

PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS STEM Y CANCER STEM CELLS EN LA GENESIS DE ADENOMAS HIPOFIARIOS: EVIDENCIAS ULTRAESTRUCTURALES Y MOLECULARES

Carolina Guido (1), Alicia Vaca (1), Liliana Sosa (1), Fabiola Velázquez (2), Beatriz Caputto (2), Jorge Mukdsi (1), Alicia Torres (1)

(1) Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET, FCM, UNC. Córdoba, Argentina. (2) CIQUIBIC, FCQ, UNC. Córdoba, Argentina
Email: carolina_guido@hotmail.com

La población de cancer stem cells (CSC), ha sido postulada como iniciadora de tumores malignos [1]. Un desafío en endocrinología es conocer los factores implicados en la neogénesis de adenomas hipofisarios, en los que participarían células iniciadoras de tumores (CIT) con fenotipo CSC. Resultados previos de nuestro laboratorio han permitido inferir la existencia de células hipofisarias que expresan marcadores de células stem (CS) y de CSC y que estarían involucradas en las etapas tempranas del desarrollo tumoral. Recientemente se ha descrito que la sobreexpresión del factor de transcripción Sox2, asociado a CS, estaría vinculada a la progresión tumoral [2]. El objetivo fue evaluar posibles cambios de los marcadores asociados a CS y CSC: Oct4, GFRA2, Sox2, Sox9, Nestin y CD133 en adenohipófisis de ratas control y tumorales y posterior aislamiento y caracterización de las CIT. Además, se propone analizar si la sobreexpresión de Sox2 modifica el comportamiento de la línea tumoral hipofisaria GH3. Los tumores adenohipofisarios fueron obtenidos en ratas hembras Fischer estimuladas con 30 mg de benzoato de estradiol durante 30 días (BE30). La expresión de los marcadores antes mencionados fue analizada por inmunofluorescencia (IF). Para los estudios *in vitro*, se aislaron pituesferas a partir de adenomas inducidos por estrógeno, cultivados y suplementados con EGF, FGFb y B27 [3]. Las mismas fueron caracterizadas con los marcadores antes mencionados y posteriormente diferenciadas con medio suplementado. La línea celular GH3 fue transducida con un vector retroviral que expresa Sox2. Se realizó IF para la detección de marcadores asociados a CS y CSC y análisis morfológico ultraestructural. Los marcadores de CS y CSC analizados por IF evidenciaron una variación en su distribución dentro de la glándula cuando se comparó con el grupo control (C) versus el grupo BE30. En la zona marginal (ZM) que limita el cleft hipofisario, donde se describe la presencia de CS, se observaron células positivas para las moléculas ensayadas y escasa inmunomarcación en adenohipófisis (AH) de ratas C. En contraposición, en BE30 la expresión de los marcadores disminuyó en ZM y aumentó en AH, indicando una movilización de CS de ZM hacia el parénquima adenomatoso (Figura 1). Las pituesferas aisladas en cultivo exhibieron a nivel ultraestructural una composición celular heterogénea siendo positivas para: Oct4, GFRA2, Sox2, Sox9, Nestin, CD133 y CD44 (Figura 2A y B). Luego del ensayo de diferenciación se apreció expresión de S100, Vimentina y GFAP (Figura 2C). La sobreexpresión de Sox2 en la línea tumoral mammosomatotropa GH3 indujo cambios subcelulares indicativos de indiferenciación incrementando además, el número de figuras mitóticas, la capacidad de formar esferoides, el metabolismo y la viabilidad con respecto a las GH3 control (Figura 3). Los resultados obtenidos demuestran que las pituesferas aisladas poseen capacidad pluripotente y que estarían involucradas en el desarrollo de adenomas hipofisarios. La formación de esferoides y las características morfológicas de células GH3 que sobre-expresan Sox2 evidencian un fenotipo más indiferenciado, sugiriendo un rol activo de este factor en la tumorigénesis hipofisaria.

REFERENCIAS.

[1] Baccelli I, Trumpp A (2012) "The evolving concept of cancer and metastasis stem cells" *J Cell Biol* 198(3):281-93.

[2] Mertens F, Gremeaux L, Chen J, Fu Q, Willems C, Roose H, Govaere O, Roskams T, Cristina C, Becú-Villalobos D, Jorissen M, Poorten VV, Bex M, van Loon J, Vankelecom H (2015) "Pituitary tumors contain a side population with tumor stem cell-associated characteristics" *Endocr Relat Cancer* 22(4):481-504.

[3] Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M, Hu J, Hwang JY, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2009) "Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours" *Br J Cancer* 101(2):303-11.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las técnicas de laboratorio Señoras María Elena Pereyra y Lucía Artino y a la Señorita Soledad Santa Cruz personal del Centro de Microscopía Electrónica (INICSA-CONICET), por su excelente asistencia en el procesamiento, corte y contrastado de los materiales analizados a nivel de microscopía electrónica de transmisión.

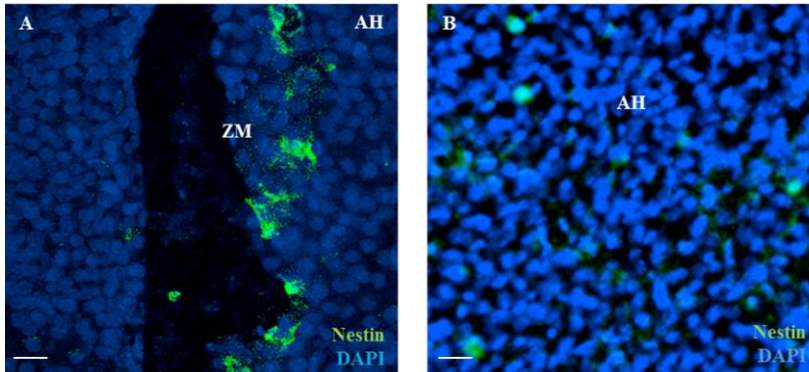


Figura 1: CS en adenomas experimentales inducidos por estrógenos. Se observan células positivas para Nestin en zona marginal de ratas control (A). Luego de la estimulación hormonal se evidencia una redistribución de la inmunomarcación de la proteína hacia el parénquima adenomatoso (B). ZM: zona marginal, AH: adenohipófisis. Barra: 20μm.

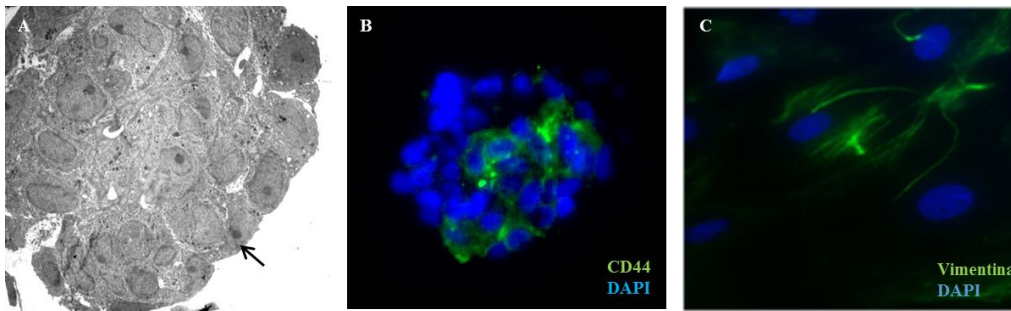


Figura 2: Análisis ultraestructural e inmunomarcación de CD44 y vimentina en cultivo primario de pituesferas. A- Las células iniciadoras de tumores (CIT) que conforman la zona central exhiben núcleos de gran tamaño con nucléolos evidentes y citoplasma sin gránulos secretorios. Hacia la periferia se identifican células con características mesenquimales (flecha) (Magnificación 1200x). B- Las CIT expresan marcadores de indiferenciación tales como CD44 (Magnificación 600x). C- La monocapa obtenida de CIT diferenciadas evidencia positividad para el filamento intermedio vimentina (Magnificación 600x).

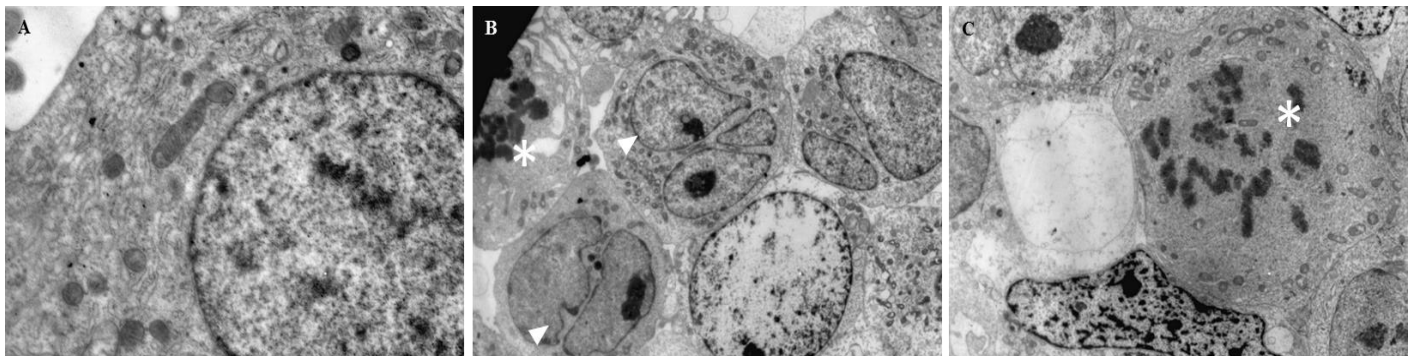


Figura 3: Células tumorales GH3 controles (A) y con sobre-expresión del gen Sox2 (B y C). Las células mamosomatotropas Sox2 positivas exhiben pleomorfismo celular caracterizado por núcleos polimorfos (punta de flecha) con nucléolos evidentes al igual que figuras de mitosis (asteriscos) (Magnificación en A: 16700x y B y C: 6700x).