002).

Además, el estradiol induce la proliferación de las células de prolactina (Lloyd y col., 1975; Perez y col., 1986) y en este efecto podría estar implicado AIB1, ya que se ha comprobado que AIB1 aumenta la inducción estrógeno-dependiente de expresión de la ciclina D1, lo que representa una de las posibles rutas que confieren a los estrógenos su papel de estimulador de la división celular (Planas-Silva y col., 2001).

Aunque los carcinomas hipofisarios son poco frecuentes, su génesis a partir de adenomas supraselares y la relación que ello pueda tener con la presencia de p53 es un dato poco conocido, pero que podría ser de gran interés (Kaltsas y col., 2005).

La estimación inmunocitoquímica de la expresión de p53 ha sido muy estudiada de cara a establecer un significado pronóstico (Hollstein y col., 1994; Thapar y col., 1996). Aunque se han descrito algunos casos de carcinoma hipofisario negativos a p53 (Nose-Alberti y col., 1998; Kumar y col., 2001; Roncaroli y col., 2003a,b) la mayoría de los estudios han demostrado su presencia o el aumento de la expresión inmunocitoquímica de la proteína, durante la progresión de los adenomas a carcinomas y en la mayoría de sus metástasis (Thapar y col., 1996b; Gaffey y col., 2002; Oliveira col., 2002; Ironside, 2003).

La predicción de la agresividad del tumor y de forma particular su comportamiento maligno se refleja principalmente por la presencia de tinción nuclear para la proteína, por tanto la presencia o ausencia de p53 podría tener un gran significado biológico (Thapar y col., 1996a).

*Sin embargo, la expresión de AIB1 y su correlación con la expresión de la aromatasa, enzima responsable de la aromatización local de testosterona a estradiol; así como, la correlación con la expresión el receptor estrogénico  $\alpha$  en estos tumores, aún no ha sido analizada y por tanto la posible correlación entre la expresión de AIB1 y la proteína p53 en prolactinomas positivos a la aromatasa y positivos al receptor estrogénico  $\alpha$ .*

*Dado que el receptor estrogénico  $\alpha$  y las proteínas AIB1 y p53 podrían ser factores importantes en la génesis y desarrollo de tumores estrógeno-dependientes y, en particular, de los prolactinomas, siendo de sumo interés comprobar su posible participación y su presencia en los prolactinomas humanos no inducidos ni iatrogénico, conocer su significado biológico y la progresión de los adenomas.*

## Diseño Experimental.

Este trabajo nace como un intento de dar respuesta a la correlación de la expresión en prolactinomas humanos del enzima aromatasa P450, aún no demostrada, la expresión del receptor estrogénico  $\alpha$ , el coactivador de dicho receptor AIB-1 y la presencia de la proteína antitumoral p53.

Para ello, se desarrolla el siguiente diseño experimental:

Después de caracterizar una serie de 87 adenomas hipofisarios humanos, se caracterizaron los prolactinomas mediante la historia clínica y la comprobación de hiperprolactinemia con niveles superiores a 300 ng/mL, se propone realizar:

- ✓ El estudio morfológico de las células lactotropas mediante inmunocitoquímica para prolactina.
- ✓ El análisis de la presencia de aromatasa p450 mediante inmunocitoquímica y western blotting.
- ✓ La demostración de la síntesis hipofisaria de aromatasa mediante la caracterización de su mRNA por hibridación in situ.
- ✓ La demostración de la presencia de receptor estrogénico  $\alpha$ , mediante inmunocitoquímica
- ✓ La demostración del coactivador de receptor estrogénico AIB-1 mediante inmunocitoquímica.
- ✓ La demostración de la presencia de p53 mediante inmunocitoquímica.

## **Material y Métodos**

### **Muestras y procesado de las mismas.**

Para nuestro estudio hemos empleado una serie de 87 adenomas humanos no inducidos por tratamientos previos; todos ellos fueron diagnosticados previamente con acuerdo a criterios clínicos y se obtuvieron a partir del banco de muestras del Servicio de Anatomía Patológica y procedentes de la extirpación quirúrgica de los tumores en el Servicio de Neurocirugía (Unidad Virgen de la Vega del Hospital Universitario de Salamanca) entre los años 1991 y 2002, contando en todos los casos con el preceptivo consentimiento informado de los pacientes.

Además, se han analizado 8 hipófisis humanas no tumorales, obtenidas a partir de autopsias clínicas, de personas sin antecedentes clínicos endocrinológicos previos y de características de edad y sexo semejantes a los pacientes con tumores.

Las muestras tumorales se obtuvieron de hipofisectomías neuroquirúrgicas regladas mediante aspiración, lo que justifica la no existencia de bordes bien delimitados en las muestras procesadas.

Tras su obtención, las muestras fueron fijadas por inmersión en parformaldehído al 4% en tampón fosfato (PBS: 0.1M, pH 7.4) durante 24 horas a 4°C.

Antes de su fijación, una porción de cada muestra fue separada sin proceder a su fijación y congelada en nitrógeno líquido para su procesado mediante western blotting.

Las muestras fijadas se deshidrataron en etanol y tras pases por xileno se incluyeron en parafina, obteniéndose cortes seriados de 5µm de grosor a partir de los bloques parafinados, para su estudio inmunocitoquímico.

### **Determinación de los niveles basales de prolactina.**

En todos los casos estudiados se tomaron muestras de sangre venosa periférica que fueron centrifugados a 3000 rpm, durante 15 minutos, a 4° C con la finalidad de separar la fracción celular del suero.

Las muestras de suero fueron congeladas hasta el día del análisis.

La determinación de los niveles séricos de prolactina se realizó mediante ELISA, empleando el kit de Bioserv Diagnostic (BS-85-25) y siguiendo los pasos indicados por el fabricante. Los valores estándar fueron de 3.8 a 23.2 ng/mL para mujeres y de 3.0 a 14.7 ng/mL para varones; siendo los valores superiores a 300ng/mL indicativos de la presencia de un prolactinoma.

### **Inmunocitoquímica.**

Los estudios inmunocitoquímicos se han realizado empleando métodos enzimáticos de marcaje simple con Biotina-Estreptoavidina-Peroxidasa que se reveló con 3-3'diaminobencidina (Sigma).

## Anticuerpos empleados.

Se han empleado los siguientes anticuerpos:

Suero policlonal obtenido en conejo anti-prolactina (Dako), diluido a 1:800 en TBS.

Suero monoclonal obtenido en ratón anti-receptor estrogénico  $\alpha$  (Alexis), diluido 1:400 en TBS.

Suero policlonal obtenido en conejo anti aromatasa P450 humana (Rb-SG 1230), diluido 1:500 en TBS.

Suero policlonal obtenido en conejo anti proteína P53 (Novocastra), diluido 1:250 en TBS

Suero policlonal obtenido en conejo anti AIB1 (cedido por Dr. J. Font de Mora), diluido 1:500 en TBS.

Suero policlonal biotinado obtenido en cabra anti IgG de conejo (Caltag), diluido a 1:150 en TBS

Suero policlonal biotinado obtenido en cabra anti IgG de ratón (Caltag), diluido a 1:150 en TBS

Complejo estroavidina-biotina (Caltag), diluido a 1:100 en TBS.

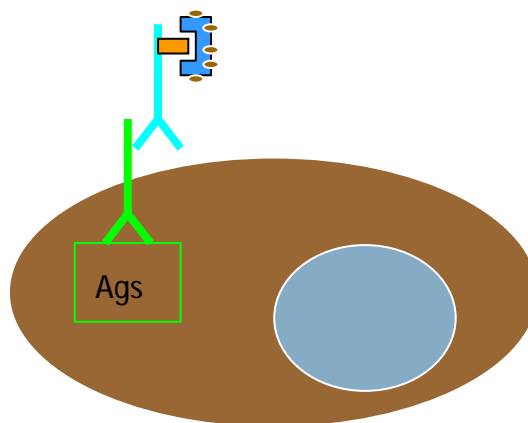
## Protocolo utilizado

En todos los casos, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante 18 horas en cámaras de humedad a 4°C.

Tras dos lavados en TBS durante 5 minutos cada uno, las muestras se incubaron con el suero secundario biotinado, durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Tras otros dos lavados en TBS de 5 minutos, las muestras se incubaron con el complejo estreptoavidinaperoxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Una vez eliminados los residuos mediante dos lavados de 5 minutos en TBS, se procedió a revelar la reacción empleando  $H_2O_2$  como sustrato para la peroxidasa y 3-3'-diaminobencidina (Sigma) como cromógeno, obteniéndose una coloración marrón allá donde se localizaba en antígeno a detectar.



## Especificidad del anticuerpo antiaromatasa.

La especificidad del anticuerpo utilizado fue confirmada por western blotting (ver más adelante), reemplazando el anticuerpo primario por suero de conejo no inmunizado o con suero de conejo inmunizado pero preabsorbido.

Para las pruebas de preabsorción del suero anti-aromatasa Rb-SG 1230 se empleó suero diluido a 1:500 en TBS que se incubó previamente con 50mg del péptido por mL de suero durante 24 horas a 4°C. El péptido utilizado fue la secuencia sintética NMLEMIFTPRNSDRCLEH, que se corresponde con los residuos 486-503 de la aromatasa P450 humana (Chen y col., 1986, Harada, 1988; PubMed accession number: P11511). Dicha secuencia fue la empleada para la obtención del anticuerpo policlonal anti-aromatasa.

Tras desarrollar el protocolo inmunocitoquímico con el suero preabsorbido no se obtuvo ninguna reacción.

### **Clasificación de los tumores.**

Los tumores se clasificaron en base al antígeno al que fueron positivos, dependiendo del marcador analizado.

En el caso de las células reactivas a hormonas, solo los tumores que mostraron una densidad de células reactivas mayor, al menos en un 35%, que los porcentajes establecidos para el tejido hipofisario no tumoral fueron considerados positivos.

### **Obtención del anticuerpo anti-aromatasa humana.**

El anticuerpo Rb-SG 1230 anti-aromatasa humana es un anticuerpo policlonal obtenido mediante dos semanas de inmunización y sangría en semanas alternativas según el protocolo de Sigma GenoSys®.

Para la inmunización se utilizó la secuencia peptídica NMLEMIFTPRNSDRCLEH, acoplada a la proteína transportadora KLH/MBS.

La secuencia se corresponde con los residuos 486-503 de la aromatasa P450 humana (Chen y col., 1986, Harada, 1988) PubMed accession number: P11511; EC number: 1.14.14.1.

Esta secuencia es altamente específica para la aromatasa P450 de acuerdo con los resultados obtenidos en BLASTP (prf: 1501399A, 1414201A, pir: O4HU19).

### **Western Blotting**

Para el western blotting de la aromatasa P450, los tumores empleados fueron congelados inmediatamente. Esta parte del estudio se ha realizado sólo con los 19 adenomas correspondientes a los años 2002 a 2005.

Los tejidos fueron lisados mediante homogenización en tampón de lisado (137 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 10% glycerol y 1% Tx-100, que contenía un cóctel de inhibidores de la





proteasa). El material insoluble se retiró mediante la centrifugación de los lisados a 10.000 rpm durante 10 minutos. La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo estándar Bradford.

50  $\mu$ g de proteína total de cada muestra (tumor) fue separada por pase electroforético en SDS-PAGE al 10%.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas durante 1 hora con leche en polvo desnatada al 5% en PBS.

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante toda la noche con suero pre-inmune o con suero policlonal de conejo anti-aromatasa P450 humana a dilución 1:500 en PBS.

Tras lavar los blots 3 x 15 minutos en PBS, fueron incubados con suero de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa (1:10.000 en PBS). Tras diversos lavados en PBS, los blots se revelaron con ECL (Amersham®), durante aproximadamente 2 minutos.

#### **Análisis densitométrico.**

Los blots obtenidos fueron analizados densitométricamente a partir de fotografías digitales de los mismos. Las fotografías se consiguieron mediante un sistema de iluminación controlado y ajustando los niveles de entrada y salida para la homogenización de las imágenes obtenidas, dicho ajuste se realizó con el programa Photoshop CS3.

El análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ de NIH para determinar los niveles relativos de la expresión de aromatasa P450.



## **Estadística**

Todos los valores obtenidos en las determinaciones cuantitativas y densitométricas se han procesado estadísticamente mediante análisis de la varianza y test de post-análisis tipo Bomferroni, aceptando como significativos valores de  $p < 0.05$ . Se ha empleado el programa informático GraphPad-Prism v 4.0

## **Sujetos de estudio.**

Los sujetos a estudiar fueron: 8 hipófisis humanas no tumorales obtenidas a partir de autopsias médico-legales y una serie de 87 adenomas hipofisarios humanos, previamente diagnosticados como tales e intervenidos quirúrgicamente, procedentes del Servicio de Anatomía Patológica de la Unidad Virgen de la Vega del Hospital Universitario de Salamanca.

Los tumores humanos se obtuvieron a partir de biopsias en extirpaciones quirúrgicas con consentimiento informado del paciente.

## **VARIABLES A CONTEMPLAR.**

En los distintos grupos de estudio planteados en el diseño experimental se analizan las siguientes variables:

Las variaciones morfológicas: forma, intensidad de reacción, forma y distribución nuclear, etc.

Las variaciones en el porcentaje de células positivas tras realizar los distintos marcajes inmunohistoquímicos empleados.

La prevalencia de los Prolactinomas.

El índice de expresión (porcentaje) de Aromatasa P450, p53, AIB1 y receptor estrogénico  $\alpha$  en las células hipofisarias.

## **Resultados**

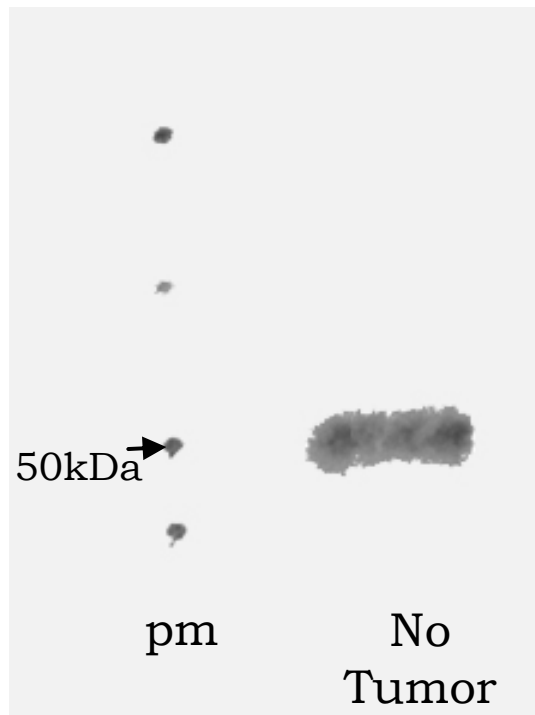
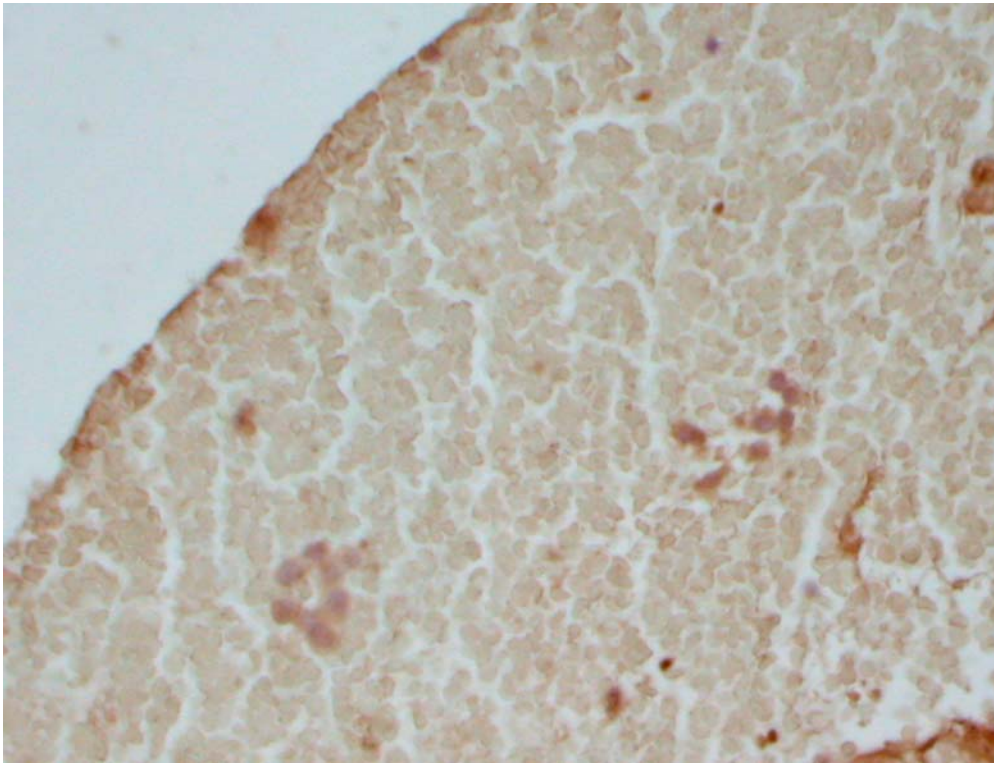
## Evidencia de la presencia de Aromatasa en la Hipófisis Humana.

El estudio de la hipófisis humana adulta no tumoral mediante inmunocitoquímica y western blotting demostró la presencia de la proteína enzimática.

Como muestra la imagen adyacente (porción superior), las células positivas a la aromatasa aparecieron aisladas o formando pequeños islotes de células bien reactivas.

El número de células positivas al enzima fue pequeño, tan sólo el  $4.85 \pm 0.01\%$  de las células fueron positivas.

El western de los lisados hipofisarios (imagen inferior) mostró la presencia de una única banda reactiva en torno a un peso molecular de 50 Kda indicativa de la presencia del enzima y de que éste no se había degradado o metabolizado en unidades más pequeñas.

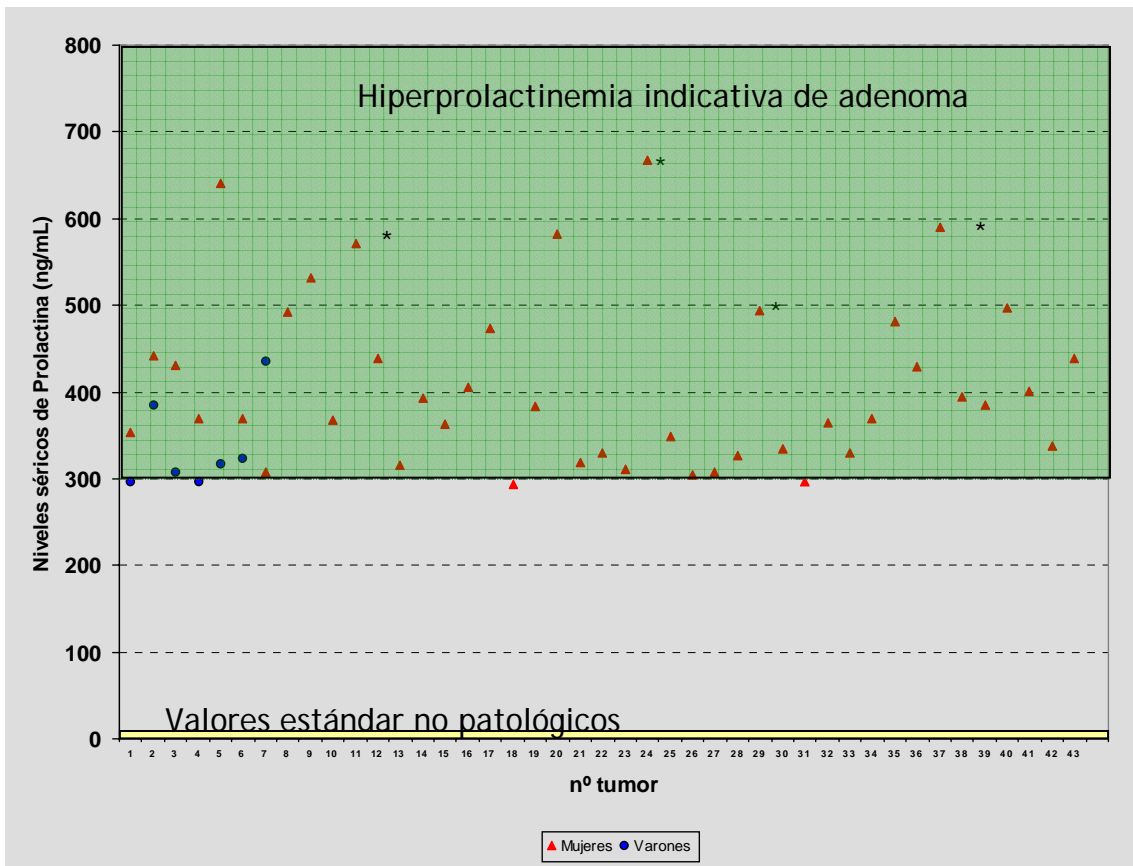


## Diagnóstico analítico de los Prolactinomas.

### Niveles séricos de Prolactina.

Junto a los datos variables de una historia clínica, caracterizados por amenorrea-galactorrea en el caso de las mujeres, de las que cinco presentaron compresión del nervio óptico y signo de silla turca vacía, y de ginecomastia y alteraciones visuales en los varones; el diagnóstico de los Prolactinomas se realizó mediante la determinación de las tasas basales séricas de prolactina mediante ELISA.

Sólo se aceptaron como prolactinomas funcionantes y, por lo tanto, fueron incluidos en el estudio, aquellos que presentaron niveles basales de prolactina superiores o muy próximos a 300ng/mL, como se muestra en la siguiente gráfica.



Niveles basales de prolactina antes de la hipofisectomía. Se estudiaron aquellas muestras obtenidas de pacientes con valores próximos o superiores a 300ng/mL.

La zona amarilla muestra los valores estándar no patológicos

La zona verde muestra los valores sugerentes de la existencia de un prolactinoma.

## Western blotting de Aromatasa en los Prolactinomas Humanos.

De cara a demostrar la presencia de aromatasa en la hipófisis y comprobar la especificidad de los anticuerpos empleados, se realizó un análisis por western blotting a partir de una muestra de 10 adenomas y de 5 hipófisis humanas no tumorales.

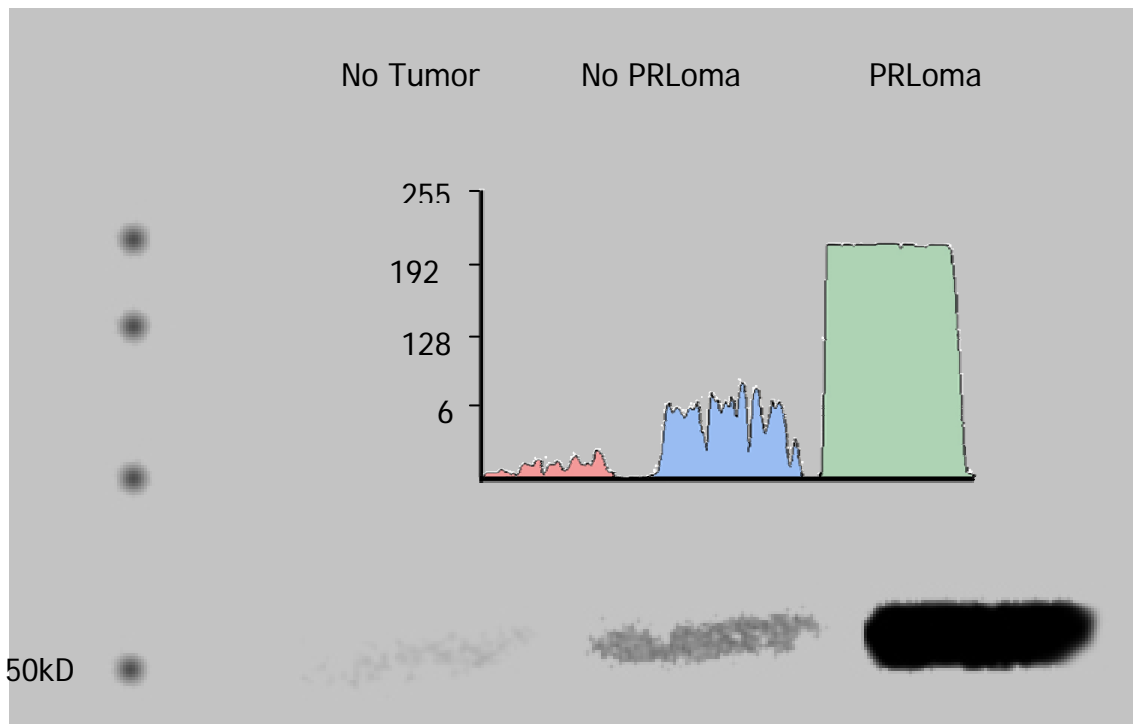
Mediante western blotting demostramos la existencia de una proteína de peso molecular en torno a los 50kDa, en lisados hipofisarios de muestras tumorales y no tumorales.

La preabsorción del anticuerpo anti-aromatasa impidió la visualización del blot correspondiente.

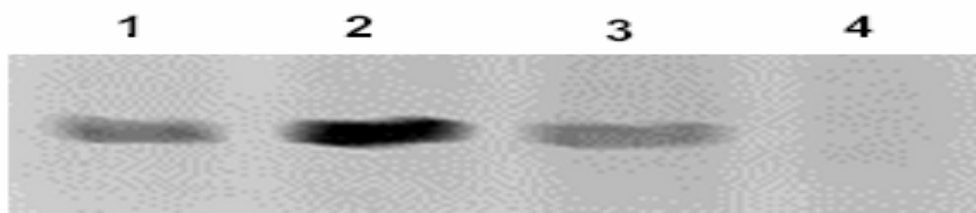
El análisis densitométrico de cada una de las bandas permitió demostrar que las muestras obtenidas a partir de prolactinomas contenían aromatasa en cantidades dos veces más altas que las muestras no tumorales ( $p < 0.01$ ).

Además, el contenido de aromatasa fue 1.7 veces superior en prolactinomas que en otros adenomas reactivos por inmunocitoquímica a la aromatasa y que no eran prolactinomas ( $p < 0.05$ ).





Imágenes obtenidas a partir de western blotting de lisados hipofisarios y perfil densitométricos en unidades arbitrarias de niveles de gris (0= blanco, 255= negro). correspondientes a las muestras 2005-01 (no tumoral, mujer 58 años), 2000-91 (adenoma hipofisario productor de ACTH, mujer 49 años), 1997-345 (adenoma hipofisario productor de prolactina, mujer 39 años, \*\* en niveles séricos de PRL). Como puede apreciarse en los blots, las bandas detectadas se sitúan en el rango de los 50kD de peso molecular.



Imágenes obtenidas a partir de western blotting de lisados hipofisarios pertenecientes a:

- 1: adenoma hipofisario no prolactinoma,
- 2: prolactinoma,
- 3: hipófisis humana no tumoral,
- 4: prolactinoma, después de realizar la preabsorción del anticuerpo.

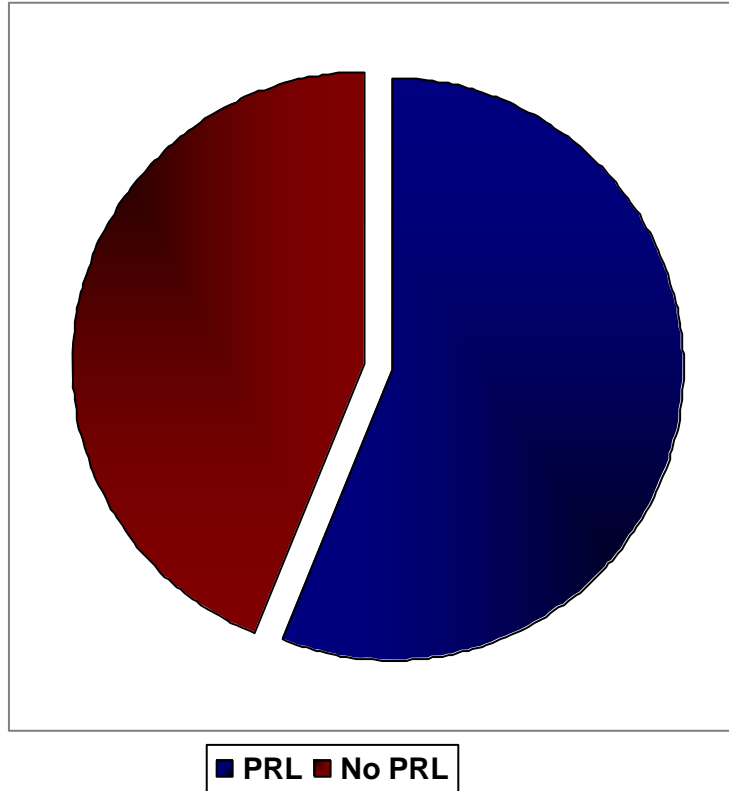
## Inmunocitoquímica

### Adenomas positivos a Prolactina

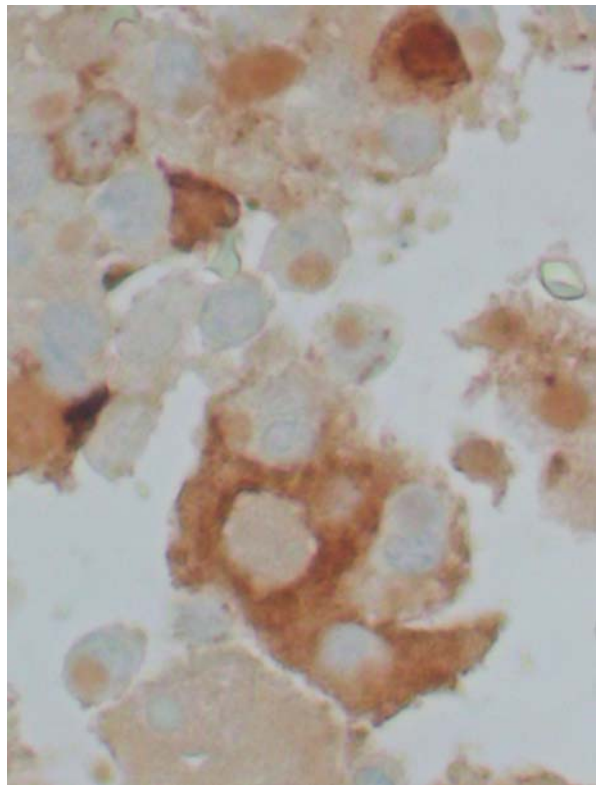
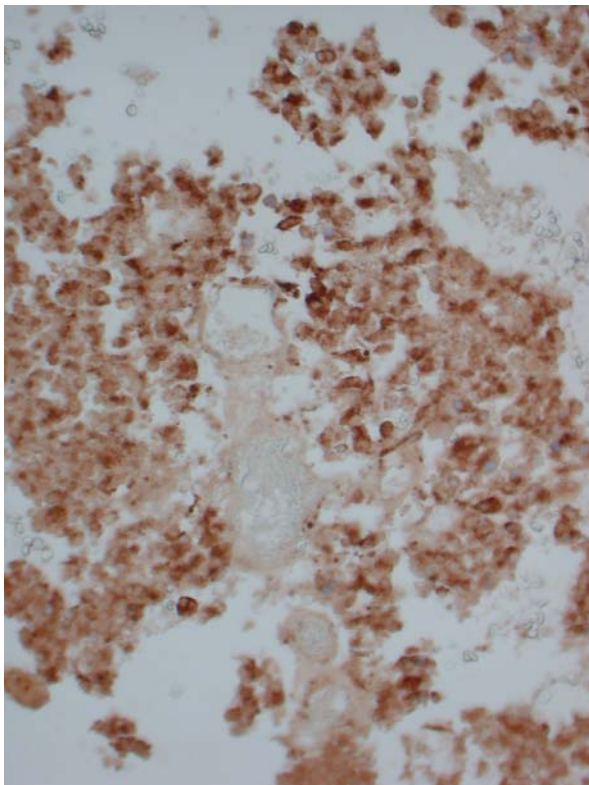
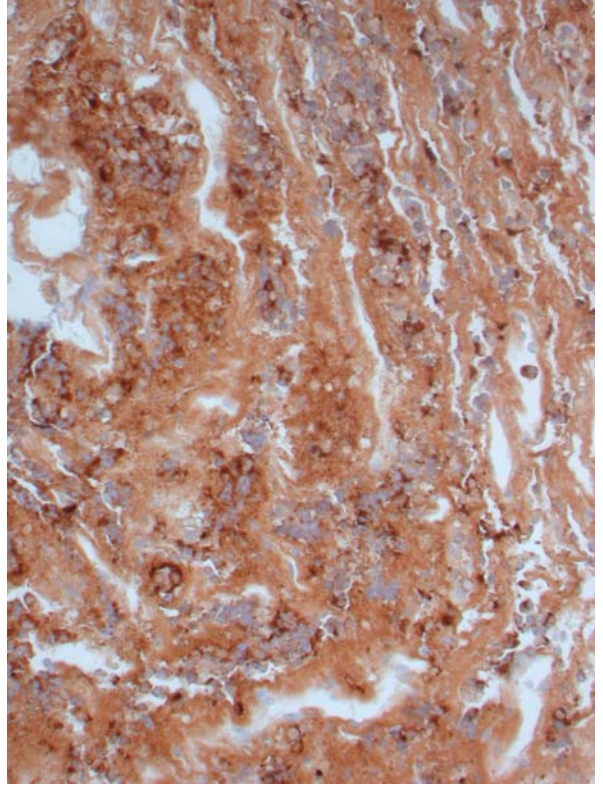
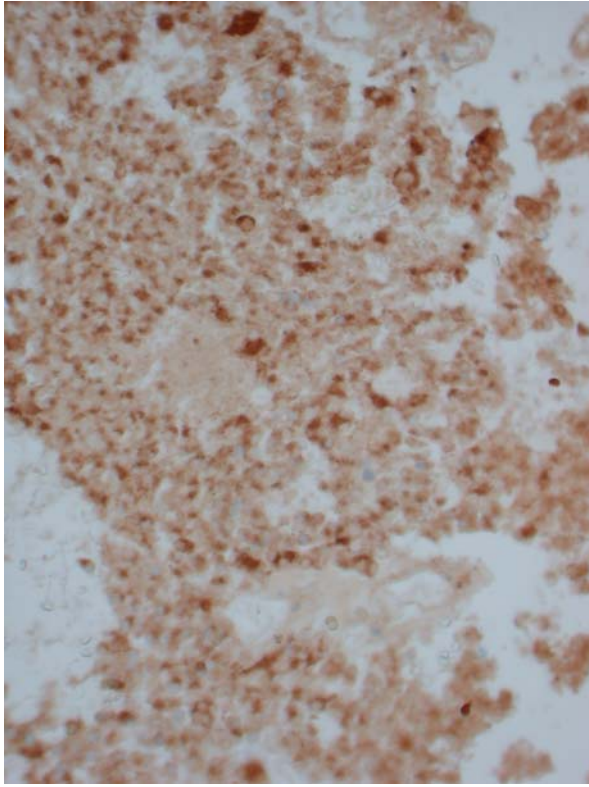
El 55% de los adenomas hipofisarios humanos de la serie estudiada fueron prolactinomas.

Sus características histopatológicas fueron variables, junto a prolactinomas hemorrágicos aparecieron prolactinomas sólidos con gran desarrollo del tejido fibroso.

La mayoría de los prolactinomas (ver imágenes adjuntas) presentaron un aspecto homogéneo, en el que, prácticamente, todas las células del tumor eran positivas a prolactina.



En tres de los casos estudiados, como se observa en la imagen adyacente a grandes aumentos (inferior derecha), las células productoras de prolactina se agrupaban en islotes homogéneos que estaban rodeados por células que no eran positivas a prolactina. En dos de esos casos, las células eran productoras de LH y, en el otro, las células no reaccionaron para ninguna hormona hipofisaria.

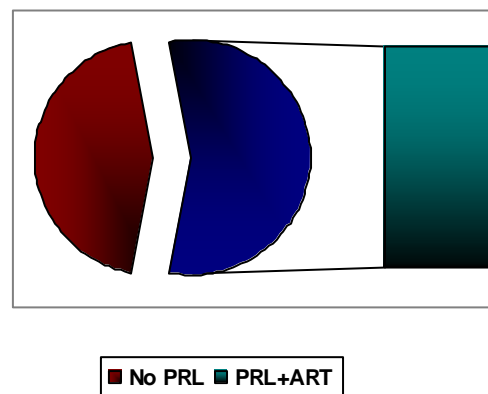
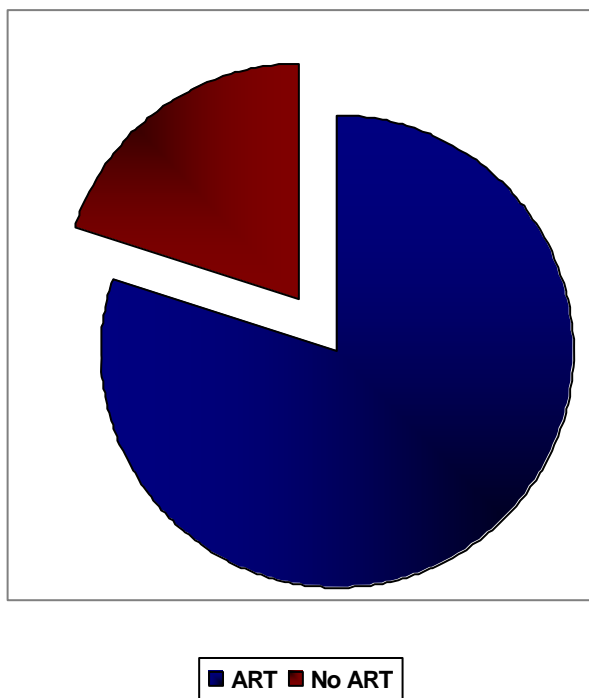


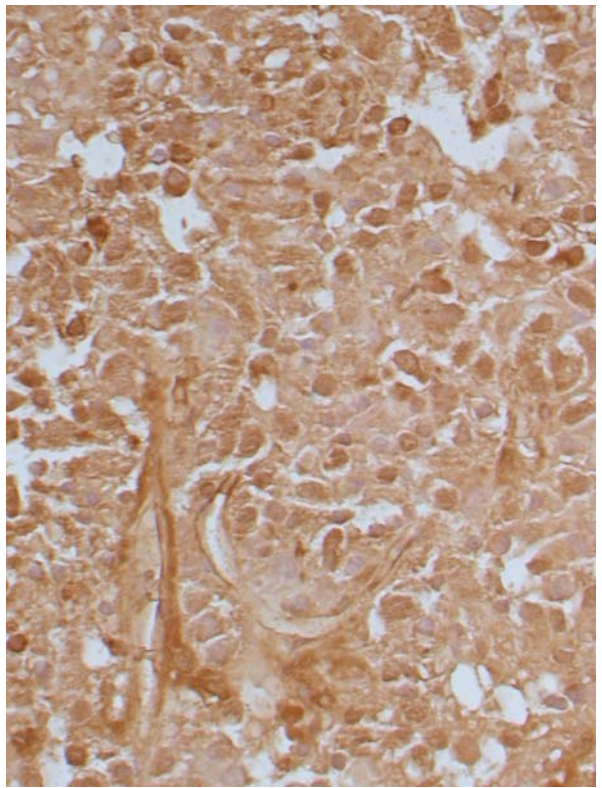
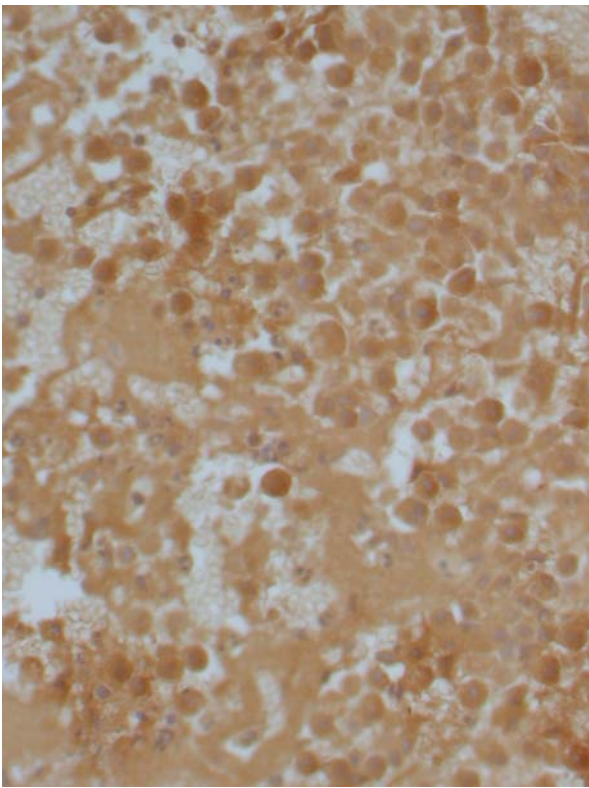
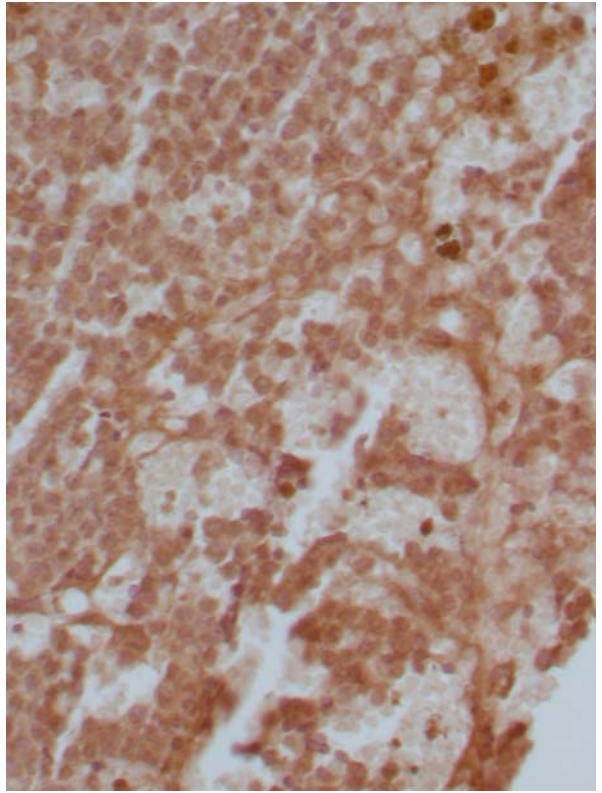
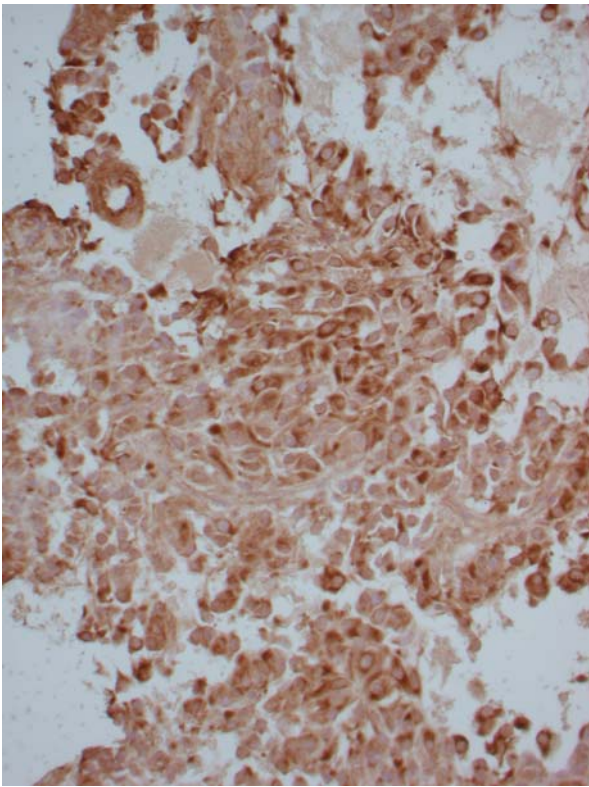
## Inmunocitoquímica

### Adenomas positivos a la Aromatasa

Como puede apreciarse en las imágenes adjuntas, las células positivas a la aromatasa aparecieron distribuidas por toda la superficie del tumor y, al igual que ocurrió con los tumores positivos a prolactina, se encontraron tumores positivos a la aromatasa con características histopatológicas diversas: tumores sólidos o hemorrágicos, con o sin alteraciones nucleares.

Mediante inmunocitoquímica se comprobó que el 80% de los adenomas hipofisarios fueron tumores aromatasa-positivos. Además, todos los prolactinomas fueron tumores positivos a la aromatasa.

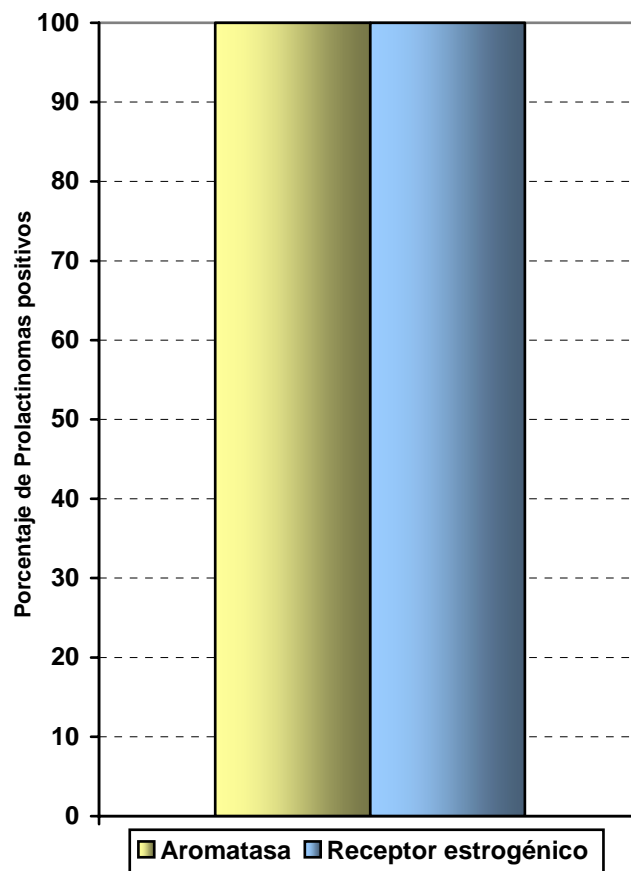




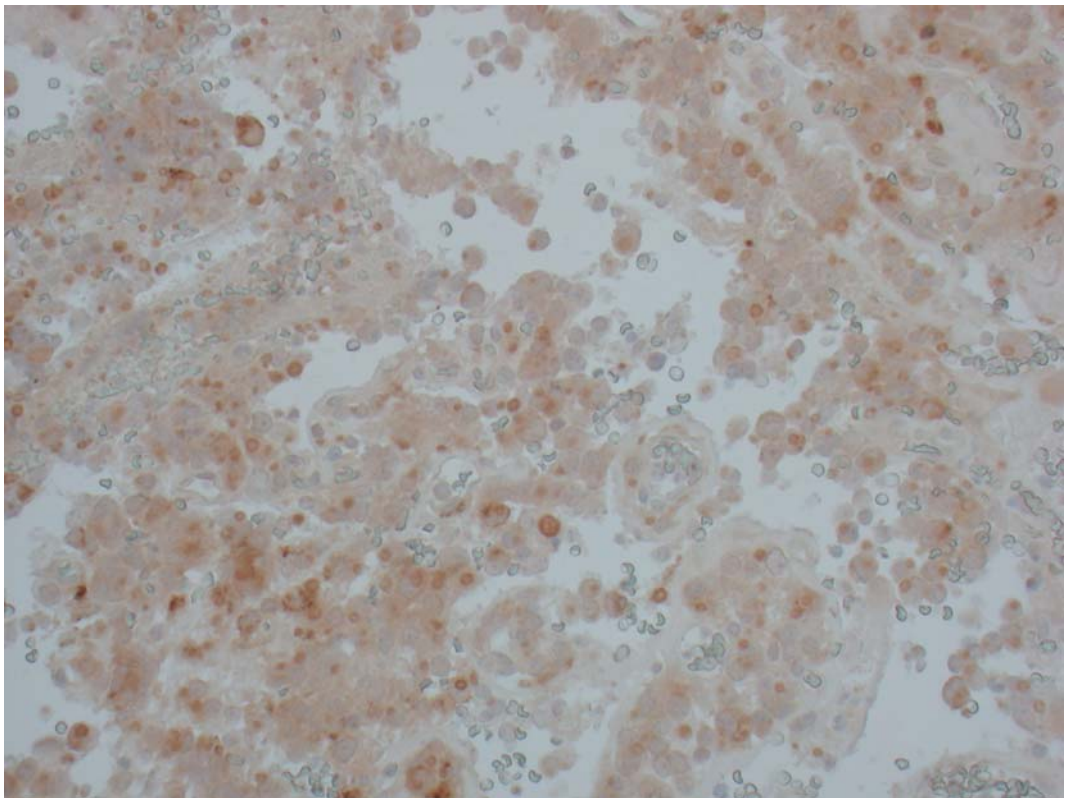
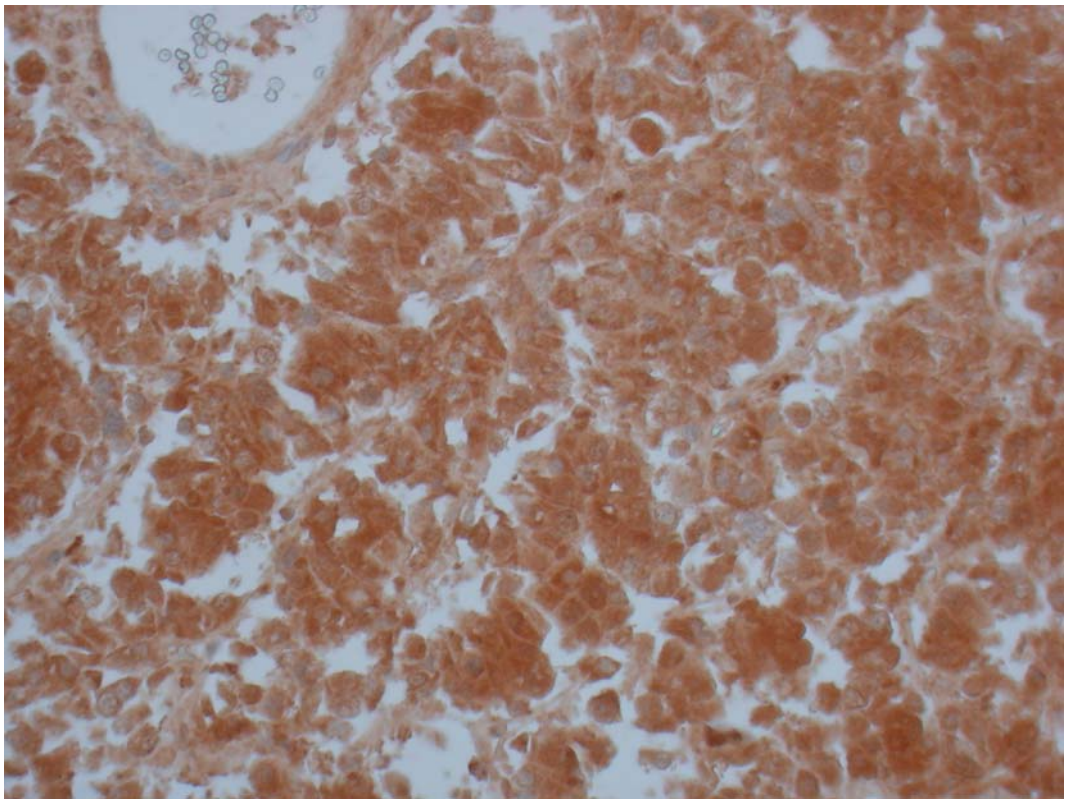
## Inmunocitoquímica

### Adenomas positivos al Receptor Estrogénico $\alpha$ .

El 100% de los prolactinomas y, por tanto, de los tumores positivos a la aromatasa fueron positivos al receptor estrogénico  $\alpha$ .



Además, pudimos apreciar la presencia de dos tipos de patrón de reacción: algunos tumores presentaban reacción nuclear y citoplásmica, mientras que otros presentaban principalmente reacción nuclear.



La positividad al receptor estrogénico  $\alpha$  fue muy variable de unos tumores a otros.

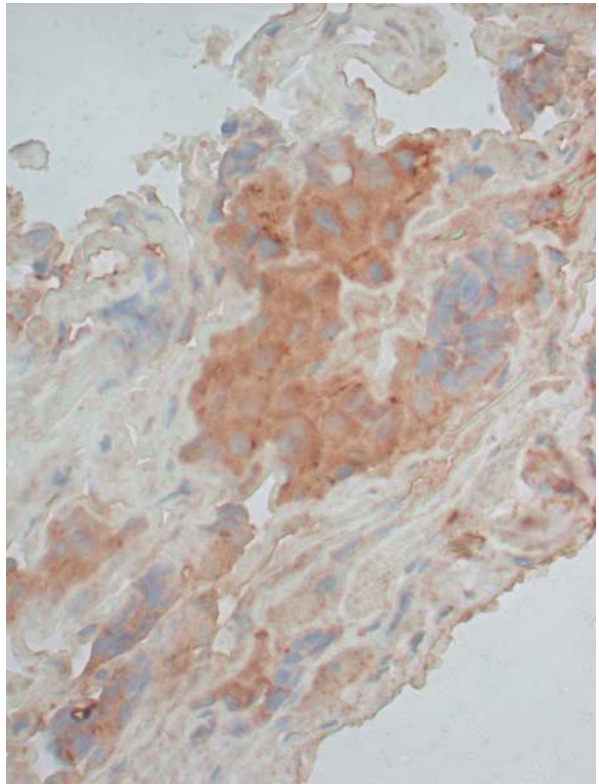
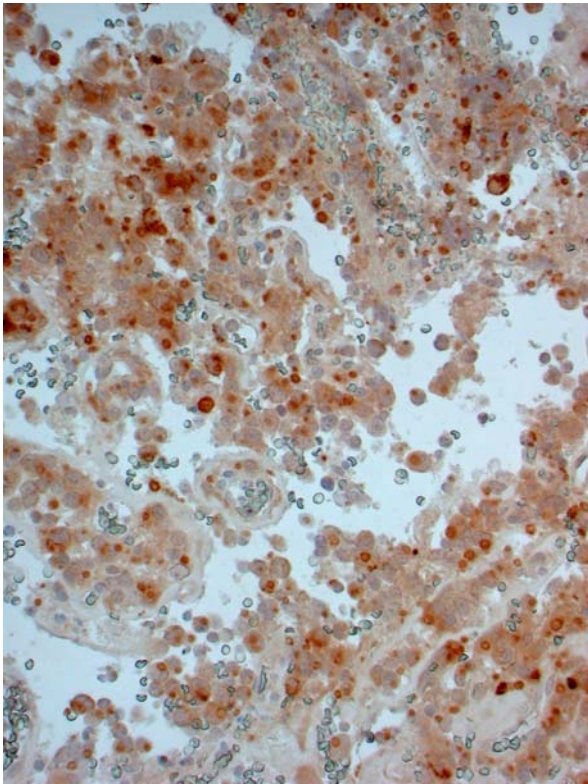
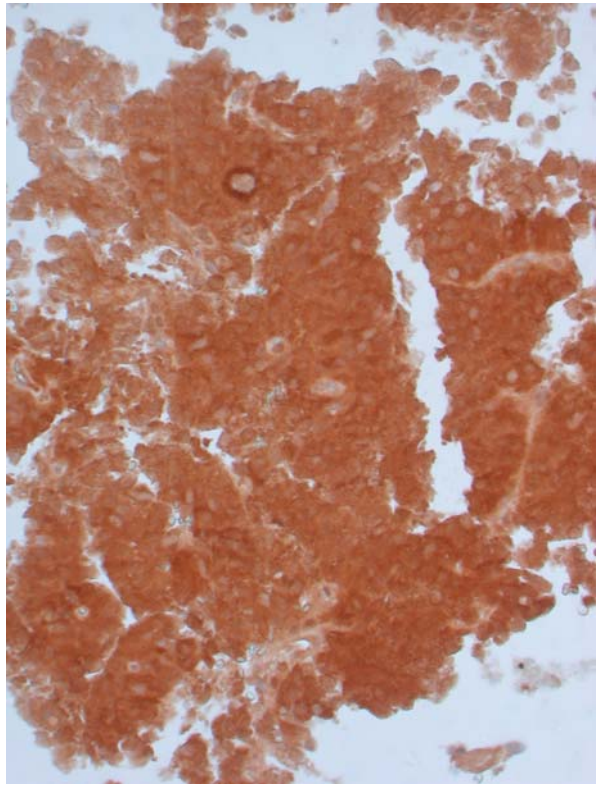
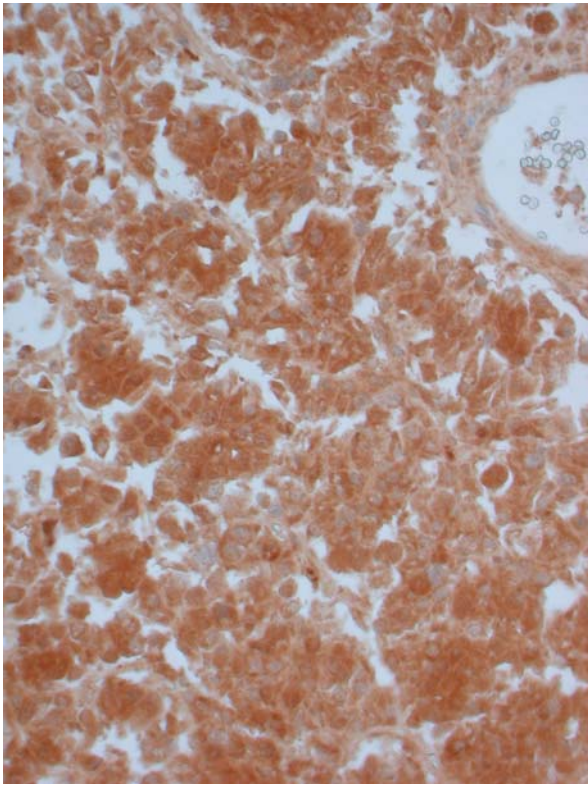
La variabilidad no sólo afectó a la localización de la reacción, sino también a su intensidad y al número de células positivas en cada tumor.

El patrón de reacción más frecuente en los tumores fue el que presentaba células con reacción citoplásmica y nuclear y, en ocasiones, como muestra la imagen superior derecha, con una intensidad de reacción muy fuerte. Con menos frecuencia, los tumores tenían ese tipo de células junto a otras con reacción estrictamente citoplásmica (imagen superior izquierda).

El patrón menos frecuente fue el de tumores que sólo presentaron reacción citoplásmica. Dentro de este tipo de tumores, algunos presentaron células en las que la reacción se localizaba en zonas muy específicas del citoplasma, formando una estructura reactiva de aspecto redondeado, junto a células con todo su citoplasma reactivo; en general, en ambos tipos de células la reacción era intensa (imagen inferior izquierda).

Otros presentaban células con una reacción más débil y homogénea, repartida por todo el citoplasma (imagen inferior derecha).





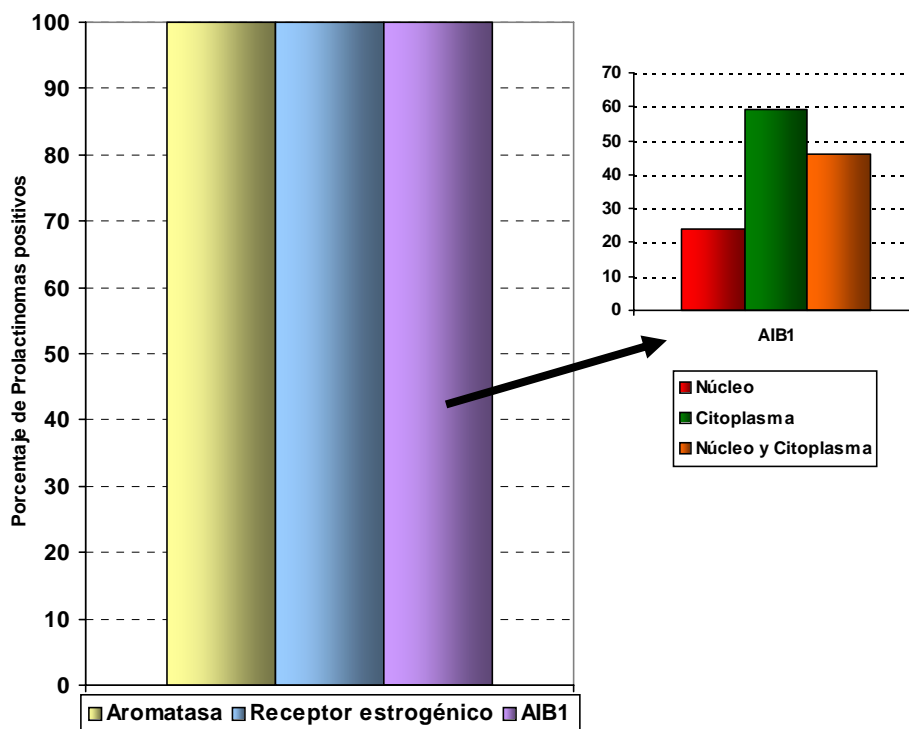
## Inmunocitoquímica

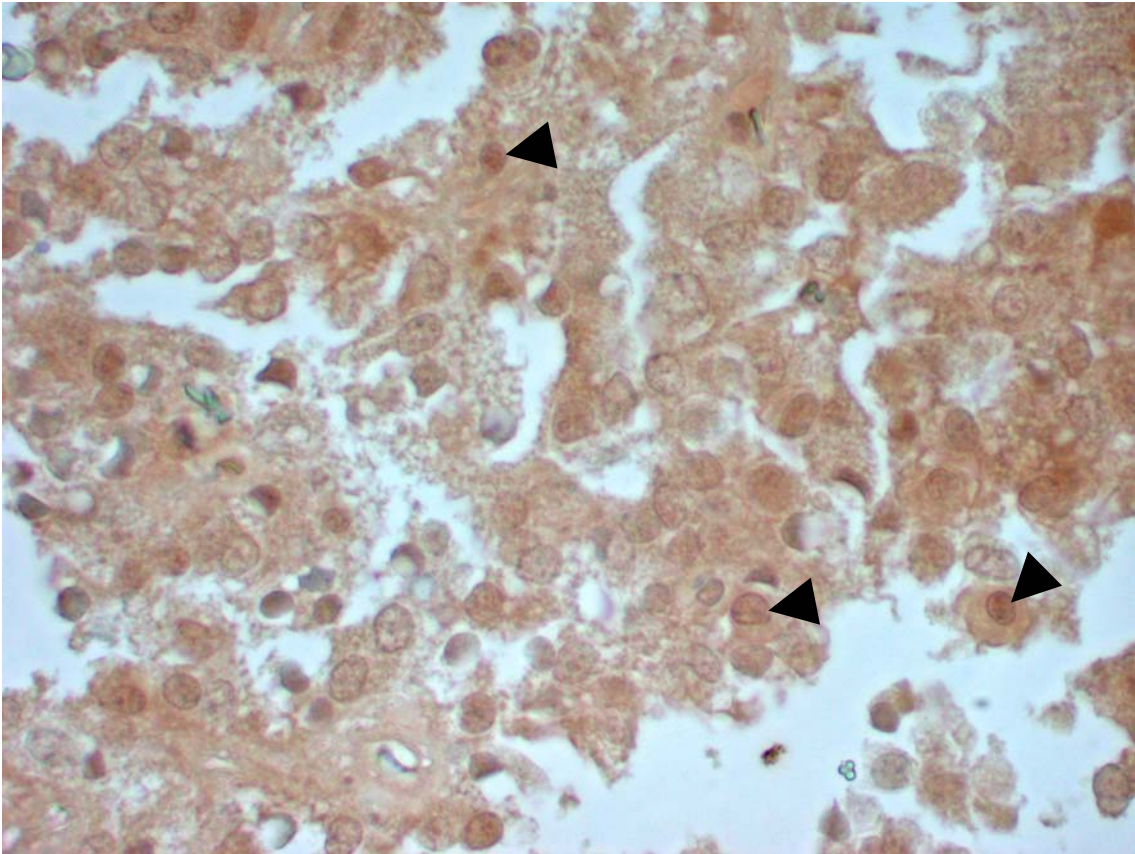
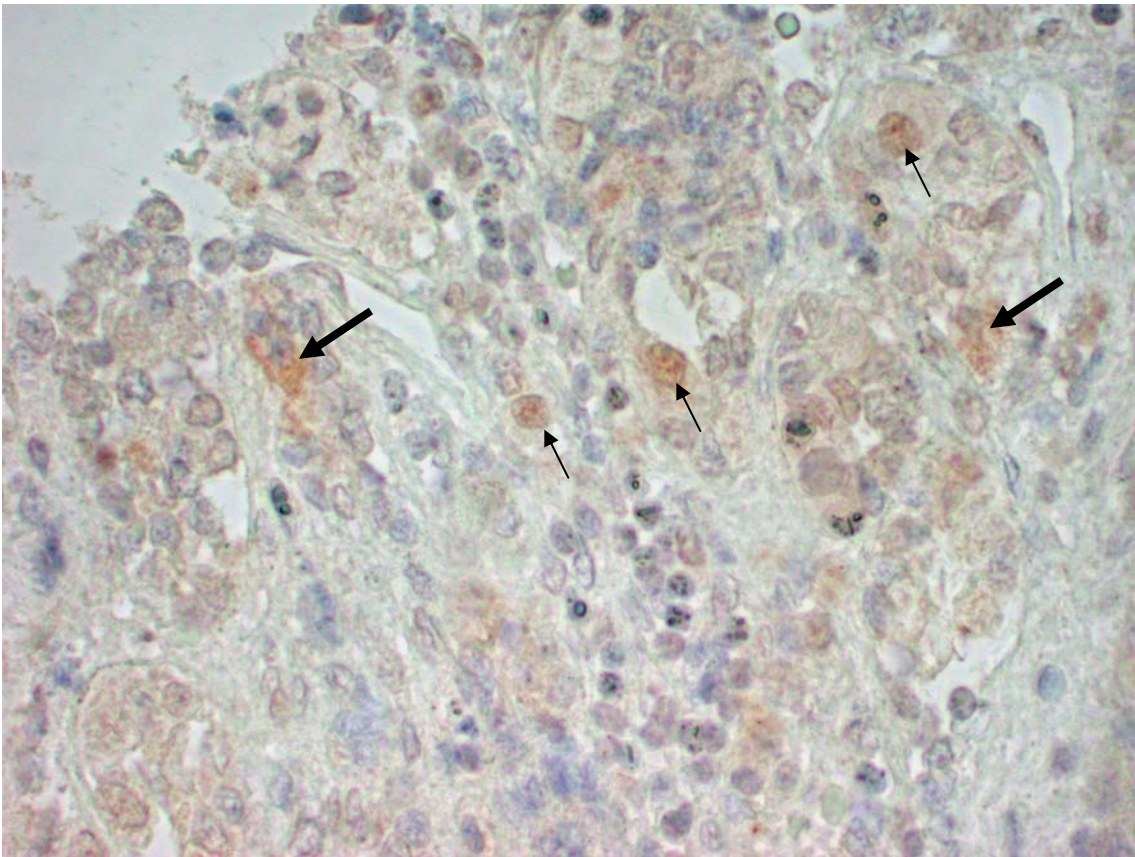
### Adenomas positivos al Coactivador del Receptor Estrogénico, AIB1.

Todos los prolactinomas y, por tanto, todos los tumores positivos a aromatasa y receptor estrogénico  $\alpha$ , fueron positivos al coactivador de receptor estrogénico AIB1.

El patrón de reacción a AIB1 fue de dos tipos diferentes: nuclear (flechas finas), nuclear y citoplásmico (cabezas de flecha) o sólo citoplásmico (flechas gruesas).

De los tumores positivos a AIB1, el 17% sólo presentaron reacción en el citoplasma, el 24% la presentaron sólo en el núcleo y el 59% tenían reacción citoplásmica y nuclear.

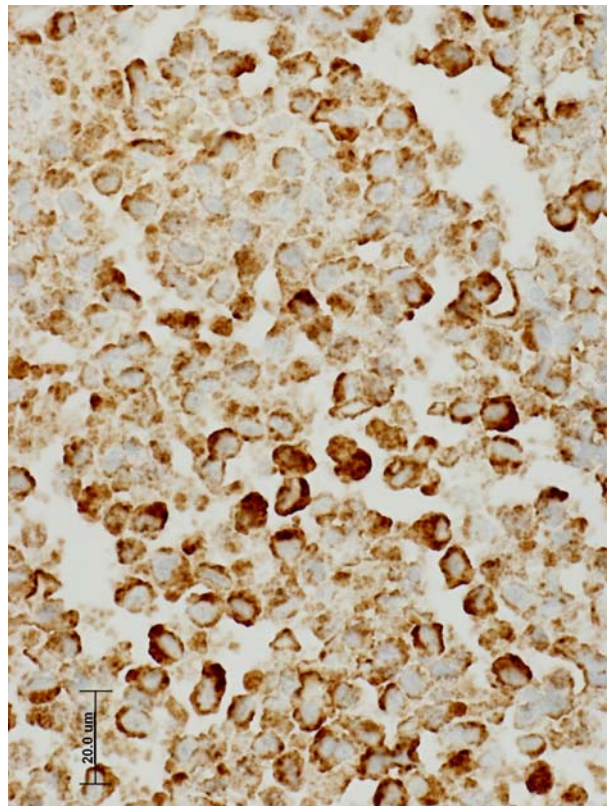
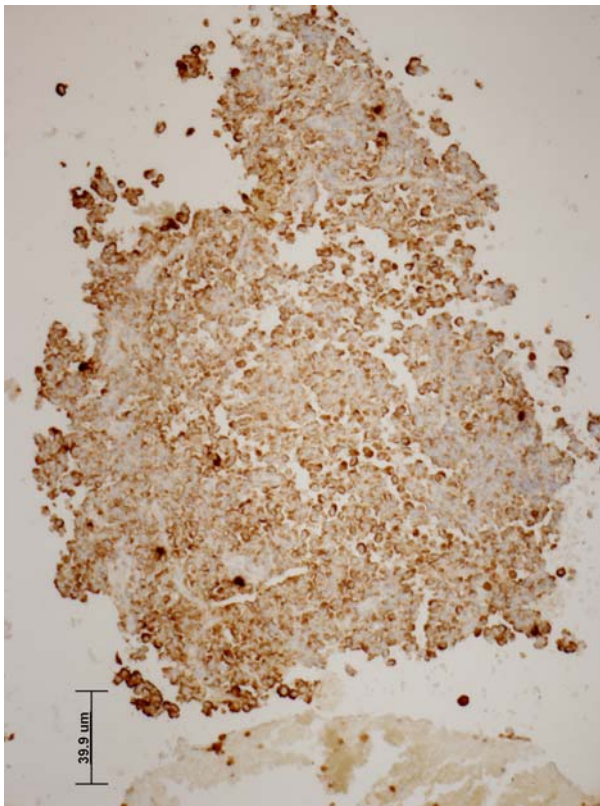
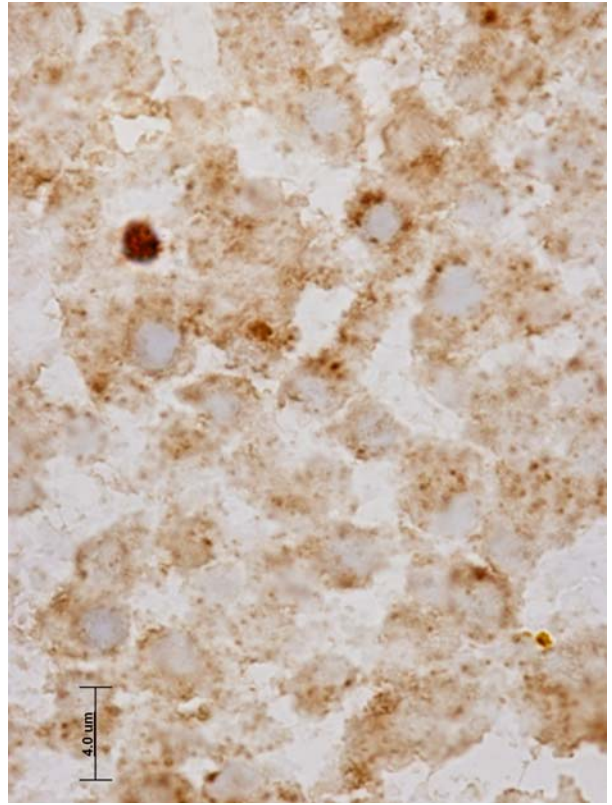
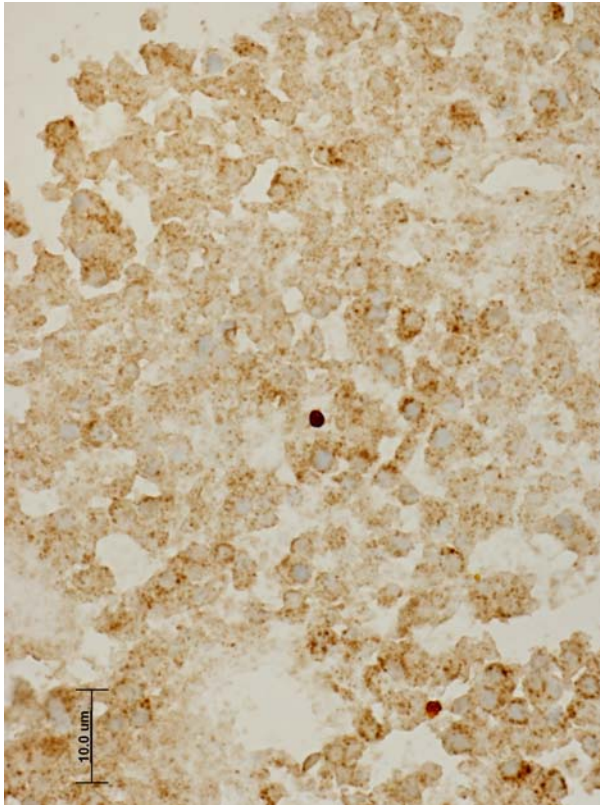




Las imágenes adyacentes muestran la positividad a AIB1 en distintos prolactinomas.

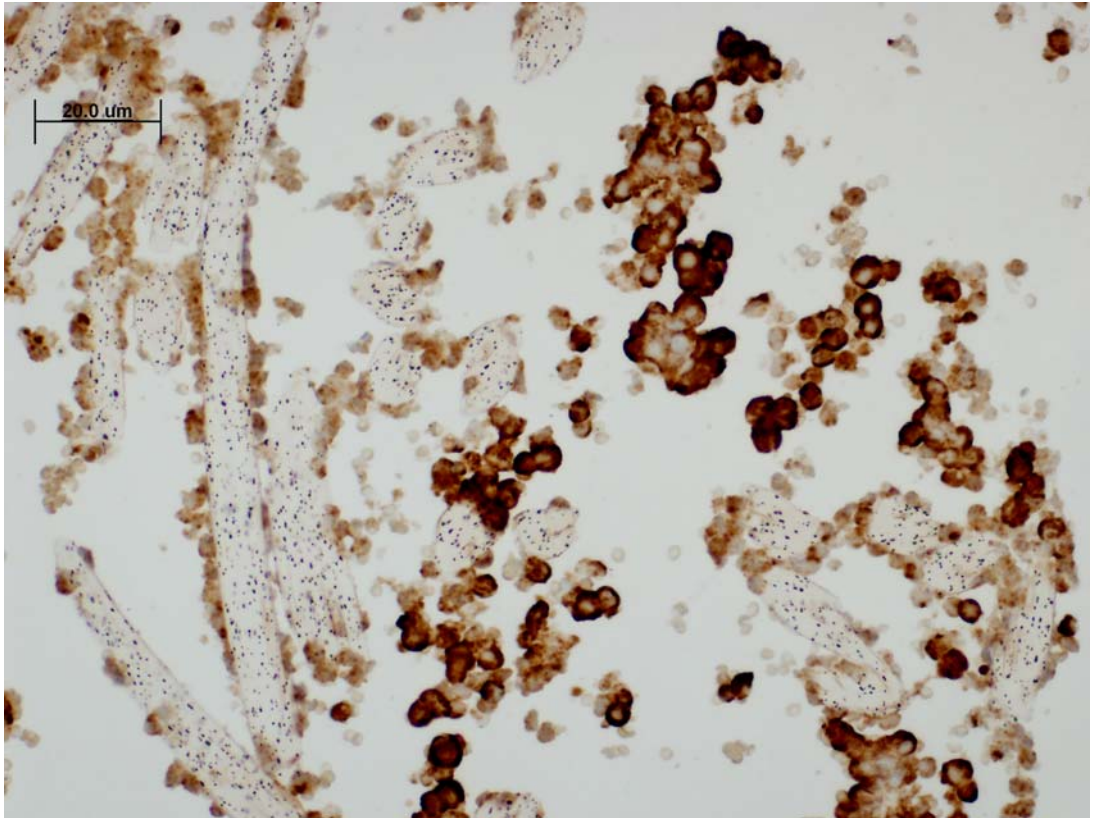
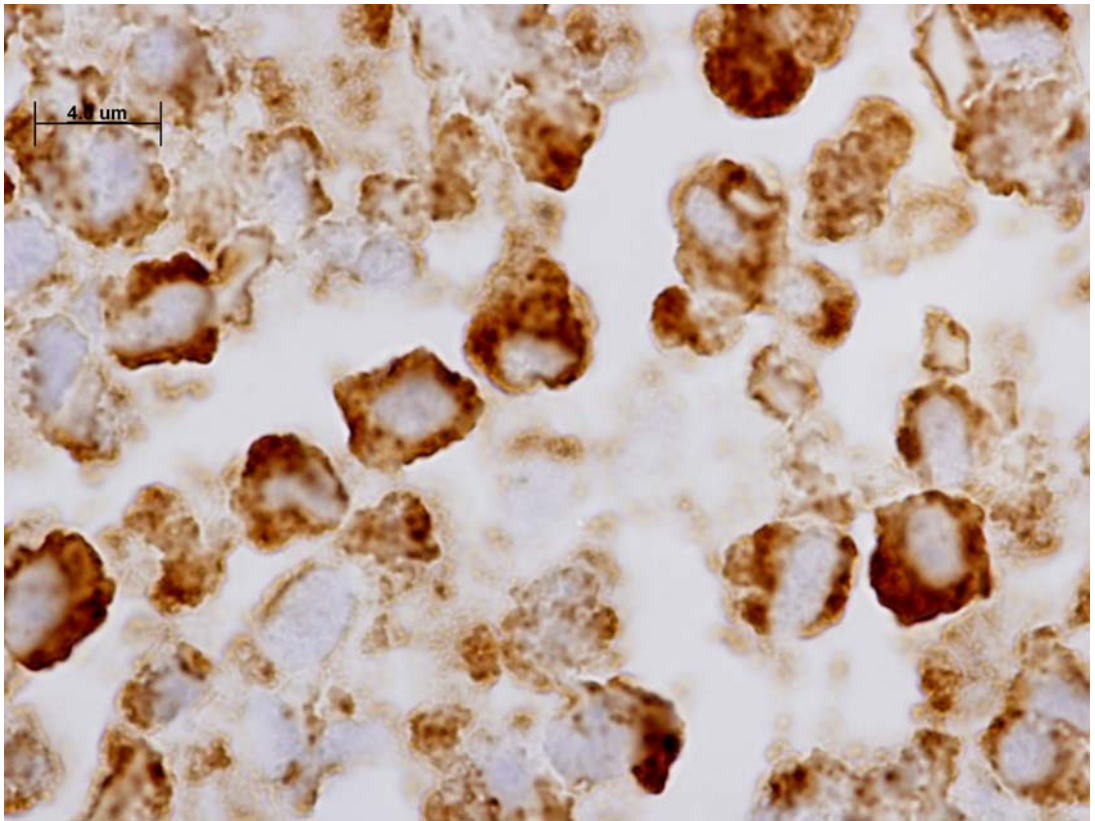
Preferentemente la reacción fue citoplásmica, aunque en algunos casos (imágenes superiores) también aparecían células con reacción nuclear.

Casi todas las células de los prolactinomas presentaron positividad a AIB1, pero la reacción podía ser granular fina (imágenes superiores) o bien ocupar la totalidad del citoplasma con una reacción intensa y compacta (imágenes inferiores).



A mayores aumentos se aprecia claramente como, incluso en los prolactinomas con reacción intensa y compacta, aparecieron células con reacción de aspecto granular, menos llamativas, pero no por ello menos numerosas (imagen superior).

Algunos prolactinomas presentaron imágenes sincitiales no reactivas junto a las cuales el resto de las células eran reactivas a AIB1, con reacción citoplásmica intensa y compacta (imagen inferior).



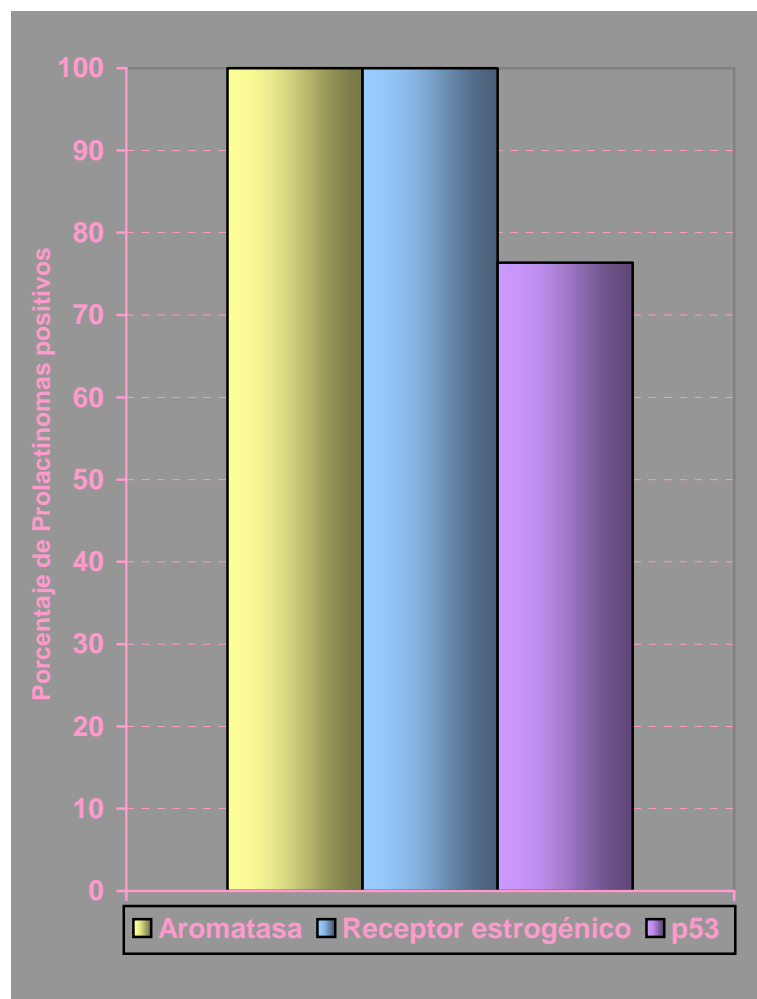
## Inmunocitoquímica

### Localización de p53.

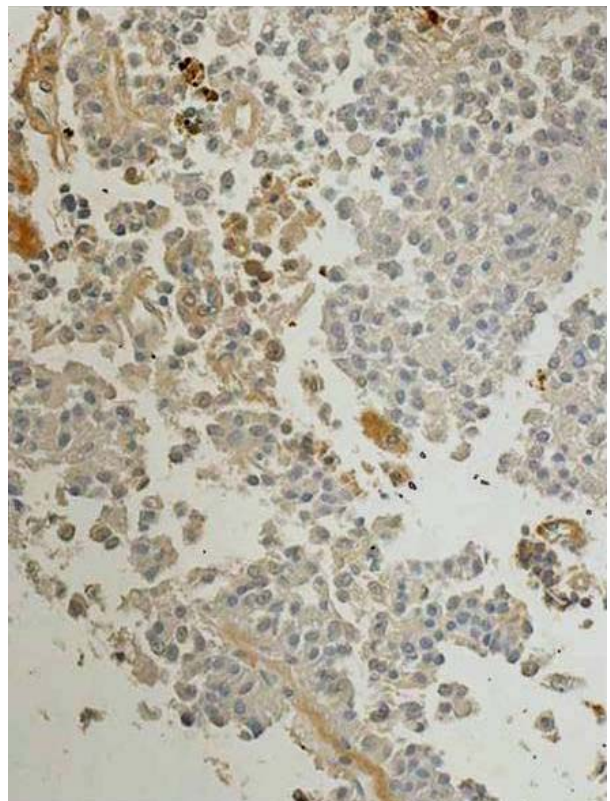
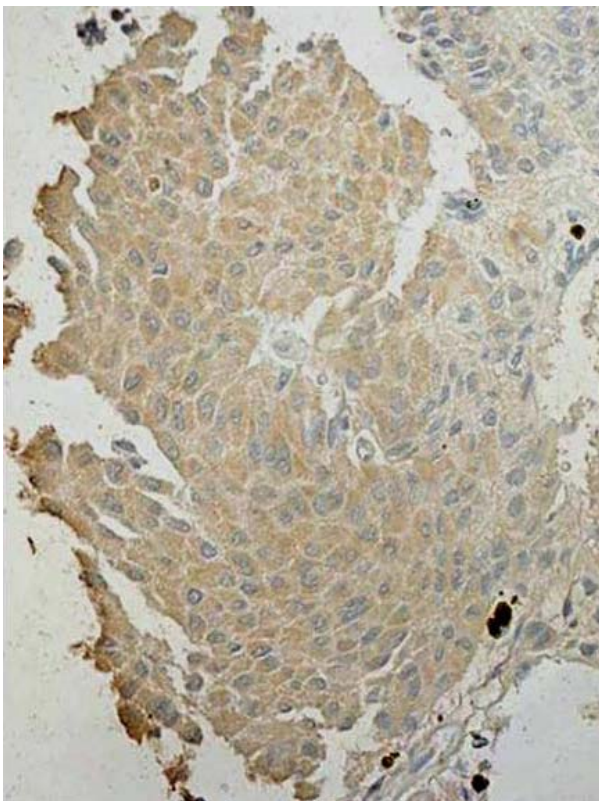
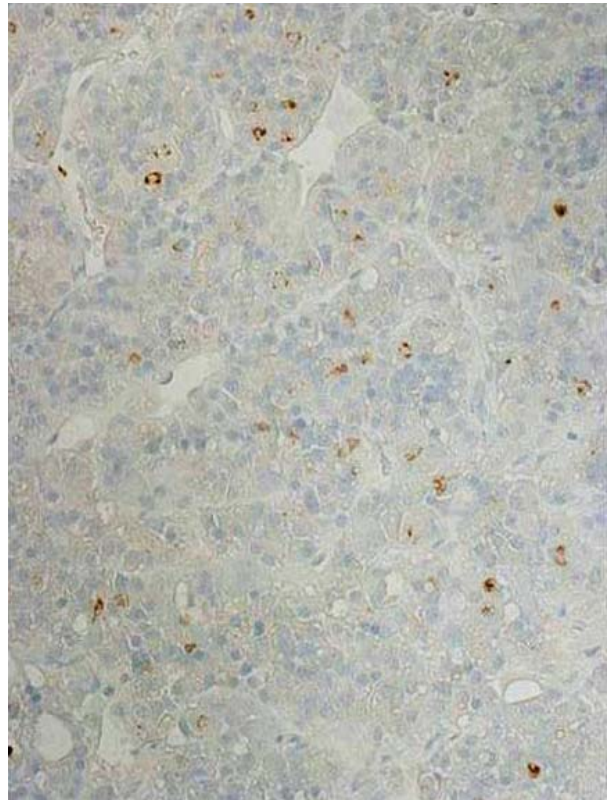
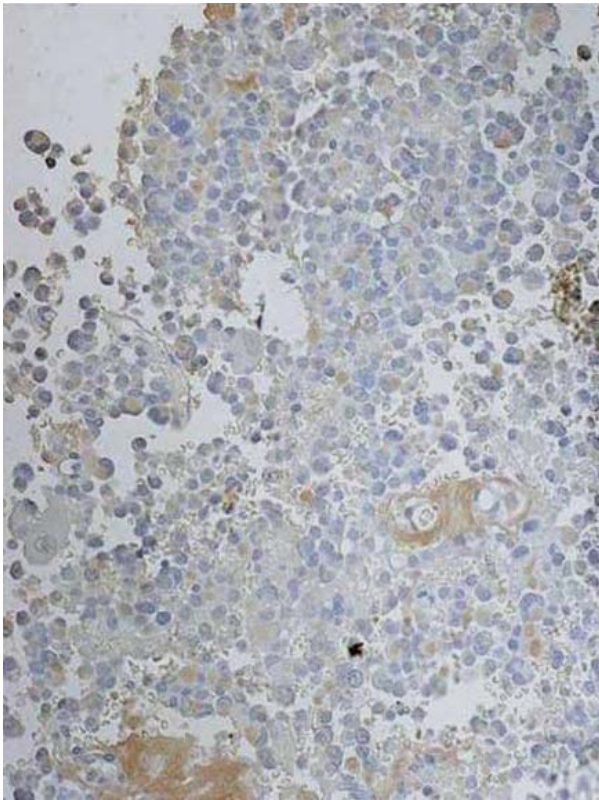
La presencia de la proteína p53 ha sido asociada por otros autores con la formación de adenomas hipofisarios.

En nuestro estudio, el 76.63% de los prolactinomas fueron p53 positivos (las imágenes adjuntas muestran distintos prolactinomas reactivos a p53).

Además, todos los tumores positivos a p53 presentaron reacción nuclear a AIB1, aunque el 68.3% de los tumores positivos a p53 la reacción nuclear se acompañó de reacción citoplásmica. Ningún tumor con reacción sólo en el citoplasma fue positivo a p53.







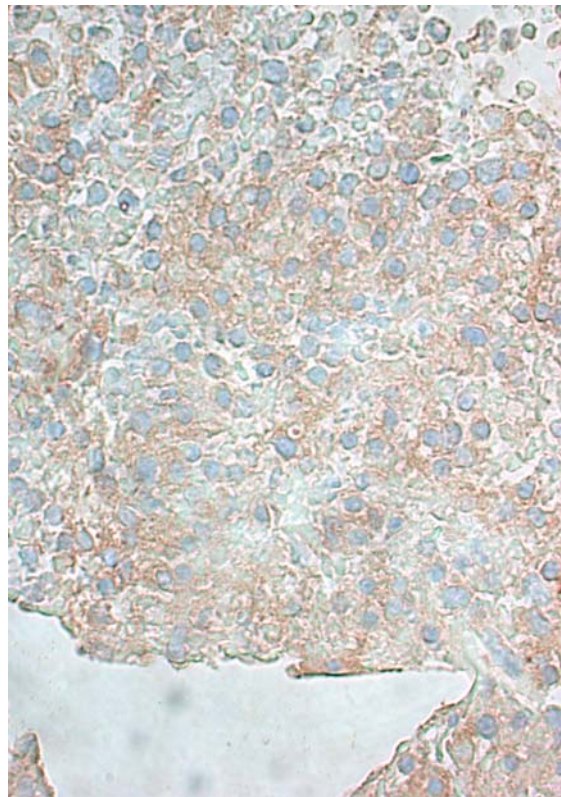
El patrón de reacción menos uniforme de todos los marcadores estudiados fue el que presentaron los prolactinomas a la p53.

Algunos tumores presentaron células reactivas muy escasas, dispersas y aisladas, aunque intensamente reactivas (imagen superior izquierda).

En otras ocasiones, las células positivas formaban cordones, claustros o islotes débilmente reactivos y con reacción granular (imagen superior derecha).

Otros prolactinomas presentaron positividad en forma de islotes que afectaba a casi todas las células del tumor (imagen inferior izquierda), la reacción era granular e intensa.

Por último, un cuarto tipo de tumores presentaba reacción débil y citoplásmica afectando a unas células y otras no, de forma desigual (imagen inferior derecha).



## **Discusión**

## Comentarios en relación con la metodología empleada.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio habíamos demostrado la existencia de la Aromatasa en la hipófisis de rata mediante técnicas inmunocitoquímicas (Vázquez 1997; Vázquez, y col. 1997; Carretero y col. 1998, 1999, 2002, 2003a,b) y la habíamos relacionado con la génesis de los prolactinomas en roedores (Carretero y col., 2002) . Este estudio propició la necesidad de validar si resultados semejantes se daban en la especie humana.

Diversos autores han mostrado que las determinaciones de la actividad de la aromatasa en el sistema nervioso central, determinada por métodos bioquímicos y la presencia del enzima en el mismo tejido, detectada mediante inmunocitoquímica, no coincidían, topográficamente hablando. Entre otras razones, este problema podría derivarse a la metodología empleada.

Aunque la aromatasa es un enzima cuya estructura proteica se ha conservado relativamente bien de unas especies a otras, no cabe la menor duda de que la mayoría de los estudios se han realizado empleando sueros contra la aromatasa placentaria humana en muy diversas estirpes de animales, pudiendo ser ésta una de las razones que explicaran algunas de las controversias existentes.

Además, se han utilizado distintos tipos de sueros anti-aromatasa, tales como, el suero policlonal anti-aromatasa placentaria humana (Harada, 1987; Jakab y col., 1993; Dellovade y col., 1994), el suero contra la secuencia de 20 aminoácidos más conservada entre las diversas especies, el oligopéptido 379-398 de la aromatasa P450 de la rata, bien conservada en el pollo y en la especie humana (Roselli y Resko, 1984; Sanghera y col., 1991) o bien, el empleo de un suero que reconoce la porción aromatasa del citocromo P450 (Shinoda y col., 1989a,b,c, 1992).

Dada la inestabilidad e insolubilidad de la aromatasa P450, la purificación del enzima ha sido muy complicada (Thompson y Siiteri, 1976; Bellino y Osawa, 1978) y por ello, la aromatasa placentaria humana se ha purificado parcialmente, como una fracción del citocromo P450 (Osawa y col., 1987; Osawa y Higashiyama, 1980).

Los anticuerpos policlonales contra esta fracción, obtenidos en conejo, suprimen parcialmente la actuación de la aromatasa, indicando que no toda la molécula se encuentra representada como determinante antigénico.

De hecho, los elementos reactivos detectados en el cerebro para el suero más efectivo de esta fracción, fueron denominados como elementos PAX positivos (Shinoda y col., 1989a,b,c, 1990) y las controversias entre la actividad de la aromatasa y la localización inmunohistoquímica fueron atribuidas a la complejidad antigénica del enzima y a la posible inespecificidad del anticuerpo empleado, dado que también podía reconocer otros antígenos similares de la familia del citocromo P450 (ver Shinoda, 1994, para más detalle).

A mediados de los años ochenta se aisló con un nivel de pureza mayor la aromatasa P450 (Mendelson y col., 1985; Nakajin y col., 1986; Tan y Muto, 1986; Kellis y Vickery, 1987; Harada, 1988; Shinoda y col., 1990), contra la que se obtuvieron distintos anticuerpos (Balthazart y col., 1991a,b; Sanghera y col., 1991; Jakab y col., 1993).

Uno de estos anticuerpos fue elaborado por Sanghera y col (Sanghera y col., 1991); sin embargo, los resultados inmunohistoquímicos obtenidos por estos autores fueron de muy difícil reproducción experimental (JaKab y col., 1993).

El grupo de Balthazart y el de Harada (Balthazart y col., 1990a,b,c; 1991a,b; Jakab y col., 1993), han empleado un anticuerpo contra una forma única de aromatasa P450 placentaria humana de 51KDa de peso molecular, si bien, esta molécula es parcialmente diferente a la aromatasa de 55KDa aceptada por otros grupos como la forma correcta (Harada, 1988).

El problema se acentúa, aún más, si se considera la presencia de isoenzimas, como ha sido sugerido por otros autores, como Osawa y col. (1987) Kitawaki y col. (1989).

El grupo de Hutchison, elaboró un anticuerpo altamente purificado contra un péptido sintético de 15 aminoácidos correspondiente a los residuos 488-502 de la aromatasa citocromo P450 del pollo (Beyer y col., 1994c).

Después de testar los anticuerpos elaborados por el grupo de Hutchison (Vázquez, 1997), dentro de los estudios derivados del proyecto BIOMED-I-BMH1-CT94-1536, en nuestro laboratorio desarrollamos anticuerpos policlonales contra la aromatasa p450 de la rata, el ratón y el hombre, a partir de la secuencia N-terminal de la molécula, empleando como antígeno los 15 últimos aminoácidos de la misma; este anticuerpo nos permitió demostrar la presencia del enzima en la hipófisis de la rata (Carretero y col., 1999a) con diferencias ostensibles en la positividad entre machos y hembras.

Estos hallazgos se confirmarían posteriormente al analizar la diferenciación postnatal y, sobre todo, postpuberal del enzima en la hipófisis (Carretero y col., 2003) o la correlación entre la expresión del enzima y el desarrollo de prolactinomas puros espontáneos en la hipófisis de ratas viejas (Carretero y col., 2002) y mediante estudios de western blotting (Carretero y col., 2002).

La aromatasa, su presencia y actividad, guarda una estrecha relación con las estructuras nerviosas que se caracterizan por ser diferentes en el macho y en la hembra y que se han denominado estructuras cerebrales sexualmente dimórficas.

Desde el punto de vista de la hipófisis, quizás nos interese recordar los efectos de la aromatasa sobre el dimorfismo sexual hipotalámico, por ser el más relacionado con la funcionalidad hipofisaria.

La actividad enzimática de la aromatasa hipotalámica es estimulada por la testosterona, que además aumenta el número de neuronas que expresan

inmunocitoquímicamente el enzima (Steimer y Hutchison, 1981; Roselli y col., 1984, 1987; Hutchison y col., 1991a, 1995).

Este hecho guardó concordancia con los resultados obtenidos en la hipófisis mediante estudios inmunocitoquímicos (Carretero y col., 1999a).

El que la hipófisis de la rata macho, presumiblemente bajo la influencia de la testosterona, presente un importante número de células aromatasas positivas y mientras que, en la de la rata hembra, no sea así, sugiere una mayor actividad enzimática en el macho que en la hembra y un posible dimorfismo sexual en la expresión del enzima.

No obstante, estas diferencias en la inmunopositividad al enzima podrían deberse a regulaciones pre- o post-traslacionales. Dicho de otra manera, las observaciones encontradas con la inmunocitoquímica no definían claramente si la regulación suponía una parada en la trascripción del gen al mRNA o bien se debían a un freno en la síntesis proteica, con una parada en la traslación de la información del mRNA hacia la proteína.

Mediante los métodos inmunohistoquímicos, se pueden caracterizar las células de la hipófisis anterior que contienen hormonas o péptidos.

Para nuestro estudio hemos utilizado el método de la Estrepto-Avidina-Biotina Peroxidasa (Stav-Pox), considerada una técnica sándwich porque necesita de tres complejos de reacción para su realización.

La Stav-Pox es una variante del método de la peroxidasa-antiperoxidasa (APA), más moderna y específica. Emplea un primer antisuero (procedente de ratón o conejo) contra el antígeno que se desea estudiar, semejante a la PAP pero normalmente de 5 a 10 veces más diluido; un segundo antisuero (obtenido generalmente de cabra o cerdo) antiinmunoglobulina (fracción Fc) del primario y que lleva incorporado a su brazo largo varias moléculas de Biotina (proteína de alta afinidad por las inmunoglobulinas) y, finalmente, un complejo de Estrepto-Avidina conjugado con varias moléculas de peroxidasa, que se une a la Biotina (por la alta afinidad de Estrepto-Avidina por la Biotina).

Para la conservación de la morfología y de la antigenicidad es fundamental el proceso de fijación. Las características de las reacciones inmunocitoquímicas después del empleo de fijadores diferentes han sido analizadas por muchos autores, como Nakane y col. (1989), Hall y col. (1990), Landerbg y Groos (1991), Golick y Rice (1992).

En nuestro estudio hemos utilizado una solución fijadora ampliamente experimentada en nuestro laboratorio, como demuestran gran número de publicaciones sobre el estudio inmunohistoquímico de la hipófisis, algunas de las cuales se recogen en este trabajo. Así comprobamos que, aun cuando la cantidad de hormona o péptido era pequeña, dicha solución se revelaba como un excelente fijador para el estudio inmunocitoquímico de las hormonas hipofisarias en la rata.

Los controles que hemos realizado están enmarcados dentro de los clásicamente descritos: test de dilución (Sternberger, 1979; Petrusz y col., 1976), test de sustitución de reactivos (Hutson y col., 1979; Forssmann y col., 1981) y, el más común de todos, el test de preabsorción (Hutson y col., 1979; Buffa y col., 1979; Forssmann y col., 1981).

Al sustituir los sueros primarios por tampón de ensayo y por suero normal de conejo o de ratón, obtuvimos como resultado la abolición total del producto de reacción.

Realizamos controles de dilución tanto para obtener la concentración más adecuada del anticuerpo primario como para eliminar tinciones de fondo y otras reacciones; después de un meticuloso test de dilución comprobamos que las diluciones óptimas de los sueros específicos fueron las que se detallan en el capítulo de material y métodos.

También hemos realizado preabsorción del suero primario con prolactina o LH (Sigma ®) a razón de 10nM/100 µl de suero diluido, y en todos los casos obtuvimos la abolición de la reacción.

De esta manera, en nuestro laboratorio se han caracterizado, mediante su expresión inmunocitoquímica, las células productoras de hormonas hipofisarias (Carretero y col., 1989; 1990; 1992b; Montero y col., 1990; Rubio y col., 1992; 1994; Sánchez y col., 1993) o productores de péptidos como GRF (Carretero y col., 1991), somatostatina (Gil, 1992) o VIP (Carretero y col., 1992a; 1995b; 1997a).

También se pueden detectar enzimas intracelulares mediante inmunohistoquímica, como hemos hecho en nuestro laboratorio con la Aromatasa P450 y la nNOS (Carretero y col., 1999a, b; 2003).

La aplicación de métodos cuantitativos morfométricos y estereológicos, intenta resolver el problema de la valoración morfológica subjetiva de la actividad celular. Estos métodos han evolucionado a lo largo de los años; en sus inicios, hace más de treinta años, se empleaban métodos manuales, pero en la actualidad, el empleo de los ordenadores y la digitalización de imágenes permite hacer análisis automáticos o semiautomáticos en los que el operador no interfiere en la medida.

Alrededor de 1850, el geólogo francés Delesse y el microscopista inglés Sorby enunciaron, independientemente, el principio de que el promedio de un área fraccional de un tipo particular de componente, en una sección tomada de un cuerpo sólido, es directamente proporcional a la fracción de volumen de ese componente dentro del cuerpo sólido original (Delesse, 1847; Sorby, 1856).

Estos autores llegaron a esta conclusión por un proceso intuitivo, pero los esfuerzos de expertos en geometría integral y probabilidad han demostrado en varias ocasiones la validez del principio de Delesse (Crofton, 1877; Delthiel, 1926; Bonnesen y Fenchel, 1934; Santalo, 1936; Blaschke, 1949).



Mayhew y Cruz Orive (1973) transformaron el principio de Delesse mediante la consideración de un modelo de esfera concéntrica (toscamente similar a una célula) y consiguieron formulaciones bastante claras de esta relación.

Otros autores también han dejado claro que las ecuaciones usadas en estereología son mera manifestación de un área mucho más amplia de las matemáticas, que se ha denominado geometría multidimensional (Miles, 1972) o simplemente probabilidad geométrica (Little, 1974).

La estereología, término acuñado por la Sociedad Internacional de Estereología en 1961, está basada en la probabilidad geométrica y permite la evaluación de estructuras tridimensionales por extrapolación de mediciones realizadas en secciones bidimensionales, tras la aplicación de medidas en secciones bidimensionales y axiomas estereológicos, y consigue la medida de volumen, superficie y número de tejidos y componentes celulares con microscopía óptica o electrónica (Rohr y col., 1978).

Los métodos estereológicos permiten derivar información tridimensional a partir de imágenes bidimensionales. En sentido amplio, esto incluirá métodos de reconstrucción tridimensional usando secciones seriadas así como métodos cuantitativos extrapolables tratados con determinaciones numéricas. Este último concepto ha sido denominado estereología cuantitativa (Underwood, 1970).

Existen bastantes revisiones y artículos que han tratado más a fondo estos temas y, entre ellos, destacamos los de Loud y col. (1965), Weibel y col. (1966), Weibel (1969), Elias y col., (1971), Weibel y Bolender (1973) y Elias y Hide (1980).

Los parámetros abiertos a estudio por los métodos estereológicos incluyen: volúmenes y áreas de superficie de componentes fraccionarios, volúmenes medios, áreas de superficie medias y densidad numérica de diferentes partículas o células dentro de un tejido, así como el tamaño y número de las mismas. Estos volúmenes, áreas, números y tamaños pueden ser estimados a partir de células o tejidos, o bien a partir de porciones de los mismos.

En estereología estricta, los valores para un componente dado son expresados como densidades que relacionan su volumen, superficie o número con la unidad de volumen de una superficie de referencia dada. En morfometría simple, los valores se expresan como la media aritmética de una población de valores que resulta de tratar estadísticamente las áreas o números referidos a áreas o a poblaciones totales de un parámetro concreto.

Los efectos de tratamientos experimentales sobre la estructura celular y el curso a través del tiempo de distintos eventos morfológicos, pueden ser constatados de forma precisa por medio del volumen, superficie o número de células o de sus organelas. Con ello se evitan en gran medida los aspectos subjetivos y se pueden obtener datos cuantitativos fiables y comparables. Por ello, los métodos estereológicos y morfométricos representan un avance importante en la microanatomía y en la investigación básica morfológica en neuroendocrinología.

En nuestro laboratorio, han sido empleados en numerosas ocasiones técnicas y métodos estereológicos o morfométricos para el estudio de la hipófisis con gran eficacia y precisión.

Es obvio que, para determinar la fracción celular en un tejido (porcentaje de células inmunopositivas, en nuestro caso) es muy importante considerar el método empleado para su cuantificación. Los métodos histológicos suelen manejar muchas menos células que la citometría de flujo.

La cuantificación normal a través de microscopio es un método seguro si analiza un número suficiente de células, aunque tiene el inconveniente de consumir mucho tiempo, tanto más cuanto mayor sea la población celular considerada (Barnard y col., 1987; Hall y col., 1988; Sheperd y col., 1988; Karamitopoulou y col., 1993). El mayor problema radica en dilucidar cuántas células es necesario contar. Distintos estudios tratan de valorar esta aproximación (Aherne y col., 1977, 1982; García y col., 1987); habiendo empleado métodos semicuantitativos (Gatter y col., 1986; García y col., 1989), así como el análisis de imagen (Schwartz y col., 1989).

En nuestro caso, hemos optado por la cuantificación manual en campos de grandes aumentos para determinar la fracción proliferativa, estimando que 4000 células por hipófisis, elegidas aleatoriamente, fue un número suficiente para obtener resultados fiables estadísticamente.

## Comentarios en relación con los resultados obtenidos.

### Prolactinomas y Aromatasa.

Se ha demostrado, en roedores, que los adenomas hipofisarios espontáneos son frecuentes al avanzar la edad del animal (Berkvens y col., 1980; McComb y col., 1984; Herzog y Schlote, 1992) y, dentro de ellos, los prolactinomas tienen la mayor incidencia, llegando en algunas series a alcanzar hasta un 80% de las ratas de edad avanzada (Meites, 1982; Sarkar y col., 1982).

Se sabe que la manipulación experimental de la regulación dopaminérgica y estrogénica de la célula de prolactina da lugar a que la dopamina anule el efecto proliferativo del estradiol (McComb y col., 1986; Phelps e Hymer, 1988; Kovacs y col., 1991) y a que los estrógenos y los antagonistas dopaminérgicos se sumen sinérgicamente para inducir dicha proliferación y, quizás tras una hiperplasia previa, inducir la aparición de prolactinomas (Pérez y col., 1986; Pasolli y col., 1992; Oliveira y col., 1996; Southgate y col., 2000).

En nuestro laboratorio, como resultado de diversos proyectos de investigación, se ha demostrado que la hipófisis de ratas adultas presenta aromatasa en algunas de sus células y que la presencia del enzima es mucho más alta en machos que en hembras (Vázquez y col., 1999; Carretero y col., 1999), siendo el primer hallazgo en este sentido publicado a nivel mundial.

Este estudio se continuó con un análisis realizado con inmunohistoquímica, hibridación in situ y western blotting, sobre la expresión hipofisaria de la aromatasa. Con un anticuerpo altamente específico para la aromatasa de rata se demostró que además del dimorfismo sexual observado en la rata adulta, existe una expresión diferencial dependiendo de la edad del animal: Prenatalmente, su expresión comienza en el día 17 del desarrollo, se mantiene en etapas postnatales tempranas, expresándose igual en machos que en hembras. Prepuberalmente, la expresión disminuye en hembras y se mantiene en machos y, en la rata adulta, apenas se expresa en la hembra, pero sí en el macho (Carretero y col., 1999b, 2003).

Además, se comprobó que las hipófisis no tumorales de ratas viejas no expresan el enzima, mientras que un porcentaje muy alto de los adenomas espontáneos que aparecen en estos animales sí lo expresan, lo que sugiere que dicha expresión podría guardar estrecha relación con el tumor. Así, de una serie de 105 adenomas espontáneos de hipófisis de rata, el 66%, fueron inmunorreactivos a la aromatasa, sin que ello guardara relación con el tipo anatomopatológico del adenoma.

Considerando sólo los prolactinomas (adenomas productores de prolactina), el 86.67% presentaron reacción a la aromatasa, llamando la atención que el 100% de los prolactinomas puros (adenomas que sólo producen prolactina) fueron aromatasa positivos, mientras que sólo el 60% de los múltiples (adenomas que producen prolactina y otras hormonas) expresaron el enzima (Carretero y col., 2002).

Estos últimos hallazgos sugerían que la producción local de estradiol a partir de testosterona, por actuación de la Aromatasa, podría estar implicada en la génesis de dichos tumores.

*De forma parecida, la presencia de aromatasa en prolactinomas humanos no inducidos, demostrada en el presente estudio, sugiere que en la hipófisis humana podrían acontecer hechos semejantes a los observados previamente en roedores, por lo que la Aromatasa P450, metabolizando la Testosterona a Estradiol, estaría implicada en la génesis de los prolactinomas humanos y, en la patogénesis de los prolactinomas humanos, podría tener una gran relevancia la producción local de estradiol.*

### **Receptor estrogénico $\alpha$ .**

En los mamíferos, los estrógenos desarrollan sus funciones biológicas a través de dos isoenzimas conocidos como ER $\alpha$  y ER $\beta$  o receptores estrogénicos  $\alpha$  y  $\beta$ .

Estas dos proteínas pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, aunque su localización subcelular no siempre ha de ser nuclear, es en el núcleo de la célula donde fundamentalmente desarrollan sus acciones. Los receptores nucleares son factores de transcripción que se activan tras la unión a la hormona respectiva, en este caso los estrógenos y modulan de esta forma la expresión de los genes diana.

La unión de los estrógenos al receptor estrogénico provoca un cambio conformacional del mismo, liberándolo de la interacción con co-represores del tipo de las proteínas hsp90 y hsp70. Posteriormente, el receptor activado se dimeriza y se une a secuencias consenso de DNA llamadas elementos de respuesta a estrógenos (Lahusen y col., 2007) que se localizan en los promotores de los genes diana.

Para mantener la premisa de que el estradiol procedente de la aromatización hipofisaria de la testosterona desarrolle sus acciones biológicas es necesaria la presencia del receptor estrogénico en la hipófisis y, en particular, en los prolactinomas estudiados.

EL estradiol estimula la secreción de prolactina e induce hiperactividad y proliferación en las células hipofisarias productoras de la hormona. Los efectos del estradiol se desarrollan aumentando la proporción de hormona que es sintetizada y segregada a través de una vía constitutiva (Larson y Wise, 1994).

Entre otros factores, en la génesis y el desarrollo de los prolactinomas, se ha implicado a los estrógenos (Lloyd y col., 1991; Heaney y col., 2002). Desde hace tiempo se sabe que el tratamiento crónico con estradiol induce, en una primera fase, hiperplasia de las células de prolactina, constituyéndose, en una

segunda fase, el prolactinoma, dependiendo del tiempo de duración del tratamiento (McEuen y col., 1936; Dunning y col., 1947; Clifton y col., 1956; Stone y col., 1979). Estudios posteriores han confirmado que los estrógenos inducen la formación de prolactinomas y VIPomas (Phelps y Hymer, 1983, 1988; Hsu y col., 1989; Lloyd y col., 1990, 1991).

Algunos tumores secretores de prolactina contienen niveles muy altos de PTTG (pituitary tumour transforming gene o gen inductor de tumores hipofisarios). Las células que expresan PTTG presentan una secreción anormalmente elevada de FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y en el tejido aparece una angiogénesis acelerada.

La expresión de PTTG está regulada por los estrógenos y la PTTG juega un importante papel en la transformación temprana de las células hipofisarias hacia células productoras de prolactina.

Green y col. (1986) y Greene y col. (1986) demostraron la existencia del receptor estrogénico  $\alpha$  y Kuiper y col. (1996) y Mosselman y col. (1996) describieron la existencia del receptor estrogénico  $\beta$ . Estos receptores están distribuidos por los diferentes órganos y tejidos del organismo y son los responsables de los efectos estrogénicos (Katzenellenbogen, 1996).

La presencia de receptores estrogénicos en la hipófisis ha sido descrita en ratas adultas de ambos sexos (Shull y Gorski, 1985, 1989), así como la actuación directa del estradiol sobre las células hipofisarias (Pérez et al., 1986; Carretero et al., 1991, 1992, 1995, 1997).

*Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que todos los prolactinomas estudiados presentan el receptor estrogénico  $\alpha$ , a la vez que son aromatasa positivos.*

*Estos resultados sugieren que la testosterona podría aromatizarse a estradiol que, actuando sobre un receptor específico, se transformaría en un regulador autoparacrino sobre-expresado activando constitutivamente la secreción de prolactina, induciendo la mitogénesis de las células productoras de la hormona y la neoangiogénesis hipofisaria, dando lugar en el tiempo al desarrollo de prolactinomas humanos, ya que el prolactinoma es un tumor inducible por estrógenos (Wingrave y col., 1980; Phelps y Hymer, 1983; Gooren y col., 1988; Molitch, 2001; Heany y col., 2002).*

### **Coactivador estrogénico AIB1.**

Se considera a AIB1 como un factor importante en el desarrollo del cáncer de mama (Anzick y col., 1997; Torchia y col., 1997; Li y col., 1997; Chen y col.,

1997) y los aumentos en su expresión podrían ser responsables de la reducción de los efectos que desarrollan los antagonistas estrogénicos sobre estos tumores (Osborne y col., 2003).

Se ha descrito la presencia de algunos coactivadores de receptor estrogénico en la hipófisis (Zhang y col., 2003) y, al parecer, la sobre-expresión de AIB1 podría estar relacionada con aumentos en la incidencia de tumores hipofisarios en ratones (Torres-Arzayus y col., 2004).

*Uno de los resultados más interesantes observados en nuestro estudio es la diferente localización subcelular de AIB1, de forma que, de los tumores positivos a AIB1, el 17% presentaron reacción sólo en el citoplasma, el 24% la presentaron sólo en el núcleo y el 59% tenían reacción citoplásmica y nuclear.*

Como coactivador traslacional, AIB1 desarrolla su acción en el núcleo celular, de hecho en las células quiescentes del epitelio mamario o en cultivos celulares desprovistos de factores de crecimiento, su localización es citoplásmica (Wang y col., 2000), mientras que su localización pasa a ser nuclear cuando las células epiteliales están en proliferación (Avivar y col., 2006) de forma semejante a como ocurre en el desarrollo de tumores de mama (Kuang y col., 2004).

En líneas celulares, se ha comprobado que AIB1 presenta diferentes localizaciones subcelulares y se ha relacionado, aunque de forma contradictoria, la localización subcelular de la proteína con su vida media.

Algunos autores han relacionado la presencia citoplásmica de la proteína con su degradación (Mani y col., 2006). Sin embargo, recientemente se ha descrito que la vida media, en líneas celulares, es bastante más larga cuando la localización es citoplásmica que cuando es nuclear (Ferrero y col., 2008). Los resultados presentados recientemente en su tesis doctoral por Avivar (2008) sugieren que la degradación de AIB1 es preferentemente nuclear y es llevada a cabo por actuación del proteasoma MG132. La posible degradación lisosomal en el citoplasma podría existir, aunque con menor importancia que la nuclear y siempre como un mecanismo minoritario de reciclaje de AIB1 (Avivar, 2008).

Parece existir una relación entre la vida media de AIB1 y la activación del receptor estrogénico  $\alpha$ , ya que los agonistas de receptor estrogénico disminuyen la vida media de AIB1, mientras que los antagonistas la aumentan, lo que podría provocar la coactivación de otros factores como E2F y AP-1, importantes promotores del ciclo celular.

En el caso de la hipófisis y, en particular, de las células de prolactina, AP-1 es uno de los mecanismos más importantes en la activación de este tipo de células, existiendo un lugar de unión específico para AP-1 en la porción próxima al exón 1 del gen, dentro del promotor.

*Resumiendo los datos mencionados anteriormente, la localización intranuclear de AIB1 podría relacionarse con la activación de receptores estrogénicos a nucleares y las acciones mitogénicas y proliferativas del estradiol sobre las células de prolactina; mientras que la localización citoplásmica de AIB1 podría estar ligada a un aumento en su vida media y a una activación de AP-1. Por todo ello, AIB1, sobre expresado por acción del 17- $\beta$ -estradiol (Edwards, 2005), asociado a la presencia de aromatasa en estos tumores y a la producción local y exagerada del esteroide, podría jugar un papel fundamental en la génesis de los prolactinomas.*

*Este papel, aunque no ha sido analizado en nuestro estudio, podría guardar relación con los efectos proliferativos (Planas-Silva y col., 2001; Louie y col., 2006; Avivar y col., 2006 Horiguchi y col., 2006) y anti-apoptóticos de AIB1, directos (Torres-Arzallus y col., 2004; Zhou y col., 2005; Colo y col., 2007) o mediados por la supresión de proteínas pro-apoptóticas sensibles a estrógenos como DRP1 (Marcantonio y col., 2001, Avivar, 2008) descritos por otros autores, preferentemente en cáncer de mama estrógeno dependiente y en líneas celulares (Avivar, 2008).*

*En nuestro estudio hemos podido comprobar que, al igual que ocurre en el cáncer de mama estrógeno dependiente, la presencia de AIB1 en prolactinomas humanos se correlaciona bien con la presencia de aromatasa y de receptor estrogénico  $\alpha$ , lo que sugiere la implicación de AIB1 en la génesis y desarrollo del tumor.*

### **Proteína p53.**

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear que actúa como supresor tumoral por impedir la progresión del ciclo celular (Vogelstein y Kinzler, 1992), inhibiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) y cuya función está alterada, generalmente por mutaciones puntuales en el gen que la codifica, en más del 50% de los cánceres humanos. La mitad o más de los tumores humanos analizados tienen lesiones genéticas detectables para p53 (Chang y col., 1993). Frecuentemente, el patrón de mutación somática en el gen de p53, en los tumores humanos, consiste en una mutación de un alelo que se acompaña de la pérdida del segundo alelo (Nigro y col., 1989; Levine y col., 1991; Hollstein y col., 1991; Caron de Fromental y Soussi, 1992).

La p53 desarrolla sus funciones dentro de la célula de una forma tetramérica; en el caso de mutaciones los hetero-oligómeros formados por p53 normal y p53 mutada podrían traer como consecuencia la inactivación de la p53 no mutada, con la pérdida de toda su actividad biológica (Stürzbecher y col., 1992), aunque formas monoméricas de p53 retienen la capacidad de actuación sobre la transcripción y la transactivación (Tarunina y Jenkins, 1993).

La p53 está implicada en el control de la integridad genética de las células: activación de los genes implicados en la parada de la división celular, la replicación y la reparación del DNA, pudiendo desencadenar en ciertas condiciones apoptosis (Lane, 1992).

La p53 activa el gen WAF1 responsable de la síntesis de p21, proteína inhibidora de la actividad quinasa de los complejos cdk/ciclina E necesarios para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (El-Deiry y col., 1993; Darbon y col., 1995).

En particular la asociación de la mutación homo o heterocigótica de p53 con la heterocigoto de Rb da lugar a la formación de tumores hipofisarios (Williams y col., 1994; Harvey y col., 1995). Por otro lado, el homeobox hipofisario Pitx-1, que juega un importante papel en el mantenimiento de la expresión génica de forma específica para los diferentes subtipos celulares de la hipófisis, estimula la activación del promotor de p53 y la transcripción de los genes implicados en la parada del ciclo celular y la apoptosis sobre los que actúa p53 (Liu y Lobie, 2007).

La importancia del papel que p53 puede jugar en la citofisiología y en la progresión de los adenomas hipofisarios se ha puesto de relevancia ya que la parada del ciclo celular en líneas tumorales hipofisarias, después de daños en el DNA, se debe a la actuación de p53 () de cara a que la célula compruebe si puede o no reparar los daños en el DNA antes de su división (Hooper, 1994; Clarke, 1995; Woloschak y col., 1996). La mutación, delección o no actuación de p53 favorece de forma clara la progresión del tumor.

La presencia de p53 en los adenomas hipofisarios está bien documentada en la literatura (Aoki y col., 2001; Oliveira y col., 2002; Ozer y col., 2003; Bothelho y col., 2006; Kontogeorgos, 2006; Saeger y col., 2008)

La apoptosis hipofisaria asociada a un aumento de p53 aparece sólo con niveles muy bajos o en ausencia de estrógenos (Aoki y col., 2001). Por otro lado, la actividad apoptótica del tratamiento de adenomas hipofisarios con bromocriptina depende de la activación de p53 y la supresión de bcl-2 (Yin y cl., 1999).

En contradicción con hallazgos descritos previamente (Oliveira y col., 2002), la p53 aparece en adenomas hipofisarios humanos invasivos o de gran tamaño (Saeger y col., 2008), lo que corrobora estudios previos en los que se establecía que la expresión de p53 es muy importante a la hora de valorar la predicción de la conducta que seguirán los adenomas hipofisarios humanos (Kontogeorgos, 2006), siendo mayor su expresión en los adenomas recurrentes en comparación con los no recurrentes (Ozer y col., 2003).



*A pesar de todos los estudios expuestos anteriormente, no hay en la literatura un análisis que correlacione la presencia de p53 en prolactinomas humanos con los otros marcadores analizados en nuestro estudio, aromatasa, receptor estrogénico  $\alpha$  y AIB-1.*

*En nuestro estudio hemos comprobado que en torno al 76% de los prolactinomas fueron positivos para p53. Hay muy pocos estudios sobre el porcentaje de adenomas hipofisarios positivos a p53 y, en general, los pocos estudios que analizan este dato se refieren principalmente a adenomas hipofisarios en general o a líneas tumorales hipofisarias en vez de a prolactinomas en concreto.*

*En los estudios de Oliveira y col. (2002) en los que se analizan los adenomas en general, los adenomas positivos a p53 fueron positivos para prolactina. Ozer y col. (2003) reportan un 17% de adenomas hipofisarios positivos a p53, pero no diferencian si eran o no prolactinomas. Un porcentaje similar ha sido descrito recientemente por Saeger y col. (2008) analizando adenomas hipofisarios no funcionantes. Una correlación parecida a la observada por nosotros fue descrita por Botelho y col. (2006).*

*Tampoco hemos podido encontrar valoraciones sobre los adenomas hipofisarios y la localización subcelular de p53. Teniendo en cuenta que p53 es una proteína que desarrolla su acción en el núcleo, el arresto de p53 en el citoplasma de las células tumorales impide que pueda desarrollar su acción biológica sobre el DNA uniéndose a los promotores, de forma que pare el ciclo celular y estimule la apoptosis.*

*Como hemos resaltado en nuestros resultados, el patrón de reacción a p53 y, en particular, la localización intracelular de la reacción varía mucho de unos tumores a otros. Aunque el 76% de los prolactinomas presentaron células positivas a p53, no es menos cierto que esa positividad en muchos casos (58% de los prolactinomas positivos a p53) se dio de forma aislada, sólo en unas pocas células tumorales. Los tumores que presentaron muchas células positivas a p53 o aquellos en los que prácticamente todas las células eran positivas a la proteína, presentaron*

*reacción en el citoplasma y, aunque alguna célula pudiera tener reacción nuclear, éstas eran muy escasas, siempre por debajo del 0.6% de las células positivas.*

*Los hallazgos anteriormente expuestos sugieren que, en la mayoría de los prolactinomas humanos, p53 no está presente o bien se localiza en el citoplasma de la célula, lo que podría indicar la existencia de mutaciones en la proteína; ambos factores influirían en que p53 no pueda desarrollar su acción antitumoral.*

Estudios en células HeLa han demostrado que AIB-1 puede modular la transactivación de p53 ya que ésta interactúa con subregiones específicas de AIB-1 (Soo-Kyung y col., 1999). También se ha demostrado que existe una correlación entre la sobre-expresión de AIB-1 y la positividad de p53 en el cáncer de mama (Bouras y col., 2001). Hallazgos semejantes se han descrito en el cáncer colo-rectal (Xie y col., 2005)

*En nuestro estudio hemos podido comprobar que la presencia de positividad a p53 se asocia a la presencia de AIB-1 en el núcleo de la célula, ya que ningún prolactinoma positivo a p53 presentó reacción a AIB-1 sólo en el citoplasma, sino que todos los prolactinomas p53 positivos tenían reacción nuclear o reacción citoplásmica y nuclear a la vez.*

*Estos hallazgos sugieren que, al igual que ocurre en otros tipos de tumor en los que AIB-1 y p53 tienen relevancia, en los prolactinomas la expresión de ambas proteínas puede guardar relación con el desarrollo y crecimiento del tumor.*

## **Conclusiones**

Después de haber analizado 87 adenomas humanos no inducidos y compararlos con 8 hipófisis humanas no tumorales, mediante métodos inmunocitoquímicos, de IRMA y de western blotting, correlacionar los resultados obtenidos para cada uno de los marcadores analizados y comparando los resultados obtenidos con los descritos por otros autores en la literatura, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- I. Los prolactinomas humanos, en su totalidad, independientemente de que se hayan desarrollado en varones o mujeres y sin relación con la edad del paciente, fueron positivos a la Aromatasa P450 con mayor intensidad que en hipófisis humanas no tumorales, lo que sugiere la participación del enzima en la génesis y desarrollo del tumor.
- II. Todos los prolactinomas presentaron positividad al receptor estrogénico  $\alpha$ , lo que sugiere que el estradiol procedente de la metabolización local de la testosterona por la catalización de la aromatasa, puede desarrollar su acción.
- III. Todos los prolactinomas fueron positivos al coactivador de receptor estrogénico AIB1. Lo que sugiere la participación de este coactivador como factor implicado en la génesis y desarrollo del tumor. La localización intracelular de AIB1 puede ser un importante factor modulador del desarrollo del tumor.
- IV. El posible secuestro de p53 en el citoplasma de las células productoras de prolactina en los prolactinomas parece estar directamente relacionado con el desarrollo del tumor. La positividad a p53 guarda una estrecha relación con la localización intranuclear de AIB1.
- V. El desarrollo de los prolactinomas espontáneos humanos parece seguir patrones de desregulación semejantes a otros tumores estrógeno-dependientes, por lo que los bloqueos selectivos de la aromatasa hipofisaria y de AIB1 podrían ser coadyuvantes terapéuticos de gran interés.

## Referencias

- Abd El-Hamid, MW. Joplin, GF. Lewis, PD. Incidentally found small pituitary adenomas may have no effect on fertility. *Acta Endocrinol.* 1988. 117: 361-364.
- Ahumada, JC. Del Castillo, EB. Amenorrea y galactorr ea. *Bol. Soc. Obst. Ginec.* 1932. 11: 64-67
- Andrieu, T. F eral, C. Joubert, M. Benhaim, A. Mittre, H. The absence of a functional nuclear receptor element A (NREA) in the promoter II of the aromatase P450 gene in rabbit granulosa cells. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 2006. 101: 127-135
- Anzick, SL. Kononen, J. Walker, RL. Azorsa, DO. Tanner, MM. Guan, XY. Sauter, G. Kallioniemi, OP. Trent, JM. Meltzer, PS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science.* 1997. 277: 965-968.
- Aoki, MP. Aoki, A. Maldonado, CA. Sexual dimorphism of apoptosis in lactotrophs induced by bromocryptine. *Histochem. Cell. Biol.* 2001. 116: 215-222
- Asa, SL. Puy, LA. Lew, AM. Sundmark, VC. Elsholtz, HP. Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator Pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993. 77: 1275-1280.
- Avivar, A. Bases moleculares de la oncog nesis mediada por AIB1. Tesis Doctoral. Dpto. Bioqu mica y biolog a molecular III e inmunolog a. Universidad de Granada. 2008.
- Avivar, A. Garc a-Mac as, MC. Ascaso, E. Herrera, G. O'Connor, JE. De Mora, JF. Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS Lett.* 2006. 580: 5222-5226.
- Balthazart, J. Foidart, A. Hendrik, JC. The induction by testosterone of aromatase activity in the preoptic area and activation of copulatory behavior. *Physiol. Behav.* 1990a. 7: 83-94
- Balthazart, J. Foidart, A. Surlemont, CH. Vockel, A. Harada, N. Distribution of aromatase in the brain of the japanese quail, ring dove, and zebra finch: and immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 1990b. 301: 276- 288
- Balthazart, J. Foidart, A. Surlemont, C. Harada, N. Immunocytochemical localization of aromatase in the brain. *Brain. Res.* 1990c. 514: 327-333.
- Balthazart, J. Foidart, A. Surlemont, C. Harada, N. Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the mouse forebrain. *Cell Tissue Res.* 1991a. 263: 71-79
- Balthazart, J. Foidart, A. Surlemont, C. Harada, N. Neuroanatomical specificity in the co-localization of aromatase-and estrogen receptors. *J. Neurobiol.* 1991b. 22: 143-157
- Bansal, S. Lee, LA. Woolf, PD. Abnormal prolactin responsivity to dopaminergic suppression in hyperprolactinemic patients. *Am. J. Med.* 1981. 71: 961-966.
- Barbarino, A. De Marinis, L. Anile, C. Menini, E. Merlini, E. Merlini, G. Maira, G. Dopaminergic mechanisms regulating prolactin secretion in patients with prolactin-secreting pituitary adenoma. Long-term studies after selective transsphenoidal surgery. *Metabolism.* 1982. 31: 1100-1104

- Barlier, A. Pellegrini-Bouiller, I. Caccavelli, L. Gunz, G. Morange-Ramos, I. Jaquet, P. Enjalbert, A. Abnormal transduction mechanisms in pituitary adenomas. *Horm. Res.* 1997. 47: 227-234.
- Barnard, NJ. Hall, PA. Lemoine, NR. Kadar, NJ. Proliferative index breast carcinoma determined in situ by KI 67 immunostaining and its relationship to pathological and clinical variables. *J. Pathol.* 1987. 152: 287-295.
- Bellino, FL. Osawa, Y. Solubilization of estrogen synthetase from human term placental microsomes using detergents. *J. Steroid. Biochem.* 1978. 9: 219- 28.
- Berkvens, JM. Van Nesselrooy, JHJ. Kroes, R. Spontaneous tumors in the pituitary gland of old Wistar rats. A morphological and immunocytochemical study. *J. Pathol.* 1980. 130: 179-191.
- Beyer, C. Tramonthe, R. Hutchison, RE. Sharp, PJ. Barker, PJ. Huskinsson, NS. Hutchison, JB. Aromatase immunoreactive neurons in the adult female chicken detected using a specific antibody. *Brains. Res. Bull.* 1994 c. 33: 583-588
- Blaschke, W. *Vorlesungen Ober Integralgeometrie.* (Chelsea Publishing Company). 1949.
- Boggild, MD. Jenkinson, S. Pistorello, M. Boscaro, M. Scanarini, M. McTernan, P. Perrett, CW. Thakker, RV. Clayton, RN. Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994. 78: 387-392.
- Bonnesen, T. Fenchel, W. *Theorie der konvexen Körper. Ergebnisse der Mathematik und ihrer Grenzgebiete.* 1934. 3: S1.
- Botelho, CH. Magalhaes, AV. Mello, PA. Schmitt, FC. Casulari, LA. Expression of p53 and c-erb B2 in growth hormone-and/or prolactin-secreting pituitary adenomas. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2006. 64: 60-66
- Bouraima, H. Hanoux, V. Mitre, H. Féral, C. Benhaïm, A. Leymarie, P. Expression of the rabbit cytochrome P450 aromatase encoding gene uses alternative tissue-specific promoters. *Eur. J. Biochem.* 2001. 268: 4506-4512
- Bouras, T. Southey, MC. Venter, DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res.* 2001. 61: 903-907.
- Bression, D. Brandi, AM. Martres, MP. Noursbaum, A. Cesselin, F. Racadot, J. Peillon, F. Dopaminergic receptors in human prolactin-secreting adenomas : a quantitative study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980. 51: 1037-1043
- Buffa, R. Solcia, E. Fiocca, R. Crivelli, O. Pera, A. Complement- mediated binding of immunoglobulins to some endocrine cells of the pancreas and gut. *J. Histochem. Cytochem.* 1979. 27: 1279-1280
- Caccavelli, L. Feron, F. Morange, I. Rouer, E. Benarous, R. Dewailly, D. Jaquet, P. Kordon, C. Enjalbert, A. Decreased expression of the two D2 dopamine receptor isoforms in bromocriptine-resistant prolactinomas. *Neuroendocrinology.* 1994. 60: 314-322.
- Cai, WY. Alexander, JM. Hedley-Whyte, ET. Scheithauer, BW. Jameson, JL. Zervas, NT. Klibanski, A. Ras mutations in human prolactinomas and pituitary carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994. 78: 89-93.

- Caron de Fromentel, C. Soussi, T. TP53 tumor suppressor gene: A model for investigating human mutagenesis. *Genes, Chrom. Cancer*. 1992. 4: 1-15
- Carretero, J. Blanco, E. Vázquez, G. Rubio, M. Santos, M. Pérez, R.M. Vázquez R. Immunohistochemical evidence for the expression of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell. Tissue. Res*. 1999a. 295: 419-423.
- Carretero, J. Blanco, E. Vázquez, G. Rubio, M. Santos, M. Pérez. R.M. Vázquez, R. Immunohistochemical evidence for the expression of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue. Res*. 1999. 295:419-423.
- Carretero, J. Burks, DJ. Vázquez, G. Rubio, M. Hernández, E. Bodego, P. Vázquez, R. Expresión of aromatase P450 is increased in spontaneous prolactinomas of aged rats. *Pituitary*. 2002. 5: 5-10.
- Carretero, J. Burks, DJ. Vázquez, G. Rubio, M. Hernández, E. Riesco, JM. Vázquez. R. Aromatase P450 is expressed in spontaneous prolactinomas of aged rats. *Pituitary*. 2002. 5: 5-10.
- Carretero, J. Rubio, M. Blanco, E. Burks, D J. Torres, J L. Hernandez, E. Bodego, P. Riesco, J M. Juanes, J A. Vazquez. R. Variations in the cellular proliferation of prolactin cells from late pregnancy to lactation in rats. *Ann. Anat*. 2003b. 185: 97-101
- Carretero, J. Rubio, M. Navarro, N. Prieto, P. Vázquez, RJ. Sánchez, F. Vázquez, R. In vitro modifications in the proliferation rate of prolactin cells are accompanied to nuclear morphometric variations. *Histol. Histopathol*. 1995. 10: 135-139.
- Carretero, J. Rubio, M. Navarro, N. Prieto, P. Vázquez, RJ. Sánchez, F. Vázquez, R. In vitro modifications in the proliferation rate of prolactin cells are accompanied to nuclear morphometric variations. *Histol. Histopathol*. 1995. 10: 135-139.
- Carretero, J. Rubio, M. Sánchez, F. Estévez, MJ. Santos, M. Vázquez, G. Blanco, E. Vázquez, R. Hyperactivity and proliferation of prolactin cells induced in vitro by met-enkephalin. *Eur. J. Anat*. 1997a. 1: 89-95
- Carretero, J. Rubio, M. Sánchez, F. Pereña, J. Estévez, FI. Vázquez, G. Pérez, RM. Vázquez, R. In Vitro effects of estradiol on pituitary GH-immunoreactive cells. *Histol. Histopathol*. 1997. 12: 631-636.
- Carretero, J. Rubio, M. Sánchez, F. Vázquez, RJ. Santos, M. Blanco, J. Vázquez, R. In vitro morphometric and proliferative variations of VIP-immunoreactive pituitary cells induced by estradiol. *Neuroendocrinology*. 1995. 62:277-282.
- Carretero, J. Sánchez, F. Blanco, E. Montero, M. Riesco, JM. González, R. Vázquez, R. Estrogenic modulation of met-enkephalin-induced prolactin secretion in rats. *Anat. Embryol*. 1991. 183: 455-459.
- Carretero, J. Sanchez, F. Blanco, E. Riesco, JM. Sanchez-Franco, F. Vazquez, R. Morhofunctional study of mammatropic cells following intraventricular administration oif met-enkephalin. *Anat. Embryol*. 1989. 179: 243- 250.
- Carretero, J. Sánchez, F. González, R. Montero, M. Juanes, JA. Riesco, JM. Vázquez, R. Morphometric análisis of GH-immunoreactive cells alter GH release induced by treatment with estrogen in adult male rats. *Acta Histochem*. 1992. 93:271-276.
- Carretero, J. Sánchez, F. González, R. Montero, M. Juanes, JA. Riesco, JM. Vázquez, R. Morphometric analysis of GH-immunoreactive cells after GH release induced by treatment with estrogen in adult male rats. *Acta. Histochem*. 1992a. 93:271-276.



- Carretero, J. Sánchez, F. Montero, M. Blanco, E. Riesco, JM. Carbajo, E. González, R. Vázquez, R. Morphological and functional study of the GH-immunoreactive adenohypophyseal cells in ovariectomized rats. *Histochem. J.* 1990. 22: 683-687.
- Carretero, J. Vázquez, G. Martín-Clavijo, A. Rubio, M. Hernández, E. Moro, JA. Gato, A. Barbosa E. Vázquez, R. In vivo studies on cytodifferentiation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur. J. Anat.* 1999b. 3: 79-85
- Carretero, J. Vázquez, G. Martín-Clavijo, A. Rubio, M. Hernández, E. Moro, JA. Gato, A. Barbosa, E. Vázquez, R. In vivo studies on cytodifferentiation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur. J. Anat.* 1999. 3: 79-85.
- Carretero, J. Vazquez, G. Rubio, M. Blanco, E. Juanes, JA. Perez, E. Burks, D. Vazquez, R. Postnatal differentiation of the immunohistochemical expresión of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol. Histopathol.* 2003a. 18: 419-423.
- Carretero, J. Vazquez, G. Rubio, M. Blanco, E. Juanes, JA. Perez, E. Burks, DJ. Vazquez, R. Postnatal differentiation of the immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol. Histopathol.* 2003. 18: 419-423.
- Carretero, J. Vázquez, G. Rubio, M. Blanco, E. Juanes, JA. Pérez, E. Burks, D. Vázquez, R. Postnatal differentiation of the immunohistochemical expresión of aromatase P450 in the rat pituitary gland. *Histol. Histopathol.* 2003. 18 : 419-423.
- Carretero, J. Vázquez, RJ. Rubio, M. Santos, M. Vázquez, G. Sánchez, F. Martín-Clavijo, A. Vázquez, R. Inverse effects of estradiol and testosterone on the in vitro proliferation rate of rat VIP-immunoreactive pituitary cells. *Eur. J. Anat.* 1998. 2: 101-108
- Chang, F. Syrjanen, S. Kurvinen, K. Syrjanen, K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am. J. Gastroenterol.* 1993. 88: 174-186
- Chen, H. Lin, RJ. Schiltz, RL. Chakravarti, D. Nash, A. Nagy, L. Privalsky, ML. Nakatani, Y. Evans, RM. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 1997. 90: 569-580
- Chen, S. Shively, JE. Nakajin, S. Shinoda, M. May, PF. Aminoterminal sequence analysis of human placenta aromatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. 135: 713-719.
- Clarke, AR. Murine models of neoplasia: functional analysis of the tumour suppressor genes Rb-1 and p53. *Cancer Metastasis Rev.* 1995. 14: 125-148
- Clayton, RN. Boggild, M. Bates, AS. Bicknell, J. Simpson, D. Farrell, W. Tumour suppressor genes in the pathogenesis of human pituitary tumors. *Horm. Res.* 1997. 47: 185-193.
- Clifton, KH. Furth, J. Changes in hormone sensitivity of pituitary mammotropes during progression from normal to autonomous. *Cancer Res.* 1961. 21: 913-920.
- Clifton, KH. Meyer, RK. Mechanism of anterior pituitary tumor induction by estrogen. *Anat. Rec.* 1956. 125: 65-81.
- Colo, Gp. Rosato, RR. Grant, S. Costas, MA. RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2007. 30: 5075-5081

- Coulon, G. Fellmann, D. Arbez-Gindre, F. Pageaut, G. Les adenome hypophysaires latents. Etude autopsique. Sem Hop Paris. 1983. 59 : 2747-2750
- Couse, JF. Hewitt, SC. Bunch, DO. Sar, M. Walker, VR. Davis, BJ. Korach, KS. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. Science. 1999. 286: 2328-2331.
- Crofton, MW. Geometrical theorems related to mean values. Proc. Lond. Math. Soc. 1877. 8: 304
- Darbon, J. Fesquet, D. Cavadore, J. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire: les protéines modulatrices des complexes Cdk-cyclines. Medicine/sciences. 1995. 11: 349-356
- Delesse, A. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches (extrait), C. R. Acad. Sci. Paris. 1847. 25: 544.
- Dellovade, TL. Hatrada, N. Rissman, EF. Distribution and steroid dependence of aromatase enzyme immunoreactivity in limbic nuclei of the female musk shrew brain. Brain Res. 1994. 634: 141-149
- Delthiel, R. Probabilités géométriques. Gauthier-Villars et Ge. Eds (Ecole Poly technique, Paris). 1926.
- Dunning, WF. Curtis, MR. Segaloff, A. Strain differences in response to diethylstilbestrol and the induction of mammary gland and bladder cancer in the rat. Cancer Res. 1947. 7: 511-521.
- Dupont, S. Krust, A. Gansmuller, A. Dietrich, P. Chambon, M. Mark, M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptor alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. Development. 2000. 127: 4277-4291.
- Edwards, DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. Annu. Rev. Physiol. 2005. 67:335-376.
- El-Azouzi, M. Hsu, DW. Black, PM. Jolesz, F. Hedley-Whyte, ET. Klibanski, A. Zervas, NT. The importance of dopamine in the pathogenesis of experimental prolactinomas. J. Neurosurg. 1990. 72: 273-281.
- El-Deiry, WS. Tokino, T. Velculescu, VE. Levy, DB. Parsons, R. Trent, JM. Lin, D. Mercer, WE. Kinzler, KW. Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. 1993. 75: 817-825.
- Elias, H. Hyde, DM. An elementary introduction to stereology (quantitative microscopy). Am. J. Anat. 1980. 159: 412-446.
- Elias, KA. Weiner, RI. Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984. 81: 4549-4553.
- Elias, PM. Ornstein, L. Lutzner, MA. Robbins, JH. A method for studying the ultrastructure of intercellular contacts in leukocyte cultures. Experientia. 1971. 27: 116-118.
- Error, A. Bassetti, M. Spada, A. Giannattasio, G. Microvasculature of human micro- and macroprolactinomas. Neuroendocrinology. 1986. 43: 159-165.

- Faccenda, E. Melmed, S. Bevan, JS. Eidne, KA. Structure of the thyrotropin-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *Clin. Endocrinol.* 1996. 44: 341-347.
- Ferrero, M. Avivar, A. García Macías, MC. Font de Mora, J. PI3K/AKT signaling can promote AIB1 stability independently of GSK3 phosphorylation. *Cancer Res.* 2008. In press.
- Fine, SA. Frohman, LA. Loss of central nervous system component of dopaminergic inhibition of prolactin secretion in patients with prolactin-secreting pituitary tumors. *J. Clin. Invest.* 1978. 61: 973-980.
- Fisher, CR. Graves, KH. Parlow, AF. Simpson, ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95: 6965-6970.
- Fitzpatrick, SL. Richards, JS. Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Mol. Endocrinol.* 1994. 8: 1309-1319.
- Forssmann, WG. Pickel, V. Reinecke, M. Hock, D. Metz, J. Immunohistochemistry and immunocytochemistry of nervous tissue. En: *Techniques in neuroanatomical research.* (Heym, C. Forssman, WG. Eds.) Springer-Verlag, Berlin. 1981. 171-205
- Fowler, KA. Gill, K. Kirma, N. Dillehay, DL. Tekmal, RR. Overexpression of aromatase leads to development of testicular leydig cell tumors: an in vivo model for hormone-mediated Testicular Cancer. *Am. J. Pathol.* 2000. 156: 347-353.
- Friedman, E. Adams, EF. Höög, A. Gejman, PV. Carson, E. Larsson, C. De Marco, L. Werner, S. Fahlbusch, R. Nordenskjöld, M. Normal structural dopamine Type 2 receptor gene in prolactin-secreting and other pituitary tumors. *J. Clin. Neuroendocrinol. Metab.* 1994. 78: 568-574.
- Gaffey, TA. Scheithauer, BW. Lloyd, RV. Burger, PC. Robins, P. Fereidooni, F. Horvath, E. Kovacs, K. Kuroki, T. Young, Jr WF. Sebo, TJ. Riehle, DL. Belzberg, AJ. Corticotroph carcinoma of the pituitary: a clinicopathological study. Report of four cases. *J. Neurosurg.* 2002. 96: 352-360.
- Gao, L. Xu, RK. Pang, CS. Xu, JP. Shan, HM. Pang, SF. Inhibitory effect of melatonin on the development of pituitary prolactin-producing tumors induced by 17-beta-estradiol. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2001. 23:49-53.
- García, CF. Weiss, LM. Lowder, J. Quantitation and stimulation of lymphocyte subsets in tissue sections. Comparison with flow cytometry. *Am. J. Pathol.* 1987. 470-477.
- García, RL. Coltrera, MD. Gown, AM. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am. J. Pathol.* 1989. 134: 733-739.
- Gatter, KC. Dunnill, MS. Gerdes, J. Stein, H. Mason, DY. New approach to assessing lung tumours in man. *J. Clin. Pathol.* 1986. 39: 590-593.
- Ghadmi, BM. Schrock, E. Walker, RL. Wangsa, D. Jauho, A. Meltzer, PS. Ried, T. Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am. J. Pathol.* 1999. 154: 525-536.
- Gil, J. Estudio inmunocitoquímico de las estirpes celulares productoras de neuropéptidos: péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona liberadora de GH (GRF) y somatoestatina

(SRIF), en la hipófisis de la rata. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca. 1992.

- Gill, K. Kirma, N. Tekmal, RR. Overexpression of aromatase in transgenic male mice results of induction of gynecomastia and other biochemical changes in mammary glands. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2000. 177: 13-18.
- Gillam, MP. Middler, S. Freed, DJ. Molitch, ME. The novel use of very high doses of cabergoline and a combination of testosterone and an aromatase inhibitor in the treatment of a giant prolactinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. 87: 4447-4451.
- Giros, B. Sokoloff, P. Martres, MP. Riou, JF. Emorine, LJ. Schwartz, JC. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature.* 1989. 342: 923-926.
- Golick, ML. Rice, M. Optimum staining of PCNA in paraffin sections is dependent of fixation, drying and intensification. *J. Histotechnol.* 1992. 15: 39-41.
- Gooren, LJ. Assies, J. Asscheman, H. de Slegte, R. van Kessel, H. Estrogen-induced prolactinoma in a man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988. 66: 444-446.
- Gorczyca, W. Hardy, J. Arterial supply of the human anterior pituitary gland. *Neurosurgery.* 1987. 20: 369-376
- Green, S. Walter, P. Greene, G. Krust, A. Goffin, C. Jensen, E. Scrace, G. Waterfield, M. Chambon, P. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *J. Steroid. Biochem.* 1986, 24: 77-83
- Greene, GL. Gilna, P. Waterfield, M. Baker, A. Hort, Y. Shine, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986. 231: 1150-1154.
- Guivarch, D. Vincent, JD. Vernier, P. Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptors in the MMQ prolactin cell line. *Endocrinology.* 1998. 139: 4213-4221.
- Hall, PA. Levinson, DA. Woods, AL. Yu, CCW. Kellock, DB. Watkins, JA. Barnes, DM. Gillet, CE. Camplejohn, R. Dover, R. Waseem, Nh. Lane, DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: a index of cell proliferation with evidence of regulated expression in some neoplasm. *J. Pathol.* 1990. 162
- Hall, PA. Richard, MA. Gregory, WM. D'Adenne, AJ. Lister, TA. Stansfeld, AG. The pronostic significate of KI 67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Pathol.* 1988. 154: 223-235.
- Harada, N. Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: immunochemical identification and sequence análisis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. 156: 725-732.
- Harada, N. Genetic analysis of human placental aromatase deficiency. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1993. 44: 331-340
- Harada, N. Novel properties of human placental aromatase as cytochrome P-450: Purification and characterization of a unique form of aromatase. *J. Biochem.* 1987. 103: 106-113.
- Harada, N. Ogawa, H. Shozu, M. Yamada, K. Genetic studies to characterize the origin of the mutation in placental aromatase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 1992b. 51: 666-672.

- Harada, N. Ogawa, H. Shozu, M. Yamada, K. Suhara, K. Nishida, E. Takagi, Y. Biochemical and molecular genetic analyses on placental aromatase (P-450AROM) deficiency. *J. Biol. Chem.* 1992a. 267: 4781-4785.
- Harada, N. Sasano, H. Murakami, H. Ohkuma, T. Nagura, H. Takagi, Y. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Cir. Res.* 1999. 84: 1285-1291.
- Hardy, J. Transsphenoidal surgery of hypersecreting pituitary tumors. In: Kohler, PO. Ross, GT. Eds. *Diagnosis and treatment of pituitary tumors.* New York. American Elsevier Publishing Co. 1973. 179-194.
- Harman, SM. Tsitouras, PD. Reproductive hormones in aging men. I. Measurement of sex steroids, basal luteinizing hormone, and Leydig cell response to human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980. 51: 35-40.
- Harvey, M. Vogel, H. Lee, EY. Bradley, A. Donehower, LA. Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Res.* 1995. 55: 1146-1151
- Heaney, AP. Fernando, M. Melmed, S. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2002. 109: 277-283
- Herman, V. Fagin, J. Gonsky, R. Kovacs, K. Melmed, S. Clonal origin adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990. 71: 1427-1433
- Herzog, T. Schlote, W. Pituitary adenomas: tumor cell growth by cluster formation. Pattern analysis based on immunohistochemistry. *Acta Neuropathol.* 1992. 84: 509-515.
- Ho, KY. Smythe, GA. Duncan, M. Lazarus, L. Dopamine infusion studies in patients with pathological hyperprolactinemia: evidence of normal prolactin suppressibility but abnormal dopamine metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984. 58: 128-133
- Ho, KY. Smythe, GA. Lazarus, L. Normal lactotroph sensitivity to graded low dose dopamine infusions in pathological hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology.* 1986. 43: 175-181.
- Hollstein, M. Rice, K. Greenblatt, MS. Soussi, T. Fuchs, R. Sorlie, T. Hovig, E. Smith-Sorensen, B. Montesano, R. Harris, CC. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22: 3551-3555.
- Hollstein, M. Sidransky, D. Vogelstein, B. Harris, CC. P53 mutations in human cancers. *Science.* 1991. 253: 29-53
- Hooper, ML. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. *J. Cell. Sci. Suppl.* 1994. 18: 13-17
- Horiguchi, K. Arai, S. Nishihara, T. Nishikawa, J. A1B1 promotes DNA replication by JNK repression and AKT activation during cellular stress. *J. Biochem.* 2006. 140: 409-19.
- Horvath, E. Kovacs, K. The adenohypophysis. In Kovacs, K. Asa, SL. Eds. *Functional Endocrine Pathology.* Boston: Blackwell Scientific Publications. 1991. 245-281
- Hsu, DW. Riskind, PN. Hedley-Whyte, ET. Vasoactive intestinal peptide in human pituitary gland and adenomas: An immunocytochemical study. *Am. J. Pathol.* 1989. 135: 329-338.
- Huang, ZJ. Edery, I. Rosbash, M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature.* 1993. 364: 259-262.

- Hudelist, G. Czerwenka, K. Kubista, E. Marton, E. Pischinger, K. Singer, ChF. Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue: AIB1 is a carcinoma-specific co-activator. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003. 78: 193-204.
- Hutchison, JB. Beyer, C. Hutchinson, RE. Wozniak, E. Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J. Steroid Biochem.* 1995. 53: 307-313.
- Hutchison, JB. Schumacher, M. Hutchison, RE. Developmental sex differences in brain aromatase activity are related to androgen level. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1990. 57: 187-95.
- Hutchison, JB. Steimer, T. Androgen metabolism in the brain: behavioural correlates. *Prog. Brain Res.* 1984. 61: 23-51.
- Hutchison, RE. Hutchison, JB. Steimer, T. Steel, E. Powers, JB. Walker, AP. Herbert, J. Hastings, MH. Brain aromatization of testosterone in the male Syrian hamster: effects of androgen and photoperiod. *Neuroendocrinology.* 1991. 53: 194-203.
- Hutson, JC. Childs, GV. Gardner, PJ. Considerations for establishing the validity of immunocytochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.* 1979. 27: 1201-1202
- Ikuyama, S. Mu, YM. Ohe, K. Nakagaki, H. Fukushima, T. Takayanagi, R. Nawata, H. Expression of an orphan nuclear receptor DAX-1 in human pituitary adenomas. *Clin. Endocrinol.* 1998. 48: 647-654.
- Ironside, JW. Best practice n° 172: pituitary gland pathology. *J. Clin. Pathol.* 2003. 56: 561-568.
- Jacoby, LB. Hedley-White, ET. Pulaski, K. Seizinger, BR. Martuza, RL. Clonal origin of pituitary adenomas. *J. Neurosurg.* 1990. 73: 731-735.
- Jakab, RL. Horvath, TL. Lerant, C. Harada, N. Naftolin, F. Aromatase immunoreactivity in the rat brain: Gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons and an unresponsive "limbic ring" of the lateral septum-bed nucleus-amygdala complex. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 1993. 44: 481-498.
- Jenkins, C. Michael, D. Mahendroo, M. Simpson, E. Exon-specific northern analysis and rapid amplification of cDNA ends (RACE) reveal that the proximal promoter II (PII) is responsible for aromatase cytochrome P450 (CYP19) expression in human ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993. 97: R1-6.
- Jones, MEE. Thorburn, AW. Britt, KL. Hewitt, KM. Wreford, NG. Proietto, J. Oz, OK. Leury, BJ. Robertson, KM. Yao, S. Simpson, ER. Aromatase deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. 97: 12735-12740.
- Kaltsas, GA. Nomikos, P. Kontogeorgos, G. Buchfelder, M. Grossman, AB. Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2005. 90: 3089-3099.
- Karamitopoulou, E. Perentes, E. Melachrinou, M. Maraziotis, T. Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in human central nervous system neoplasms. *Acta Neuropathol.* 1993. 85: 316-322.
- Katzenellenbogen, BS. Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol. Reprod.* 1996. 54: 287-293.

- Kellis, JT. Vickery, LE. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 1987. 262: 4413-4420.
- Kilts, JD. Connery, HS. Arrington, EG. Lewis, MM. Lawler, CP. Oxford, GS. O'Malley, KL. Todd, RD. Blake, BL. Nichols, DE. Mailman, RB. Functional selectivity of dopamine receptor agonists. II. Actions of dihydrexidine in D2L receptor-transfected MN9D cells and pituitary lactotrophs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. 301: 1179-1189.
- Kirma, N. Mandava, U. Wuichet, K. Tekmal, RR. The effects of aromatase overexpression on mammary growth and gene expression in the aromatase x transforming growth factor alpha double transgenic mice. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2001. 78: 419-426.
- Kitawaki, J. Yoshida, N. Osawa, Y. An enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of aromatase cytochrome P-450. *Endocrinology.* 1989. 124: 1417-1423.
- Kontogeorgos, G. Predictive markers of pituitary adenoma behaviour. *Neuroendocrinology.* 2006. 83: 179-188
- Kovacs, K. Stefaneanu, L. Horvath, E. Lloyd, RV. Lancrajan, I. Buchfelder, M. Fahlbusch, R. Effect of dopamine agonist medication on prolactin producing pituitary adenomas. A morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1991. 418: 439-446.
- Krege, JH. Hodgin, JB. Couse, FJ. Enmark, E. Warner, M. Mahler, JF. Sar, M. Korach, KS. Gustafsson, JA. Smithies, O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. 95: 15677-15682.
- Krestin, D. Spontaneous lactation associated with enlargement of the pituitary. *Lancet.* 1932. 1: 928-930.
- Kuang, SQ. Liao, L. Zhang, H. Lee, AV. O'Malley, BW. Xu, J. AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signalling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice. *Cancer Res.* 2004. 64: 1875-1885.
- Kuiper, GG. Enmark, E. Peltö-Huikko, M. Nilsson, S. Gustafsson, JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. 93: 5925-5930.
- Kukstas, LA. Domec, C. Bascles, L. Bonnet, J. Verrier, D. Israel, JM. Vincent, JD. Different expression of the two dopaminergic D2 receptors, D2415 and D2444, in two types of lactotroph each characterised by their response to dopamine, and modification of expression by sex steroids. *Endocrinology.* 1991. 129: 1101-1103
- Kumar, K. Macaulay, RJ. Kelly, M. Pirlot, T. Absent p53 immunohistochemical staining in a pituitary carcinoma. *Can. J. Neurol. Sci.* 2001. 28: 174-178.
- Lahusen, T. Fereshteh, M. Oh, A. Wellstein, A. Riegel, AT. Epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation and signaling controlled by nuclear receptor coactivator. Amplified in breast cancer 1. *Cancer Res.* 2007. 67: 7256-7265.
- Landerbg, G. Groos, G. Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. *Cancer Res.* 1991. 51: 4570-4574.
- Landolt, AM. Biology of pituitary microadenomas. In: Faglia, G. Giovanelli, MA. MacLeod, Rm. Eds. *Pituitary microadenomas.* London: Academic press, 1980. 107-122

- Lane, D. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992. 358: 15-16
- Larson, GH. Wise, PM. Constitutive and regulated prolactin secretion: effects of estradiol. *Biol. Reprod.* 1994. 50: 357-362.
- Latschul, SF. Madden, TL. Schaffer, AA. Zhang, J. Zhang, Z. Miller, W. Lipman, DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 3389-3402.
- Leo, C. Chen, JD. The SRC family of nuclear receptor co-activators. *Gene*. 2000. 245: 1-11.
- Levine, AJ. Momand, J. Finlay, CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991. 351: 453-456
- Li, H. Gomes, PJ. Chen, JD. RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. 94: 8479-8484
- Li, J. O'Malley, BW. Wong, J. P300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 2000. 20: 2031-2042.
- Liao, L, Kuang, SQ. Yuan, L. González, SM. O'Malley, BW. Xu, J. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2002. 83: 3-14.
- Little, DV. A third note on recent research in geometrical probability. *Advanc. Appl. Prob.* 1974. 6: 103.
- Liu, DX. Lobie, PE. Transcriptional activation of p53 by Pitx1. *Cell Death and Differentiation*. 2007. 14: 1893-1907.
- Livingstone, JD. Lerant, A. Freeman, ME. Ovarian steroids modulate responsiveness to dopamine and expression of G-proteins in lactotropes. *Neuroendocrinology*. 1998. 68: 172-179.
- Lloyd, HM. Meares, JD. Jacobi, J. Effects of oestrogen and bromocryptine on in vivo secretion and mitosis in prolactin cells. *Nature*. 1975. 255: 497-498
- Lloyd, RV. Jin, L. Fields, K. Kulig, E. Effects of estrogens on pituitary cells and pituitary tumor growth. *Path. Res. Pract.* 1991. 187: 584-586.
- Lloyd, RV. Jin, L. Fields, K. Kulig, E. Regulation of prolactin gene expression in a DMBA-estrogen-induced transplantable rat pituitary tumor. *Am. J. Pathol.* 1990. 137: 1525-1537.
- Loud, AV. Barany, WC. Pack, BA. Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab. Invest.* 1965. 14: 996-1008.
- Louie, MC. Revenko, AS. Zou, JX. Yao, J. Chen, HW. Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol. Cell. Biol.* 2006. 26: 3810-3823.
- Lubahn, DB. Moyers, JS. Golding, TS. Couse, JF. Korach, KS. Smithies, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. 90: 11162-11166.



- Mahendroo, MS. Mendelson, CR. Simpson, ER. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 1993. 268: 19463-19470.
- Mandava, U. Kirma, N. Tekmal, RR. Aromatase overexpression transgenic mice model: cell type specific expression and use of letrozole to abrogate mammary hyperplasia without affecting normal physiology. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2001. 79: 27-34.
- Mani, A. Oh, AS. Bowden, ET. Lahusen, T. Lorick, KL. Weissman, AM. Schlegel, R. Wellstein, A. Riegel, AT. E6AP mediates regulated proteasomal degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells. *Cancer Res.* 2006. 66: 8680-8686.
- Marcantonio, D. Chalifour, LE. Alaoui-Jamali, MA. Huynh, HT. Steroid sensitive gene-1 is an androgen-regulated gene expressed in prostatic smooth muscle cells in vivo. *J. Mol. Endocrinol.* 2001. 26: 175-184.
- Martin, MC. Weiner, Ri. Monroe, SE. Roberts, JM. Licko, V. Jaffe, RB. Prolactin-secreting adenomas in women. VII. Dopamine regulation of prolactin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984. 59: 485-490.
- Mayhew, TM. Cruz Orive, LM. Stereological correction procedures for estimating true volume proportions from biased samples. *J. Microscopy.* 1973. 99: 287-299.
- McComb, DJ. Hellmann, P. Thorner, MO. Scot, D. Evans, WS. Kovacs, K. Morphologic effects of bromocriptine on spontaneously occurring pituitary prolactin-cell hyperplasia in old Long-Evans rats. *Am. J. Pathol.* 1986. 122: 7-16.
- McComb, DJ. Kovacs, K. Beri, J. Zak, F. Pituitary adenomas in old Sprague-Dawley rats: A histologic, ultrastructural and immunocytochemical study. *JNCL.* 1984. 73: 1143-1166.
- McCormick, WF. Halmi, NS. Absence of chromophobe adenomas from a large series of pituitary tumors. *Arch. Pathol.* 1971. 92: 231-238
- McEuen, CS. Selye, H. Collip, JB. Some effects of prolonged administration of oestrin in rats. *Lancet.* 1936. 1: 775-776.
- McGuire, WL. Chamness, GC. Costlow, ME. Richert, NJ. Steroids and human breast cancer. *J. Steroid. Biochem.* 1975. 6: 723-727.
- Means, GD. Mahendroo, MS. Corbin, CJ. Mathis, JM. Powell, FE. Mendelson, CR. Simpson, ER. Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1989. 264: 19385-19391.
- Means, GD. Mahendroo, MS. Corbin, CJ. Mathis, JM. Powell, FE. Mendelson, CR. Simpson, ER. Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P-450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 1989. 264: 19385-19391.
- Meites, J. Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging. *Neuroendocrinology.* 1982. 34: 151-156.
- Mendelson, CR. Wright, EE. Evans, CT. Porter, JC. Simpson, ER. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985. 243: 480-491.

- Miles, RE. Multi-dimensional perspectives on stereology. *J. Microscopy*. 1972. 95: 181.
- Miller, WR. Aromatase activity in breast tissue. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 1991. 39: 783-790.
- Misiti, S. Schomburg, L. Yen, PM. Chin, WW. Expression and hormonal regulation of co-activator and co-repressor genes. *Endocrinology*. 1998. 139: 2493-2500.
- Molitch ME. Dopamine resistance of prolactinomas. *Pituitary*. 2003. 6:19-27.
- Molitch ME. Prolactinomas. In: *Prolactinomas*. ND Horseman, editor. Kluwer Academic Publishers. Boston, Massachusetts, USA. 2001: 82-99.
- Molitch, ME. Hyperprolactinemia. *Medical Grand Rounds*. 1982. 1: 307-319
- Molitch, ME. Prolactinoma. In: *The pituitary*. Melmed, S. ed. Blackwell publishing second edition. 2002.
- Molitch, ME. Russell, EJ. The pituitary "incidentaloma". *Ann. Intern. Med.* 1990. 112: 925-931.
- Montero, M. Sanchez, F. Juanes, JA. Blanco, E. González, R. Vaázquez, R. Carretero, J. Estudio morfométrico de las células adenohipofisarias inmunorreactivas a h-ACTH de ratas sometidas a estrés. *An. Anat.* 1990. 36: 47-54.
- Montmayeur, JP. Bausero, P. Amlaiky, N. Maroteaux, L. Hen, R. Borrelli, E. Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS. Lett.* 1991. 278: 239-243.
- Mosca, L. Solcia, E. Capella, C. Buffa, R. Pituitary adenomas: surgical versus post mortem findings today. In: *Flagia, G. Giovanelli, MA. MacLeod, Rm. Eds. Pituitary microadenomas*. London: Academic Press. 1980: 137-142
- Mosselman, S. Polman, J. Dijkema, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS. Lett.* 1996. 392: 49-53.
- Muhr, C. Bergstrom, K. Grimelius, L. Larsson, SG. A parallel study of the roetgen anatomy of the sella turcica and the histopathology of the pituitary gland in 205 autopsy specimens. *Neuroradiology*. 1981. 21: 55-65
- Mukdsi, JH. De Paul, AL. Muñoz, S. Aoki, A. Torres, AI. Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen. *Histochem. Cell. Biol.* 2004. 121: 453-462.
- Nagy, L. Kao, HY. Love, JD. Li, C. Banayo, E. Gooch, JT. Krishna, V. Chatterjee, K. Evans, RM. Schwabe, JWR. Mechanism of co-repressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* 1999. 13: 3209-3216.
- Nakajin, S. Shinoda, M. Hall, PF. Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. 134: 704-10.
- Nakamura, Y. Usui, T. Mizuta, H. Murabe, H. Muro, S. Suda, M. Tanaka, K. Tanaka, I. Shimatsu, A. Nakao, K. Characterization of Prophet of Pit-1 gene expression in normal pituitary and pituitary adenomas in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. 84: 1414-1419.

- Nakane, PK. Moriuchi, T. Koji, T. Taniguchi, Y. Izumi, S. Hui, L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin): review and some new findings. *Acta. Histochem. Cytochem.* 1989. 22: 105-116.
- Nigro, JM. y col., Mutations in the p53 gene occur in the diverse human tumour types. *Nature.* 1989. 342: 705-708
- Nose-Alberti, V. Mesquita, MI. Martin, LC. Kayath, MJ. Adenocorticotropin-producing pituitary carcinoma with expression of c-erbB-2 and high PCNA index: a comparative study with pituitary adenomas and normal pituitary tissues. *Endocrinol. Pathol.* 1998. 9: 53-62
- Oliveira, MC. Marroni, CP. Pizarro, CB. Pereira-Lima JF. Barbosa-Coutinho, LM: Ferreira, NP. Expresión of p53 protein in pituitary adenomas. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002. 35: 561-565.
- Oliveira, MC. Marroni, CP. Pizarro, CB. Pereira-Lima, JF. Barbosa-Coutinho, LM. Ferreira, NP. Expression of p53 protein in pituitary adenomas. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002. 35: 561-565
- Oliveira, MC. Moraes, JT. Barros, HM. Barbosa-Coutinho, LM. Effect of estrogen and neuroleptics on prolactin secretion and immunoreactive prolactin cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996. 29: 521-525.
- O'Malley, KL. Mack, KJ. Gandelman, KY. Todd, RD. Organization and expression of the rat D2A receptor gene: identification of alternative transcripts and a variant donor splice site. *Biochemistry.* 1990. 29: 1367-1371.
- Osawa, Y. Higashiyama, T. Isolation of human placental cytochrome P-450 and its mechanism of action of androgen aromatization. M.J. Coon, A.H. Conney, R.W. Estrabrook, H.C. Gelbain, J.R. Gillette, P.J. O'Brien (eds). *Microsomes, Drug Oxiadtions, and Chemical Carcinogenesis.* Vol. 1. pp. 224-228. New York. Academic Press, Inc. 1980.
- Osawa, Y. Yoshida, N. Fronckowiak, M. Kitawati, J. Immunoaffinity purification of aromatase cytochrome P-450 from human placental microsomes, metabolic switching from aromatization to 1 beta and 2 beta monohydroxylation, and recognition of aromatase isozymes. *Steroids.* 1987. 50: 11-28.
- Osborne, CK. Bardou, V. Hopp, TA. Chamness, GC. Hilsenbeck, SG. Fuqua, SA. Wong, J. Allred, DC. Clark, GM. Schiff, R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2003. 95: 353-361.
- Oyesiku, NM. Evans, CO. Brown, MR. Blevins, LS. Tindal, GT. Parks, JS. Pituitary adenomas: Screening for G□q mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997. 82: 4184-4188.
- Ozer, E. Canda, MS. Ulukus, C. Guray, M. Erbayraktar, S. Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study. *Tumori.* 2003. 89: 54-59
- Pandey, J. Bannout, A. Wendell, DL. The Espm5 locus prevents the "angiogenic switch" in an estrogen-induced rat pituitary tumor. *Carcinogenesis.* 2004. 25: 1829-1838.
- Parent, AD. Bebin, J. Smith, RR. Incidental Pituitary adenomas. *J. Neurosurg.* 1981. 54: 288:231

- Pasolli, HA. Torres, AI. Aoki, A. Influence of lactotroph cell density on prolactin secretion in rats. *J. Endocrinol.* 1992. 134: 241-246.
- Pei, L. Melmed, S. Scheitauer, B. Kovacs, K. Prager, D. H-ras mutations in human pituitary carcinoma metastases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994. 78: 842-846.
- Pellegrini-Bouiller, I. Morange-Ramos, A. Barlier, A. Gunz, G. Enjalbert, A. Jaquet, P. Pit-1 gene expression in human pituitary adenomas. *Horm. Res.* 1997. 47: 251-258.
- Pérez, RL. Machiavelli, GA. Romano, MI. Burdman, JA. Prolactin release, estrogens and proliferation of prolactin-secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats. *J. Endocrinol.* 1986. 108: 399-403
- Petrusz, P. Sar, M. Ordronneau, P. Dimeo, P. Specificity in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.* 1976. 24: 1110-1115
- Phelps, CJ. Hymer, WC. Characterization of estrogen-induced adenohypophyseal tumors in the fisher 344 rat. *Neuroendocrinology.* 1983. 37: 23-31.
- Phelps, CJ. Hymer, WC. Effects of bromocriptine on prolactin cellular hypertrophy, proliferation and secretory activity in diethylstilbestrol-induced pituitary tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1988. 58: 137-148.
- Planas-Silva, MD. Shang, Y. Donaher, JL. Brown, M. Weinberg, RA. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer. Res.* 2001. 61: 3858-3862.
- Ponchon, M. Lause, P. Maiter, D. In vivo effects of oestradiol on galanin gene expression in rat anterior pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.* 2000. 12: 559-564.
- PubMed, n° acceso: XP 001072953
- PubMed-Protein, n° de acceso: NP000094
- Reichlin, S. Molitch, ME. Neuroendocrine aspects of pituitary adenoma. In: Camanni, F. Muller, EE. Eds. *Pituitary hyperfunction physiopathology and clinical aspects.* Raven Press: New York. 1984. 47-70
- Reschini, E. Ferrari, C. Peracchi, M. Fadini, R. Messchia, M. Crosignani, PG. Effect of dopamine infusion on serum prolactin concentration in normal and hyperprolactinemic subjects. *Clin. Endocrinol.* 1980. 13: 519-523.
- Rodman, EF. Molitch, ME. Post, KD. Biller, BJ. Reichlin, S. Long-term follow-up of transsphenoidal selective adenectomy for prolactinoma. *JAMA.* 1984. 252: 921-924
- Rohr, HP. Bartsch, G. Oberholzer, M. Reith, A. Hollinger, O. Stereology. En: *Electron microscopy in human medicine. 1. Instrumentation and techniques.* (Johannessen JV; Ed). McGraw-Hill International Book Company. London, 1978. pp: 285-309.
- Roncaroli, F. Nose, V. Scheithauer, BW. Kovacs, K. Horvath, E. Young, Jr WF. Lloyd, RV. Bishop, MC. His, B. Fletcher, JA: Gonadotrophic pituitary carcinoma: HER-2/neu expression and gene amplification. Report of two cases. *J. Neurosurg.* 2003b. 99: 402-408.
- Roncaroli, F. Schithauer, BW. Young, WF. Horvath, E. Kovacs, k. Kross, JM. Al Sarraj, S. Lloyd, RV. Faustini-Fustini, M. Silent corticotroph carcinoma of the adenohypophysis: a report of five cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003a. 27: 477-486.

- Roselli, CE. Ellinwood, WN. Resko, JA. Regulation of brain aromatase activity in rats. *Endocrinology*. 1984. 114: 192-200.
- Roselli, CE. Resko, JA. Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism. *Endocrinology*. 1984. 114: 2183-2189.
- Roselli, CE. Salisbury, RL. Resko, JA. Genetic evidence for androgen-dependent and independent control of aromatase activity in the rat brain. *Endocrinology*. 1987. 121: 2205-2210.
- Rubio, M. Carretero, J. Sanchez, F. Riesco, Jm. Vazquez, RJ. Vazquez, R. Estradiol influences the LH response to met-enkephalin. An immunocytochemical and morphometric study. *Acta. Anat.* 1992. 145: 382-386
- Rubio, M. Sanchez, F. Carretero, J. Riesco, Jm. Cabo, L. Vazquez, R. Immunohistochemical-morphometric study of the LH-adenohypophyseal cells following chronic treatment with met-enkephalin. *Histol. Histopathol.* 1994. 9: 221-226.
- Saeger, W. Lüdecke, B. Lüdecke, DK. Clinical tumor growth and comparison with proliferation markers in non-functioning (inactive) pituitary adenomas. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 2008. 116: 80-85
- Sakakura, C. Hagiwara, A. Yasuoka, R. Fujita, Y. Nakanishi, M. Masuda, K. Kimura, A. Nakamura, Y. Inazawa, J. Abe, T. Yamagishi, H. Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int. J. Cancer.* 2000. 89: 217-223.
- Sanchez, F. Carretero, J. Rubio, M. Riesco, JM. Vazquez, R. Morphometric analysis of the hipoactivity of FSH-immunoreactive cells in estrogen-primed male rats. *Acta Histochem.* 1993. 94: 125-130.
- Sanghera, MK. Simpson, ER. Mcphaul, MJ. Kozlowski, G. Conley, AJ. Lep-Hart, ED. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology*. 1991. 129: 2834-2844.
- Sanno, N. Teramoto, A. Matsuno, A. Takekoshi, S. Itoh, J. Osamura, RY. Expression of Pit-1 and estrogen receptor messenger RNA in prolactin producing pituitary adenomas. *Mod. Pathol.* 1996. 9: 526-533.
- Sano, T. Kovacs, KT. Scheithauer, BW. Young, WF. Jr. Aging and the human pituitary gland. *Mayo Clin. Proc.* 1993. 68: 971.
- Santalo, LA. *Geometria integral* 15. *Abhandlungen* 12. 1936.
- Sarkar, DK. Gottschall, PE. Meites, J. Damage to hypothalamic dopaminergic neuron is associated with development of prolactin-secreting pituitary tumors. *Science.* 1982. 218: 684-686.
- Schetchter, J. Goldsmith, P. Wilson, C. Weiner, R. Morphological evidence for the presence of arteries in human prolactinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988. 67: 713-719
- Schwartz, Br. Pinkus, G. Bacus, S. Toder, M. Weinberg, DS. Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphoms. Digital image analysis of KI 67 antibody staining. *Am. J. Pathol.* 1989. 134: 327-336.

- Serri, O. Kuchel, O. Buu, NT. Somma, M. Differential effects of a low dose dopamine infusion on prolactin secretion in normal and hyperprolactinemic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983. 56: 255-259
- Shang, Y. HU, X. DiRenzo, J. Lazar, MA. Brown, M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* 2000. 103: 843-852.
- Sheperd, NA. Richman, PL. England, J. KI 67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J. Pathol.* 1988. 155: 1213-1219.
- Shimon, I. Melmed. Pituitary tumor pathogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997. 82: 1675-1681.
- Shinoda, K. Brain aromatization and its associated structures. *Endocrinol. J.* 1994. 41: 115-138.
- Shinoda, K. Moris, Ohtsuki, T. Osawa, V. An aromatase-associated cytoplasmic inclusion, the "stigmoid body" in the rat brain, I. Distribution in the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 1992. 322: 360-376.
- Shinoda, K. Sakamoto, N. Osawa, Y. Pearson, J. Aromatase neurons in the monkey forebrain demonstrate by antibody against human placental antigen X-p2. *Soc. Neurosci.* 1989a. Abstr 15:232. Abstract 96.20
- Shinoda, K. Shiotani, V. Osawa, V. "Neckline olfactory glomeruli" form unique components of the rat primary olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 1989c. 284: 362-373
- Shinoda, K. Vagi, H. Fujita, H. Osawa, V. Shiotani, V. Screening of aromatase-containing neurons in rat forebrain; an immunohistochemical study with antibody against human placental antigen X-P2 (hPAX-P2). *J. Comp. Neurol.* 1989b. 290: 502-515.
- Shinoda, K. Vagi, H. Osawa, V. Shiotani, V. Involvement of specific placental antigen X-P2 in rat olfaction; an immunohistochemical study in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 1990. 294: 340-344.
- Shull, JD. Gorski, J. Estrogen regulates the transcription of the rat prolactin gene in vivo through at least two independent mechanisms. *Endocrinology.* 1985. 116: 2456-2462.
- Shull, JD. Gorski, J. Estrogen regulation of prolactin gene transcription in vivo: paradoxical effects of 17 beta-estradiol dose. *Endocrinology.* 1989. 124: 279-285.
- Simpson, E. Jones, M. Misso, M. Hewitt, K. Hill, R. Maffei, L. Carani, C. Boon, WC. Estrogen, a fundamental player in energy homeostasis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005. 95: 3-8.
- Simpson, ER. Mahendroo, MS. Means, GD. Kilgore, MW. Hinshelwood, MM. Graham-Lorence, S. Amarneh, B. Ito, Yuji. Fisher, CR. Michael, MD. Mendelson, CR. Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine reviews.* 1994. 15: 342-355
- Siqueira, MG. Guembarovski, AL. Subclinical pituitary microadenomas. *Surg. Neurol.* 1984. 22: 134-140.
- Smith, EP. Boyd, J. Frank, GR. Takahashi, H. Cohen, RM. Speciker, B. Williams, TC. Lubahn, DB. Korach, KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 1994. 331: 1056-1061.

- Sommers, SC. Pituitary cell relations to body states. *Lab. Invest.* 1959. 8: 588-621
- Soo-Kyung, L. Han-Jong, K. Jung Woo, K. Jae Woon, L. Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol. Endocrinol.* 1999. 13: 1924-1933.
- Sorby, H. On slaty cleavage as exhibited in the Devonian limestones of Devonshire. *Phil. Mag.* 1856. 11: 20.
- Southgate, TD. Windeatt, S. Smith-Arica, J. Gerdes, CA. Perone, MJ. Morris, I. Davis, JR. Klatzmann, D. Löwenstein, PR. Castro, MG. Transcriptional targeting to anterior pituitary lactotrophic cells using recombinant adenovirus vectors in vitro and in vivo in normal and estrogen/sulpiride-induced hyperplastic anterior pituitaries. *Endocrinology.* 2000. 141: 3493-3505.
- Spada, A. Nicosia, S. Cortelazzi, Pezzo, G. Bassetti, M. Sartorio, A. Giannattasio, G. In Vitro studies on prolactin release and adenylate cyclase activity in human prolactin-secreting pituitary adenomas. Different sensitivity of macro- and microadenomas to dopamine and vasoactive intestinal polypeptide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983. 56: 1-10
- Steimer, TH. Hutchison, JB. Androgen increases formation of behaviourally effective oestrogen in the dove brain. *Nature.* 1981. 292: 345-347.
- Sternberger, L. *Immunocytochemistry.* (Wiley J, 50S, eds.) New Cork. 2<sup>a</sup> ed. 1979.
- Stone, JP. Holtzman, S. Shellabarger. Neoplastic responses and correlated plasma prolactin levels in diethylstilbestrol-treated ACI and Sprague-Dawley rats. *Canc. Res.* 1979. 39: 773-778.
- Stürzbecher, HW. Brain, R. Addison, C. Rudge, K. Remm, M. Grimaldi, M. Keenan, E. Jenkins, JR. A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene.* 1992. 7: 1513-1523.
- Susman, W. Pituitary adenoma. *Br. Med. J.* 1933. 2: 1215
- Tan, L. Muto, N. Purification and reconstitution properties of human placental aromatase. A cytochrome P-450-type monooxygenase. *Eur. J. Biochem.* 1986. 156: 243-250.
- Tarunina, M. Jenkins, J. Human p53 binds DNA as a protein homodimer but monomeric variants retain full transcription transactivation activity. *Oncogene.* 1993. 8: 3165-3173
- Tekmal, RR. Liu, YG. Nair, HB. Jones, J. Perla, RP. Lubahn, DB. Korach, KS. Kirma, N. Estrogen receptor alpha is required for mammary development and the induction of mammary hyperplasia and epigenetic alterations in the aromatase transgenic mice. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005. 95: 9-15.
- Tekmal, RR. Ramachandra, N. Gubba, S. Durgan, VR. Mantione, J. Toda, K. Shizuta, Y. Dillehay, DL. Overexpression of int-5/aromatase in mammary gland transgenic mice results in the induction of hyperplasia and nuclear abnormalities. *Cancer Res.* 1996. 56: 3180-3185.
- Tekmal, RR. Santen, RJ. Local estrogen production: is aromatase an oncogene, in: A. Amanni (ed.) *Endocrinology of the breast.* Human Press. 1999. pp. 79-92.
- Teramoto, A. Hirakawa, K. Sanno, N. Osamura, Y. Incidental pituitary lesions in 1000 unselected autopsy specimens. *Radiology.* 1994. 193: 161.

- Thapar, K. Kovacs, K. Scheithauer, BW. Stefaneanu, I. Horvath, E. Pernicone, PJ. Murray, D. Laws, Jr. ER. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery*. 1996b. 38: 99-106.
- Thapar, K. Scheithauer, BW. Kovacs, K. Pernicone, PJ. Laws, Jr ER. p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery*. 1996a. 38: 765-771.
- Thapar, K. Yamada, Y. Scheithauer, B. Kovacs, H. Yamada, S. Stefaneanu, L. Assessment of mitotic activity in pituitary adenomas and carcinomas. *Endocr. Pathol.* 1996c. 7: 215-221.
- Thompson, EA. Siiteri, PK. Partial resolution of the placental microsomal aromatase complex. *J. Steroid. Biochem.* 1976. 7: 636-639.
- Torchia, J. Rose, DW. Inostroza, J. Kamei, Y. Westin, S. Glass, CK. Rosenfeld, MG. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*. 1997. 387: 677-684.
- Torres-Arzayus, MI. De Mora, JF. Yuan, J. Vázquez, F. Bronson, R. Rue, M. Sellers, WR. Brown, M. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell*. 2004. 6: 263-274.
- Underwood, EE. *Quantitative sterology* (Addison Wesley, Massachusetts). 1970.
- Van Loon, GR. A defect in catecholamine neurons in patients with prolactin-secreting pituitary adenoma. *Lancet*. 1978. 21:2 (8095):868-71.
- Vázquez Perfecto, G. "Estudio ontogenico de la Aromatasa P450 en la hipofisis de la rata y su modulacion postnatal ejercida por los esteroides gonadales y la GNRH". Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca. 1997.
- Vázquez Perfecto, RJ. Estradiol, testosterona, corticosterona y dopamina como reguladores de la proliferación de las células VIPérgicas hipofisarias de la rata. Tesis Doctoral en Medicina. Universidad de Salamanca. 1994.
- Vázquez, G. Carretero, J. Pérez, RM. Montero, MC. Blanco, E. Martín-Clavijo, A. Hernández, E. Vázquez, R. Modifications induced by stradiol and testosterone on the immunohistochemical expression of aromatase P450 in rat's hypophyseal gland. *Eur. J. Anat.* 1997. 1 Supp.1: 45-46
- Vázquez, R. Vázquez, G. Rubio, M. Sánchez, F. Vázquez, RJ. Riesco, JM. Juanes, JA. Blanco, E. Carretero, J. Effects of gonadal steroids on immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat hypophysios. *Eur. J. Anat.* 1999. 3 supp1: 34.
- Vogelstein, B. Kinzler, KW. p53 function and dysfunction. *Cell*. 1992. 70: 523-526.
- Von Schwezinger, G. Warzok, R. Hyperplasien und adenome der hypophse im unselektierten sektionsgut. *Zbl. Allg. Pathol. U. Pathol. Anat.* 1982. 126: 495-498.
- Wang, Y. Wu, MC. Sham, JS. Zhang, W. Wu, WQ. Guan, XY. Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using highthroughput tissue microarray. *Cancer*. 2002b. 95: 2346-2352.
- Wang, Z. Rose, DW. Hermanson, O. Liu, F. Herman, T. Wu, W. Szeto, D. Gleiberman, A. Krones, A. Pratt, K. Rosenfeld, R. Glas, CK. Rosenfeld, MG. Regulation of somatic



growth by the p160 coactivator p/CIP. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. 97: 13549-13554.

Weibel, ER. Bolender, RP. *Stereological techniques for electron microscopy*. En: *Principle and techniques of electron microscopy*. (Hyatt MA; Ed). Van Nostrand-Reinhold, New York, 1973. pp: 239-296.

Weibel, ER. Kistler, GS. Tondury, G. A stereologic electron microscope study of "tubular myelin figures" in alveolar fluids of rat lungs. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1966. 69: 418-427.

Weibel, ER. *Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology*. *Int. Rev. Cytol.* 1969. 26: 235-302.

Williams, BO. Remington, L. Albert, DM. Mukai, S. Bronson, RT. Jacks, T. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nature Genetics.* 1994. 7: 480-484

Wingrave, SJ. Kay, CR. Vessey, MP. Oral contraceptives and pituitary adenomas. *Br. Med. J.* 1980. 1: 685-686.

Woloschak, M. Roberts, JL. Post, K. c-myc, c-fos, c-myb gene expression in human pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994. 79: 253-257.

Woloschak, M. Yu, A. Xiao, J. Molecular and cellular responses to DNA damage in a murine pituitary adenoma cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996. 119: 61-68

Xie, D. Sham, JS. Zeng, WF. Lin, HL. Bi, J. Che, LH. Hui, L. Zeng, YX. Guan, ZY. Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* 2005. 36: 777-783.

Xu, J, Liao, L. Ning, G. Yoshida-Komiya, H. Deng, S. O'Malley, BW. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97:6379-6384.

Xu, J. Li, Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Molecular Endocrinology.* 2003. 17: 1681-1692

Xu, R. Parlow, AF. Wang, Y. The effects of dopamine and D2 receptor antagonists on pituitary hormone secretion are intact in mice lacking dopamine D2L receptor. *Brain. Res.* 2002. 939: 95-99.

Yamada, M. Hashimoto, K, Sato, T. Shibussawa, N. Kohga, H. Ozawa, Y. Yamada, S. Mori, M. A novel transcript for the thyrotropin-releasing hormone receptor in human pituitary and pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997. 82: 4224-4228.

Yamada, S. Takahashi, M. Hara, M. Hara, M. Hattori, A. Sano, TY. Ozawa, Y. Shishiba, Y. Hirata, K. Usui, M. Pit-1 gene expression in human pituitary adenomas using the reverse transcription polymerase chain reaction method. *Clin. endocrinol.* 1996. 45: 263-272.

Yin, D. Tamaki, N. Kokunai, T. Yasuo, K. Yonezawa, K. Bromocriptine-induced apoptosis in pituitary adenoma cells: relationship to p53 and bcl-2 expression. *J. Clin. Neurosci.* 1999. 6: 326-331

- Zhang, H. Liao, L. Kuang, SQ. Xu, J. Spatial distribution of the messenger ribonucleic acid and protein of the nuclear coactivator, amplified in breast cancer-3, in mice. *Endocrinology*. 2003. 144: 1435-1443,.
- Zhang, H. Yi, X. Sun, X, Yin, N. Shi, B. Wu, H. Wang, D. Wu, G. Shang, Y. Differential gene regulation by the SRC family of coactivators. *Genes & Development*. 2004. 18: 1753-1765
- Zhou, HJ. Yan, J. Luo, W. Ayala, G. Lin, SH. Erdem, H. Ittmann, M. Tsai, SY. Tsai, MJ. SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res*. 2005. 65: 7976-7983.