

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS



Posible implicación del receptor dopaminérgico D2 y
la aromatasa P450 en el desarrollo de adenomas es-
pontáneos hipofisarios.

Sonia Gutiérrez Gabriel

Salamanca, 2009

José CARRETERO GONZÁLEZ, Catedrático de Embriología y Anatomía Humana, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, en su calidad de Directores del trabajo de Tesis Doctoral,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

Posible implicación del receptor dopaminérgico D2 y la aromatasas P450 en el desarrollo de adenomas espontáneos hipofisarios

Ha sido realizado bajo mi dirección por la Lda. Dña. **Sonia Gutiérrez Gabriel**, en los laboratorios de Neuroanatomía Humana y Neuroendocrinología Experimental del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, ubicados en el Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Que, a mi 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, firmo la presente en Salamanca a 29 de Junio de 2009.

José Carretero González

Índice

Índice	5
Prólogo.....	9
Agradecimientos	13
Introducción	15
Adenomas hipofisarios. El Prolactinoma.....	17
Prolactina	23
Estructura química de la Prolactina	25
Regulación génica de la Prolactina	25
Acciones biológicas de la Prolactina.....	26
Secreción de Prolactina.....	28
Ritmo circadiano de liberación.....	28
Niveles basales.....	29
Mecanismos de regulación.....	29
Hipótesis del Estudio	33
Antecedentes	35
Hipótesis.....	40
Objetivo del estudio.....	43
Material y Métodos.....	45
Obtención de las muestras.....	47
Adenomas humanos.....	47
Clasificación de los tumores.....	47

Determinación de los niveles basales de prolactina.	48
Adenomas hipofisarios espontáneos en ratas viejas.	48
Clasificación de los tumores.	49
Ratones knock out para los genes de aromatasa o del receptor dopaminérgico D2. 49	
Procedencia de los animales.	49
Determinación de la delección génica. Genotipaje por PCR.	49
Procesado de las muestras.....	52
Inclusión en parafina.	52
Inmunocitoquímica.....	53
Anticuerpos empleados.	53
Protocolo inmunocitoquímico.	53
Tampones utilizados.	54
TBS: Trizma base Sigma ® 0.5M con CLNa al 8%, rectificando Ph hasta 7.4. Diluido posteriormente 1:10 para conseguir 0.05M.....	54
TB: Similar preparación al anterior sin CLNa. Utilizado para revelar con 3-3´diaminobencidina	54
Controles de la reacción.	54
Estadística.....	55
Tratamiento de los Textos y figuras. Edición final.	55
Resultados.....	57
Incidencia de los adenomas espontáneos en ratas viejas de la cepa Wistar...58	
Prevalencia de los prolactinomas en los adenomas espontáneos de ratas viejas.	60

Demostración inmunocitoquímica de la coexistencia de positividad para la prolactina y la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2 en los prolactinomas.	62
Immunocitoquímica para la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2 en los prolactinomas espontáneos.	66
Anomalías estructurales y patrones de reacción en las células positivas a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2.	70
Demostración inmunocitoquímica de la coexistencia de positividad para la prolactina y la aromatasa en los prolactinomas.	74
Adenomas espontáneos en ratones knock out y wilde type.	75
Adenomas espontáneos en ratones knock out y wilde type.	76
Prevalencia de los adenomas en ratones.	78
Prevalencia de los prolactinomas en ratones	80
Adenomas humanos.	82
Prolactinomas.	82
Positividad a la aromatasa p450 en los prolactinomas humanos	84
Positividad a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico en los prolactinomas humanos	86
Discusión	89
Prolactinomas y Aromatasa.	91
Prolactinomas y Receptor dopaminérgico D2L.	95
Conclusiones	103
Bibliografía.	107

Prólogo

*“ Investigar significa pagar la entrada por adelantado
y entrar sin saber lo que se va a ver”
(Oppenheimer)*

Es cierto que cuando uno comienza su marcha en la investigación nunca sabe qué puede sorprenderle en el camino. Este trabajo recoge la ilusión y el deseo de terminar los estudios y aproximarme al apasionante mundo de la investigación que con tanto respeto y admiración he contemplado siempre. Aunque bien es cierto que mi trabajo y desarrollo profesional no fue encauzado por la vía del laboratorio, mi inquietud siempre me mantuvo en contacto con el mundo de la investigación que tantas alegrías y éxitos han hecho conseguir en la medicina y sin el que sin duda nada de lo que hacemos sería posible.

Comprender el método científico no es posible sin experimentarlo y no conocerlo, no permitiría mantener la mirada crítica ante la práctica clínica diaria. Éste nos permite obtener conocimientos y nos da herramientas para estudiar cualquier situación, diagnosticar necesidades y problemas que puedan ser útiles para aplicarlos con fines prácticos. Se trata de conocer el idioma universal que hace posible el avance en todos los campos.

El tema y desarrollo de mi trabajo se enmarca en la línea de investigación del Departamento de Anatomía e Histología que desde el inicio de mi carrera me abrió sus puertas y siempre han sido símbolo de entrega y trabajo docente.

El tema de la tumorigénesis es sin duda uno de los temas más apasionantes y que con más inquietud se vive en el día de hoy a todos los niveles de nuestra vida diaria. Muchos son los trabajos encauzados a esclarecer algunos de los factores que originan o modulan la formación de tumores. En la presente tesis expondremos algunas conclusiones sobre la relación de los receptores dopaminérgicos y el prolactinoma. Para ello desarrollamos una hipótesis de trabajo que argumentaremos e implicaremos históricamente con las investigaciones previas sobre el tema, facilitando continuar así la investigación en este campo en el futuro.

Agradecimientos

Agradecer en primer lugar, la posibilidad que el Prof. Carretero me brindó al abrirme las puertas de su laboratorio. Su infinita paciencia, su ayuda incondicional, su trabajo incansable y su dedicación docente; sin duda ejemplo de esfuerzo, constancia y buen hacer.

Agradecer de forma muy especial a Marisa su paciencia para enseñarme y acompañarme en toda la instrumentación, trabajadora infatigable y aliada indiscutible.

Agradecer también al Departamento de Anatomía e Histología que siempre estuvo dispuesto a facilitar el camino y hacer más accesible los recursos. En particular al Prof. Vázquez Rodríguez.

Agradecer a mis padres, que con ilusión y esfuerzo me dieron esta carrera, su apoyo incondicional y su insistencia siempre en que aprovechara todas las oportunidades, para ellos toda mi admiración y orgullo.

Agradecer también a mi marido su paciencia y empuje, su fuerza incondicional, sin la que esto no hubiera sido posible.

A todos, de verdad, gracias de corazón.

Introducción

Adenomas hipofisarios. El Prolactinoma.

Se sabe que del 10 al 23% de los tumores intracraneales son tumores hipofisarios originados a partir de células glandulares (Molitch y Rusell, 1990).

Estos tumores se denominan adenomas hipofisarios y se han descrito, como primer diagnóstico, en autopsias de un 1.5 a un 27 % de sujetos sin sospecha de enfermedad hipofisaria a lo largo de su vida (Berkvens y col., 1980; Kovacks y col., 1980; Burrow y col., 1981; Parent y col., 1981; Muhr y col., 1981; Meites y col., 1982; Sarkar y col., 1982; McComb y col., 1984; Abd El-Hamid y col., 1988; Molitch, 1990; Herzog y col., 1992; Sano, 1993; Teramoto y col., 1994; Kruse y col., 1995).

Al menos el 10 % de las hipófisis examinadas en autopsias presentaban adenomas y, de todos ellos, el 44% eran positivos a prolactina distribuidos por igual tanto por edad como por sexos. A los adenomas hipofisarios positivos a prolactina se les llama prolactinomas.

La incidencia espontánea de los adenomas hipofisarios en ratas viejas es muy alta (hasta el 80%) y en la especie humana se han descrito incidencias del 35% en personas mayores de 75 años (McComb y col., 1984; Herzog y Schlote, 1992). De todos ellos, los prolactinomas tienen la mayor prevalencia, llegando en algunas series a alcanzar hasta el 80% (Meites y col., 1982; Sarkar y col., 1982).

El diagnóstico clínico del prolactinoma no exige sólo la existencia del tumor con células positivas a la prolactina, de por sí muy abundantes en la hipófisis no tumoral; sino que, además, deben acompañarse de hiperprolactinemia, niveles elevados de prolactina en sangre circulante.

Los adenomas y, en particular los prolactinomas se clasifican con arreglo a su tamaño en:

- Microadenomas, tumores con un diámetro menor a 10 mm.
- Macroadenoma, tumores con un diámetro mayor de 10 mm
- Macroadenoma con extensión extraselar, cuando sobrepasan los límites e la silla turca.
 - Nota: Los valores se refieren a adenomas humanos.

Hardy (Hardy y col., 1973) publicó un esquema de clasificación que en general utiliza el tamaño y la extensión extraselar. En este esquema, el Grado I equivale a microadenomas, el Grado II a macroadenomas que pueden tener extensión supraselar, pero no evidencia radiológica de invasión de estructuras óseas vecinas; el Grado III se refiere a tumores con invasión de hueso localizada y el Grado IV cuando hay invasión difusa de estructuras óseas.

La importancia de demostrar radiológicamente la invasión no está aclarada ya que el 88% de los macroadenomas y 69 % de microadenomas muestran evidencias de invasión dural en el examen histológico (Selman y col., 1986).

En general, los niveles de prolactina son proporcionales al tamaño del tumor (Klijn y col., 1980), aunque existen controversias entre el grado de reacción inmunocitoquímica de las células tumorales y los niveles séricos de la hormona (Molitch y col., 1985).

En el diagnóstico de la hiperprolactinemia, es importante el tipo de análisis empleado ya que se ha demostrado que la sensibilidad del RIA es superior a la de otras técnicas como IRMA o ICMA, la importancia de este hecho radica en la posibilidad de diagnosticar como adenomas no funcionantes, tumores

que en realidad son prolactinomas o viceversa (Molitch y col., 1985; Bevan y col., 1987; Kruse y col., 1995; St-Jean y col., 1996; Barkan y col., 1998).

Existen estudios realizados en autopsias que sugieren que los microprolactinomas están presentes en, aproximadamente, un 5-10 % de las hipófisis obtenidas a partir de la población adulta; pero no suelen existir macroadenomas, por lo que es posible que el crecimiento de micro a macroadenoma sea poco frecuente o bien que como los macroadenomas son clínicamente funcionantes reciben un tratamiento por lo que no suelen ser hallados en las autopsias.

En una serie de pacientes con prolactinoma en el periodo de pretratamiento con bromocriptina en el que la mayoría de pacientes con diagnóstico de tumor fueron a cirugía, dos tercios tenían microadenoma y un tercio macroadenoma (Post y col., 1979; Domingue y col., 1980; Randall y col., 1983).

Por consiguiente, aproximadamente un 3 % (es decir, un tercio del 5-10 % de tumores que requieren atención médica) de los microadenomas puede esperarse que se conviertan en macroadenomas. El resto de los microadenomas, o son clínicamente insignificantes, o son descubiertos, posteriormente, como macroadenomas.

El paso de micro a macroadenoma es pues un tema controvertido y discutido. En series de seguimiento con TAC o TACAR de hasta 8 años en mujeres con microadenomas que no recibieron tratamiento (a voluntad propia), sólo se observó crecimiento entre un 6,5 y un 16.5 % (March y col., 1981; Von Werder y col., 1982; Weiss y col., 1983; Koppelman y col., 1984; Pontiroli y col., 1984; Rjosk y col., 1985; Martin y col., 1985; Sisam y col., 1987; Sisam y col., 1987; Schlechte y col., 1989).

Obviamente, los macroadenomas se desarrollan a partir de microadenomas, pero dado que de un 93 a un 97 % de los microadenomas no evolucionan a macroadenomas pueden ser considerados como entidades nosológicas diferentes.

Además, ambos tipos de tumor evolucionan de forma diferente en respuesta al tratamiento con antagonistas dopaminérgicos, los macroadenomas frecuentemente disminuyen de forma significativa su tamaño mientras que los microadenomas sólo parecen disminuir discretamente, por ello se considera que los macroadenomas son más sensibles que los microadenomas a la inhibición de la secreción de prolactina por dopamina tanto en vivo como in vitro (Serri y col., 1983; Spada y col., 1982).

Por otro lado, se admite que la superficie ocupada por los capilares sanguíneos en los macroadenomas es menor que la que ocupan en la hipófisis no tumoral y en los microadenomas (Erroi y col., 1986), aunque estos hallazgos han llevado a hipótesis de distinto tipo, no es menos cierto que algunos macroadenomas son adenomas hemorrágicos en los que casi el 90% de la superficie está ocupada por vasos sanguíneos.

En general, el tamaño del tumor no guarda relación con el grado de proliferación celular del mismo, aunque suele existir relación entre la proliferación celular y la invasión dural del tumor (Nagashima y col., 1986; Landolt y col., 1987; Delgrange y col., 1997).

Por su funcionalidad, los adenomas hipofisarios se clasifican en puros, cuando liberan una única hormona, o mixtos, si liberan más de una.

Los prolactinomas pueden secretar otras hormonas. La combinación más frecuente es la de prolactina y GH, entre un 25 y un 40% de los tumores secretores de GH lo son también de PRL.

Una variante particular de tumor secretor de PRL y GH es el adenoma de células madre acidófilas, también llamadas células mamosomatotropas. Este tumor es irregular, posee células alargadas con núcleo irregular y puede tener cambios oncóticos como grandes mitocondrias. A diferencia de otros tumores secretores de otras hormonas, los pacientes con estos tumores tienen una elevación más marcada de prolactina y GH y habitualmente presentan alteraciones menstruales, galactorrea, libido disminuida o impotencia, y pueden tener tendencia a la acromegalia (Warner y col., 1982). Estos tumores son normal-

mente macroadenomas y desde que se manifiestan suelen tener una vida corta.

Otras combinaciones hormonales son: PRL y ACTH, PRL y TSH, PRL y FSH (Cunningham y col., 1977; Duello y col., 1977, Martinez y col., 1982; Jaquet y col., 1984, Spertini y col., 1986).

La mayoría de prolactinomas tienen células escasamente granuladas que pueden ser observadas al microscopio electrónico. Las células son irregulares, tienen un gran núcleo y un nucleolo prominente, y abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi (Horvath y col., 1991, Robert y col., 1975; Martinez y col., 1980; Kameya y col., 1980; Lloyd y col., 1983; Asa y col., 1999). Los gránulos de secreción inmaduros son pleomórficos pero los maduros son esféricos con un diámetro de 150-500 nm (Horvath y col., 1991; Lloyd y col., 1983).

Una característica de estas células es la “exocitosis indebida”. Esto significa la expulsión de gránulos de secreción dentro del espacio extracelular (Horvath y col., 1974; Horvath y col., 1991). Entre varias características de estas células, el incremento de la actividad endocrina está relacionado con la alta frecuencia de exocitosis y la disminución del número de gránulos por célula y el marcado desarrollo del retículo endoplásmico, pero no hay relación entre la actividad endocrina y el tamaño de los gránulos y desarrollo del aparato de Golgi (Dingemans y col., 1982).

Los prolactinomas granulados densamente son más extraños. Aunque el retículo endoplásmico rugoso no es tan abundante como en los tumores granulados escasamente, el aparato de Golgi está bien diferenciado y es de alta densidad. Los gránulos de secreción grandes (200-1200 nm) están presentes. En general, los prolactinomas granulados densamente están más relacionados con la disminución de la actividad secretora y niveles más bajos de prolactina plasmática que en los tumores escasamente granulados (Martinez y col., 1980; Lloyd y col., 1983).

McComb y col. (1986) estudiaron histológica, inmunohistoquímica, microscópica y morfométricamente el efecto de la bromocriptina, agonista dopamínico, en la hiperplasia espontánea de células secretoras de PRL hipofisarias que sucede en ratas viejas considerando tanto las que tenían hiperprolactinemia como normoprolactinemia antes del tratamiento.

En el grupo control con niveles de PRL altos se observó que tanto el peso de la hipófisis como el área nuclear era más grande que en aquellas que tenían niveles normales de PRL en suero. Los gránulos eran más pequeños al igual que el volumen de los lisosomas; sin embargo, no existían diferencias respecto al área citoplasmática, diámetro de los gránulos almacenados, el volumen de mitocondrias, gotas de lípidos, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi. Esto sugirió que los niveles de PRL en suero no se relacionan con el incremento en el número de células productoras de PRL ni la actividad secretora. Estas características de disminución del núcleo y reducción en densidad de volumen de los lisosomas sugirieron que la síntesis de PRL y su destino intracelular estaban afectados.

En humanos, la calcificación en el prolactinoma ocurre con relativa frecuencia (Horvath y col., 1974) y hay casos publicados en los que casi existe una osificación completa del tumor (Guay y col., 1978; Mukada y col., 1987).

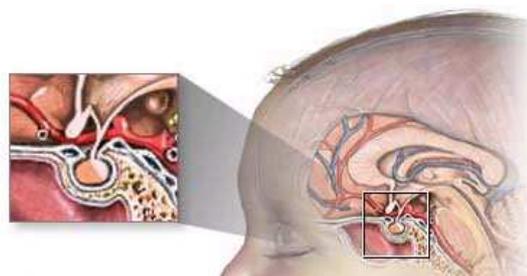
La amiloidosis también está presente (Kuratsu y col., 1983; Kubota y col., 1986). Raramente un prolactinoma tiene una estructura de oncocitoma con las características propias de los oncocitos: abundante hiperplasia y mitocondrias anormales (Kalyanaraman y col., 1980).

Los prolactinomas pueden invadir los tejidos de forma local, alterando sus características histológicas, pero no dan lugar a metástasis a distancia.

Los prolactinomas malignos son realmente raros, sólo 25 han sido publicados (Pernicone y col., 1997; Hurel y col., 1997). La presencia de metástasis a distancia debe ser diferenciada de 2 prolactinomas intrahipofisarios desarrollados a la vez o de tumores primarios localizados ectópicamente (Warner y col., 1982).

Prolactina

La Prolactina es la hormona adenohipofisiaria que estimula la secreción láctea, según definición de Riddle en 1933. Fue descubierta en 1928 en la hipófisis de la vaca, y es considerada, filogenéticamente, la hormona más antigua del reino animal, ya que ha sido detectada en insectos, anfibios, peces y mamíferos. Su actividad luteotrófica se estableció en 1945, también se la conocía como hormona lactotrófica.



En un principio, fue difícil su aislamiento pues su estructura es semejante a la de la hormona de crecimiento y ambas se localizan en la hipófisis, aunque la concentración de GH es mayor.

Su existencia como una entidad química, distinta de la hormona de crecimiento, se estableció a través de una serie de estudios realizados entre 1965 y 1971, conociendo también como se lleva a cabo su secreción, regulada por la interacción de diversos factores fisiológicos con componentes neurohormonales hipotalámicos positivos y negativos.

Al mismo tiempo que se caracterizaba la prolactina, se describieron distintos síndromes clínicos que se asociaban a la hiperprolactinemia, como la amenorrea con la galactorrea (Ahumada y del Castillo, 1932; Krestin y col., 1932).

Tres síndromes clínicos fueron descritos: el síndrome de Chiar-Frommel (Mendel, 1946), caracterizado por: amenorrea, galactorrea y bajo nivel de gonadotropinas urinarias durante el post-parto; el síndrome de Ahumada-Argonz-Del Castillo, cuyas características eran: amenorrea no puerperal, galactorrea y bajo nivel de gonadotropinas sin evidencia de tumor hipofisario en pruebas de rayos X estándar, y el síndrome de Forbes-Henneman-Grismold-Albright

que presenta: amenorrea, galactorrea y niveles bajos de gonadotropinas, todo ello asociado a un adenoma cromóforo (Forbes y col, 1954).

La sobreproducción de prolactina fue postulada en los dos últimos síndromes y, aunque inicialmente se publicaron niveles elevados de prolactina en la sangre de pacientes con galactorrea (Kleinberg y col., 1971), fue Friesen y col. (1972) quien demostró por primera vez, mediante radioinmunoanálisis, los niveles elevados de la hormona en pacientes con prolactinoma, la caída de dichos niveles con la resección parcial del tumor y la producción de prolactina por el tumor *in vitro*.

La falta de sensibilidad, que es reconocida actualmente, de los rayos X convencionales, junto con el mejor conocimiento de la fisiopatología de los prolactinomas, ha dejado obsoleta la anterior clasificación por epónimos de las enfermedades debidas a prolactina.

Los prolactinomas se consideran los tumores hipofisarios secretores de hormonas más frecuentes a partir de los resultados obtenidos en autopsias y en series quirúrgicas (Horvath y col., 1991).

Estructura química de la Prolactina

La prolactina es una hormona polipeptídica de cadena única, con un peso molecular aproximado 22,500 daltons, siendo la hormona adenohipofisaria que regula la lactación, por medio de eventos fisiológicos y bioquímicos.

Su cadena polipeptídica consta de unos 198-200 residuos aminoácidos. De los primeros 50 aminoácidos más del 80% son idénticos u homólogos a la prolactina bovina y presenta una homología muy elevada (en torno al 80%) con la secuencia aminoácida de la hormona del crecimiento.

Esta es la secuencia de los primeros 23 residuos aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal

NH₂-leu-pro-ile-cys-pro-gly-ala-ala-arg-cys-gln-val-thr-leu-
arg-asp-leu-phe-asp-arg-ala-val

En un sujeto normal del 80 al 90% consiste en una forma pequeña pero funcional llamada l-PRL (little Prolactin) constituida por 199 monómeros de aminoácidos también llamada nativa.

Dicha isoforma coexiste con otra isoforma hormonal, de mayor peso molecular (40,000-50,000 daltons), llamada b-PRL (big-Prolactin) que se presupone que sea una forma de depósito, ya que pocas veces es detectada en el suero y su actividad biológica es casi nula. Sin embargo, se la detecta en las hiperprolactinemias asintomáticas, quizás porque sea segregada directamente desde la hipófisis o por representar una forma de agregados poliméricos.

También se ha descrito una forma dimérica de la big-PRL, probablemente unida a una inmunoglobulina IgG, a esta forma se la denomina macroprolactina (big-big-Prolactin) con un peso molecular superior a los 100,000 daltons y sin actividad biológica.

Regulación génica de la Prolactina

El gen codificador de la prolactina, en los humanos, está localizado en el cromosoma 6. Aunque químicamente esté relacionada con la hormona de cre-

cimiento y el lactógeno placentario, cuyos genes se localizan en el cromosoma 17.

En la rata, la prolactina está igualmente diferenciada y localizada en el cromosoma 17, mientras que la GH lo está en el 10.

La prolactina humana (hPRL) y la prolactina en las ratas (rPRL) están a 10 kb desde el extremo 5' del inicio de la transcripción hasta el extremo 3'. Su gen está formado por 5 exones separados por cuatro grandes intrones.

La región del extremo 5' contiene 500 pares de bases con una secuencia considerablemente homóloga entre humanos, ratas y especies bovinas, indicando que los elementos reguladores estén posiblemente situados en esta zona.

Hay dos regiones responsables de la transcripción específica que permite la expresión de prolactina sólo en células lactotropas hipofisarias y no en otros tejidos; una zona distal entre 1720 al 1580 bp que contiene el 98/99 % de esta actividad, mientras que el otro 1-2 % está localizado en una zona más proximal desde el 422 al 33.

Acciones biológicas de la Prolactina

A la prolactina se le han asignado más de 85 acciones biológicas; sin embargo, la más conocida y a la que debe su nombre es la de estimular y mantener la lactancia puerperal en mamíferos (incluida la especie humana), actuando directamente sobre las células de la glándula mamaria.

Durante la lactancia, en la mama, se desarrollan dos procesos principales: Aumenta el sistema ductal, para lo que se requiere la actuación de los estrógenos, la hormona de crecimiento, los corticoides, el lactógeno placentario y la prolactina.

Se desarrolla el sistema lóbulo-alveolar, para lo que se requiere la participación de los estrógenos, la progesterona y la prolactina.

En ambos procesos, la prolactina es importante.

Durante la gestación los niveles de prolactina en el líquido amniótico llegan hasta 1000 ng/mL, mayor concentración que en cualquier otro fluido orgánico, esto sucede entre la 15ª y 20ª semana de gestación y desciende poco a poco hasta el final del embarazo a 450 ng/mL. Se presupone que es producida por la hipófisis fetal y la materna, con una posible función de osmorregulación en el feto, para la supervivencia en el medio acuático intrauterino, contribuyendo así a la maduración pulmonar con aumento en el contenido de fosfolípidos y cambios en la relación lecitina-esfingomielina.

En resumen, en la glándula mamaria, la prolactina estimula las células secretoras alveolares induciendo la síntesis y la secreción de la leche, para lo que también se requiere de insulina e hidrocortisona, necesarias para estimular el sistema lactosa-sintetasa. Las quinasas proteicas dependientes de AMP cíclico inducen la síntesis de caseína por producción de RNA mensajero específico.

En otras especies animales, principalmente en peces y anfibios, se la asocia con una función osmorreguladora, evitando las pérdidas urinarias de agua y electrolitos, aún no comprobada en humanos, pero con posible relación con el síndrome de tensión premenstrual.

También se ha relacionado a la prolactina con la regulación del ciclo reproductivo, el mantenimiento del embarazo y el crecimiento fetal, mediante un efecto sobre el metabolismo materno actuando sobre diferentes órganos efectores para facilitar sus funciones potenciando o inhibiendo los efectos de otras hormonas.

En la especie humana, las otras funciones atribuidas se presentan en sinergismo con los esteroides gonadales, entre ellas se ha descrito su participación en la permanencia de la estructura del cuerpo lúteo y su producción de progesterona; en la estimulación de la formación de receptores de membrana para las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) participando así en el desarrollo folicular. En los folículos antrales pequeños, se ha demos-

trado una concentración de prolactina casi 6 veces mayor que la circulante, cuando el folículo alcanza entre 6 y 8 mm de diámetro los niveles descienden, aproximándose a los niveles sanguíneos basales cerca de la ovulación.

En los varones, el comportamiento de la prolactina puede afectar a la función adrenal, el equilibrio electrolítico, ginecomastia, algunas veces galactorrea, descenso de la libido e impotencia y otras funciones como mantener la funcionalidad normal de la próstata, las vesículas seminales y los testículos.

También se han descrito otras funciones secundarias o de menor potencia, relacionándola con la andrógenesis que se lleva a cabo en la zona reticular de la corteza suprarrenal, pues se han encontrado receptores específicos para prolactina, la unión con dichos receptores estimula la secreción de dehidroepiandrosterona y su sulfato.

Secreción de Prolactina.

Ritmo circadiano de liberación.

Los niveles séricos de prolactina tiene variaciones diarias y circadianas, su secreción es pulsátil, como describieron Sassin y col. (1972) midiendo los niveles sanguíneos cada 20 minutos y con aumentos de hasta un 50%.

Este ritmo circadiano consiste en aumentos o picos secretores durante la etapa de sueño, iniciando entre los 10 minutos y poco más de 1 hora de iniciado el sueño y alcanzando los valores más altos principalmente en las etapas mas profundas. Dichos valores descienden unas dos horas después de haber despertado y caen poco a poco hacia el final de la tarde, sin una tendencia a repetirse en el mismo sujeto en días posteriores, una vez en circulación la vida media de la prolactina se estima en 14 minutos.

Al parecer las variaciones por horario y durante el sueño se deben a que el estímulo dopaminérgico del hipotálamo se va modificando, la fluctuación circadiana no se ve afectada por la administración de anticonceptivos.

Niveles basales.

En la especie humana, la prolactina se detecta en sangre fetal desde la 16ª semana del desarrollo, aumentando sus niveles por secreción activa, ya que al nacimiento muestra cantidades mayores a los registrados en la madre.

El rango de niveles basales en un promedio de 102 mujeres adultas, aparentemente sanas, fue de 1.39 a 24.2 ng/mL, con un valor medio de 7.97 ng/mL; en varones, hombres en un promedio de 87 varones adultos, aparentemente sanos, el valor medio fue de 5.6 ng/mL, oscilando entre 1.61 a 18.77 ng/mL.

Los niveles basales no son constantes a lo largo de la vida. En la mujer se ha observado un aumento desde los 7 ng/mL en la etapa prepúber a los 13 ng/mL en la pubertad. Además, en las mujeres fértiles los niveles presentan una ligera elevación durante la ovulación y la fase luteínica, con respecto a la fase folicular. En los varones, los valores medios pueden oscilar desde 8 ng/mL, en varones prepúberes, hasta 10 ng/mL en varones púberes y 13 ng/mL en varones adultos. En mujeres posmenopáusicas y hombres de edad avanzada, los niveles descienden.

Mecanismos de regulación

El sistema nervioso central es el que regula la secreción de prolactina mediante un mecanismo de inhibición, vía conexiones hipotálamo-hipofisarias.

El hipotálamo ejerce una función importante inhibidora para establecer el nivel normal de secreción de prolactina, a través del llamado factor PIF (Prolactin Inhibitor Factor) su efecto tónico inhibitor es predominante, y cuando se presenta una desconexión hipotálamo-adenohipofisaria por sección del tallo hipotalámico o por lesiones destructivas hipotalámicas lleva consigo una hipersecreción de prolactina.

A la Dopamina se le atribuye ser el factor PIF fisiológico, ya que ejerce un control importante inhibiendo de forma tónica la liberación hipofisaria de prolactina, a través del tracto tuberoinfundibular-intrahipotalámico dopaminér-

gico o TIDA medial, que lleva la dopamina desde el núcleo arcuato hasta los espacios pericapilares del sistema porta hipofisario, en la zona externa de la eminencia media.

Al igual que la dopamina, la apomorfina, la bromocriptina y la cabergolina, drogas agonistas dopaminérgicas, tienen control inhibitorio sobre la hormona prolactina.

Sin embargo, la dopamina no es el único inhibidor hipotalámico de la prolactina, por ejemplo, las catecolaminas y los alcaloides muestran su efecto inhibitorio tanto *in vitro* como *in vivo*, actuando directamente sobre la hipófisis o aumentando el contenido hipotalámico de PIF. En este grupo de inhibidores cabría incluir a la somatostatina.

El hipotálamo también libera al sistema porta hipofisario factores estimuladores de la secreción de la hormona. Entre ellos destacan la TRH, hormona liberadora de tirotropina, ya que en situaciones con hipersecreción del péptido coexiste un aumento de secreción de TSH y Prolactina, las células de prolactina tienen receptores para TRH que estimula la liberación de Prolactina empujando como segundo mensajero al fosfatidil-inositol.

No obstante, hay hechos que sugieren que TRH no es el principal regulador estimulador ya que situaciones fisiológicas, como la lactancia, con hipersecreción de prolactina no se acompañan de variaciones o alteraciones de la función tiroidea, a pesar de existir hiperprolactinemia.

De igual forma se hace mención de varias sustancias que han presentado la función de PRF como el Polipéptido Intestinal vasoactivo (VIP), presente en el hipotálamo, la hipófisis y la sangre del tallo hipofisario; el ácido gamma-hidroxi-butírico (metabolito del GABA, ácido gamma aminobutírico), la prostaglandina E₂, la serotonina, los estrógenos y algunos extractos de la glándula pineal.

De todos ellos, probablemente sea VIP el mejor candidato para estimular desde el hipotálamo y desde la propia hipófisis la secreción hormonal, tam-

bién tiene receptores en la célula lactotropa y su segundo mensajero es el cAMP.

Desde la periferia, fuera del sistema nervioso, los estrógenos son los principales estimuladores de la síntesis y la secreción de prolactina.

Hipótesis del Estudio

Antecedentes

El papel del hipotálamo en la patogénesis del prolactinoma es controvertido. El defecto primario del hipotálamo en la regulación de la secreción de la prolactina, así como el defecto en el tono dopaminérgico, han sido planteados como hipótesis por facilitar o causar el crecimiento de la mayoría de prolactinomas (Fine y col., 1978; Van Loon y col., 1978).

Otras hipótesis postulan que la mayoría de cambios en la función hipotalámica en pacientes con tumores son secundarios a la aparición de alteraciones intrínsecas de novo en la hipófisis.

La regulación principal del hipotálamo en la secreción de prolactina es inhibidora, principalmente debida a dopamina, por lo que se postula que defectos hipotalámicos son una de las causas de disminución del tono dopaminérgico. Se ha debatido si esto era un defecto funcional (Fine y col., 1978) o una alteración de la sensibilidad de las células lactotropas a la dopamina debido a una alteración inducida por estrógenos en la circulación hipófisis.

Fine y Frohman (1978) postularon que los prolactinomas eran causados por un defecto hipotalámico en la secreción de la dopamina. Posteriores estudios, sin embargo, sugirieron que estos hallazgos debían ser reinterpretados, ya que las respuestas observadas por estos autores eran reversibles *in vitro* (Molitch y col., 1982; Barbarino y col., 1982).

Asa y col. (1991) estudiaron la influencia de las hormonas hipotalámicas en la patogénesis de los adenomas hipofisarios y concluyeron que la estimulación hormonal excesiva puede aumentar la liberación de la hormona así como una hiperplasia celular.

Otra posible vía por la que podría ser disminuida la cantidad de dopamina liberada por la hipófisis podría ser si hubiera una alteración en la circulación

así como en la cantidad de sangre proveniente de los vasos portales, que estarían diluidos por la llegada de la sangre de la circulación general. A este respecto existe una gran controversia sobre la llegada de arterias a la hipófisis:

Schechter en 1988 obtuvo por microscopía electrónica datos que sugerían que los prolactinomas contienen arterias mientras que no era así en las hipófisis no tumorales. Sin embargo, estudios previos demostraban la no existencia de arterias en ningún tipo de hipófisis (Erroi y col., 1986) o bien que más de un 81% de las hipófisis normales contienen terminaciones arteriales (Gorczyca y Hardy, 1987). Por lo que esta cuestión de la vascularización anormal del tumor continúa siendo un punto controvertido.

La investigación sobre la sensibilidad de los prolactinomas a la dopamina ha sacado a la luz resultados conflictivos. Algunos sugieren que los tumores son resistentes a la supresión con dopamina (Bansal y col., 1981; Serri y col., 1983; Martin y col., 1984) y otros que no (Fine y col., 1978; Reschini y col., 1980; Ho y col., 1984; Ho y col., 1986).

De este último grupo, sólo los estudios del grupo de Ho usaron dosis casi máximas de dopamina. El mecanismo por el cual se justificaría esta posible disminución de sensibilidad a dopamina estaría relacionado con la disminución de receptores de alta afinidad a la dopamina en prolactinomas, comparado a la hipófisis normal (Bression y col., 1980). Serri en 1983 encontró que pacientes con hiperprolactinemia debida a una alteración hipotalámica y una transmisión defectuosa de dopamina eran extremadamente sensibles a la supresión con dopamina.

La literatura recoge diferentes aproximaciones para intentar determinar si es posible que exista una disfunción hipotalámica primaria como causa de prolactinoma, las principales son:

- Examinar la porción no tumoral de la glándula para detectar hiperplasia de las células lactotropas.
- Evaluar los defectos de regulación del hipotálamo sobre la secreción de la prolactina después de una resección selectiva del adenoma.

- Determinar la tasa de formación tumoral nueva tras la resección del adenoma.
- Analizar la clonicidad para determinar si los tumores son policlonales más que monoclonales.
- Evaluar la presencia en los tumores de mutaciones específicas que dan lugar a una proliferación monoclonal.

Desde hace mucho tiempo se sabe que la administración de estrógenos a ratas induce a largo plazo la formación de tumores hipofisarios (McEuen y col., 1936; Clifton y col., 1956). Con episodios repetidos, los tumores pueden convertirse en completamente autónomos (Clifton y col., 1961). Dar treinta días de estrógenos causa sólo hiperplasia (Batke y col., 1984; El-Azouzi y col., 1990), pero sesenta días de tratamiento causa neoplasia (El-Azouzi y col., 1990).

Algunas cepas de ratas son particularmente sensibles a la inducción de tumores por estrógenos tal como las Fischer 344 y las ACI (Dunning y col., 1947; Stone y col., 1979) y algunas como las Holtzman no desarrollan prolactinomas en respuesta a estrógenos (Wiklund y col., 1981). Aunque ambos, Fischer 344 y Holtzman, aumentan la síntesis de prolactina en respuesta a estrógenos, sólo la Fischer 344 responde con la formación de tumores. Estas diferencias sugieren que en la formación de tumor requiere algún factor mitogénico además del aumento de prolactina.

Al igual que los prolactinomas asociados a la edad, los tumores inducidos por estrógenos también se asocian al daño en las neuronas del tracto infundibular dopaminérgico (TIDA), a una eminencia media reducida así como la disminución de los niveles de dopamina en los vasos portales (Sarkar y col., 1982; Casanueva y col., 1982; Sarkar y col., 1984), y del feed-back negativo TIDA sobre la prolactina (Demarest y col., 1984).

Los efectos antidopaminérgicos de los estrógenos van a afectar de dos formas: estimulando la transcripción génica de la prolactina y actuando también de forma intracelular.

Aunque el efecto directo hipotalámico en la disminución de la liberación de la dopamina en los vasos portales fue en un principio postulado (Cramer y col., 1979), estos efectos no aparecen en ratas hipofisectomizadas, sugiriendo que este efecto es secundario y es debido al aumento de prolactina en sangre.

En un estudio en el que se midió de forma simultánea la actividad dopaminérgica hipotalámica y los niveles de prolactina hipofisaria en ratas Fischer 344 tratadas con implantes de estrógenos en varios periodos de tiempo, Morgan y col. (1982) encontraron un aumento en la actividad dopaminérgica en los primeros catorce días del tratamiento con disminución de los niveles de prolactina, pero a los 30 días disminuía la actividad dopaminérgica, sugiriendo que al principio existía un feed-back negativo normal al aumento de prolactina que quizá dio lugar a un posible agotamiento de las neuronas TIDA con disminución de la respuesta de dopamina a la prolactina e incluso daño celular con el tiempo.

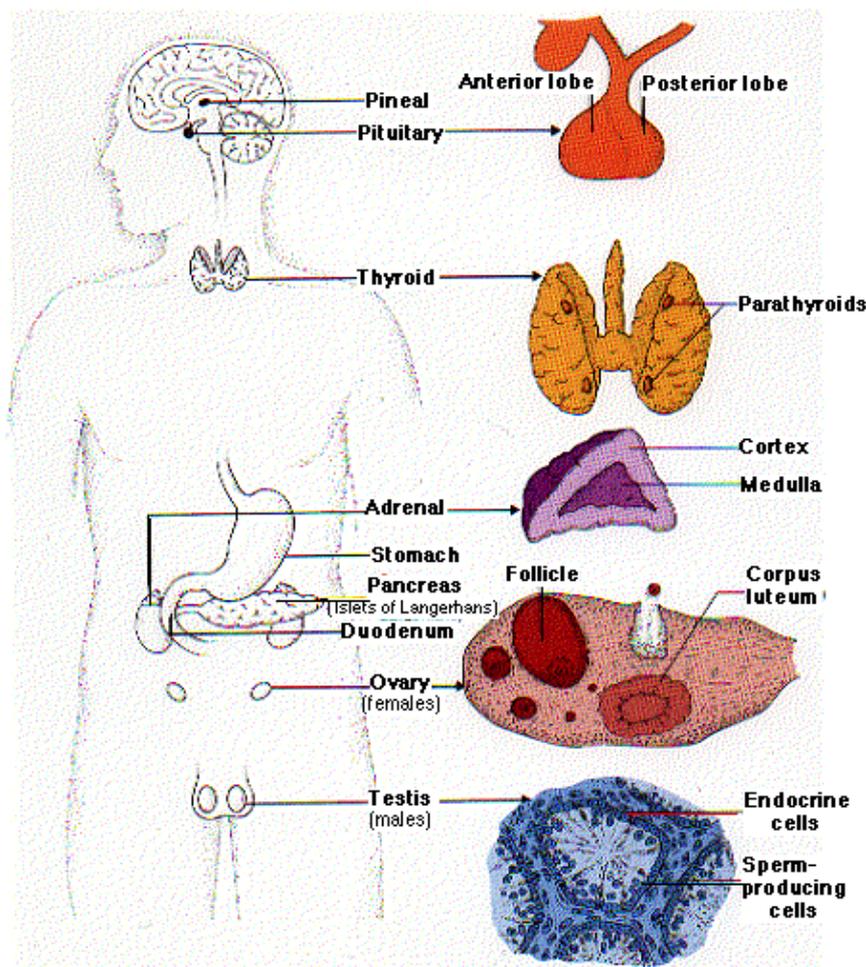
De hecho, hay tumores que responden negativamente a agonistas de la dopamina tales como la bromocriptina, apoyando el papel de esta pérdida tardía de dopamina en la progresión de los tumores (Morgan y col., 1985) o bien un defecto en el receptor dopaminérgico hipofisario.

Sin embargo, en apoyo al concepto de que la disminución en la inhibición de la dopamina no es lo principal con respecto a la formación actual del tumor, Wiklund y col. (1981) encontró diferencias en la tumorigénesis entre las ratas Fischer 344 y las Holtzman cuando sus hipófisis eran trasplantadas debajo de la cápsula renal y por tanto se conseguía liberarlas de la influencia directa del hipotálamo.

Un paso más dieron los estudios realizados por El-Azouzi y col. (1990) que, tras el tratamiento con estrógenos, comprobaron la disminución de los niveles de PRL en el día 30 y un aumento en el peso de la glándula de hasta 3 veces así como que la inmunorreactividad a dopamina disminuía hasta casi desaparecer. Pero todos estos cambios eran reversibles si se retiraba el implante. Por el contrario, si prolongamos el tratamiento hasta 60 días se producían tu-

mores hemorrágicos grandes que mantenían niveles elevados de prolactina y alteraciones irreversibles en las células tuberoinfundibulares del núcleo arcuato.

Phelps y Hymer (1988) publicaron también como estos efectos provocados por el tratamiento de estrógenos podía ser revertido por el tratamiento con bromocriptina, demostrando además que éste tratamiento disminuía el número de células en fase S y G2, pero esto sólo ocurría en las células más pequeñas con gradientes más altos. Por el contrario la inhibición en la liberación de PRL se producía por igual tanto en células densas como en células ligeras. Estudios similares publicaron los japoneses Akihiro y col. (1985) que demostraron la inhibición del crecimiento del tumor MtT/F84 en ratas F344 estimulado por estrógenos, cuando se le administraba bromocriptina a dosis altas o tamoxifeno confirmando la mediación en el fenómeno de los receptores de dopamina y estrógenos.



Hipótesis

Junto a alteraciones génicas, cuyo estudio supera el propósito de este trabajo, parece ser que dopamina y estradiol son los dos factores extrahipofisarios principalmente implicados en el crecimiento y desarrollo de prolactinomas.

La maquinaria enzimática intracelular, en determinados tejidos, incluida la hipófisis, permite la producción de testosterona a partir del colesterol.

De las dos rutas de metabolización de los andrógenos, la reducción y la aromatización, la última depende de la presencia de un enzima, la aromatasa P450, que pertenece a la superfamilia del citocromo P450, y actúa como catalizador para la transformación rápida de la testosterona en estradiol en el interior de la propia célula.

El estradiol es un esteroide gonadal con capacidad reguladora de la actividad secretora hipofisaria, actuando sobre el hipotálamo o sobre la propia hipófisis, e interviene en la regulación de la síntesis y secreción de varias hormonas, principalmente, las gonadotropinas LH y FSH, la prolactina y la hormona del crecimiento (GH), así como de distintos péptidos reguladores auto-paracrinós hipofisarios, como VIP y galanina.

En nuestro laboratorio, como resultado de dos proyectos de investigación, uno financiado por la Unión Europea (BIOMED-I, nº BMH1-CT94-1536, nº proyecto PL931536) y otro por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (JCyL, SA58/98), empleando un anticuerpo anti-Aromatasa P450 altamente específico, se demostró, por primera vez, la expresión inmunohistoquímica de la aromatasa P450 en la hipófisis de la rata. Esta expresión es sexualmente diferente (Carretero y col., 1999).

Además, 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 (Carretero y col., 2001). 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., 2003).

En la hipófisis de ratas viejas (más de 24 meses de edad) que no desarrollaron adenomas hipofisarios, la presencia de la aromatasa (determinada por Western blotting e inmunocitoquímica) es casi inapreciable (Carretero y col., 2002).

También en nuestro laboratorio, mediante hibridación *in situ* también se ha demostrado la expresión del mRNA de la aromatasa P450 en la hipófisis de ratas adultas machos y hembras. Esta expresión, al igual que antes se había comprobado mediante inmunocitoquímica ser más intensa en machos que en hembras (Carretero y col., 2003).

La producción hipofisaria de estradiol por actuación de la aromatasa alcanza sentido funcional ya que la hipófisis presenta el receptor estrogénico α , a través del cual el esteroide desarrolla sus acciones reguladoras (Carretero y col., 2009).

Como hemos comentado antes, las células hipofisarias de ratas viejas que no han desarrollado adenomas hipofisarios apenas presentan aromatasa (Carretero y col., 2003), lo que podría ser una característica de la evolución postnatal del enzima en respuesta a déficit de la secreción de testosterona o a la aromatización periférica de la testosterona en el periodo senil (Harman y Tsitouras, 1980).

Al contrario, un porcentaje muy alto de los adenomas espontáneos que aparecen en ratas viejas sí expresan el enzima, lo que sugiere que dicha expresión podría guardar estrecha relación con el tumor. De una serie de 105 adenomas espontáneos en hipófisis de ratas viejas, el 66%, fueron positivos a la aromatasa, sin que ello guardara relación con el tipo anatomopatológico del adenoma, aunque sí con la naturaleza funcional del tumor. Considerando sólo los prolactinomas, el 86.67% presentaron reacción a la aromatasa, lla-

mando la atención que el 100% de los prolactinomas puros fueron aromatasa positivos, mientras que sólo el 60% de los múltiples expresaron el enzima (Carrero y col., 2002). El western blotting sugiere una sobreproducción del enzima en los tumores si se compara con las hipófisis no tumorales.

Como hemos puesto antes de manifiesto, existe una controversia interesante en la relevancia del papel de dopamina y estradiol como factores implicados en la génesis de los prolactinomas.

Esto hace que sea de sumo interés contrastar la presencia de la aromatasa P450 en los prolactinomas y contrastarla con la presencia de receptores dopaminérgicos, de cara a comprobar si la presencia de uno u otro modifica la expresión de cada uno de ellos.

Objetivo del estudio

Nuestro estudio se encuadra dentro de un proyecto de investigación más amplio que se lleva a cabo en los laboratorios del Departamento de Anatomía e Histología Humanas y en el laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, sobre Tumorigénesis Hipofisaria.

Ante los resultados previos, que hemos expuesto, nos surgió el siguiente *interrogante* que dio lugar a este estudio:

Si en los prolactinomas espontáneos se produce estradiol a nivel local por efecto de la aromatasa sobre la testosterona ¿Este mecanismo afecta a la presencia de receptores dopaminérgicos en dichos tumores?

Para dar respuesta a estos interrogantes nos planteamos como *objetivos*:

1.- Analizar, mediante un estudio inmunocitoquímico, una serie de prolactinomas espontáneos obtenidos a partir de ratas viejas en los que previamente se había detectado la presencia de la aromatasa. Valorando en ellos la presencia de la isoforma larga del receptor dopaminérgico D2.

2.- Si el receptor D2 está presente en los prolactinomas, comparar la expresión inmunocitoquímica de la aromatasa y la de dicho receptor.

3.- Si ratones ko para aromatasa o receptor D2 desarrollan prolactinomas, valorar la prevalencia de los mismos y la relevancia de cada una de las dos deleciones.

4.- Analizar mediante un estudio inmunocitoquímico la importancia que los hallazgos anteriores pudiera tener al contrastar la reacción a la aromatasa y al receptor D2L en prolactinomas humanos espontáneos.

Material y Métodos

Obtención de las muestras.

Adenomas humanos.

Las muestras utilizadas en el presente estudio, proceden del banco de muestras del Servicio de Anatomía Patológica, obtenidas de la extirpación quirúrgica de los tumores en el Servicio de Neurocirugía (Unidad Virgen de la Vega del Hospital de Salamanca) entre los años 1991 y 2002. Todas las muestras, objeto del estudio, se obtuvieron previo consentimiento informado de los pacientes.

Para realizar este estudio, se utilizaron una serie de 87 adenomas humanos no inducidos por tratamientos previos que fueron diagnosticados anteriormente según criterios clínicos y 8 hipófisis humanas no tumorales, procedentes de autopsias clínicas, de personas sin antecedentes clínicos endocrinológicos previos y de características de edad y sexo semejantes a los pacientes con tumores. El total de hipófisis analizadas fue por tanto de 95.

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.

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, sólo 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.

Los utilizados en el trabajo fueron prolactinomas puros, en número de 47, de los que 15 procedían de varones y los 32 restantes de mujeres, en ambos casos los tumores procedían de pacientes entre 29 y 48 años de edad.

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.

Adenomas hipofisarios espontáneos en ratas viejas.

En este estudio se utilizaron 400 ratas albinas adultas de ambos sexos de la cepa Wistar, entre 12 y 30 meses de edad. Agrupadas de 20 en 20 según sexo y edad de sacrificio cada 2 meses.

Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones estándar:

Enjaulados en grupos de 4 animales.

Temperatura de 21 ± 2 °C.

Humedad relativa del aire $50 \pm 5\%$.

Fotoperiodo controlado de luz/10 horas oscuridad.

Agua y comida “ad libitum” con dieta equilibrada de mantenimiento rata-ratón (Panlab®).

Fueron sacrificadas entre las 10:00 y las 11:00 horas (a.m.) por decapitación, previa anestesia por inhalación con éter etílico (PanReac®).

Inmediatamente después se procedió a la apertura de los cráneos, comprobando la existencia o no de un adenoma hipofisario.

En todos los casos se extrajeron las hipófisis, para la comprobación microscópica de la existencia o no de microadenomas.

Las hipófisis extraídas se fijaron por inmersión en formaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4, durante 12 horas.

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.

Los utilizados en el trabajo fueron prolactinomas puros, en número de 125. De los que 83 procedían de ratas hembras mayores de 20 meses de edad y los otros 42 de ratas machos mayores de 24 meses de edad.

Ratones knock out para los genes de aromatasa o del receptor dopaminérgico D2.

Procedencia de los animales.

Los ratones sufrían deleciones en los genes específicos que codifican la síntesis de aromatasa p450 o del receptor dopaminérgico D2.

Se han obtenido a partir de progenitores heterocigóticos ya que los homocigóticos son estériles.

Determinación de la deleción génica. Genotipaje por PCR.

El genotipaje de los animales se realizó mediante amplificación por PCR del gen implicado, a partir de DNA extraído de la cola del animal. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

Extracción, aislamiento y purificación del DNA
Kit Roche

PCR

Aromatasa (29 ciclos: 94°/54°/72°)

P27 (34 ciclos: 94°/59°/72°)

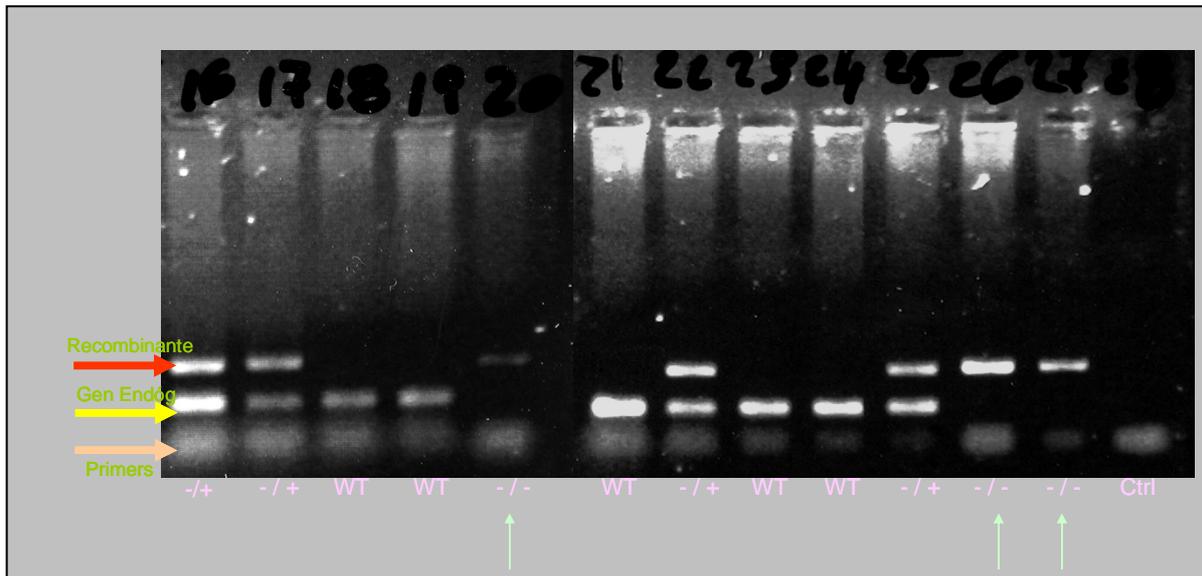
Receptor D2: (11 ciclos: 94°/64°/72° + 24 ciclos: 94°/58°/72°)

Electroforesis en gel de agarosa en TAE (150mV)

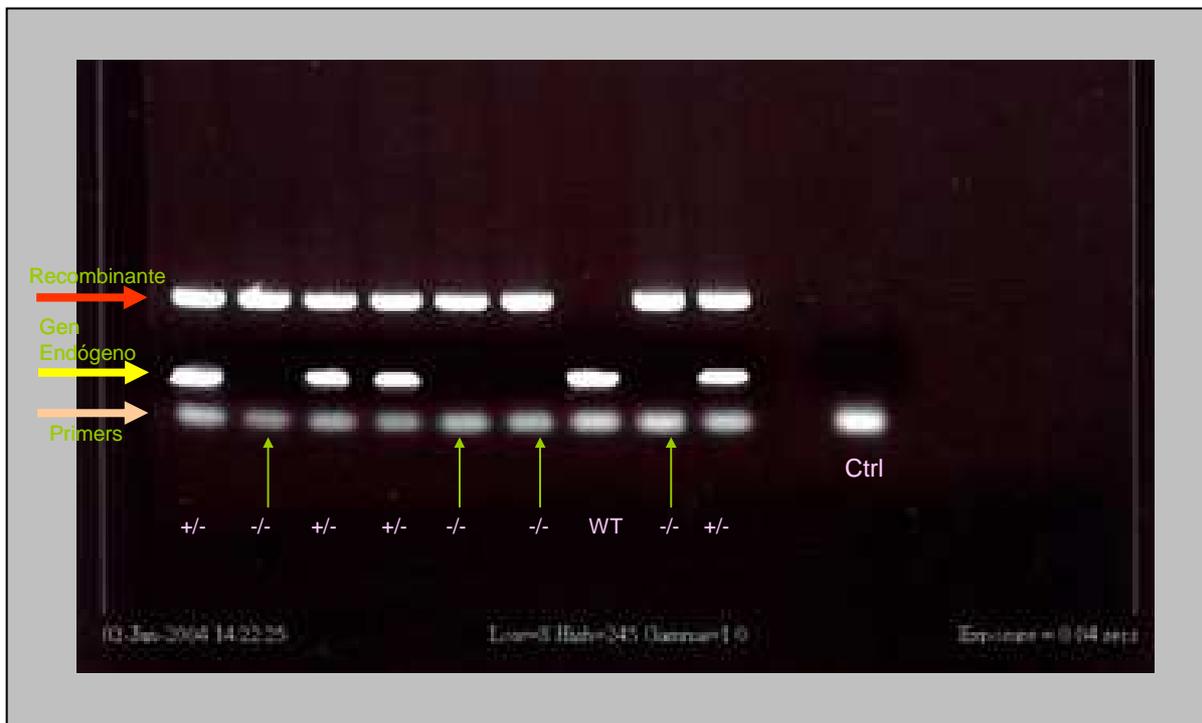
Fotografiado de las bandas de electroforesis

En la página adjunta se presentan dos muestras de las bandas electroforéticas para la pCR del genotipaje para aromatasa p450 y para el receptor D2.

Genotipaje para aromatasa p450



Genotipaje para D2R



Procesado de las muestras

Todos los tumores, humanos o murinos, fueron extraídos con el máximo cuidado posible. Tras su obtención, las muestras fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PBS: 0.1M, pH 7.4) durante 24 horas a 4° C para su posterior inclusión en parafina.

Inclusión en parafina.

La inclusión consiste en reemplazar el agua que contiene el tejido, por un medio líquido capaz de solidificarse, de tal manera que la muestra adquiera una consistencia adecuada para poder obtener cortes de la misma suficientemente finos y sin fragmentarse, manteniendo la estructura de los distintos elementos.

Para realizar este proceso, procedemos en primer lugar a la deshidratación de la muestra, pasando las muestras por etanol de diferente gradación progresivamente ascendente. A continuación se hicieron tres pases por xileno para realizar el denominado aclaramiento o desalcoholización, de esta manera se sustituye el etanol utilizado para la deshidratación, por una sustancia líquida, en la que el medio de inclusión pueda más tarde penetrar de manera homogénea en el tejido.

El medio de inclusión utilizado fue la parafina, se pasaron las muestras por diferentes parafinas fundidas, para finalmente confeccionar el bloque de parafina mediante moldes.

Una vez realizado el bloque de parafina, se obtuvieron cortes seriados de 5 micras de grosor con un microtomo de rotación o tipo Minot, estos cortes se colocaron sobre portaobjetos tratados con gelatina al alumbre de cromo sobre una placa a 37°C para el estiramiento de los cortes.

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-aromatasa P450 humana (Rb-SG 1230, diluido 1:500 en TBS)
- Suero policlonal, obtenido en conejo, anti-aromatasa P450 de rata (RB-SG, diluido 1:500 en TBS)
- Suero policlonal, obtenido en conejo, anti-Prolactina humana (Dako, diluido 1:900 en TBS)
- IgG obtenida en conejo anti-isoforma D2L del receptor dopamínico D2 (...), diluida ... en TBS.
- Suero policlonal biotinado, obtenido en cabra, anti-Ig G de conejo (Caltag, diluido 1:150 en TBS).
- Complejo estreptoavidina-peroxidasa (Caltag, diluido a 1:100 en TBS).

Protocolo inmunocitoquímico.

Una vez hidratadas las muestras, se incubaron con el anticuerpo primario durante 18 horas en cámaras de humedad a 4°C.

Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados de 5 minutos en TBS, para la eliminación de anticuerpos no unidos a antígenos.

Incubación con el anticuerpo secundario biotinado, durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos cada uno.

Incubación con el complejo estreptoavidina-peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en TBS de 5 minutos cada uno.

Revelado de la reacción empleando H₂O₂ como sustrato para la peroxidasa y 3-3´ diaminobencidina (Sigma), utilizado como cromógeno, obteniéndose una coloración marrón donde se localizaba el antígeno a detectar. Esta reacción se desarrolló a temperatura ambiente, bajo control microscópico. La reacción se paró retirando el cromógeno mediante inmersión de los portas en agua destilada.

Las muestras se sumergieron en hematoxilina ácida de Mayer, durante 20 segundos, se lavaron con agua destilada y se montaron con Aquatex (Merck®), con cubres de vidrio.

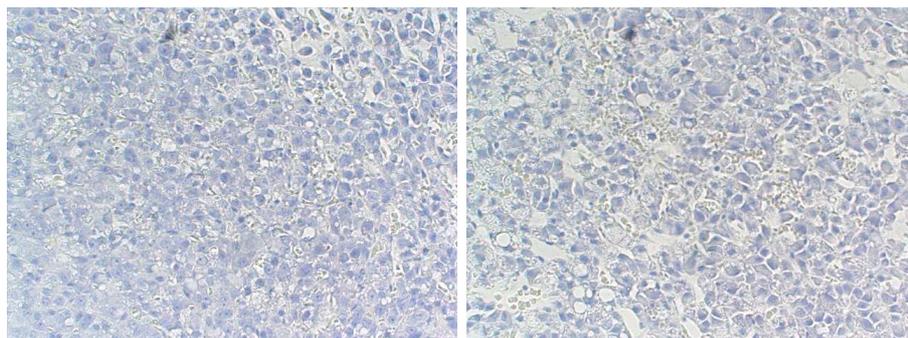
Tampones utilizados.

TBS: Trizma base Sigma® 0.5M con ClNa al 8%, rectificando Ph hasta 7.4. Diluido posteriormente 1:10 para conseguir 0.05M

TB: Similar preparación al anterior sin ClNa. Utilizado para revelar con 3-3´ diaminobencidina

Controles de la reacción.

La especificidad de la reacción inmunocitoquímica se controló mediante preabsorción con 10nM del antígeno (prolactina o la isoforma D2L) durante 24 horas a 4°C, tras centrifugado (10000rpm 20 minutos a 4°C), se obtuvo el sobrenadante con el que se desarrolló el mismo protocolo inmunocitoquímico descrito con anterioridad. Las imágenes de la página adyacente muestran los resultados negativos para prolactina (foto izquierda) y la isoforma D2L (foto derecha).



Estadística.

Dado que el estudio ha consistido en valorar los porcentajes de tumores que expresaban o no inmunocitoquímicamente algún tipo de reacción o el porcentaje de animales que desarrollaban adenomas a una determinada edad, contrastando si el tumor presentaba o no reacción a los 3 marcadores empleados, no se ha precisado ningún test estadístico para analizar los resultados obtenidos.

Tratamiento de los Textos y figuras. Edición final.

Las micrografías fueron digitalizadas empleando una cámara digital Nikon® incorporada a un microscopio Nikon Labophot II®, capturando las imágenes con el software At-2® a un ordenador HP® Pentium IV® y procesadas mediante el programa Adobe PhotoShop CS-3® (resolución final 4000 ppp).

El procesado de los textos, los gráficos y la edición final se realizó con el programa Microsoft Word (Office 2003, para Windows XT), empleando el ordenador antes mencionado.

La impresión se realizó con una impresora OKI C5600 a color.

Resultados

Incidencia de los adenomas espontáneos en ratas viejas de la cepa Wistar.

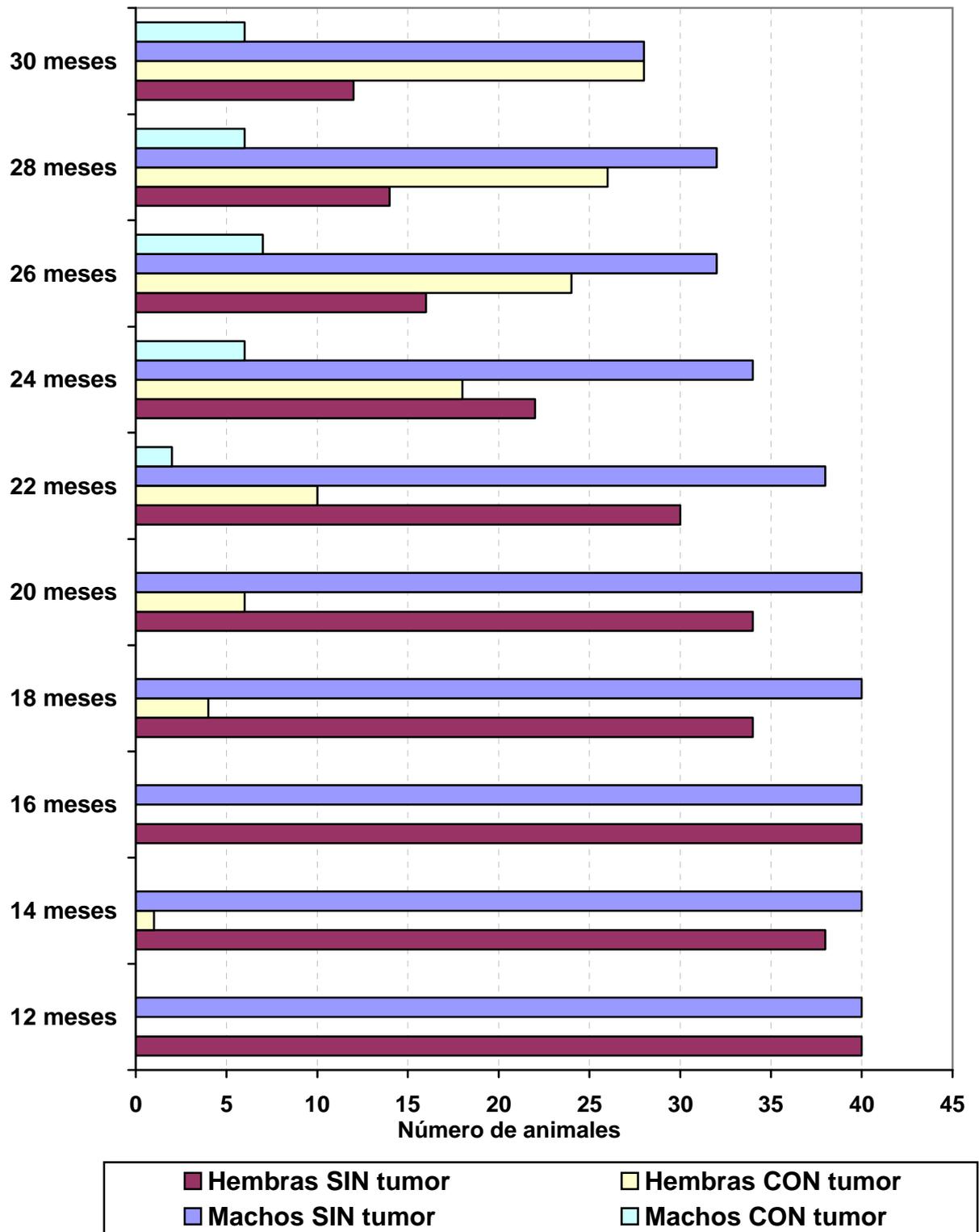
Como se muestra en la gráfica, la incidencia de los adenomas espontáneos en la rata guarda una relación estrecha con la edad y el sexo de los animales.

En nuestra serie, ningún animal desarrolló un adenoma a los 12 meses de edad. La primera incidencia apareció a partir de los 14 meses en ratas hembras, mientras que en los machos no apareció ningún tumor hasta los 22 meses de edad.

La incidencia de adenomas en las ratas hembras se incrementó sucesivamente desde los 18 hasta los 30 meses, principalmente en la rata hembra.

A los 18 meses, el 10% de las ratas hembras desarrollaron un adenoma; a los 20 meses lo hicieron el 17.5%, a los 22 meses el 25%.

Este fenómeno se aceleró a partir de los 24 meses, edad a la que el 45% de las hembras desarrollaron el tumor, para hacerlo el 64.19% a los 26 meses, el 67.5% a los 28 meses y el 70% a los 30 meses (en este grupo de edad, se incluyen 3 hembras que murieron entre 7 y 4 días antes de la fecha prevista y que no desarrollaron adenomas).



Prevalencia de los prolactinomas en los adenomas espontáneos de ratas viejas.

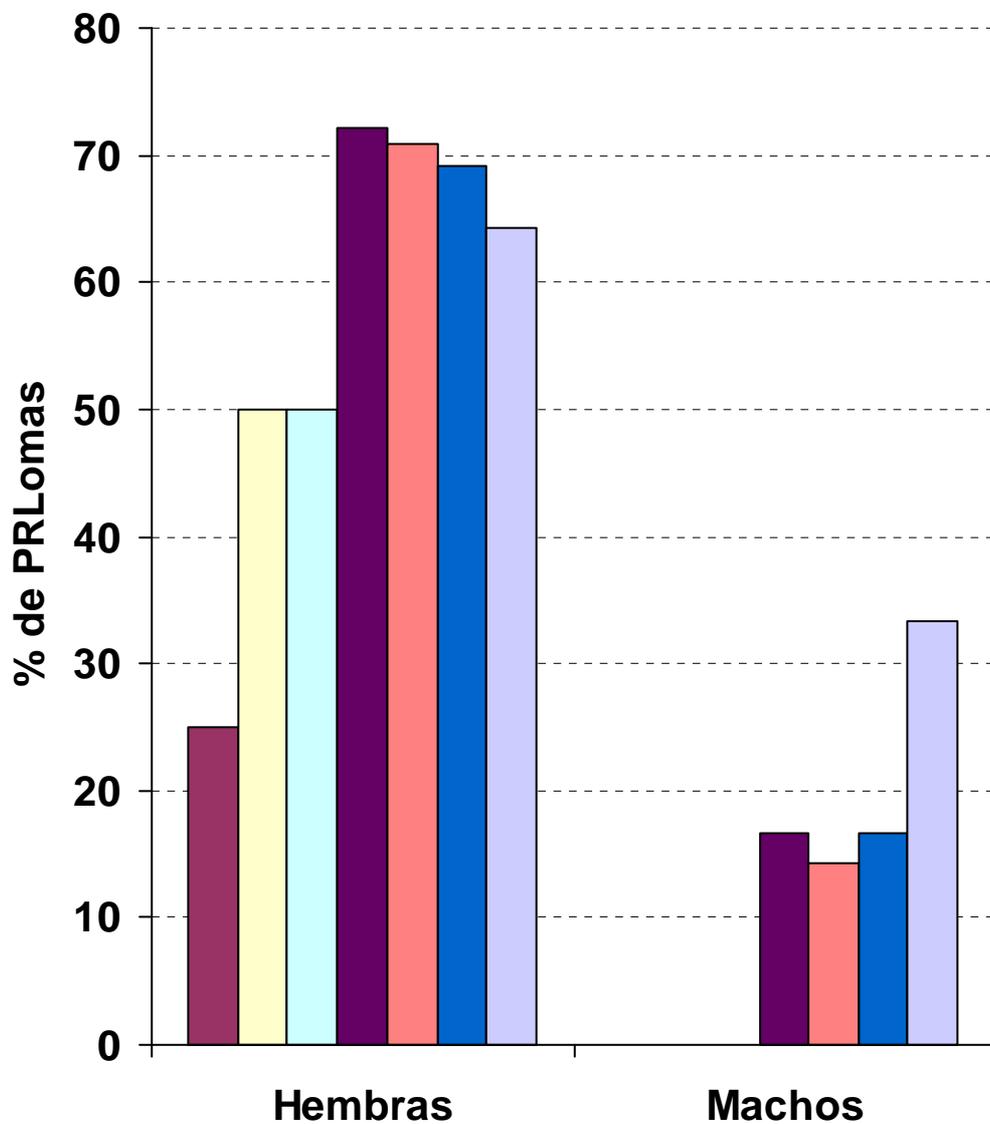
Las diferencias observadas, relacionadas con la edad y el sexo, en la incidencia de los adenomas hipofisarios fueron mucho más evidentes cuando se analizaron sólo los prolactinomas.

En las ratas hembras, comienzan a observarse prolactinomas a partir de los 18 meses de edad, en los que el 25% de los adenomas fueron prolactinomas. A los 20 y 22 meses, el 50% de los tumores fueron prolactinomas. La mayor prevalencia ocurrió a partir de los 24 meses de edad, en los que la incidencia estuvo en torno al 70%.

En conjunto, el 65.81% de los adenomas observados en las ratas hembras fueron prolactinomas.

En los machos, no se observaron prolactinomas hasta los 24 meses de edad, en el que el 16.67% de los tumores fueron de este tipo. Incidencias semejantes se observaron a los 26 y 28 meses. Tan sólo aumentó la incidencia en ratas machos de 30 meses, en los que el 33.33% de los tumores fueron prolactinomas.

En conjunto, el 18.52% de los adenomas observados en las ratas machos fueron prolactinomas.



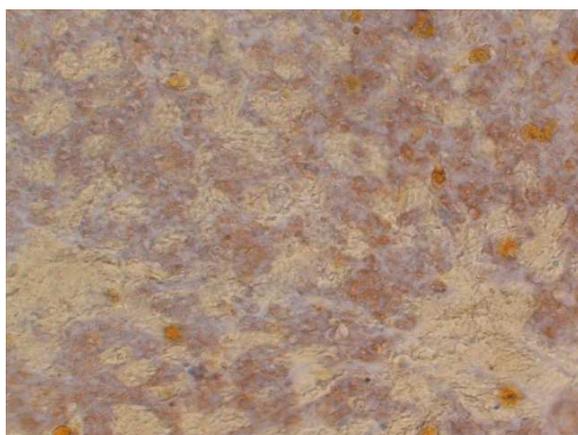
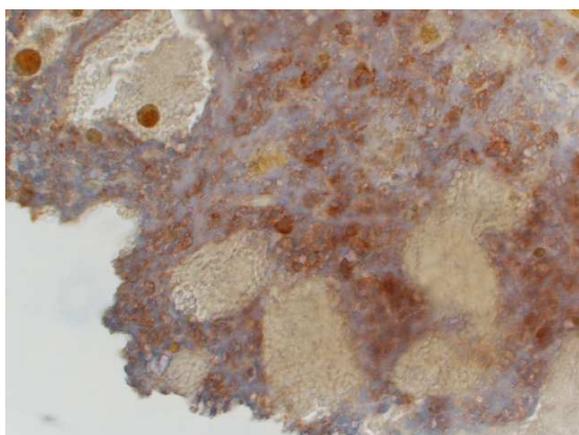
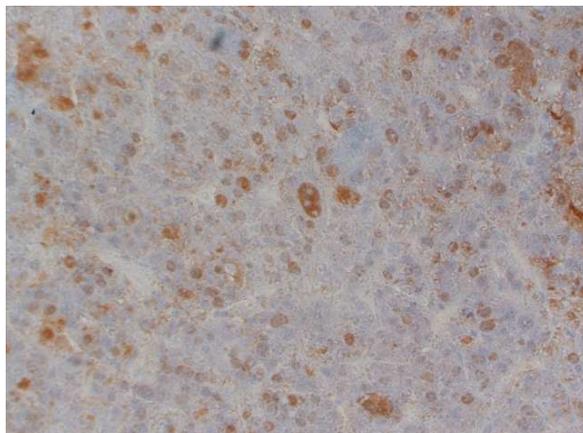
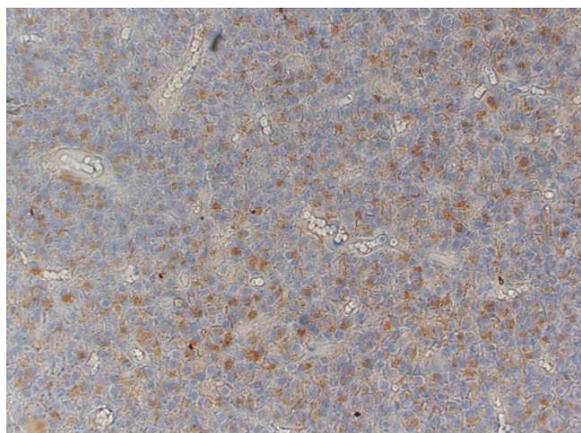
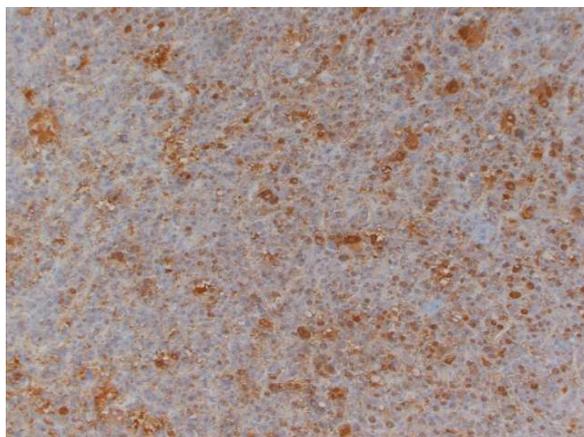
Demostración inmunocitoquímica de la coexistencia de positividad para la prolactina y la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2 en los prolactinomas.

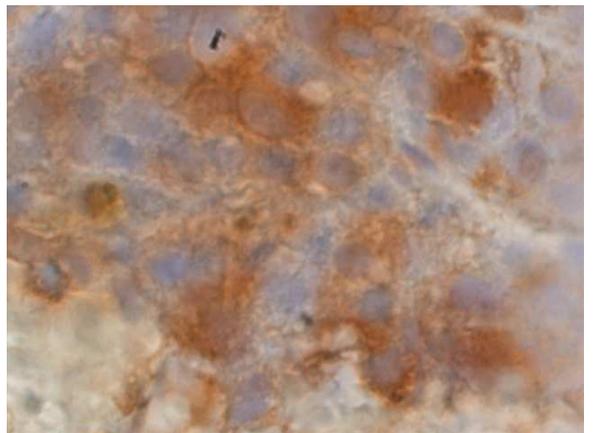
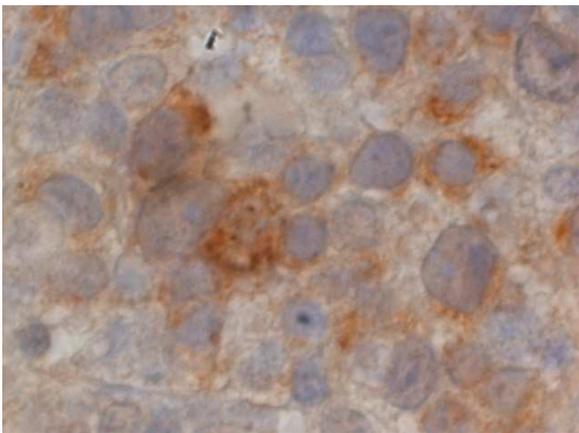
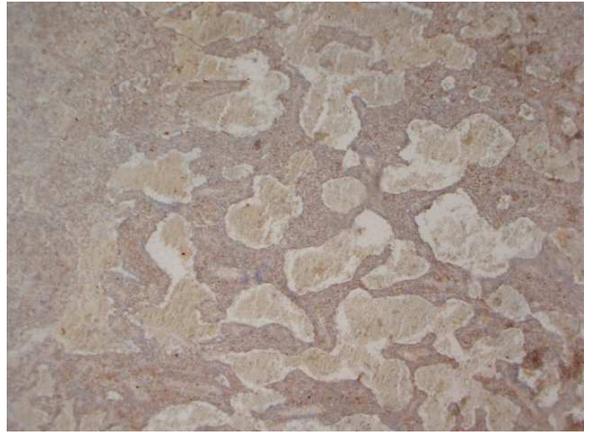
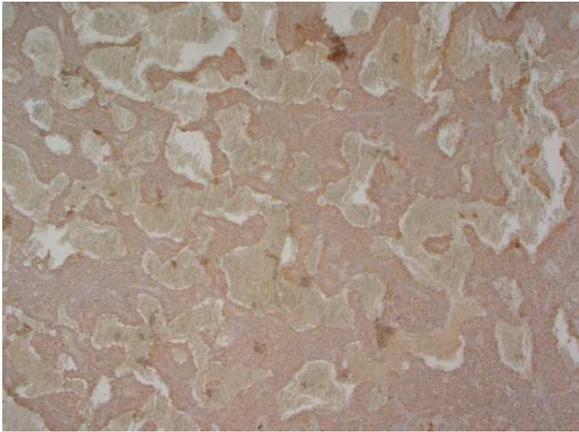
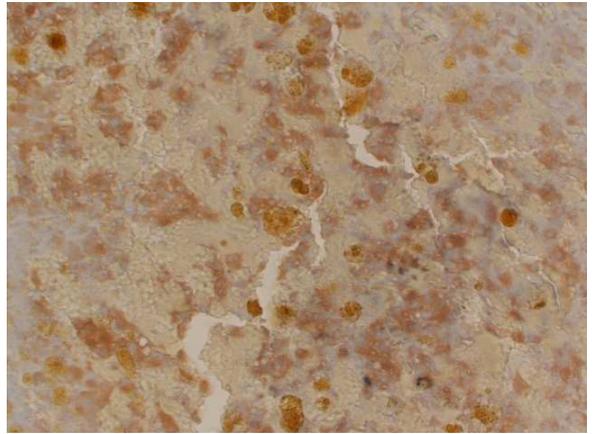
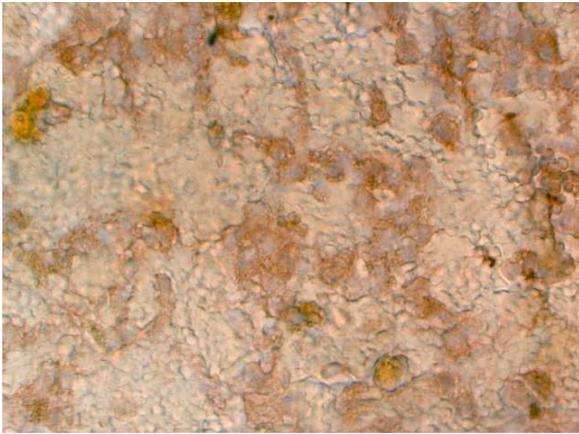
Como muestran las imágenes de las páginas siguientes (columnas izquierdas) los prolactinomas presentaron gran cantidad de células positivas a prolactina.

La reacción no siempre fue homogénea dentro del tumor, de forma que en la mayoría de las ocasiones, dentro del mismo tumor, aparecieron células con una intensidad de reacción mayor que en otras.

La reacción siempre se localizó en el citoplasma de las células, pudiendo ocupar todo el citoplasma o tan sólo una parte del mismo.

Las columnas derechas muestran la reacción a la isoforma D2L en el mismo tumor que la foto adyacente de la izquierda.





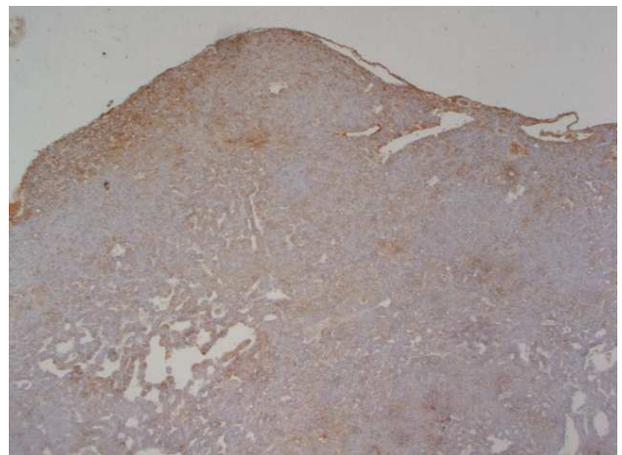
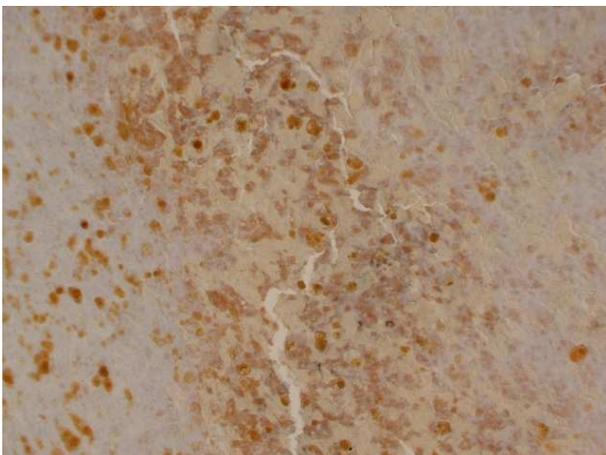
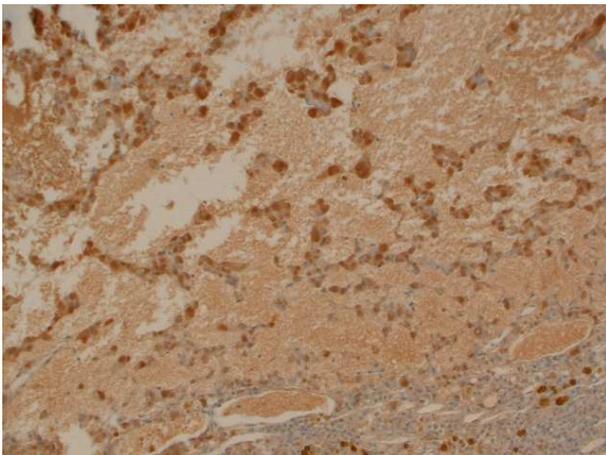
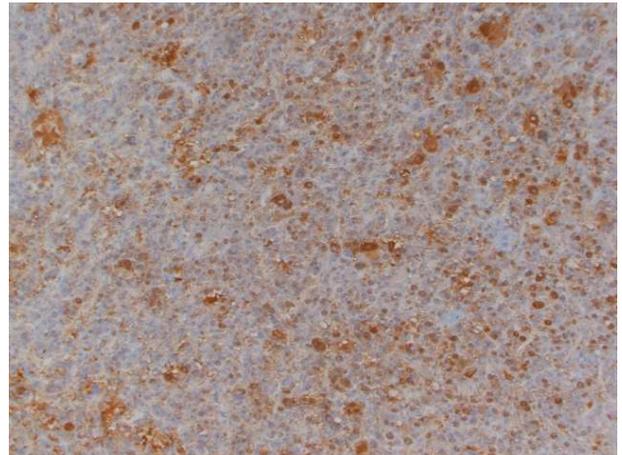
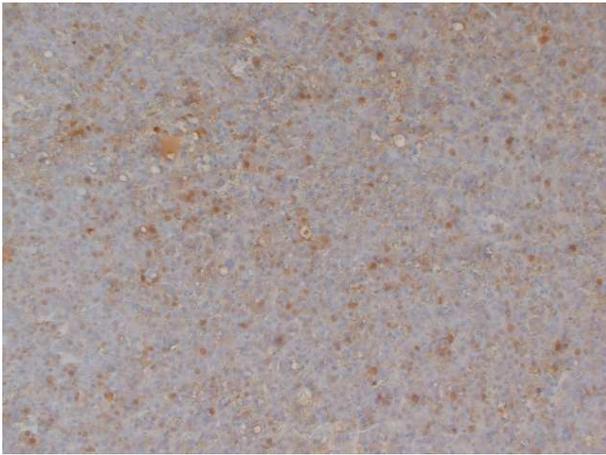
Inmunocitoquímica para la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2 en los prolactinomas espontáneos.

Como se aprecia en las imágenes obtenidas a bajos aumentos en prolactinomas hipofisarios espontáneos, la detección inmunocitoquímica de la presencia de la isoforma D2L del receptor dopaminérgico fue evidente en estos tumores.

La presencia de esta isoforma del receptor no guardó relación con la morfología del tumor, sólido, hemorrágico, cavernoso, etc.

Tampoco guardó relación con el tamaño del tumor, apareciendo en tumores de gran tamaño o en microadenomas.

Por último, tampoco estuvo relacionada con la edad o el sexo del animal.



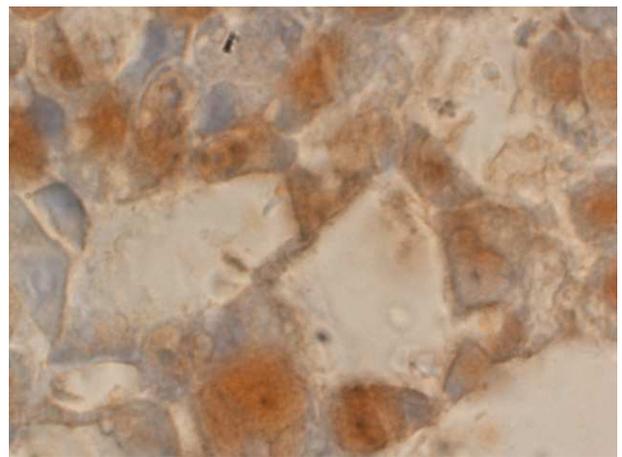
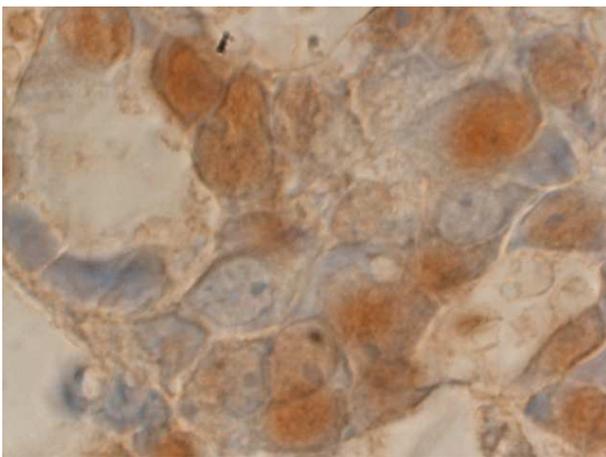
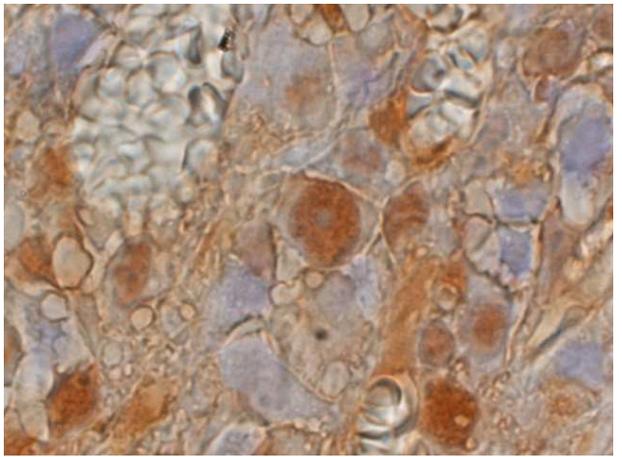
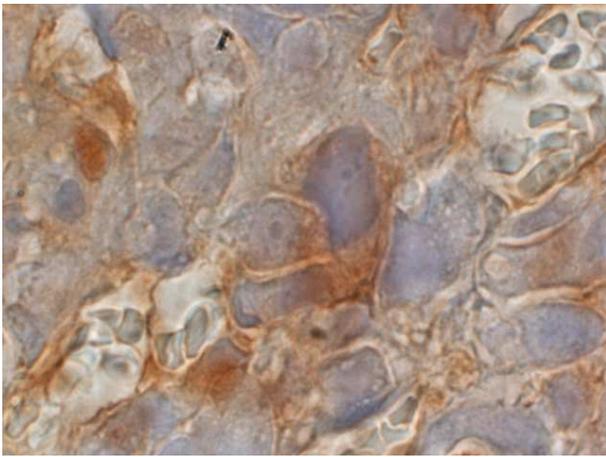
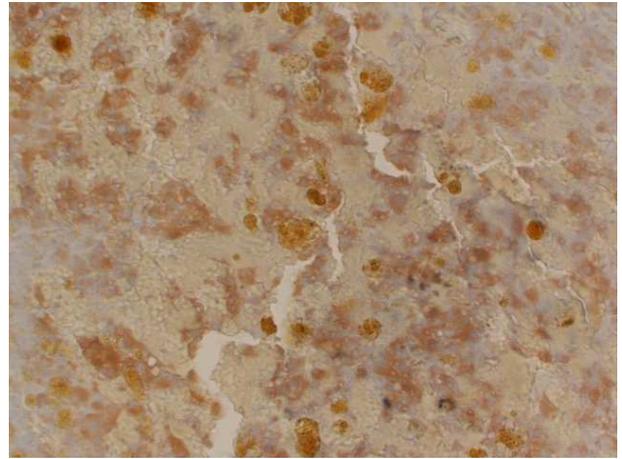
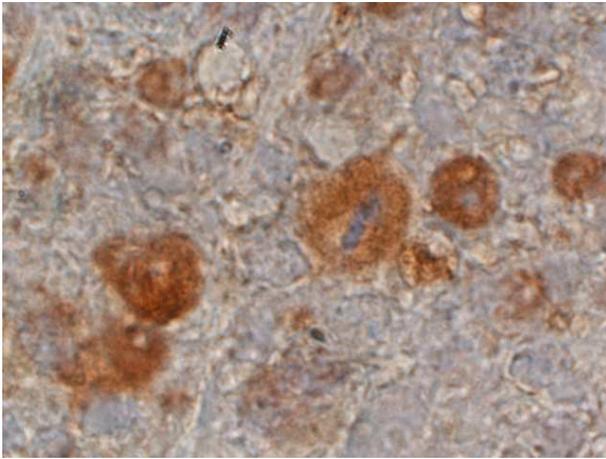
A mayores aumentos, las características de localización y la intensidad de la reacción dentro de las células del tumor sí presentaron diferencias de unos a otros tumores.

La localización intracelular observada con mayor frecuencia fue en el citoplasma. Esta localización afectó al 80% de los prolactinomas.

Los tumores que presentaron macrófagos con hemosiderina en su interior, siempre presentaron reacción exclusivamente citoplásmica. Afectando al 4% de prolactinomas

En ocasiones, algunos tumores con el receptor localizado en el citoplasma, presentaban alguna célula, aunque en baja proporción, con reacción nuclear. Este patrón de localización se observó en el 12% de los prolactinomas.

Raramente, aunque fue así en un 4% de los prolactinomas, la reacción se localizó preferentemente en el núcleo de la célula; no obstante, en estos tumores siempre hubo un porcentaje de células con reacción citoplásmica, asociada o no a la reacción nuclear.



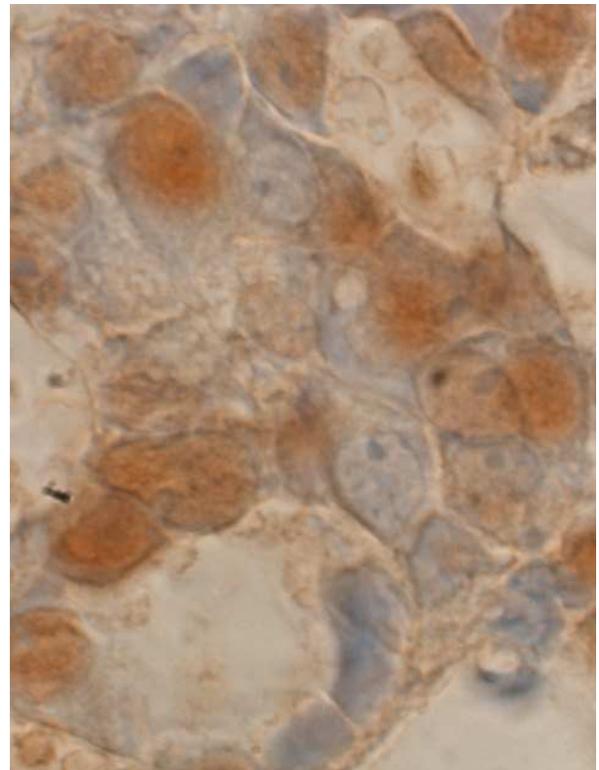
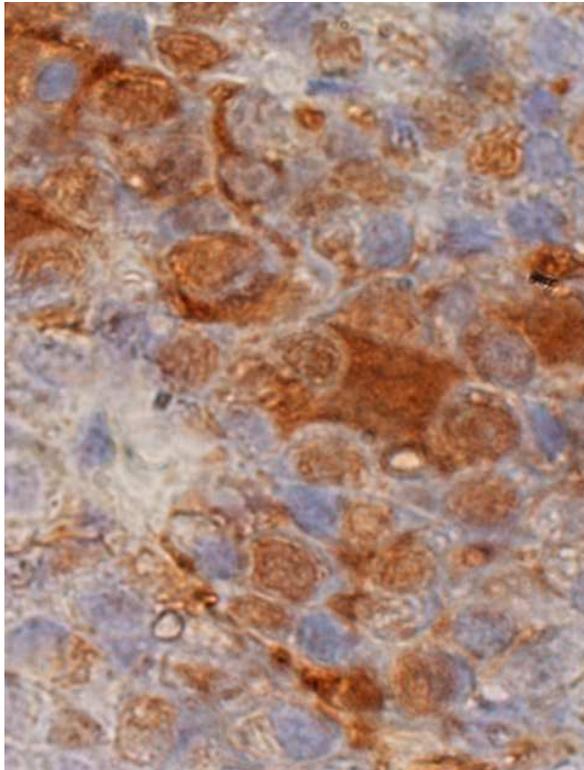
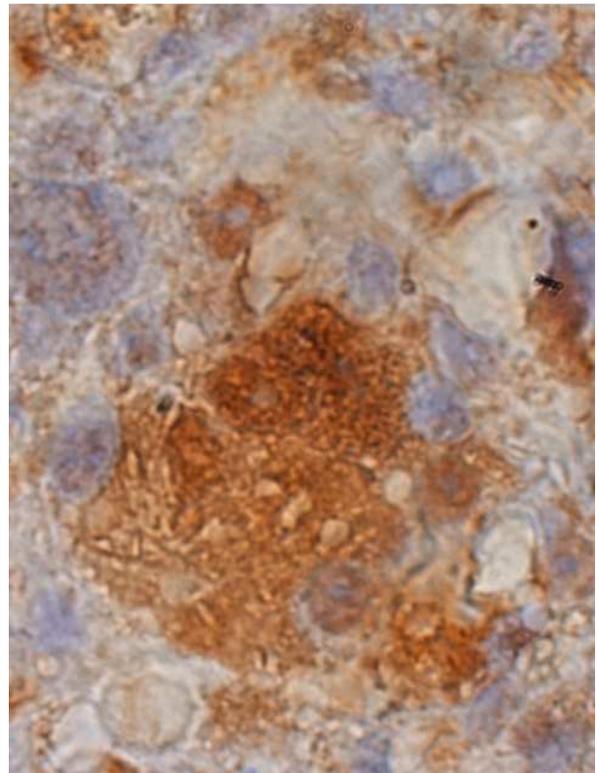
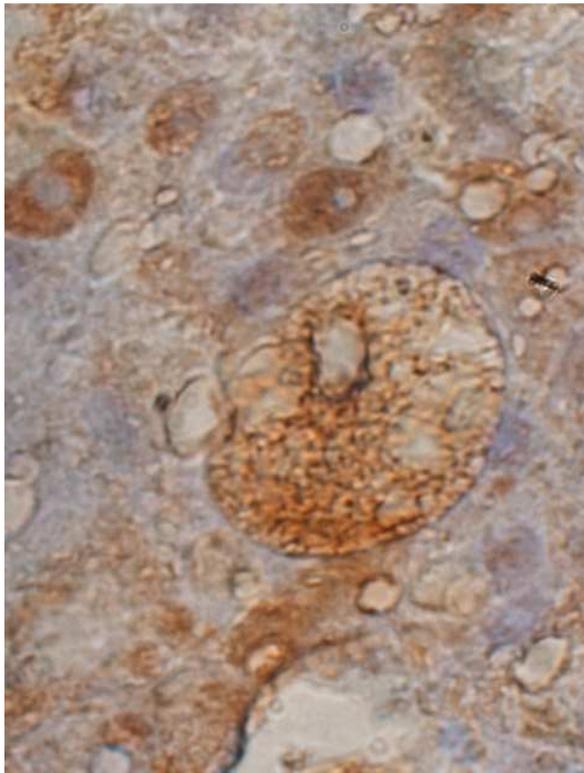
Anomalías estructurales y patrones de reacción en las células positivas a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2.

Aproximadamente el 10% de los prolactinomas presentaciones grandes alteraciones celulares, en células positivas a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico.

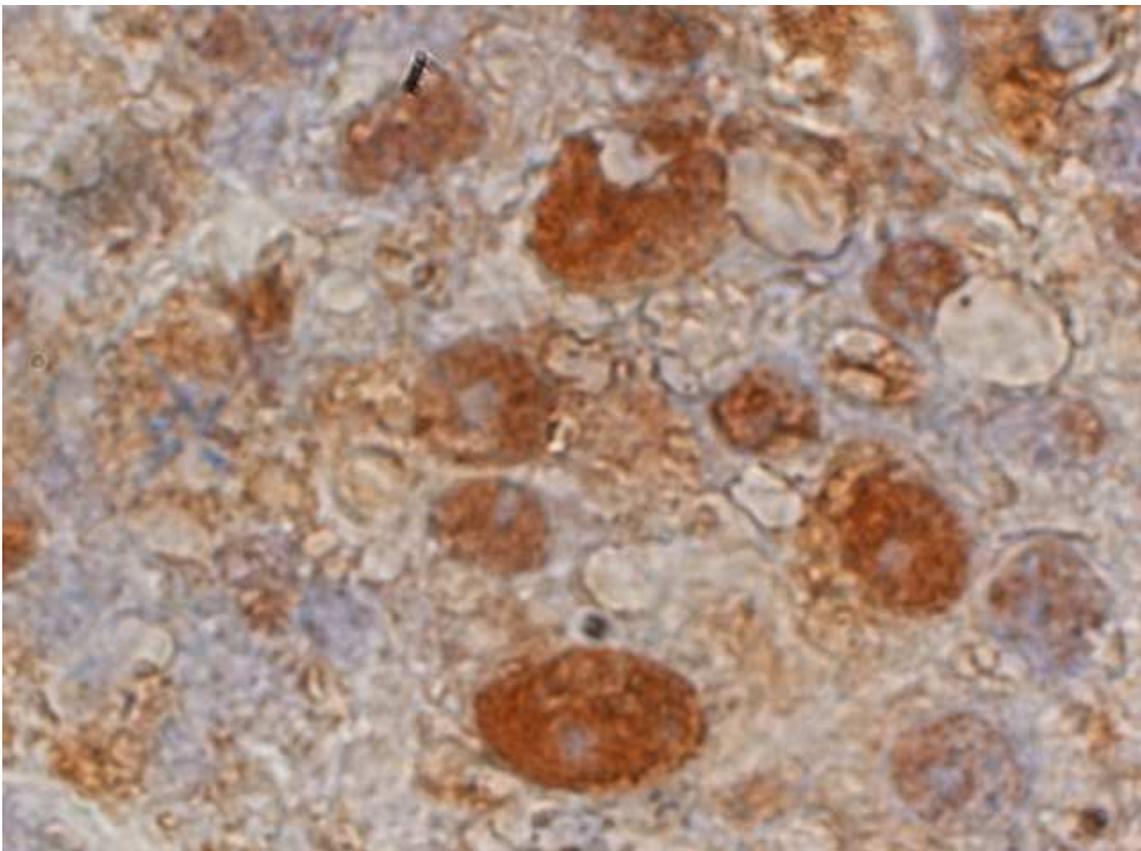
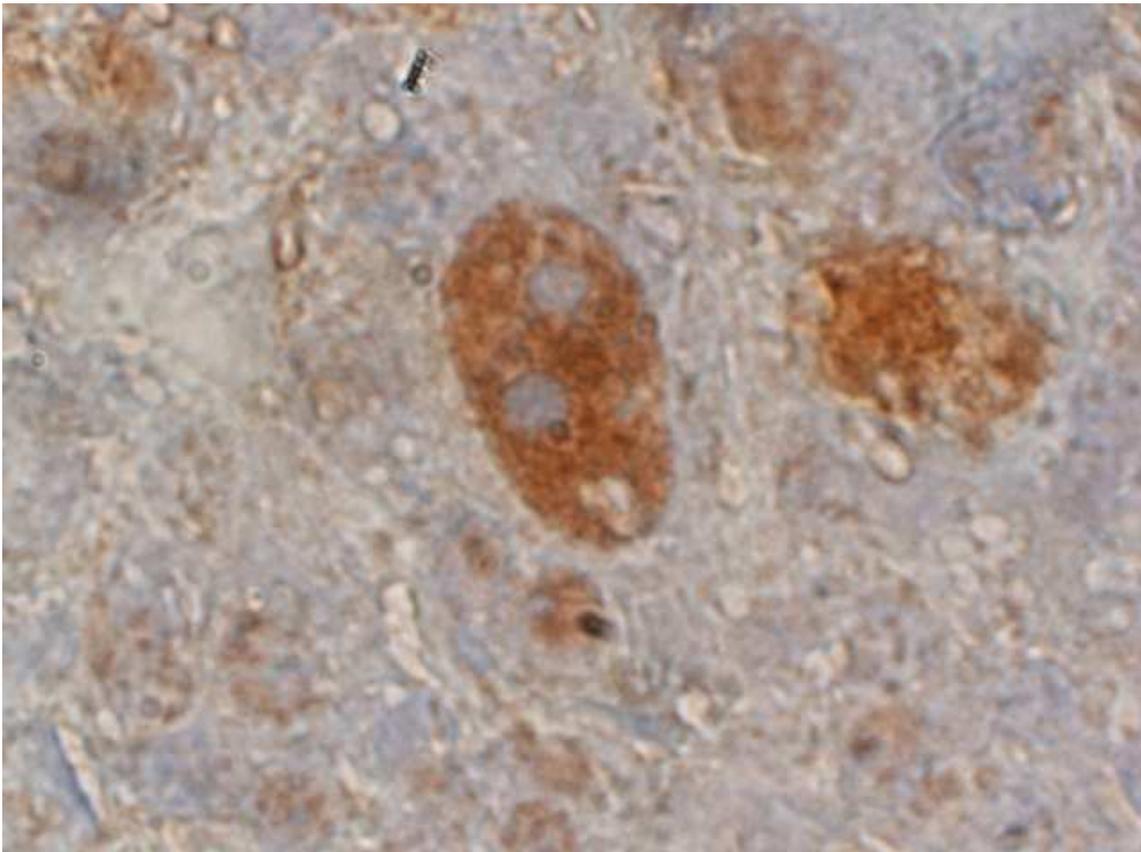
En algunos tumores, principalmente sólidos, aproximadamente el 4% aparecían células de aspecto normal y con reacción citoplásmica al receptor (flechas finas) junto a elementos de aspecto sincitial muy grandes con varios núcleos anormales en su interior (flecha gruesa).

En otras ocasiones, aparecieron células grandes e irregulares, con reacción citoplásmica y nuclear intensa, junto a células con reacción citoplásmica de menor intensidad.

Por último, algunos tumores, principalmente cavernosos, presentaron células con núcleos de morfología muy variable, reactivos al receptor; junto a células que no presentaban ningún tipo de reacción.



Al analizar comparativamente la reactividad a prolactina (foto superior) y a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico (foto inferior), pudimos comprobar que las células que presentaban alteraciones morfológicas, como las células gigantes o polinucleadas o las estructuras de aspecto sincitial, que hemos descrito al hablar de la reactividad a la isoforma D2L, fueron también células reactivas a prolactina.



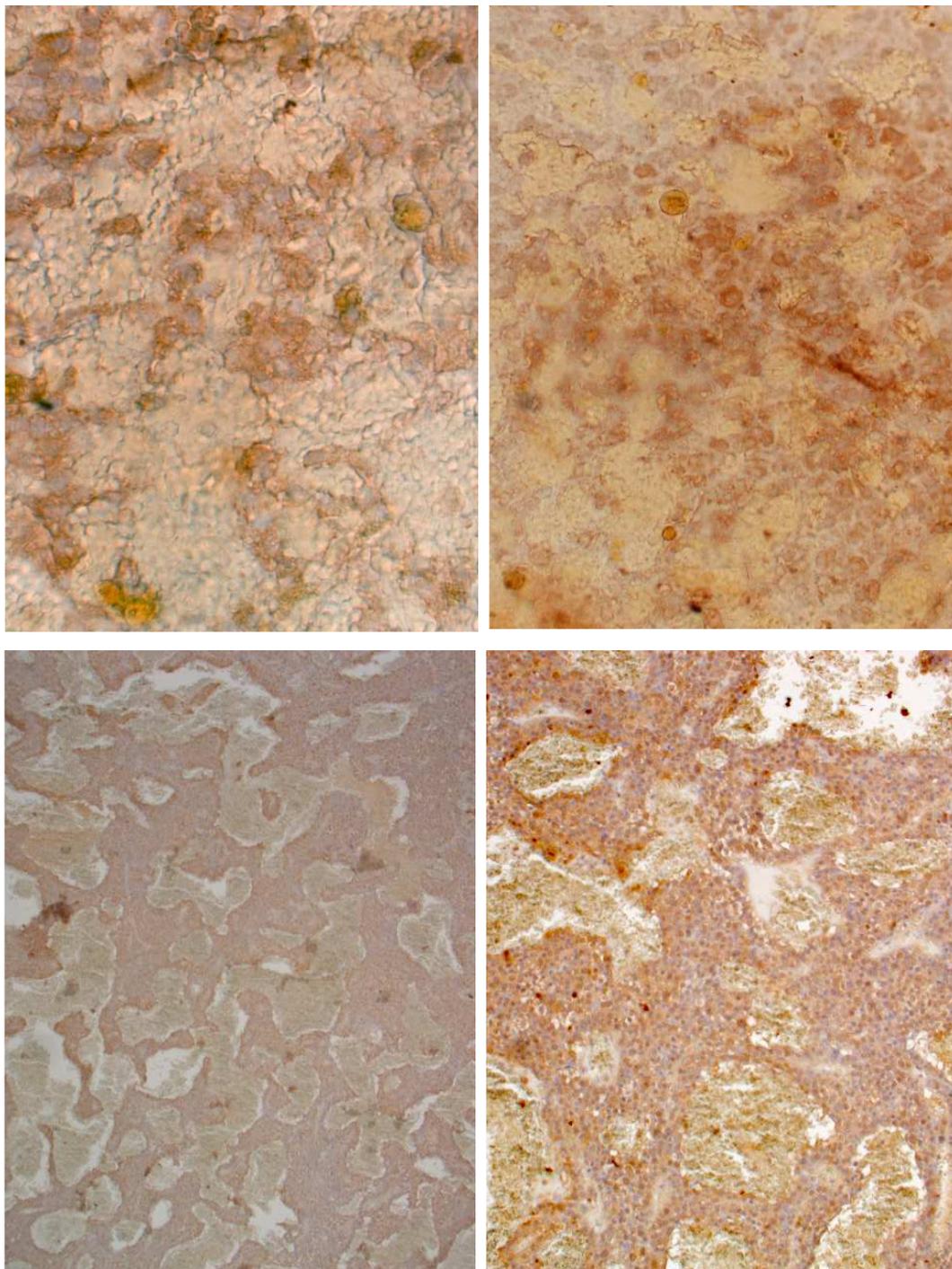
Demostración inmunocitoquímica de la coexistencia de positividad para la prolactina y la aromatasa en los prolactinomas.

Las micrografías de la página adjunta muestran dos prolactinomas espontáneos de rata vieja.

Las imágenes de la columna de la izquierda muestran la positividad a la prolactina en dos prolactinomas diferentes.

La columna de la derecha muestra como las células glandulares y algunas células endoteliales del tumor aparecían positivas a la aromatasa P450.

Esta coexistencia se dió en todos los prolactinomas espontáneos de rata estudiados en nuestra serie.



Adenomas espontáneos en ratones knock out y wilde type.

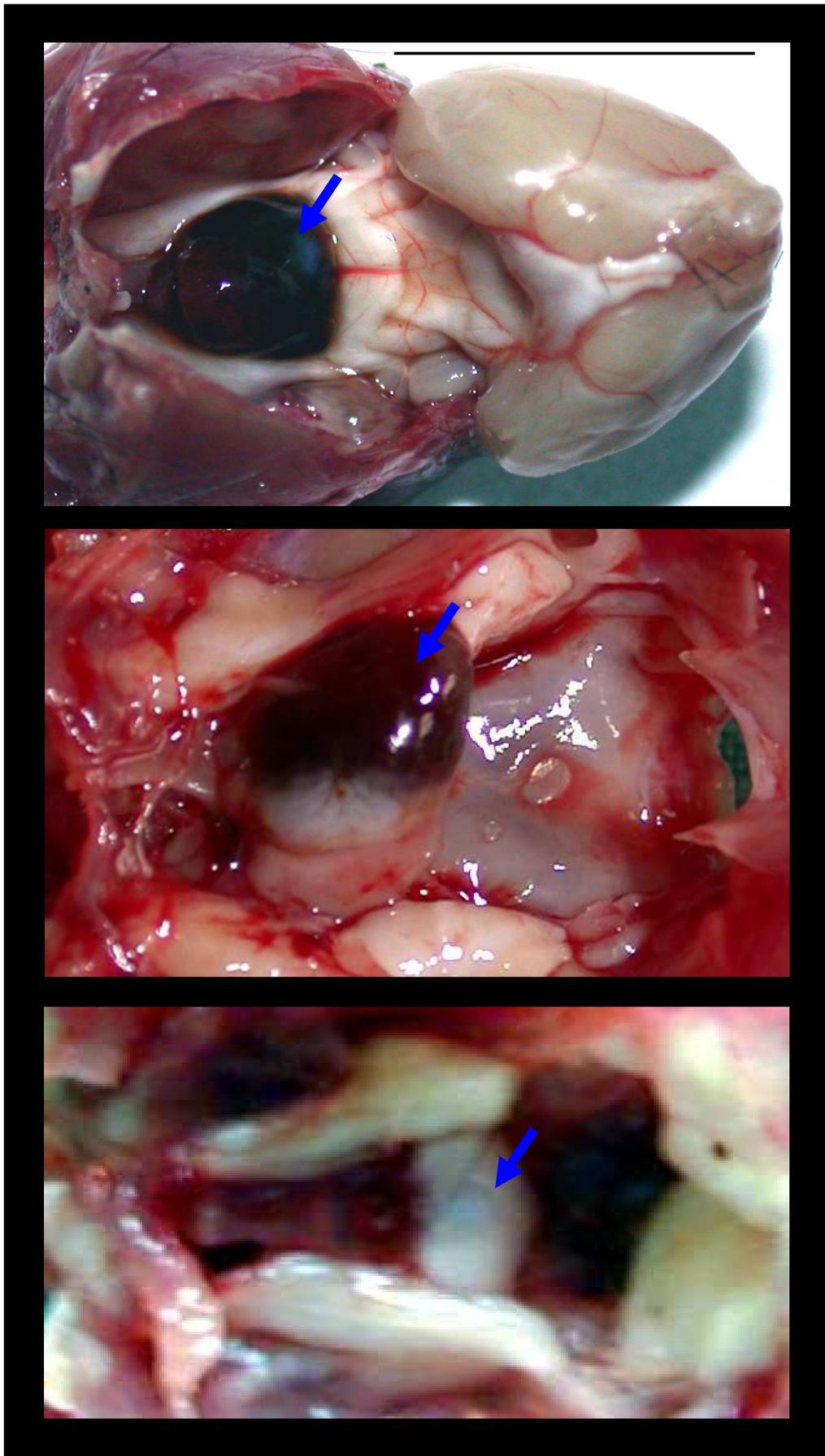
Las fotografías de la página siguiente muestran in situ el aspecto macroscópico de las hipófisis (flecha), en los tres grupos de ratones estudiados.

Todas están obtenidas a partir de ratones hembras de 20 meses de edad.

La imagen superior corresponde a un ratón WT para receptor dopaminérgico D2 y aromatasa en la que se aprecia claramente la presencia de un adenoma hipofisario de tipo hemorrágico (flecha) que en el análisis postmortem resultó ser un prolactinoma.

La imagen del medio corresponde a un ratón ko para receptor dopaminérgico D2 en la que se aprecia claramente la presencia de un adenoma hipofisario de tipo hemorrágico (flecha) que en el análisis postmortem resultó ser un prolactinoma.

La imagen inferior corresponde a un ratón ko para aromatasa p450, en la que se aprecia un aspecto normal de la hipófisis (flecha) sin que se desarrollara un adenoma. El análisis postmortem demostró que no existían macro o microadenomas.



Prevalencia de los adenomas en ratones.

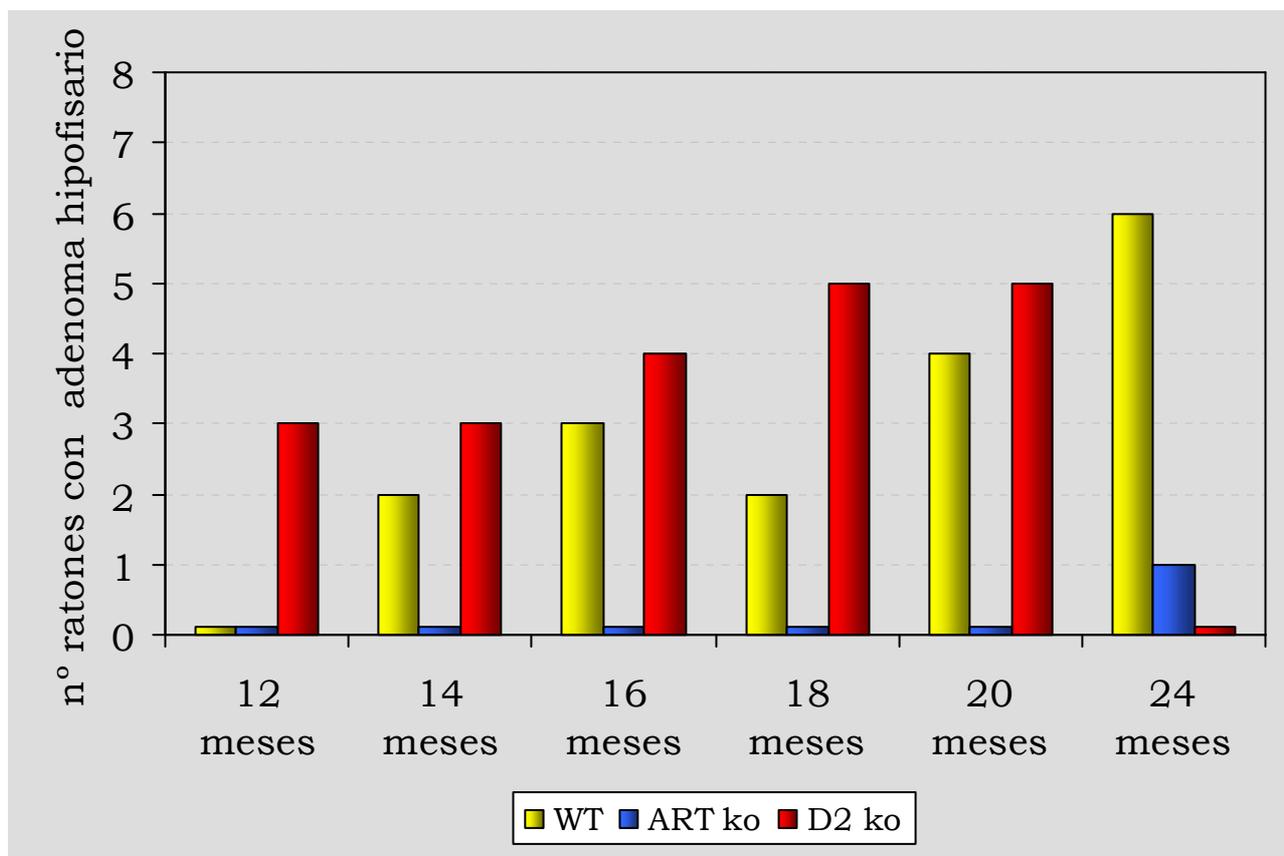
El estudio de la prevalencia de los adenomas se desarrolló a partir de 180 ratones, 90 por sexo, de los que 30 fueron *wilde type*, 30 fueron *ko* para aromatasa y 30 fueron *ko* para receptor dopaminérgico D2. Cada subgrupo de 30 ratones fue sacrificado a un periodo de tiempo determinado, a partir de los 12 meses de edad, cada 2 meses, hasta los 24 meses. Los lotes por tiempos estaban formados por 5 ratones por sexo para cada subgrupo.

Los 10 ratones (5 machos y 5 hembras) *ko* para receptor dopaminérgico D2 que se dejaron evolucionar hasta 24 meses murieron por causas naturales entre los 22 y los 24 meses, por lo que no se pudo constatar la presencia de adenomas en este grupo de animales.

Como muestra la gráfica, los ratones *ko* para receptor dopaminérgico D2 comenzaron a desarrollar adenomas a partir de los 12 meses de edad. A partir de los 18 meses la mitad de los ratones desarrollaron un adenoma hipofisario.

Los ratones *wt* comenzaron a desarrollar adenomas a partir de los 14 meses. De forma creciente el porcentaje de ratones que desarrollaban adenomas fue creciendo según aumentaba la edad del animal. La mayor incidencia de adenomas se dio en las hembras ya que el número de adenomas fue el doble que en los machos. Los prolactinomas supusieron el 59% de los adenomas observados en estos animales.

Los ratones *ko* para aromatasa no desarrollaron adenomas, a excepción de un ratón macho de 24 meses de edad que desarrolló un adenoma corticotropo originado a partir de la pars intermedia de la hipófisis.



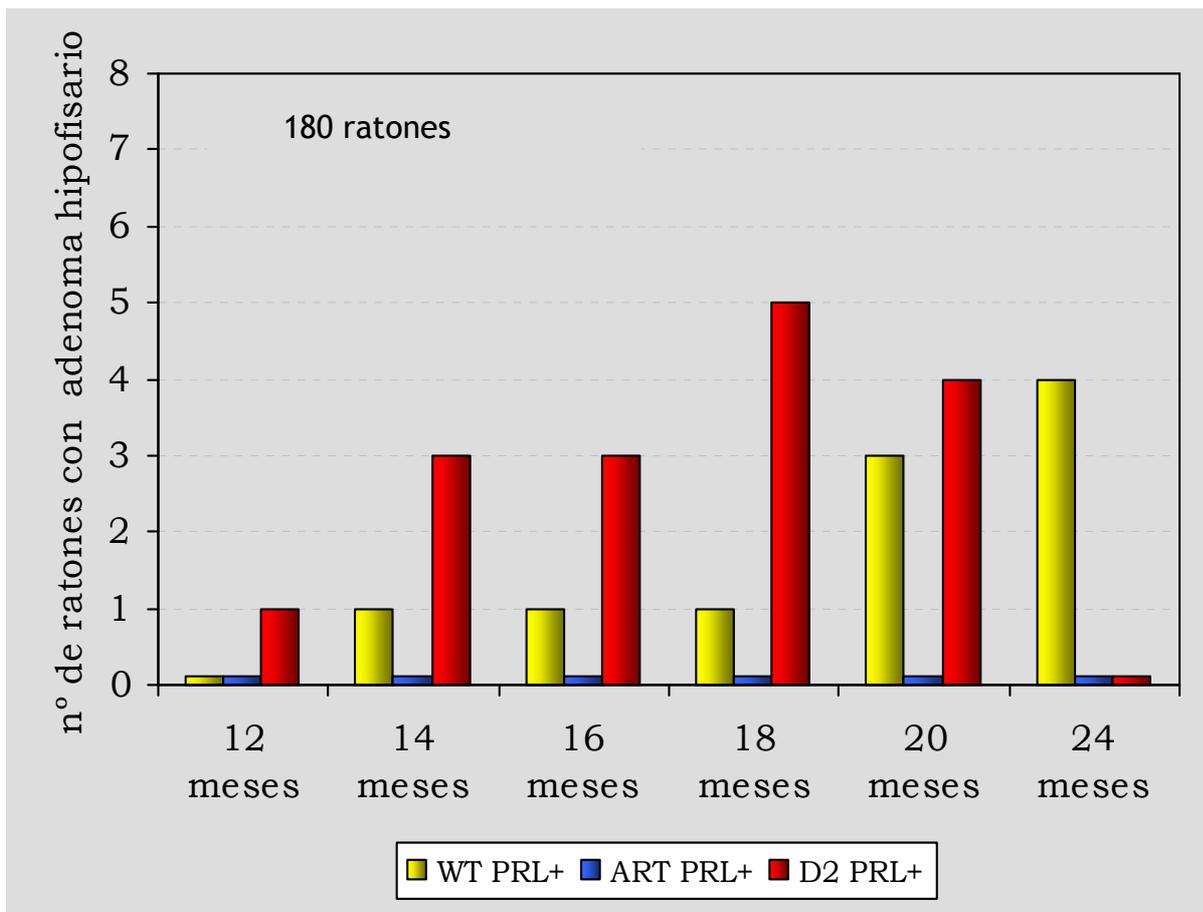
Prevalencia de los prolactinomas en ratones

El estudio de la prevalencia de los prolactinomas se desarrolló a partir de los mismos animales que para el análisis de la prevalencia de los adenomas

Como muestra la gráfica, los ratones ko para receptor dopaminérgico D2 comenzaron a desarrollar prolactinomas a partir de los 12 meses de edad. A partir de los 18 meses la mitad de los ratones desarrollaron un adenoma hipofisario. Como puede comprobarse al comparar la prevalencia de los adenomas con la de los prolactinomas, la mayoría de los adenomas desarrollados en estos animales, fueron prolactinomas.

Los ratones wt comenzaron a desarrollar prolactinomas a partir de los 14 meses. De forma creciente el porcentaje de ratones que desarrollaban prolactinomas fue creciendo según aumentaba la edad del animal, principalmente a partir de los 20 meses de edad. A partir de esta edad, la mayoría de los adenomas desarrollados fueron prolactinomas.

Los ratones ko para aromatasa nunca desarrollaron prolactinomas.



Adenomas humanos.

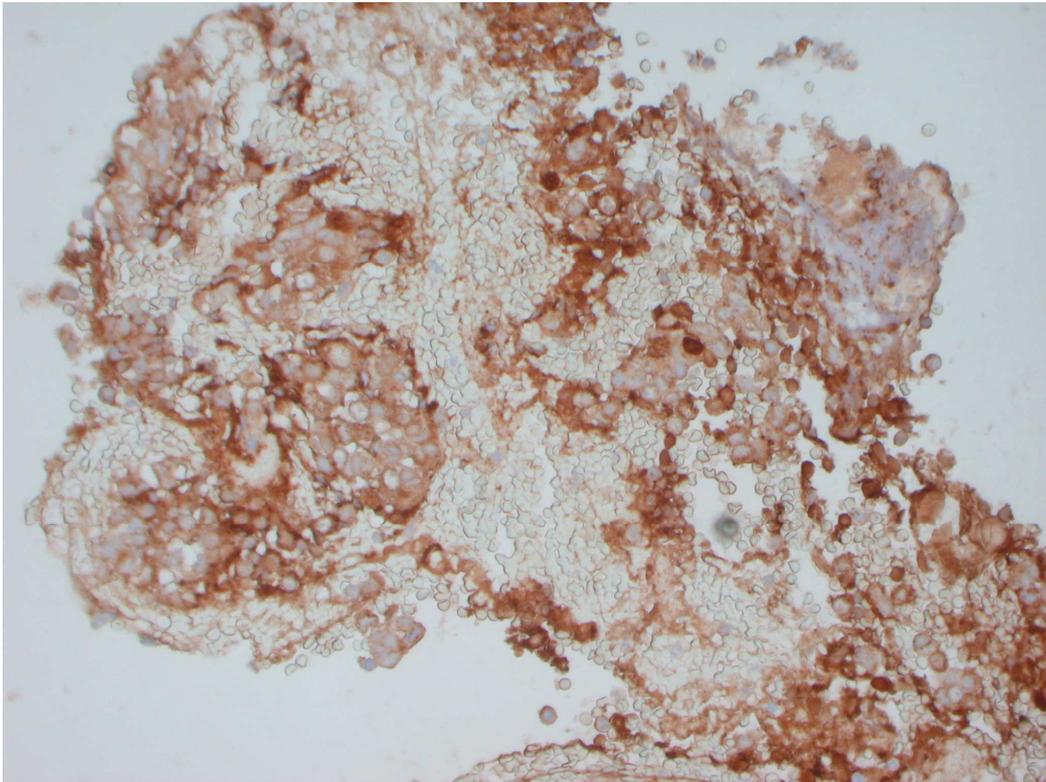
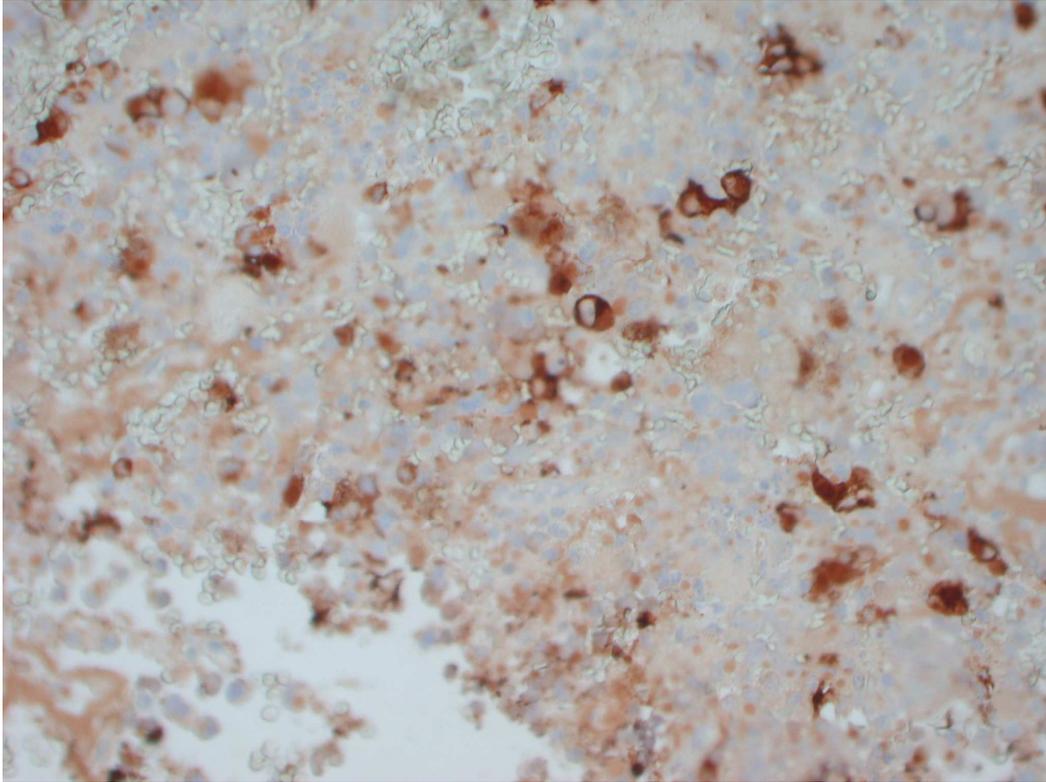
Prolactinomas

El 55% de los adenomas humanos estudiados fueron prolactinomas lo cual se constató por presentar niveles séricos de prolactina superiores a 300ng/mL e inmunocitoquímicamente por presentar casi la totalidad de las células glandulares positivas a la hormona.

En las imágenes adjuntas, se muestran dos de estos tumores con características histológicas diferentes.

La fotografía superior se corresponde con un tumor sólido en el que se aprecian dos patrones diferentes de reactividad a prolactina: unas células aparecen fuertemente reactivas, lo que sugiere que pertenecen al grupo de células densamente pobladas de granos de secreción, mientras que la mayoría de las células son algo más pequeñas y débilmente teñidas, lo que sugiere que, en su mayoría, son células degranuladas.

La fotografía inferior muestra un tumor hemorrágico, desorganizado y con tractos fibrosos. En este tumor, prácticamente la totalidad de las células glandulares eran positivas a la hormona y aparecieron fuertemente reactivas.



Positividad a la aromatasa p450 en los prolactinomas humanos

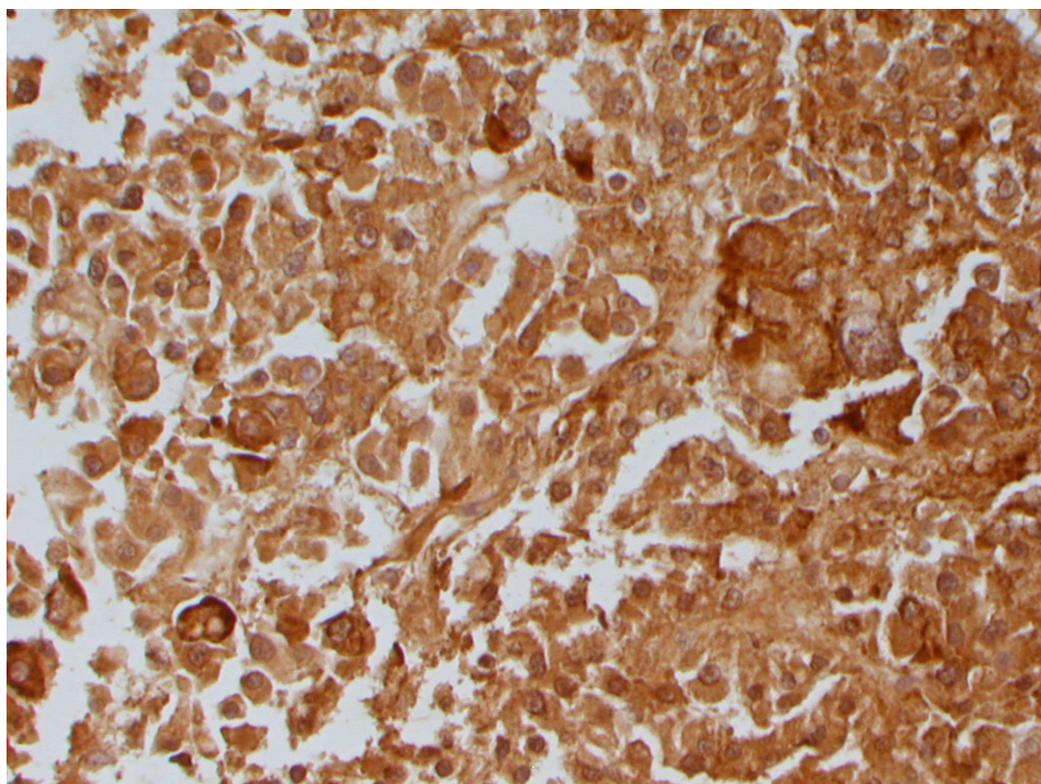
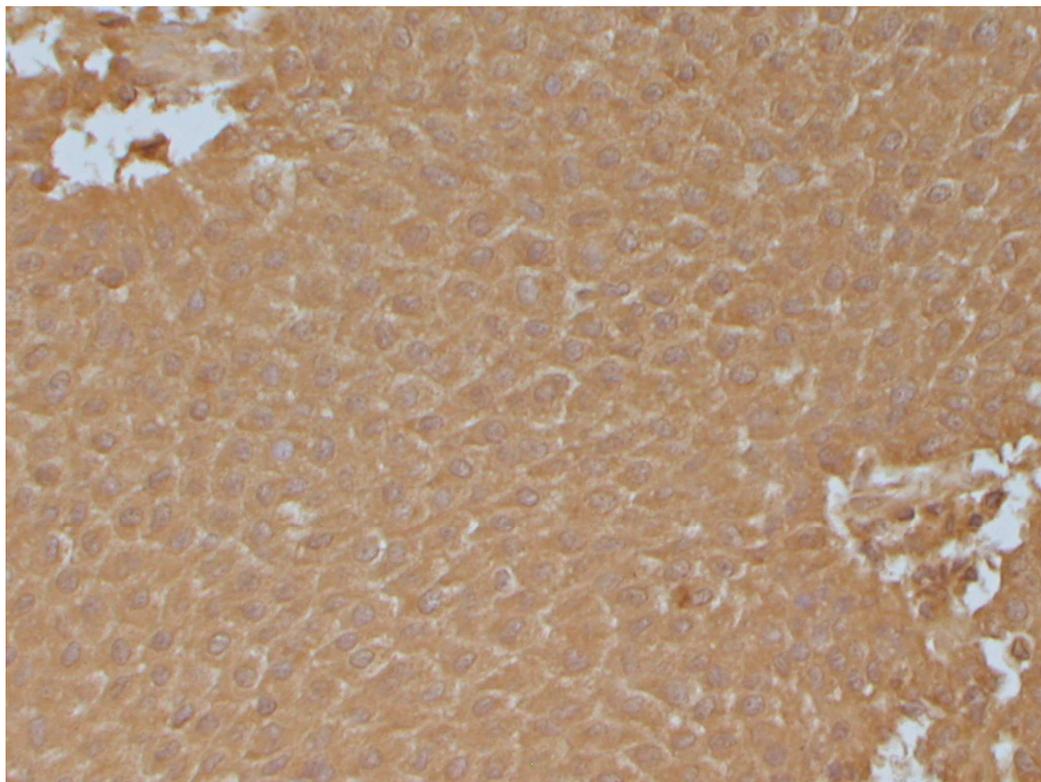
Todos los prolactinomas humanos estudiados fueron positivos a la aromatasa p450.

Las fotografías de la página siguiente demuestran esa positividad.

Aunque los patrones de reacción variaron de unos tumores a otros, por lo general casi la totalidad de las células del tumor eran positivas al enzima.

La imagen superior muestra un tumor sólido, bien organizado, en el que todas las células eran positivas al enzima y presentaban un patrón de reacción citoplásmica muy homogéneo, sin que existieran diferencias entre las células del tumor.

La imagen superior, pertenece también a un tumor sólido, en el que las células eran fuertemente positivas al enzima y en el que puede apreciarse que, además de en las células glandulares, también había positividad a la aromatasa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.



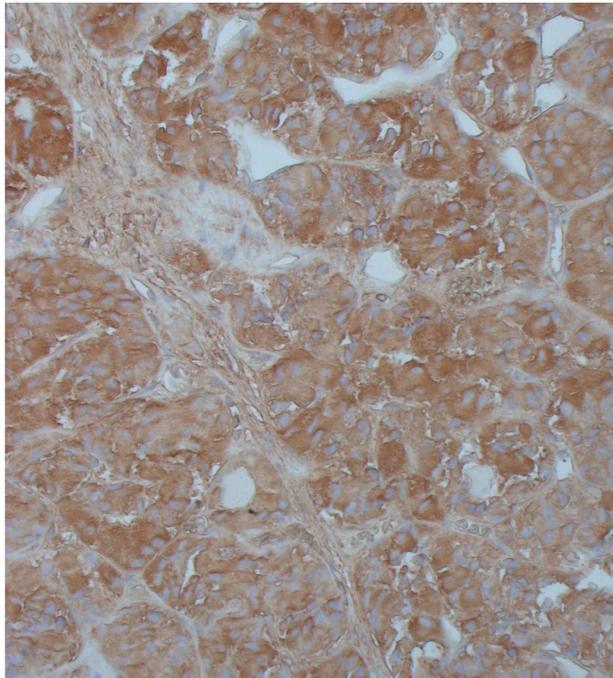
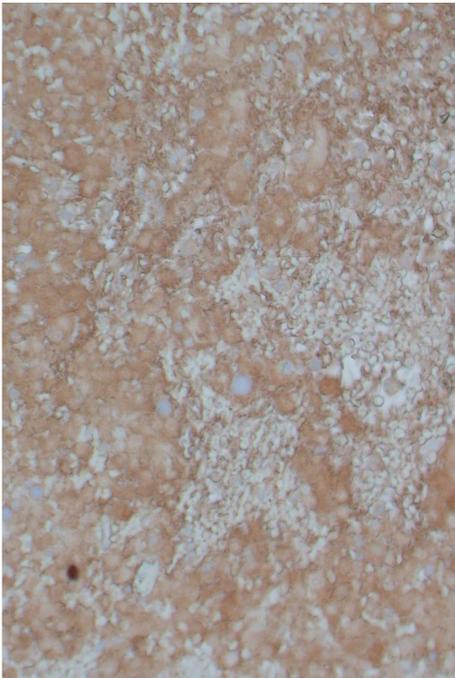
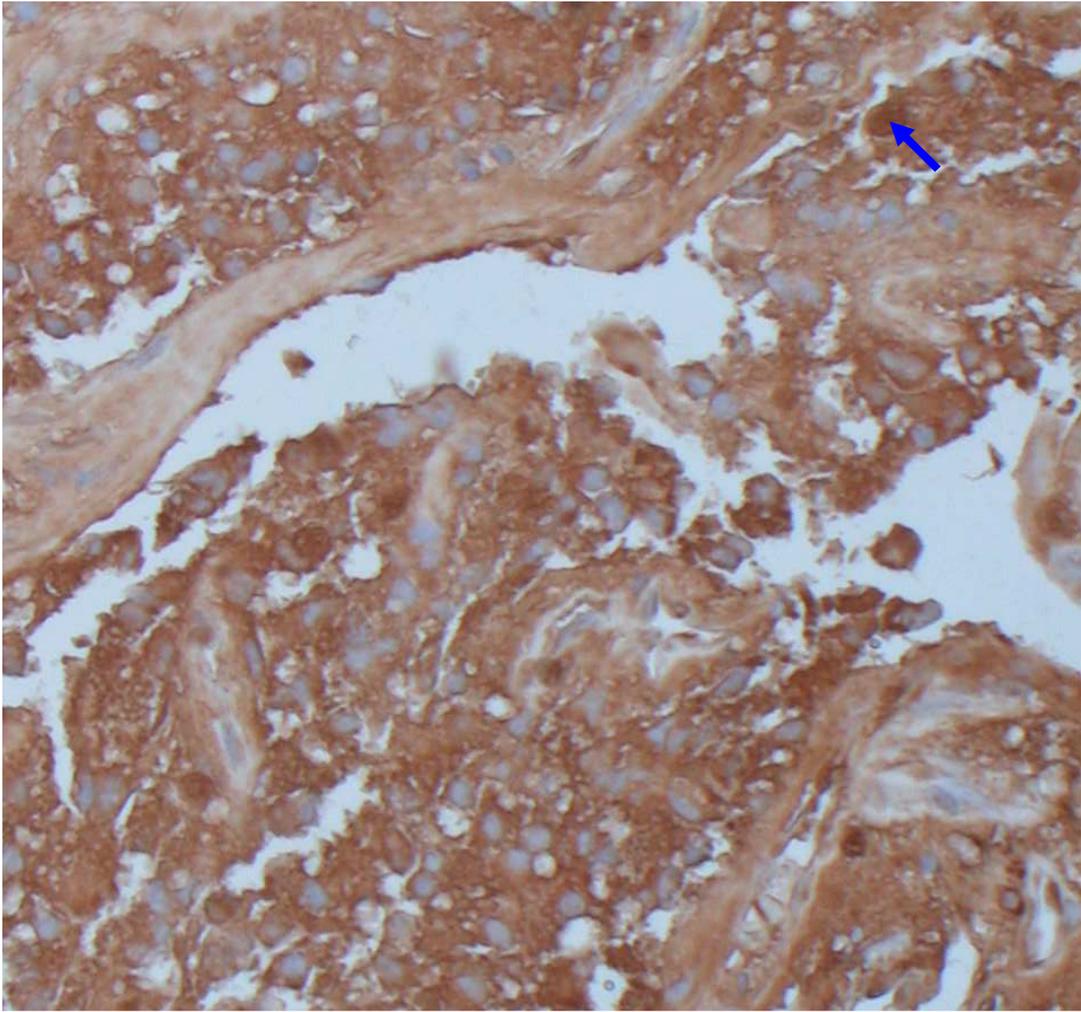
Positividad a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico en los prolactinomas humanos

De todos los prolactinomas, el 98% fueron positivos para la isoforma larga del receptor dopaminérgico D2. Solamente un prolactinoma de la serie estudiada no presentó positividad.

En la página siguiente se muestran tres prolactinomas después del estudio inmunocitoquímico de dicha isoforma.

Como puede apreciarse en las imágenes, todas las células glandulares del tumor eran positivas, de manera que la única diferencia observada fue la intensidad de reacción de unos tumores a otros, pero no el porcentaje de células afectado.

La reacción fue citoplásmica, a excepción de alguna célula aislada, en alguno de los tumores que también presentó reacción nuclear (flecha en la fotografía superior).



Discusión

Prolactinomas y Aromatasa.

La biosíntesis de estrógenos está catalizada por un enzima conocido como aromatasa P450 (Thomson y Siiteri, 1974a; Mendelson y col., 1985; Nakajin y col., 1986; Kellis y Vickery, 1987). La aromatasa P450 es el producto de la expresión del gen CYP19 (Nelson y col., 1993).

EL CYP 19 es un miembro de la superfamilia de genes P450, formada a su vez por más de 300 miembros repartidos en unas 36 familias de genes (Nelson y col., 1993).

Todos ellos dan lugar a enzimas, caracterizados por catalizar la inserción de átomos de oxígeno, derivados del oxígeno molecular, dentro de moléculas orgánicas para dar lugar a la formación de grupos hidroxilos.

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

En el caso de la aromatasa P450, el oxígeno molecular da lugar a la pérdida del grupo metilo angular C19 del substrato esteroideo para transformarlo en ácido fórmico a la vez que se produce la aromatización del anillo A para transformarlo en el anillo fenólico A, típico de los estrógenos (Thompson y Siiteri, 1974b).

Los diferentes transcritos de la aromatasa derivados del gen CYP19, derivan de la expresión de los 9 exones del gen, comenzando a partir del exón II; mientras que la región 5' de los transcritos es diferente dependiendo del tejido en el que se sintetiza la aromatasa, dependiendo del promotor que actúe; los promotores son diferentes de unos tejidos a otros y son regiones no trasladadas del exón I (Means y col., 1991; Kilgore y col., 1992; Toda y Shizuta, 1993).

La síntesis de aromatasa en la placenta está dirigida por un promotor distal muy potente el promotor I.1 (Means y col., 1991; Jenkins y col., 1993); en el ovario está dirigida por el promotor II; mientras que en el tejido adiposo lo está por el promotor I.4 (Meandro y col., 1991, 1993; Harada y col., 1993), y en el cerebro actúa el promotor 1f, de forma específica, al menos, en el hipotálamo y la amígdala (Honda y col., 1994).

Aunque los transcritos en los diferentes tejidos presentan un terminal 5' diferentes, al no ser trasladados, la proteína final resultante es siempre la misma, independientemente del lugar de producción.

Aunque, 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. No obstante, como ya hemos comentado antes, la proteína resultante de ambos transcritos es idéntica.

El exón I presenta un elemento de respuesta a glucocorticoides (también puede ser para los andrógenos), un lugar Sp1 de unión, un lugar de activación para interferón-g, el elemento GAS y un receptor soluble para interleucina-6.

La estimulación de las células por factores como IL-6, IL-11 y oncostatina-M, en presencia de glucocorticoides, da lugar a la fosforilación de residuos de tirosina en Jak1y a la fosforilación de STAT3 que se une al elemento GAS del promotor (Zhao y col., 1995).

La transcripción normal del gen da lugar a un transcrito de casi 3 Kb cuya secuencia en la especie humana es:

```

1      GCGGTGTCAGAAACCCTGTGGTGAATTCAGCCTGTGGATTCCAGAAATTTGGAGTGTT
61     TTGGGGGGAAAAATCCGCACACACAAGCAACATTTGGAAATCCCTGTGGACTCTAAAT
121    GCCCCTCTGAGGTCAAGGAACACAAGATGGTTTTGGAAATGCTGAACCCGATACATTAT
181    AACATCACCAGCATCGTGCCGCAAGCCATGCCTGCTGCCACCATGCCAGTCCTGCTCCT
241    ACTGGCCTTTTTCTCTTGGTGTGGAATTATGAGGGCACATCCTCAATACCAGGTCCTGGC
301    TACTGCATGGGAATTGACCCCTCATCTCCACGGCAGATTCTGTGGATGGGGATCGGC
361    AGTGCCTGCAACTACTACAACCGGTATATGGAGAATTCATGCGAGTCTGGATCTCTGGA
421    GAGGAAACACTCATTATCAGCAAGTCTCAAGTATGTCCACATAATGAAGCACAAATCAT
481    TACAGCTCTCGATTTCGGCAGCAAACCTGGGCTGCAGTGCATCGGTATGCATGAGAAAGGC
541    ATCATATTTAACAACAATCCAGAGCTCTGAAAACAACCTCGACCCTCTTTATGAAAGCT
601    CTGTCAGGCCCGGCCCTTGTTCGTATGGTACAGTCTGTGCTGAATCCCTCAAAACACAT
661    CTGGACAGGTTGGAGGAGGTGACCAATGAATCGGGCTATGTGGACGTGTTGACCCTTCTG
721    CGTCGTGTCATGCTGGACACCTTAACACGCTCTTCTTGAGGATCCCTTTGGACGAAAGT

```

781 GCTATCGTGGTTAAATCCAAGGTTATTTTGTATGCATGGCAAGCTCTCCTCATCAAACCA
 841 GACATCTTCTTAAAGATTTCTTGGCTATACAAAAGTATGAGAAAGTCTGTCAAGGATTTG
 901 AAAGATGCCATAGAAGTTCTGATAGCAGAAAAAGACGCAGGATTTCCACAGAAGAGAAA
 961 CTGGAAGAATGTATGACTTTGCCACTGAGTTGATTTTAGCAGAGAAAACGTGGTGACCTG
 1021 ACAAGAGAGAATGTGAACCAGTGCATATTGGAATGCTGATCGCAGCTCCTGACACCATG
 1081 TCTGTCTCTTGTCTTCTATGCTATTTCTCATTGCAAAGCACCTAATGTGAAGAGGCA
 1141 ATAATAAAGGAAATCCAGACTGTTATTGGTGAGAGAGACATAAAGATTGATGATATACAA
 1201 AAATTAAGTGTATGGAACCTTCATTTATGAGAGCATGCGGTACCAGCCTGTCGTGGAC
 1261 TTGGTCATGCGCAAAGCCTTAGAAGATGATGTAATCGATGGCTACCCAGTGAAGAGGGG
 1321 ACAAACATTATCCTGAATATTGGAAGGATGCACAGACTCGAGTTTTTCCCAAACCCAAAT
 1381 GAATTTACTCTGAAAATTTTGCAAAGAATGTTCCCTATAGGTACTTTCAGCCATTTGGC
 1441 TTTGGGCCCCCGTGGCTGTGCAGGAAAGTACATCGCCATGGTGATGATGAAAGCCATCCTC
 1501 GTTACACTTCTGAGACGATTCCACGTGAAGACATTGCAAGGACAGTGTGTTGAGAGCATA
 1561 CAGAAGATACACGACTTGTCTTGCACCCAGATGAGACTAAAAACATGCTGGAATGATC
 1621 TTTACCCCAAGAACTCAGACAGGTGTCTGGAACACTAGAGAAGGCTGGTCAGTACCCAC
 1681 TCTGGAGCATTCTCATCAGTAGTTCACATACAAATCATCCATCCTTGCCAAATAGTGTCA
 1741 TCCTCACAGTGAACACTCAGTGGCCATGGCATTATAGGCATACCTCCTATGGGTTGT
 1801 CACCAAGTAGGTGCTATTTGTCATCTGCTCCTGTTACACACCAGAGAACCAGGCTACAA
 1861 AGAAAAAGCAGAGGCCAAGAGTTGAGGGAGAAATAGTCGGTGAAGAAAACCGTATCCATA
 1921 AAGACCCGATTCCACCAAATGTGCTTTGAGAAGGATAGGCCTTCATTAACAAAATGTATG
 1981 TCTGGTTCCCCAGTAGAGCTCTACTGCCTCAACCCAAAGGGGATTTTTATGTCTGGGGCAG
 2041 AAACACTCAAGTTGATTAGAAAGACCAGGCCAATGTACAGGTACCTGGGGCCAAACCCAC
 2101 CTGCTAGTGTGAATTAAGTACTTTAATTTGTTTTCTGTGGAGGTGGAAGCAACATT
 2161 CATAGTCTTTGAGAAATGCTTAGAAATCAGCATTGACCCCTGCTGTGAATTAAGCCC
 2221 AATTAATCCTGTTTGTCTACATATGATCTGTCTGTGGCAAAAGTTAATCAGAGGAAAT
 2281 TCTTTCCAGTCTGTGATTTATGCCTCAGCCACTGCCTGTGCTACAATTCATTGTGTT
 2341 ACCTGTAGATTACAGTAATACAACTATATATAATCATCAAGTAATACAACTAATTTAG
 2401 TAATAGCCTGGGTTAAGTATTATTAGGGCCCTGTGTCTGCTGTAGAAAAAAAATTCACA
 2461 TGATGCACTTCAAATCAAATAAAATCCTTTTGGCATGTTCCCATTTTGTCTAGCTCA
 2521 ATTAGTGTGGCTAACCAAGAGATAACTGTAAATGTGACATTGATTTGCTCTTACTACAGC
 2581 TTCAGTATTGGGGGAGGAAAGTCCCAACCCCAATGGGCTCAAACCTTCTAAGGGGTACTC
 2641 CTCTCATCCCCCTATCCTTCTCCCTCGACATTTTCTCCCTTTTCTCCCATGACCCCAA
 2701 AGCCAAGGGCAACAGATCAGTAAAGACGTGGTCAGAGTAGAACCCCTGAAGTATTTTTT
 2761 AATCCTACCTCAAATTTAACAGTTACCTGAGAGATTTAACATTATCTAGTTCATTGAAT
 2821 CATTGTATGTGGTCATGGATAAATTCACACCTTGAATTCGCTTTCTAAAGGAAATCAA
 2881 ATGAATGGAGGAACTTTCCAAACACCCTTACTTGTGTTATATAGCCAAATATAACTATC
 2941 TCTACTGAATGTCATTGAAAACTAAAAATTAACCTTATTTACAAATAGGT

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 mvlemInpih ynitsivpea mpaatmpvll ltlflflwn yegtssipgp gycmgigpli
 61 shgrflwmgi gsacnynrv yefmrvwis geetliiks ssmfhimkhn hyssrfgskl
 121 glqicgmhek giifnnpel wktrpffmk alsppglvrm vtvcaeslkt hldrleevtn
 181 esgyvdvltl lrrvldtsn tflriplde saivvkiqgy fdawqallik pdiffkislw
 241 ykkyeksvkd lkdaievlia ekrrristee kleecmdfat elilaekrgd ltrenvnqci
 301 lemliapdt msvslffmlf liakhpvnee aiikeiqvti gerdikiddi qklkvmenfi
 361 yesmryqpqv dlvmrkaled dvidgypvkk gtniilnigr mhrleffpkp neftlenfak
 421 nvpyryfqp fggprgcagk yiamvmmkai lvtllrrfhv ktlqgcves iqkhdslsh
 481 pdetknmlem iftprnsdrc 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”.

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 y la relevancia que la producción local de estradiol pudiera tener para el desarrollo de los prolactinomas espontáneos.

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 inmunoreactivos a la aromatasa, sin que ello guardara relación con el tipo anatómopatológico 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.

Nuestro trabajo corrobora resultados anteriores demostrando la presencia de la aromatasa en los prolactinomas espontáneos humanos y murinos.

Por lo que la Aromatasa P450, metabolizando la Testosterona a Estradiol, estaría implicada en la génesis y desarrollo de los prolactinomas.

Prolactinomas y Receptor dopaminérgico D2L.

La dopamina es el neurotransmisor hipotalámico de mayor relevancia en la inhibición de la secreción de prolactina desde las células hipofisarias. Este efecto inhibitor lo realiza a través de su unión a receptores dopaminérgicos tipo D2 (Picetti y col., 1997; Missale y col., 1998).

El subtipo de receptor dopaminérgico D2 pertenece a una familia de receptores acoplados a dominios transmembrana de proteínas G.

El estudio de ratones knock-out para este tipo de receptores permitió comprobar la presencia de un aumento en la expresión de prolactina y un desarrollo anormal de la hipófisis (Baik y col., 1995; Kelly y col., 1997).

Habiéndose comprobado que los efectos antiproliferativos y apoptóticos de los agonistas dopaminérgicos sobre líneas celulares tumorales hipofisarias son desarrollados a través de los receptores D2 (Ji y col., 2003).

Existen dos isoformas del receptor dopaminérgico D2 (Bunzow y col., 1988; Giros y col., 1989; Dal Toso y col., 1989), codificadas por el mismo gen, que se generan por la transcripción alternativa del exón 6 de dicho gen. Una isoforma larga D2L, de 444 aminoácidos, y otra corta D2S, de 415 aminoácidos; de las dos, la más abundante es la D2L (Montmayeur y col., 1991).

Ambas isoformas muestran características farmacológicas semejantes y se expresan en el mismo tipo de células, aunque, como ya hemos comentado, la cantidad de la forma D2L suele ser mayor que la de la D2S.

Las diferencias entre ambas isoformas se localizan en la longitud de la tercera asa intracelular, que presenta 29 aminoácidos más en la forma D2L que en la forma D2S del receptor.

Dicho asa se localiza en el citoplasma celular y está relacionada con el acoplamiento a proteínas G (Guivarc'h y col., 1998), provocando una disminución de los contenidos intracelulares de cAMP (Montmayeur y Borrelli, 1991; Montmayeur y col., 1993).

Las dos isoformas podrían actuar con proteínas G diferentes, particularmente sobre la proteína tipo G_i iniciando diferentes rutas de señal intracelular (Guiramand y col., 1995; Choi y col., 1999; Usiello y col., 2000).

La activación de receptores ligados a proteínas G provoca la disociación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, que se unen a diferentes efectores celulares.

En las células de prolactina, la activación del receptor D2 da lugar a la inhibición de los aumentos del cAMP inducidos por VIP a través de proteínas Gi (Senogles, 1994; Liu y col., 1994, 1999). Abre los canales de potasio, a través de la proteína Gi3, a la vez que cierra los canales de calcio, a través de la proteína Go (Lledoy col., 1992; Aertschi y col., 1992; Liu y col., 1994, 1999).

La activación de la isoforma D2S abre los canales de potasio, bloquea los canales de calcio, inhibe la producción de cAMP e inhibe la activación de las MAPK (Albert y col., 1990; Vallar y col., 1990; Elsholtz y col., 1991; Liu y col., 1994, 1999; Senogles, 1994; Ohmichi y col., 1994; Chuprun y col., 1997).

Se ha comprobado que los efectos inhibidores de la secreción estimulada de prolactina mediante la activación de los canales de calcio, desarrollada por la dopamina sobre el receptor D2S, es más dependiente de Go que de Gi; mientras que la ejercida sobre la secreción estimulada por TRH depende de Gi3.

La inhibición mediada a través de la isoforma D2L requiere a la proteína Go, pero no a la proteína Gi2. Los efectos inhibidores sobre la síntesis de DNA se desarrollan a través de las proteínas Gi/Go para la isoforma D2S y, a través de la proteína Gi2 para la isoforma D2L (Albert, 2002).

En las células de prolactina, se producen ambas isoformas en cantidades semejantes (Oomizu y col., 2003).

Por lo tanto, la cantidad total de mRNA o de proteína no se modifica, sino que los cambios acontecen en las cantidades relativas de cada isoforma (Givarc'h y col., 1998).

En nuestro estudio, hemos demostrado que la isoforma D2L del receptor dopaminérgico estaba presente en la casi totalidad de los tumores, de forma que sólo un prolactinoma de nuestra serie no presentó el receptor; y que dicho receptor se localizaba preferentemente en el citoplasma de las células glandulares del prolactinoma. Lo que confirma plenamente que las células glandulares del prolactinoma presentan es-

ta isoforma y que existe el lugar de unión para la dopamina y sus agonistas.

Los estrógenos afectan a la cantidad de proteínas G, de manera que disminuyen la expresión de $G_{i\alpha 3}/G_{\alpha o}$ (Livingstone y col., 1998), lo que podría guardar relación con la inhibición estrogénica de la inhibición dopaminérgica.

Ya hemos comentado con anterioridad en este capítulo la relevancia de que todos los prolactinomas sean tumores positivos a la aromatasa p450, lo que sugiere que la aromatización local de la testosterona a estradiol pueda estar implicada como un fenómeno paracrino que favorezca el desarrollo del tumor. Esto supone que en las células glandulares de los prolactinomas existe un gradiente elevado de estrógenos que podría disminuir la expresión de las proteínas G antes mencionadas.

Bajo el efecto activador estrogénico, la isoforma D2L aumenta considerablemente desapareciendo prácticamente la forma D2S (Oomizu y col., 2003).

Además, en adenomas hipofisarios no funcionantes, en la especie humana, se ha demostrado que la presencia de la isoforma D2S es más eficaz en la respuesta a cabergolina que la presencia de la isoforma D2L (Pivonello y col., 2004), lo que sugiere que éste podría ser otro mecanismo a través del cual los estrógenos podrían bloquear la inhibición dopaminérgica del desarrollo de los prolactinomas.

La alta densidad de células positivas a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico detectada en nuestro estudio, quizás provocada por un aumento en los niveles locales de estradiol por actuación de la aromatasa p450 podría justificar el claro desarrollo de estos tumores. Esta idea se deduce del hecho demostrado en nuestro estudio de la coexistencia de aromatasa y la isoforma D2L del receptor en la casi totalidad de las células glandulares de los prolactinomas. Nuestros resultados sugieren que un aumento en los niveles locales de estradiol por actuación de la aromatasa provocan un predominio de la isoforma D2L que respondería con menor afinidad a la acción inhibidora de la dopamina,

de forma que el bloqueo de la inhibición dopaminérgica se sumaría a la acción estimulantes estrogénica para el desarrollo de los prolactinomas.

Si ello fuera así, el papel de la aromatasa p450 sería preponderante sobre el papel del fallo dopaminérgico ya que éste dependería del primero.

En los prolactinomas, el factor de crecimiento nervioso regula la expresión del receptor D2 a través de la activación del factor nuclear κB mediada por p75^{NGFR} (Fiorentini y col., 2002).

Aunque, la cabergolina se muestra como un fármaco eficaz y bien tolerado para el tratamiento de la hiperprolactinemia y los síntomas asociados a los prolactinomas humanos (Bolko y col., 2003), no está bien comprobado que ello suponga la desaparición del tumor (Coalo y col., 2003).

In vitro, se ha comprobado que los cambios en la isoforma del receptor D2 con predominancia de la isoforma D2L inducida por etanol, disminuye sensiblemente la capacidad de los agonistas dopaminérgicos, como bromocriptina, para desarrollar su acción inhibitoria sobre prolactina (Oomizu y col., 2003).

Empleando ratones transgénicos se ha descrito que la isoforma D2S está más implicada en la regulación de la síntesis de prolactina y del número de células de prolactina; mientras que la isoforma D2L lo estaría en el control de la regulación de la liberación hormonal.

El hecho de que persista en tan alta cantidad la inmunorreactividad a la isoforma D2L del receptor dopaminérgico como hemos podido observar en nuestro estudio y que la capacidad de los agonistas dopaminérgicos y de la propia dopamina disminuya de forma importante en relación con esta isoforma a la hora de inhibir la prolactina podría indicar que una preponderancia de la isoforma D2L sobre la D2S pueda favorecer la actuación de otros factores para el desarrollo de los prolactino-

mas, por desarrollar un menor control sobre la citología lactotropa de la hipófisis.

Los ratones knock-out para receptor D2 desarrollan prolactinomas; sin embargo, estos adenomas se desarrollan tardíamente: entre 14 y 18 meses en las hembras y entre 18 y 21 meses en los machos (Asa y col., 1999), lo que sugiere que otros factores podrían estar implicados en la génesis del tumor.

Nuestros resultados en ratones ko para el receptor D2 demuestran resultados parecidos a los observados por el grupo de Asa, aunque el porcentaje de prolactinomas es mayor en estos animales que en los wild type. Entre los otros posibles factores implicados, indudablemente, parecen estar los estrógenos producidos localmente en la hipófisis, ya que los animales ko para aromatasa nunca desarrollaron prolactinomas. Este hallazgo sugiere que la producción local de estradiol parece ser más relevante en el desarrollo del adenoma que el fallo en la inhibición dopaminérgica.

Algunos autores sugieren la existencia de una dependencia gonadal, al menos en las hembras, ya que los estrógenos, dependiendo de la cepa animal, podrían ser alguno de los factores implicados (Hentges y Low, 2002). El tratamiento con estrógenos a ratones “wild type” induce un aumento de la isoforma D2S (Iacarino y col., 2002).

Nuestros resultados y otros desarrollados en nuestro laboratorio, ponen en evidencia que en los prolactinomas espontáneos siempre hay aromatasa y receptor estrogénico α y que la inmunorreactividad en los tumores a ambos se correlaciona bien con un aumento del coactivador de receptor estrogénico AIB-1 (Hernández, 2009), un alto grado de proliferación detectado con el marcaje a PCNA y un escaso índice apoptótico determinado con el marcaje a caspasa 3 activa (Larrínaga, 2009). Todo ello analizado en su conjunto sugiere que la aromatización de andrógenos a estrógenos está implicada en el desarrollo de los prolactinomas. Este efecto local se acompaña, como se observa en nuestro es-

tudio de un importante marcaje para la isoforma D2L. Estos resultados si se contrastan con los del grupo de Iacarina, sugieren que existe una respuesta anómala en la hipófisis ante el aumento de estradiol localmente y en vez de inducirse la formación de la isoforma D2S, que inhibiría la proliferación celular, se induce la formación de la isoforma D2L.

La resistencia en los prolactinomas, definida como el fallo en la normalización de los niveles séricos de prolactina y la reducción del tamaño del tumor a menos del 50% de su tamaño es variable dependiendo del agonista dopaminérgico empleado, oscilando su frecuencia de aparición entre el 10 y el 24% de los tumores. Este hecho se ha asociado a un descenso en el número de receptores D2 (Pellegrini y col., 1989), pero no en su afinidad o capacidad de actuación (Caccavelli y col., 1994), asociado a un descenso en la expresión de la proteína $G\alpha$ (Caccavelli y col., 1994).

Nuestro estudio parece sugerir que efectivamente, considerado de forma global, el receptor dopaminérgico no desaparece en los prolactinomas espontáneos. Por otro lado, el descenso de la proteína $G\alpha$ podría guardar relación con un exceso de producción local de estrógenos catalizado a través de la aromatasa p450.

Conclusiones

Tras desarrollar el diseño experimental previamente diseñado y analizar inmunocitoquímicamente los adenomas hipofisarios en ratas viejas, en ratones knock out para aromatasa y receptor dopaminérgico D2, y en hipófisis humanas, comparando nuestros resultados obtenidos con los datos existentes en la literatura, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. En primer lugar, creemos haber alcanzado el objetivo de iniciación en las tareas investigadoras, que nos habíamos propuesto como paso inicial para el desarrollo del trabajo de Tesis Doctoral.
2. La aromatasa P450 parece directamente implicada en la génesis de los prolactinomas murinos y humanos, como sugieren nuestros resultados, ya que todos los prolactinomas estudiados humanos o de rata fueron positivos al enzima y los ratones knock out para el enzima nunca desarrollaron prolactinomas.
3. La participación de la inhibición dopaminérgica en impedir la génesis de los prolactinomas es evidente, como se deriva de los resultados obtenidos en ratones knock out para el receptor D2 estudiados en esta Tesis Doctoral. Estos resultados confirman los hallazgos descritos por otros autores previamente.
4. En los prolactinomas espontáneos obtenidos en ratas y en humanos la isoforma D2L del receptor dopaminérgico D2 está hiperexpresada y coexiste en las células hipofisarias con la localización de las células de prolactina y de aromatasa. Lo que sugiere que la

posible aromatización de la testosterona a estradiol no impide la expresión del receptor dopaminérgico D2L.

5. Estos resultados sugieren que la presencia de esta isoforma del receptor podría estar implicada en un descenso del control inhibitor dopaminérgico del número de células hipofisarias productoras de prolactina, que podría ser desarrollada a través de la isoforma D2S del mismo receptor.
6. Analizados conjuntamente, de nuestros resultados parece deducirse que es más importante la producción local de estradiol dependiente de la actuación de la aromatasa P450 que un déficit en la inhibición dopaminérgica, para el desarrollo de los prolactinomas en rata, ratón y humanos.

Sonia Gutiérrez

Bibliografía

- Abd El-Hamid MV; 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. Amenorréa y galactorréa. *Bol Soc Obst Y Ginec* 1932;11:64-67.
- Akihiro Ito, Kengo Kawashima, Nariaki Fujimoto, Hiromitsu Watanabe, and Masashi Naito. Inhibition by 2-Bromo- α -ergocriptine and tamoxifen of the Growth of an Estrogen-dependent Transplantable Pituitary Tumor (MtT/F84) in F344 rats. *Cancer Res.* 1985. 45:6436-6441.
- Albert PR, Neve KA, Bunzow JR, Civelli O. Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J Biol Chem.* 1990;265:2098-2104.
- Asa S. The pathology of pituitary adenomas. *Endocrinol Metab clin N Amer* 1999;28:13-43.
- Asa S.L. ,The role of hypothalamic Hormones in the pathogenesis of Pituitary Adenomas, *Path. Res. Pract.* 1991, 187;581-583.
- Asa S.L., Kelly M. A., Grandy M.A., Low M.J. Pituitary Lactotroph adenomas Develop after Prolonged Lactotroph Hyperplasia in Dopamine D2 Receptor-Deficient Mice. *Endocrinology* ,1999, 140:5348-5355.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, LeMeur M, Borrelli E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptor. *Nature* 1995 337, 424-428.
- 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 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.
- Barkan A, Chandler W.F. Giant pituitary prolactinoma with falsely low serum prolactin: the pitfall of the "high-dose hook effect": case report. *Neurosurgery* 1998;9;13-15.

- Bartke A, Doherty PC, Steger RW, Morgan WW, Amador AG, Herbert DC, Siler-Khodr TM, Smith MS, Klemcke HG, Hymer WC. Effects of estrogen-induced hyperprolactinemia on endocrine and sexual functions in adult male rats. *Neuroendocrinology* 1984;39: 126-135.
- Bevan JS, Burke CW; Esiri MM, Adams CBT. Misinterpretation of prolactin levels leading to management errors in patients with sellar enlargement. *Am J Med* 1987; 82:29-32.
- Bolko P, Jaskula M, Wasko R, Wolun M, Sowinski J. The assessment of cabergoline efficacy and tolerability in patient with pituitary prolactinoma type. *Pol Ach Md Wewn.* 2003;109:489-495.
- Bression D, Brandi AM, Martres MP, Nousbaum 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.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O. . Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor. *Nature.* 1988;336:783-787.
- Burrow GN, Wonzman G, Rewcasde NB, Holgate RC, Kovacs K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. *N Engl J Med* 1981; 304:156-158.
- Caccavelli L, Feron 1; 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.
- Carretero J, Vázquez RJ, Rubio M, Santos M, Vázquez G, Sánchez F, Martín-Clavijo A y 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.
- Carretero J, Blanco E, Vázquez G, Rubio M, Santos M, Pérez RM y Vázquez R. Immunohistochemical evidence for the expression of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Cell Tissue Res* 1999; 295:419-423.

- Carretero J, Vázquez, A Martín-Clavijo, M Rubio, E Hernández, JA Moro, A Gato, E Barbosa y R Vázquez. In vivo studies on cytodifferentiation of pituitary aromatase-immunoreactive cells. *Eur J Anat*, 3, 1999: 79-85.
- 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*, 5, 2002: 5-10.
- 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*, 18, 2003: 419-423.
- Carretero J, Hernández R, Tapia M, Prieto D, Carretero M, Guitérrez S, González R, Basco M, González L, Herrero JJ, Rubio M, Blanco E, Vázquez R. Immunocytochemical evidence for the coexistence of aromatase P450 and estrogen receptors in the pituitary gland of the adult male rat. *Eur J Anat* 2009; 13: 1-6.
- Casanueva F, Cocchi D, Locatelli V, Flauto C, Zambotti F, Bestetti G, Rossi GL, Müller E. Defective central nervous system dopaminergic function in rats with estrogen-induced pituitary tumors, as assessed by plasma prolactin concentrations. *Endocrinology* 1982; 110: 590-599.
- Choi EY, Jeong D, Park KW, Baik JH. G protein mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1999. 256, 33-40.
- Chuprun JK, Raymond JR, Blackshear PJ. The heterotrimeric G protein G α i2 mediates lysophosphatidic acid-stimulated induction of the c-fos gene in mouse fibroblasts. *J Biol Chem*. 1997;272:773-781.
- Clifton KH, Furth J. Changes in hormone sensitivity of pituitary mammatropes 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.
- Colao A, Di Sarno A, Cappbianca P, Di Somma C, Pivonello R, Lombardi G. Withdrawal of long-term cabergoline therapy for tumoral and nontumoral hyperprolactinemia. *N Engl J Med* 2003;349:2023-2033.

- Cramer CM, Parker CR, Porter JC. Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 1979;104:419-422.
- Cunningham GR, Huckins C. An FSH and prolactin-secreting pituitary tumor: pituitary dynamics and testicular histology. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;44:248-253.
- DelGrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire J.. Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2102-2107.
- Demarest KT, Riegler GD, Moore KE. Long-term treatment with estradiol induces reversible alterations in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: a decreased responsiveness to prolactin. *Neuroendocrinology* 1984;39:193-200.
- Dingemans KP, Assies J, Jansen N, Diegenbach PC. Sparsely granulated prolactinomas of the pituitary gland. *Virchows Arch Pathol Anat* 1982; 396:167-186.
- Domingue JN, Richmond IL, Wilson CB. Results of surgery in 114 patients with prolactin-secreting pituitary adenomas. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:102-108.
- Duella TM, Halmi NS. Pituitary adenoma producing thyrotropin and prolactin. *Virchows Arch Path Anat HistoI* 1977;376:255-265.
- Dunning WE, Curtis MR, Segalof A. Strain differences in response to diethylstilbestrol and the induction of mammary gland and bladder cancer in the rats. *Cancer Res* 1947;7:511-521.
- El-Azouzi M, Hsu DW, Black PM, Jolesz F, Hedley-Whyte ET, Klibanski A, Zeervas NT. The importance of dopamine in the pathogenesis of experimental prolactinomas. *J Neurosurg*. 1990;72:273-281.
- Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC. Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *J Biol Chem*. 1991;266:22919-22925
- Erroi A, Bassetti M, Spada A, Giannattasio G. Microvasculature of human micro- and macroprolactinomas. *Neuroendocrinology* 1986;43:159-165.

- 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.
- Forbes AP, Henneman PH, Griswold GC, Albright F., Syndrome characterized by galactorrhea amenorrhea and low urinary FSH: comparison with acromegaly and normal lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 1954;14:265-271.
- Friesen H, Webster BR, Hwang P, Guyda H, Munro RE, Read L.. Prolactin synthesis and secretion in a patient with the Forbes-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34:192-199.
- 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.
- Gorczyca W, Hardy J. Arterial supply of the human anterior pituitary gland. *Neurosurgery* 1987;20:369-376.
- Guay AT, Freeman R, Rish BL, Sperber E, Woolf PD. Calcified pituitary tumor with hyperprolactinemia: selective removal by transsphenoidal adenectomy. *Fertil Steril* 1978;29:585-588.
- Guiramand J, Harris AG, Kvistborg A, Kjartansson O, Hanssen E, Smith O, Djosland O, Hass G, Jervell J. A randomized study of SMS 201-995 vs. bromocriptine treatment in acromegaly: clinical and biochemical effects. *J. Biol. Chem.* 1995. 270, 7354-7358.
- Guivarc'h D, Vincent JD, Vernier P. Alternative splicing of the D2 dopamine receptor messenger ribonucleic acid is modulated by activated sex steroid receptor in the MMQ prolactin cell line. *Endocrinology*. 1998;139:4213-42121.
- Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 11312-11316.
- 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, Kowatch MA, Kowarski AA. Advantage of Florisil over charcoal separation in a mechanized testosterone radioimmunoassay. *Clin Chem*. 1980;26:1613-1616.
- Hentges ST, Low MJ. Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice. *Endocrinology*. 2002;143:4536-4543
- Hernández, R. Regulación paracrina de las células gonadotropas hipofisarias por estradiol. Efectos de la aromatasa p450, 2007. Tesis doctoral Universidad de Salamanca.
- 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.
- Honda S, Harada N, Takagi Y. Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198:1153-1160.
- Horvath E, Kovacs K. Misplaced exocytosis. Distinct ultrastructural feature in some pituitary adenomas. *Arch Pathol* 1974;97:221-224.
- Horvath E, Kovacs K. The adenohipophysis. In: Kovacs K, Asa SL, eds. *Functional Endocrine Pathology*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1991:245-281.
- Hurel SJ, Harris PE, McNicol AM, Foster S, Kelly WF, Baylis PH. Metastatic prolactinoma: effect of octreotide, cabergoline, carboplatin and etoposide; immunocytochemical analysis of proto-oncogene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;2962-2965.
- Iaccarino C, Samad TA, Mathis C, Kercret H, Picetti R, Borrelli E. Control of lactotroph proliferation by dopamine: essential role of signaling through D2 receptors and ERKs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 99:14530-14535.

- Jaquet P, Hassoun J, Ddori P, Gunz G, Grisoli F, Weintraub BD. A human pituitary adenoma secreting thyrotropin and prolactin: immunohistochemical, biochemical, and culture studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:817-824.
- 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.
- Ji WJ, Yang L, Ding JS, Wang ZL, Liu C, He HZ. Immunohistochemical method for the detecting expression of transforming growth factor-beta1 in lung tissues of silica-treated mice. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2003; 21:182-184.
- Kalyanaraman UP, Halmi NS, Elwood PW. Prolactin-secreting pituitary oncocyoma with galactorrhea-amenorrhea syndrome. *Cancer* 1980;46:1584-1589.
- Kameya T, Tsumuraya M, Adachi I, Abe K, Ichikizaki K, Toya S, Demura R. Ultrastructure, immunohistochemistry and hormone release of pituitary adenomas in relation to prolactin production. *Virchows Arch A Path Anat Histol* 1980;387:31-46.
- Kellis JT Jr, Vickery LE. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem*. 1987; 262:4413-4420.
- Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*. 1997;19:103-113.
- Kilgore MW, Means GD, Mendelson CR, Simpson ER. Alternative promotion of aromatase P-450 expression in the human placenta. *Mol Cell Endocrinol*. 1992;83:R9-16.
- Kleinberg DL, Frantz AG. Human prolactin: measurement in plasma by in vitro bioassay. *J Clin Invest* 1971;50:1557-1568.
- Klijn JGM, Lamberts SWJ, De Jong FH, Docter R, Van Dongen KJ, Birkenhager JC. The importance of pituitary tumour size in patients with hyperprolactinaemia in

- relation to hormonal variables and extrasellar extension of tumor. *Clin Endocrinol* 1980;12:341-355.
- Koppelman MCS, Jaffe MJ, Rieth KG, Caruso RC, Loriaux DL. Hyperprolactinemia, amenorrhea, and galactorrhea. *Ann Intern Med* 1984;100:115-121.
- Kovacs K, Ryan N, Horvaht E, Singer W., Ezrin C. . Pituitaryadenomas in old age. *J Gerontol* 1980;35:16-22.
- Kovacs K, Stefaneanu L, Horvath E, Lloyd RV, Lancranjan 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.
- Krestin D. Spontaneous lactation associated with enlargement of the pituitary. *Lancet* 1932;1:928-930.
- Kruse A, Astrup J, Gyldensted C, Cold GE. Hyperprolactinaemia in patients with pituitary adenomas. The pituitary stalk compression syndrome. *Brit J Neurosurg* 1995;9:453-457.
- Kubota T, Kuroda E, Yamashisna T, Tachibana O, Kabuto M, Yamamoto S. Amyloid formation in prol. ctinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:72-75.
- Kuratsu JI, Matsukado Y, Miura M. Prolactinoma of pituitary with associated amyloid-like sustances. *J Neurosurg* 1983;59:1067-1070.
- Landolt AM, Shibata T, Kleihues P. Growth rate of human pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1987;67:803-806.
- Larrínaga JM. Expresión de la aromatasa p450 en los prolactinomas y su relación con la proliferación celular y apoptosis. 2009. Tesis Doctoral Universidad de Salamanca.
- Liu YF, Jakobs KH, Rasenick MM, Albert PR. G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G₀ and G_{i2} in GH4C1 pituitary cells. *J Biol Chem.* 1994; 269:13880-13886.

- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS. Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:2086-2090.
- Livingstone JD, Lerant A, Freeman ME. Ovarian steroids modulate responsiveness to dopamine and expression G-proteins in lactotropes. *Neuroendocrinology.* 1998; 68: 172-179.
- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent JD. Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron.* 1992. 8:455-463.
- Lloyd RV, Gikas PW; Chandler WE. Prolactin and growth hormone-producing pituitary adenomas. *Am J Surg Pathol* 1983;7:251-260.
- March CM, Klerzky OA, Davajan V, Teal J, Weiss M, Apuzzo ML, Marrs RP, Mishell DR Jr. . Longitudinal evaluation of patients with untreated prolactin-secreting pituitary adenomas. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139:835-844.
- 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.
- Martin TL, Kim M, Malarkey WB. The natural history of idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:855-858.
- Martinez AJ, Lee A, Moossy J, Mamon JC. Pituitary adenomas: clinicopathological and immunohistochemical study. *Ann Neuro* 1980; 7:24-36.
- Martinez D, Barthe D. Heterogeneous pituitary adenomas. *Virchows Arch Path Anat* 1982;394:221-233.
- McComb D.J., Hellmann P., Thorner M.O., Scott D., Evans W.S., Kovacs ., Morphologic Effects of Bromocriptine on Spontaneously Occurring Pituitary Prolactin-Cell Hyperplasia in Old Long-Evans Rats. *Amer.J.Path*,1986;122:7-16.
- McComb DJ, Kovacs K., Beri J., et al. Pituitary adenomas in old Sprague-Dawley rats: a histologic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *J Natl Cancer Inst.*, 1984; 73: 1143-66.

- McEuen CS, Selye H, Collip]B. Some effects of prolonged administration of oestrin in rats. *Lancet* 1936;1:775-776.
- Means GD, Kilgore MW, Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol Endocrinol.* 1991;5:2005-2013.
- Meites J. Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging. *Neuroendocrinology* 1982;34:151-156.
- Meites J., Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging, *Neuroendocrinology*, 1982; 34:151-156.
- Mendel EB. Chiari-Fromrnell syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1946; 51:889-892.
- 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.
- Molitch M.E., Russell E.J., The Pituitary "incidentaloma". *Ann Intern Med.*, 1990;112:925-931.
- Molitch ME, Reichlin S. Hypothalamic hyperprolactinemia: neuroendocrine regulation of prolactin secretion in patients with lesion of the hypothalamus and pituitary stalk. In: Macleod RM, Thomer MO, Scapagnini U, eds. *Prolactin. Basic and clinical correlates. Proceedings of the IVth International Congress on prolactin.* Padova, Italy: Liviana Press, 1985:709-719.
- Molitch ME. Hyperprolactinemia. *Medical Grand Rounds* 1982;1:307-319.
- Molitch ME. Prolactin. En: *The pituitary.* 2002. Melmed S. 2^a ed. Blackwell Pub, Malden Mass. pp: 119-171.
- Montmayeur JP, Bausero P, Amlaiky N, Maroteaux L, Hen R, Borrelli E. Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Letter.* 1991;278:239-243.
- Montmayeur JP, Borrelli E. Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 3135-3139.

- Morgan WW, Herbert DC, Pfeil KA. The effect of hypophysectomy and subsequent prolactin replacement or of elevated prolactin alone on median eminence noradrenaline and dopamine in the rat. *Endocrinology*. 1982;110:1584-1591.
- Morgan WW; Steger RW; Smith MS, Bartke A, Sweeney CA. Time course of induction of prolactin-secreting pituitary tumors with diethylstilbestrol in male rats: response of tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology* 1985;116:17-24.
- Muhr C, Bergstrom K, Grimelius L, Larsson S-G. A parallel study of the roentgen anatomy of the sella turcica and the histopathology of the pituitary gland in 205 autopsy specimens. *Neuroradiology* 1981;21:5~5.
- Mukada K, Ohta M, Uozumi T, Arita K, Kurisu K, Inai K. Ossified prolactinoma: case report *Neurosurgery* 1987;20:473-475.
- Nagashima T, Murovic JA, Hoshino T, Wilson CB, DeArmond SJ.. The proliferative potential of human pituitary tumors in situ. *J Neurosurg* 1986;64:588-593.
- Nakajin S, Shinoda M, Hall PF . Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986; 134: 704-10.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. 1993; 12:1-51.
- Ohmichi M, Koike K, Nohara A, Kanda Y, Sakamoto T, Zhang ZX, Hirota K, Miyake A. Dopamine inhibits TRH-induced MAP kinase activation in dispersed rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201:642-648.
- Oliveira HC, Chouinard RA, Agellon LB, Bruce C, Ma L, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. Cis-acting sequences mapped in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1996;271:31831-31838.
- Oomizu S, Boyadjieva N, Sarkar DK. Ethanol and estradiol modulate alternative splicing of dopamine D2 receptor messenger RNA and abolish the inhibitory ac-

- tion of bromocriptine on prolactin release from the pituitary gland. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27:975-980.
- Parent AD, Bebin J, Smith RR. Incidental pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1981;54:228-231.
- Pasolli HA, Torres AI, Aoki A. Influence of lactotroph cell density on prolactin secretion in rats. *J Endocrinol.* 1992;134:241-246
- Pellegrini I, Rasolonjanahary R, Gunz G, Bertrand P, Delivet S, Jedynak CP, Kordon C, Peillon F, Jaquet P, Enjalbert A. Resistance to bromocriptine in prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;69:500-509.
- Pérez RL, Machiavelli GA, Romano MI, Burdman JA . Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin-secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats. *J Endocrinol,* 1986. 108: 399-403.
- Pernicone PJ, Scheithauer BW, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Young WF Jr, Lloyd RV, Davis DH, Guthrie BL, Schoene Pituitary carcinoma. *Cancer* 1997;79:804-812.
- Phelps C.J., Hymer W.C. Effects of bromocriptine on prolactin cellular hypertrophy, proliferation and secretory activity in diethylstilbestrol-induced pituitary tumors. *Molecular and cellular Endocrinology,* 1988;58:137-148.
- Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. dopamine D2 receptors in signal transduction and behaviour. *Crit. Rev. Neurobiol.* 1997; 11: 121-142.
- Pivonello R, Matrone C, Filipella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, Annunziato L, Lombardi G. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunction pituitary tumor:comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinolo Metab.* 2004;89:1674-1683.
- Pontiroli AE, Falsetti L. Development of pituitary adenoma in women with hyperprolactinaemia: clinical, endocrine, and radiological characteristics. *Brit Med J* 1984;288:515-518.
- Post KD, Biller BJ, Adelman LS, Molitch ME, Wolpert SM, Reichlin S. Selective transsphenoidal adenomectomy in women with galactorrhea-amenorrhea. *JAMA* 1979;242:158-162.

- Randall RV; Laws ER, Abboud CF et al. Transsphenoidal microsurgical treatment of prolactin-producing pituitary adenomas. *Mayo Clin Proc* 1983; 58:108-121.
- Reschini E, Ferrari C, Peracchi M, Fadini R, Meschia M, Crosignani PG. Effect of dopamine infusion on serum prolactin concentration in normal and hyperprolactinaemic subjects. *Clin Endocrinol* 1980;13:519-523.
- Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. The preparation, identification and assay of prolactin - a hormone of the anterior pituitary. *Am J Physiol* 1933; 105: 191-216.
- Rjosk HK, Fahlbusch R, von Werder K. Spontaneous development of hyperprolactinaemia. *Acta Endocrinol* 1982;100:333-336.
- Robert F, Hardy J. Prolactin-secreting adenomas. A light and electron microscopical study. *Arch Pathol* 1975;99:625-633.
- Sano T, Kovacs KT, Scheithauer BW, Young WF Jr. Aging and the human pituitary gland. *Mayo Clin Proc* 1993;68:971.
- 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.
- Sarkar DK, Gottschall PE, Xie QW; Meites J. Reduced tuberoinfundibular dopaminergic neuronal function in rats with in situ prolactin-secreting pituitary tumors. *Neuroendocrinology* 1984;38:498-503.
- Sassin JF, Frantz AG, Weitzman ED, Kapen S. Human prolactin: 24-hour pattern with increased release during sleep. *Science*. 1972;177:1205-1207.
- Schechter 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.
- Schlechte J, Dolan K, Sherrnan B, Chapler F, Luciano A.. The natural history of untreated hyperprolactinemia: a prospective analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:412-418.
- Selman W.R., Laws E.R., Scheithauer B.W., Carpenter S.M.. The occurrence of dural invasion in pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1986;64:402-407.

- Senogles SE. The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins. *J Biol Chem.* 1994;269:23120-23127.
- Senogles SE. The D2 dopamine receptor mediates inhibition of growth in GH4ZR7 cells: involvement of protein kinase-C epsilon. *Endocrinology.* 1994; 134:783-789.
- 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.
- Serri O, Rasio E, Beauregard H, Hardy J, Somma M. Recurrence of hyperprolactinemia after selective transsphenoidal adenomectomy in women with prolactinoma. *N Engl J Med* 1983;309:280-283.
- Sisam DA, Sheehan JP, Sheeler LR. The natural history of untreated microprolactinomas. *Fertil Steril.* 1987;48:67-71.
- 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;141:3493-4055.
- Spada A, Sartorio A, Bassetti M, Pezzo G, Giannattasio G. In vitro effect of dopamine on growth hormone (GH) release from human GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 55:734-740.
- Spertini F, Deruaz JP, Perentes E, Pelet B, Gomez F. Luteinizing hormone (LH) and prolactin-releasing pituitary tumor: possible malignant transformation of the LH cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:849-854.
- Sternberger LA. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem.* 1979;27:1657
- St-Jean E, Blain F, Comtois R. High prolactin levels may be missed by immunoradiometric assay in patients with macroprolactinomas. *Clin Endocrinol* 1996;44:305-309.

- 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.
- Teramoto A, Hirakawa K, Sanno N, Osamura Y.. Incidental pituitary lesion in 1000 unselected autopsy specimens. *Radiology* 1994;193:161.
- Thompson EA Jr, Siiteri PK. The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem.* 1974; 249:5373-5378.
- Thompson EA Jr, Siiteri PK. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem.* 1974;249:5364-5372.
- Toda K, Shizuta Y. Molecular cloning of a cDNA showing alternative splicing of the 5'-untranslated sequence of mRNA for human aromatase P-450. *Eur J Biochem.* 1993;213:383-389.
- Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O. Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in Ltk- fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem.* 1990;265:10320-10326.
- Van Loon GR. A defect in catecholamine neurons in patients with prolactin- secreting pituitary adenoma. *Lancet* 1978;2:868-871.
- Vázquez R, Vázquez G, Rubio M, Sánchez F, Vázquez RJ, Riesco JM, Juanes JA, Blanco E, Carretero J X. Effects of gonadal steroids on immunohistochemical expression of aromatase P450 in the rat hypophysis. *Eur J Anat*, 1999. 3 (s1): 34.
- Von Werder K, Eversmann T, FahIbusch R, Rjosk H-K. Development of hyperprolactinemia in patients with adenomas with adenomas with an without prior operative treatment. *Excerpta Med Itl Congr Ser* 1982;584:175-188.
- Warner BA, Santen RJ, Page RB. Growth hormone and prolactin secretion by a tumor of the pharyngeal pituitary. *Ann Intern Med* 1982;96:65-67.
- Weiss MH, Tea! J, Gott P, Wycoff R, Yadley R, Apuzzo ML, Giannotta SL, Kletzky O, March C.. Natural history of microprolactinomas: six- year follow-up. *Neurosurgery* 1983;12:180-183.

Wiklund J, Wertz N, Gorski J. A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and prolactin synthesis in F344 and Holtzman rats. *Endocrinology* 1981;109:1700-1707.

Zhao Y, Nichols JE, Bulun SE, Mendelson CR, Simpson ER. Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *J Biol Chem.* 1995;270:16449-16457.