

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL DURANTE EL DESARROLLO TUMORAL HIPOFISARIO

M. Eugenia Sabatino(1), Ezequiel Grondona(1), Aline Remor(2), Roberta Martins(2), Lucila De Bortoli(2), Virginia Juárez(1), Juan Petiti(1), Silvina Gutiérrez(1), Alicia Torres(1), Alexandra Latini(2), Ana De Paul(1).

(1) Centro de Microscopia Electrónica, Fc. Cs Médicas, UNC, INICSA-CONICET, Córdoba, Argentina. (2) Laboratorio de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Centro de Ciências Biológicas, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Email: adepaul@cmefcm.uncor.edu

Los tumores hipofisarios son una patología muy frecuente en la población general y representan el 15% de los tumores intracraneales [1], y en este contexto la desregulación de la coordinación de señales intra y extracelulares, estimuladoras e inhibitorias que actúan a través de diferentes vías de señalización puede promover el inicio y progresión del crecimiento tumoral. Considerando el rol vital de la mitocondria para la regulación de procesos como la muerte celular programada y el metabolismo energético, la supervivencia celular depende de una precisa coordinación entre la organela y el resto de la célula. Esta comunicación, determinada por las señales de estrés mitocondrial y sus efectos sobre diferentes compartimentos subcelulares, tiene como finalidad inducir respuestas celulares adaptadas [2]. Además, la mitocondria es blanco de acciones estrogénicas por lo que su rol sobre la actividad y dinámica mitocondrial es relevante. En este contexto, resulta interesante analizar *in vivo* la homeostasis mitocondrial durante el desarrollo del cuadro tumoral hipofisario inducido por estrógeno. Nos propusimos evaluar el metabolismo y dinámica mitocondrial durante el desarrollo del tumor hipofisario inducido con estrógeno por 10, 20, 40 y 60 días (E10, E20, E40 y E60) en ratas macho Wistar (cápsulas vacías se implantaron en controles). Análisis estadístico: ANOVA-Fischer test ($p < 0,05$). Se caracterizó el metabolismo energético mitocondrial a lo largo del desarrollo tumoral hipofisario mediante el análisis de distintos parámetros vinculados a la funcionalidad mitocondrial. Las variaciones morfométricas y morfológicas observadas en esta organela fueron analizadas a partir de micrografías electrónicas de transmisión. El recuento del número de mitocondrias por campo (área de foto) permitió detectar un leve aumento en E10 ($p < 0,05$), que luego restableció los valores basales a partir de E20 (Figura 1). A través del análisis morfológico mitocondrial del: área, circularidad, elongación e intensidad media de grises para cada grupo experimental, se observó que durante el desarrollo tumoral se produjo un aumento progresivo del tamaño y la circularidad junto pérdidas de la elongación mitocondrial. Estos datos indicarían que se produce una hinchazón de las mitocondrias, tomando una morfología más circular. A su vez, el contenido mitocondrial mostró una menor intensidad de gris, señalando que la hinchazón mitocondrial podría estar acompañada por la ruptura de su estructura interna, rasgo característico de mitocondrias disfuncionales [3] (Figura 2). También se detectó una disminución de expresión de la proteína de fisión DRP1 junto con una mayor expresión de MFN1 (proteína de fusión), lo que sugiere un desbalance entre ambos procesos dinámicos tendiente hacia la fusión, en favor de un agrandamiento de la organela. Estos resultados fueron acompañados por la determinación de la actividad enzimática por espectrofotometría dinámica en extractos hipofisarios de distintos componentes mitocondriales. Ya a partir de E10, se detectó un aumento significativo del contenido mitocondrial determinado por la actividad de citrato sintasa ($p < 0,05$), probablemente inducido por el aumento agudo del metabolismo oxidativo, caracterizado por el incremento de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria (CR) detectado luego de E10. Estos efectos fueron seguidos por aumentos sostenidos, a partir de E20, de la actividad del complejo IV de la CR y de la creatina quinasa, demostrando una readaptación del metabolismo mitocondrial, frente a mayores demandas energéticas. En paralelo, este aumento de la actividad mitocondrial, fue acompañado por inducción de estrés oxidativo, evidenciado por el aumento de producción de especies reactivas de oxígeno determinadas por citometría de flujo (CF) mediante DCFA, la reducción del contenido de glutatión y aumento de proteínas carboniladas analizadas por espectrofotometría, así como la oxidación de ADN detectada por el aumento en la expresión proteica de 8-OH-guanosina. Mediante el análisis de microfotografías electrónicas se detectó una mayor presencia de figuras de vesículas autofágicas conteniendo mitocondrias (Figura 3), resultado que fue acompañado por el incremento de la proteína PINK1, reguladora de la mitofagia, sugiriendo la ocurrencia de este fenómeno en el tumor hipofisario. Estos resultados indican que durante el desarrollo del tumor hipofisario

4° Congreso de la Asociación Argentina de Microscopía (SAMIC 2016)

inducido por estrógeno, ocurrió una pérdida de la homeostasis mitocondrial, que comprometió la funcionalidad de dicha mitocondria, lo cual podría ser la responsable de estrés oxidativo observado y afectar el metabolismo celular, y por ende influenciar, el control del crecimiento tumoral.

REFERENCIAS

- [1] Asa S.L. & Ezzat S. (2009) "The pathogenesis of pituitary tumors." *Annu Rev Pathol* 4: 97-126.
 [2] Felty Q. & Roy D. (2005) "Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells" *J Carcinog.* 4:1.
 [3] Blondin G.A. & Green D.E. (1967) "The mechanism of mitochondrial swelling." *Proc Natl Acad Sci* 58:612-619.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Centro de Microscopía Electrónica de la Fc. de Ciencias Médicas por el acompañamiento en las metodologías de obtención de muestra y adquisición de imágenes y a las agencias FONCyT, CONICET, CAPES/MINCyT y SECyT que proveyeron la financiación del proyecto bilateral entre Brasil y Argentina.

FIGURAS

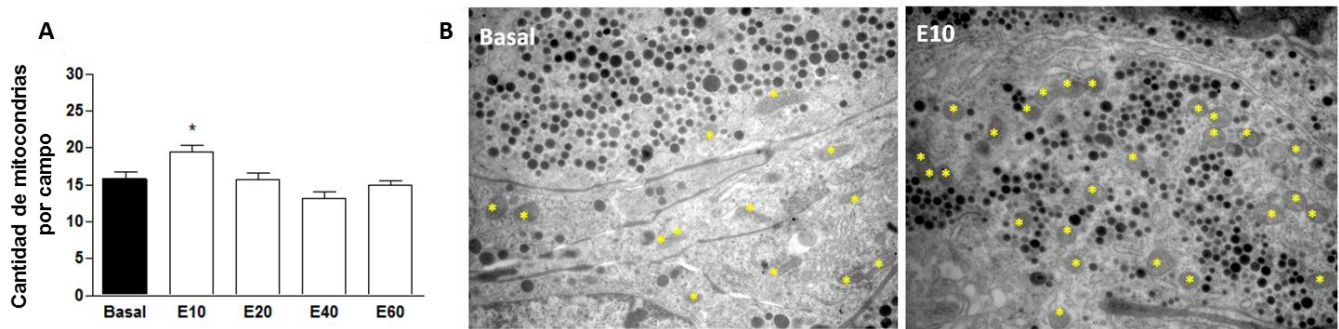


Figura 1. Cantidad de mitocondrias durante el desarrollo tumoral hipofisario. A) Recuento del número de mitocondrias por campo en micrografías de microscopía electrónica de transmisión. Datos presentados como Media±SEM. (Fischer test, $p < 0,05$, *vs Basal). B) Micrografías electrónicas representativas de glándulas normales y tumorales (E10). Los símbolos amarillos resaltan las mitocondrias presentes en el área. Amplificación:10.000X

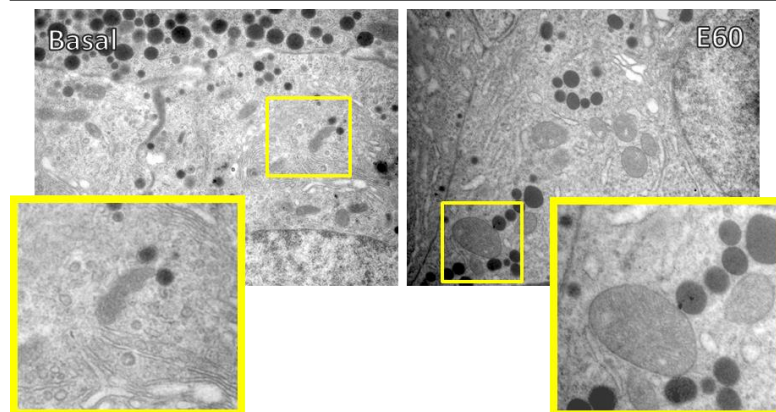


Figura 2. Morfometría mitocondrial de hipófisis normales y tumorales. Micrografías electrónicas representativas de glándulas normales y tumorales (E60), se puede apreciar como varía la morfología de la organela, incrementando su tamaño y circularidad en glándulas tumorales. Amplificación:10.000X.

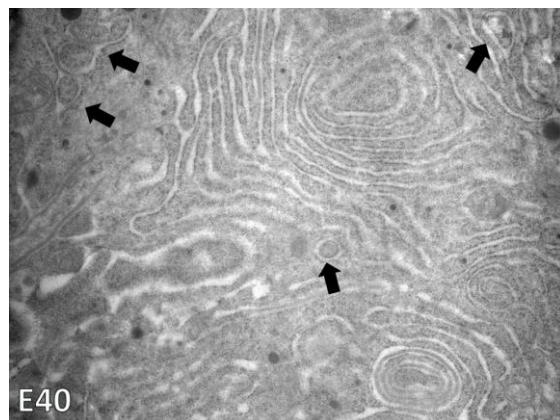


Figura 3. Figuras de vesículas autofágicas con contenido mitocondrial. Micrografías electrónicas representativas de glándulas tumorales (E40), se puede apreciar vesículas de doble membrana conteniendo mitocondrias. Amplificación:10.000X.