

**Universidad de Santiago de Compostela  
Facultad de Medicina**

**Departamento de Fisiología**

**EFECTO DE Pit-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
GH Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN  
GLÁNDULA MAMARIA HUMANA**

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> Carmen Gil Puig**

**Santiago de Compostela  
Septiembre 2005**



D. Román Pérez Fernández, Profesor Titular del Departamento de Fisiología,  
Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “EFECTO DE Pit-1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE GH Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN GLÁNDULA MAMARIA HUMANA”, elaborada por la Licenciada en Ciencias Biológicas Dña. María del Carmen Gil Puig, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela y, hallándose concluida, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que conste, expide y firma la presente certificación en Santiago de Compostela a 15 de Septiembre de 2005.

Fdo. Román Pérez Fernández



*A mis padres,  
por animarme a seguir siempre adelante.*



*Quisiera expresar mi agradecimiento,*

*Al profesor Román Pérez, director de esta tesis, por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación.*

*A la profesora Carmen Segura, quién estuvo a mi lado cuando hice la primera PCR, por su apoyo y consejos.*

*Al Dr. Tomás García-Caballero y a su grupo de investigación: Lía, Montse y Lola por el estudio inmunohistoquímico.*

*Al Dr. Manuel Macia por facilitarme parte de las muestras de tejido mamario necesarias para la realización de este estudio.*

*A todas aquellas mujeres, Dolores, Victoria, Teresa, Maria,... que, sin saberlo, han participado en este proyecto, y que sin ellas sería imposible realizarlo.*

*A Lourdes Loidi y a su grupo de investigación del área de Medicina Molecular (CHUS) por la secuenciación de los productos de PCR y por su ayuda con la PCR a tiempo real.*

*A todos mis compañeros de laboratorio de los que aprendí todo lo necesario para poder desarrollar esta tesis.*

*A Eduardo y Rubén por su asesoramiento en el mundo de las PCRs.*

*A Ángel García y María Pardo, dos de las personas que me prestaron su ayuda siempre que lo necesité.*

*A Begoña, por ser una gran compañera pero sobre todo, por su gran amistad.*

*A mi familia por su apoyo incondicional y por animarme a seguir siempre adelante.*



**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AMPc:** 3'5'adenosin monofostato cíclico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATM:** Gen Mutado en la Ataxia Telangiectasia

**ATP:** Adenosin trifostato

**BRCA:** Gen de susceptibilidad al cáncer de ovario y mama

**BrdU:** Bromodeoxiuridina

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**DAB:** Dextrano abidina-biotina

**DAPI:** 4'-6-Diamidino-2-fenilindol

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**CHOP:** Proteína homóloga C/EBP

**DIG:** Dioxigenin

**DMEM:** Medio dulbecco mínimo esencial

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**dNTP:** Desoxirribonucleótido 5' trifosfato

**DAPI:** 4'-6-Diamidino-2-fenilindol

**DTT:** Ditiotreititol

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**EGTA:** Ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetiléter)N, N, N', N'-tetraacético

**ERK:** Señal extracelular regulada por kinasa

**FBS:** Suero bovino fetal

**FICT:** Fluoresceína isotiocianato

**FSB:** Tampón de congelación

**GH:** Hormona de crecimiento

**GHBP:** Proteína transportadora de GH

**GHF-1:** Factor de transcripción hipofisario-1

**GH-R:** Receptor de la hormona de crecimiento

**GHRH:** Hormona liberadora de la hormona de crecimiento

**HEPES:** N- (2-hidroxietil)piperazino N'-(2-etanosulfanílico)

**Ig:** Inmunoglobulina

**IGF-I:** Factor de crecimiento tipo insulina

**IP:** Inmunoprecipitación

**kDa:** kilodaltons

**ONPG:** O-Nitrofenil  $\beta$ -D-Galactopiranosido

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Pit-1:** Factor de transcripción hipofisario

**PMSF:** Fluoruro de metilsulfonilfenilo

**PRL:** Prolactina

**PTHrP:** Proteína relacionada con hormona paratiroidea

**RT:** Retrotranscripción

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SS:** Somatostatina

**TBS:** Tampón salino con Tween

**TERT:** Subunidad catalítica de la telomerasa

**TSH:** Hormona estimuladora del tiroides

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. Glándula Mamaria.....</b>	<b>5</b>
1.1. Estructura.....	5
1.2. Desarrollo.....	6
<b>2. Cáncer de mama.....</b>	<b>8</b>
2.1. Definición .....	8
2.2. Genética .....	9
2.3. Tipos de cáncer de mama.....	10
2.4. Desarrollo del tumor .....	11
2.5. Factores de riesgo .....	12
<b>3. Hormona de crecimiento .....</b>	<b>13</b>
3.1. Estructura .....	13
3.2. Receptor de la hormona de crecimiento.....	16
3.3. Mecanismo de acción.....	17
3.4. Efectos fisiológicos de la hormona de crecimiento .....	18
3.5. Regulación de la secreción de la hormona de crecimiento .....	20
<b>4. Factor de transcripción hipofisario-1 (Pit-1/GHF-1) .....</b>	<b>23</b>
4.1. Estructura .....	24
4.2. Pit-1 y su papel fisiológico .....	25
<b>5. GH y Pit-1 extrahipofisario .....</b>	<b>26</b>
5.1. GH extrahipofisaria.....	26
5.2. Pit-1 extrahipofisario.. ..	27
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
<b>1. Cultivo celular .....</b>	<b>31</b>
<b>2. Tejidos humanos.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Estudio del ARNm .....</b>	<b>31</b>
3.1. Extracción de ARN .....	31
3.2. RT-PCR .....	32
3.3. Secuenciación .....	34
3.4. PCR a tiempo real .....	34

<b>4. Estudio de la proteína</b> .....	35
4.1. Extracción de proteína .....	35
4.2. Inmunoprecipitación .....	35
4.3. Western blot .....	36
4.4. Inmunohistoquímica .....	37
4.5. ELISA GH .....	38
<b>5. Plásmidos y transfecciones</b> .....	39
5.1. Preparación de bacterias competentes y transformación .....	39
5.2. Obtención de plásmidos a gran escala .....	40
5.3. Transfecciones .....	40
5.4. Ensayos de luciferasa y $\beta$ - galactosidasa .....	41
<b>6. Estudios de proliferación: incorporación de BrdU.</b> .....	42
<b>7. Análisis estadístico</b> .....	43
<b>V. RESULTADOS</b>	
<b>1. Estudio <i>in vitro</i>: línea celular MCF-7</b> .....	45
1.1. Detección de ARNm de Pit-1 y GH por RT-PCR .....	45
1.2. Expresión proteica de Pit-1 y GH .....	46
1.2.1. Inmunoprecipitación y Western blot .....	46
1.2.2. Inmunohistoquímica .....	47
1.3. Efecto de Pit-1 sobre la expresión de GH en la línea celular MCF-7 .....	48
1.3.1. Estudio de la expresión a nivel de ARNm .....	48
1.3.2. Expresión de GH a nivel proteico .....	49
1.3.2.1. Western blot .....	49
1.3.2.2. ELISA GH .....	50
1.3.3. Análisis de la actividad transcripcional del promotor de GH .....	51
1.4. Efecto de Pit-1 sobre la expresión de IGF-I mediante PCR a tiempo real .....	52
1.5. Papel de Pit-1 en la proliferación celular .....	53
<b>2. Estudio <i>in vivo</i>: Glándula mamaria normal y carcinomas ductales infiltrantes</b> .....	57
2.1. Detección de ARNm de Pit-1 por RT-PCR .....	57
2.2. Detección proteica de Pit-1 .....	60
2.2.1. Inmunoprecipitación y Western blot .....	60
2.2.2. Inmunohistoquímica .....	62
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	65
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	77
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	79

## **I. RESUMEN**



El cáncer de mama es la enfermedad con mayor índice de mortalidad por neoplasia en las mujeres. Se trata de una enfermedad hormonodependiente, donde las hormonas, tanto ováricas como hipofisarias juegan un importante papel no sólo en el desarrollo normal de la mama sino también en el desarrollo del tumor. Desde los primeros estudios que relacionan el incremento de GH en plasma con el riesgo de padecer cáncer de mama, numerosos trabajos han intentado establecer una relación entre la expresión de GH en la propia glándula mamaria y el desarrollo de cáncer.

En hipófisis, a nivel fisiológico, el factor de transcripción hipofisario-1, Pit-1, es necesario para la expresión de los genes que codifican para la hormona de crecimiento, prolactina y la subunidad  $\beta$  de la TSH. Sin embargo, el papel de Pit-1 a nivel extrahipofisario es discutido. Algunos estudios han demostrado que Pit-1 incrementa la proliferación de las células hipofisarias, sugiriendo que este factor puede estar implicado en la patogénesis tumoral hipofisaria.

En este trabajo analizamos la expresión de GH y Pit-1 en la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) y la regulación de GH por Pit-1. Paralelamente, se realiza un estudio sobre la expresión de Pit-1 en tejido normal y tumoral mamario. Valoramos también el papel de Pit-1 sobre proliferación celular.

Nuestros resultados demuestran que tanto GH como Pit-1 se expresan en la línea celular MCF-7. En estas células, Pit-1 regula a nivel transcripcional la expresión de GH. En muestras de tejido humano, existe una mayor expresión de Pit-1 en carcinomas ductales infiltrantes que en tejido mamario normal. Además, demostramos que la sobreexpresión de Pit-1 en la línea celular MCF-7 incrementa significativamente proliferación celular.

Nuestros resultados sugieren que Pit-1, directamente o a través de otros mediadores (como GH), pueden jugar un importante papel en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama humano.



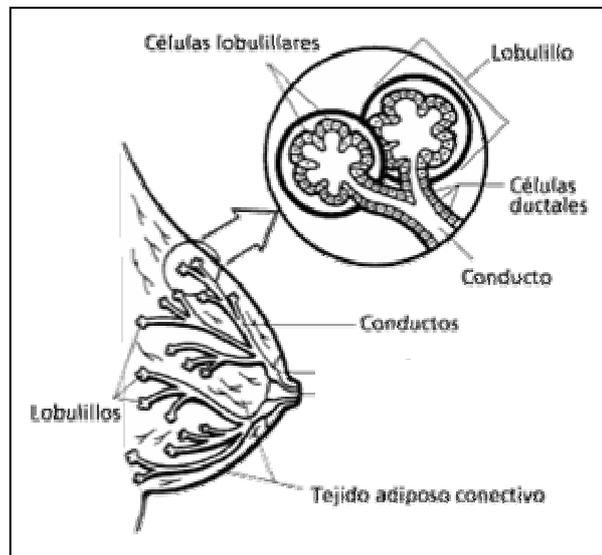
## **II. INTRODUCCIÓN**



## 1. GLÁNDULA MAMARIA

### 1.1. Estructura

La mama es una glándula de secreción externa situada bajo la piel a nivel del tórax, y es el resultado de la modificación de las glándulas sudoríparas de la piel adaptadas para la producción de leche. Está formada por tejido fibroadiposo y un sistema de conductos (conjunto de estructuras arboriformes o ramificadas, tubulares y huecas) que confluyen progresivamente en canalículos más gruesos hasta terminar en uno de los doce a dieciocho galactóforos. Hacia el interior de la mama, los conductos desembocan en unas agrupaciones de acinos en forma de racimos llamados lobulillos. A lo largo de toda su longitud los conductos galactóforos están tapizados por dos capas de células: una capa interna continua de células epiteliales y una capa externa discontinua de células mioepiteliales. La mama contiene además de vasos arteriales, venosos y linfáticos, grasa y tejido conectivo que junto con los ligamentos de *Cooper* constituyen los elementos que le dan forma y sostén.



**Figura 1.** Estructura de la glándula mamaria.

## 1.2. Desarrollo

La glándula mamaria experimenta importantes cambios a lo largo del desarrollo. En la infancia, en condiciones normales, permanece en un estado embrionario y no se desarrolla hasta la pubertad. Durante el embarazo, las mamas aumentan de tamaño, volviendo a su estado normal al terminar la lactancia.

A mediados del siglo XX se recogen las primeras evidencias del papel que desempeñan las hormonas en el desarrollo de la glándula mamaria. Así, en trabajos realizados en roedores a los que se extirpó hipófisis, ovarios y las glándulas adrenales, y que posteriormente se les trató con distintas hormonas, se observó que en la morfogénesis mamaria, la hormona de crecimiento (GH) y los estrógenos estimulaban la elongación de los ductos; la progesterona era necesaria para el desarrollo alveolar, mientras que la prolactina (PRL), junto con la hormona de crecimiento y los esteroides adrenales estarían implicados en la diferenciación lóbulo-alveolar y síntesis de leche (Lyons *et al.*, 1958).

Factores de crecimiento locales, entre los que se encuentran la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y el receptor tipo I de la PTH/PTHrP, FGF10 y su receptor FGFR2b, el factor de transcripción Lef1 8, y los productos de los genes Hoxc6 9, Msx1 10 y Msx2 11 son los responsables del desarrollo embriológico de las glándulas mamarias en ratones. De todos ellos, sólo PTHrP es necesaria para el desarrollo embriológico de las mamas en humanos (Wysolmerski *et al.*, 2001).

Desde el nacimiento hasta la pubertad se desarrolla un rudimentario sistema ductal proporcional al crecimiento corporal. En este estadio, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) podría jugar un importante papel en el desarrollo de este sistema ductal, dado que experimentos realizados en ratones *knockout* para el receptor de EGF, presentan una elongación defectuosa de los ductos (Russo J. y Russo I.H., 1987).

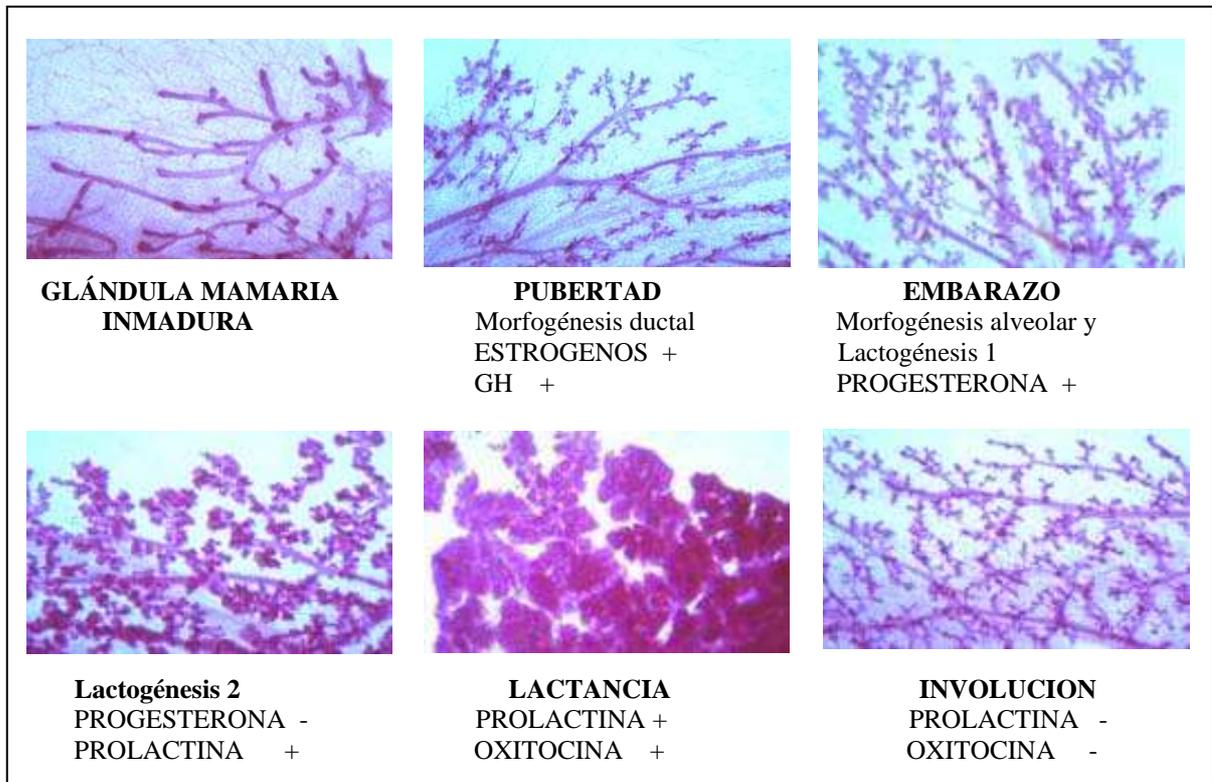
En la pubertad, la glándula mamaria presenta un rápido crecimiento. En ratones, se desarrollan los conductos finales, estructuras formadas por 4-6 capas de células epiteliales cuboidales situadas encima de una capa de células mioepiteliales. Los conductos finales proliferan en el interior del tejido adiposo, mientras que las células del

interior sufren apoptosis generando el lumen del conducto. Estudios pioneros realizados en ratones han demostrado que una ovariectomía origina la regresión de los conductos finales y paraliza el crecimiento de los ductos, indicando que los estrógenos son necesarios para el crecimiento de los ductos durante la pubertad (Flux *et al.*, 1954). En la pasada década, utilizando técnicas de ingeniería genética se desarrollaron ratones *knockout* para el receptor de estrógenos, observándose que estos animales no desarrollan conductos finales y, por tanto, no presentaban elongación de los ductos, confirmándose los datos obtenidos medio siglo antes (Couse *et al.*, 1999). En humanos, los datos son similares, habiéndose observado en adolescentes una estrecha relación entre los niveles de estrógenos en plasma y el desarrollo mamario en adolescentes. Además, la administración de estrógenos estimula el desarrollo de las glándulas mamarias actuando sobre la elongación de los ductos (Ankarberg-Lindgren *et al.*, 2001). Respecto a la hormona de crecimiento, estudios realizados en roedores, han demostrado que GH es necesaria para el crecimiento de la glándula mamaria durante la pubertad. GH actuaría a nivel del estroma mamario donde estimula la producción de IGF-I, que a su vez estimula a su vez la proliferación de las células que constituyen el epitelio mamario (Kleinberg, 1997). En humanos GH contribuye a la morfogénesis ductal, elevándose sus niveles durante la pubertad (Rose *et al.*, 1991).

Durante el embarazo se acelera el desarrollo mamario, activándose el desarrollo alveolar al final de los ductos. Dos son las hormonas que están implicadas en este proceso: prolactina y progesterona. Estudios realizados en ratones deficientes tanto en la síntesis de prolactina como en su receptor, muestran que son incapaces de formar los ductos y alvéolos, lo cual, indica que esta hormona está implicada en la morfogénesis alveolar (Humphreys *et al.*, 1997). La progesterona, secretada por la placenta durante el embarazo, es necesaria para la lactogénesis y responsable del inicio de la producción de leche (Deis y Delouis, 1983). Otras hormonas necesarias para este proceso son la oxitocina, que es el principal regulador de la eyección láctea y la mencionada prolactina, que mantiene la lactancia (Crowley *et al.*, 1992).

El proceso de involución de las células mamarias se origina por la caída de los niveles de prolactina, seguido de la inducción de apoptosis en las células epiteliales,

eliminándose finalmente las estructuras lóbulo-alveolares recuperando una morfología similar a la presente antes de la gestación (Wilde *et al.*, 1999) (Figura 2).



**Figura 2.** Regulación hormonal del desarrollo de la glándula mamaria.

## 2. CÁNCER DE MAMA

### 2.1. Definición

El cáncer de mama representa una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios. Es el más frecuente en las mujeres (excluyendo los cánceres cutáneos), aunque es bastante raro en los varones. El cáncer de mama humano es una enfermedad clonal. Ello quiere decir, que una única célula transformada, resultado final de una serie de mutaciones somáticas (adquiridas) o de la

línea germinal (heredadas), es capaz de expresar todo el potencial maligno, en una serie de sucesos que se producen de forma secuencial y aleatoria. Por lo tanto, el cáncer de mama puede existir durante un largo periodo como enfermedad no invasora, o como enfermedad invasora pero no metastásica, por ello, es necesario diagnosticarlo a tiempo y tratarlo adecuadamente (Fauci, *et al.*, 1998).

## **2.2. Genética**

Aproximadamente entre el 5 y 10% del cáncer de mama está relacionado de forma directa con mutaciones en la línea germinal, siendo por tanto, hereditarios. El descubrimiento de los genes que confieren susceptibilidad a padecer cáncer de mama hereditario y el conocimiento de los mecanismos de acción que intervienen en este proceso han sido claves para comenzar a comprender la etiología y progresión de los tumores mamarios.

Las primeras mutaciones que se identificaron en cáncer de mama se encuentran en el gen supresor de tumores *p53*, localizado en el cromosoma 17, y fue éste el primer gen identificado como mutante tumoral en el año 1979 (DeLeo *et al.*, 1979). Se trata de una fosfoproteína nuclear implicada en la regulación del ciclo celular, en la reparación del ADN, apoptosis e inhibición de la angiogénesis. Por tanto, una sobreexpresión de la forma mutada de esta proteína está asociada a áreas de mayor proliferación celular.

Otro gen, identificado en el año 1990 (Hall *et al.*, 1990) y localizado en el cromosoma 17q21 y que se conoce como BRCA-1 (gen de susceptibilidad al cáncer de ovario y mama)(Miki *et al.*, 1994), codifica a una proteína que actúa como un factor de transcripción. Dentro de su estructura destaca una secuencia en el extremo aminoterminal constituida por 126 aminoácidos, que determinan el dominio con dedos de zinc que media la unión al ADN o a otra proteína. La proteína BRCA-1 se uniría a regiones específicas del ADN y controlaría la expresión de otros genes. Además de actuar como un factor de transcripción, se ha observado que BRCA-1 está implicado en la reparación del ADN, regulación del ciclo celular, apoptosis y mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Las mutaciones más frecuentes en este gen corresponden a deleciones o inserciones de bases que provocan un desplazamiento de la pauta de

lectura, originando un codón de terminación que causa la producción de proteínas truncadas a las que les falta desde un 5% a un 90% de su secuencia de aminoácidos (Hofmann y Schlag, 2000; Yoshida y Miki 2004; Arai *et al.*, 2004).

ATM (gen Mutado en la Ataxia Telangiectasia) codifica una protein-quinasa que fosforila a la proteína BRCA1 y dispara su acción reparadora. Las células de los pacientes con la proteína ATM mutada, dan lugar a una proteína no funcional que no fosforila BRCA1 y por tanto no puede reparar el ADN (Cortez *et al.*, 1999).

Posteriormente a la identificación de BRCA-1, en el año 1994, se identifica el gen BRCA-2, localizado en el cromosoma 13q12.13 (Wooster *et al.*, 1994) que codifica una proteína constituida por 3418 aminoácidos (Tavtigian *et al.*, 1996) y que presenta las mismas funciones que BRCA-1. Al contrario que muchos de los genes implicados en cáncer hereditario, BRCA-1 y BRCA-2 no están mutados en el cáncer de mama esporádico.

Otro de los muchos genes implicados en la etiología del cáncer de mama es el que codifica para un miembro de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento epidérmico denominado erbB2 o HER /Neu. Este gen media en la estimulación de la proliferación celular, previene la apoptosis y estimula la angiogénesis y metástasis, y por tanto, una hipersecreción de esta proteína parece estar implicada en el desarrollo del carcinoma mamario (Ross *et al.*, 1999). Sin embargo, son numerosos los casos de cáncer de mama originados de modo esporádico.

### **2.3. Tipos de cáncer de mama**

El cáncer de mama puede clasificarse en dos grupos:

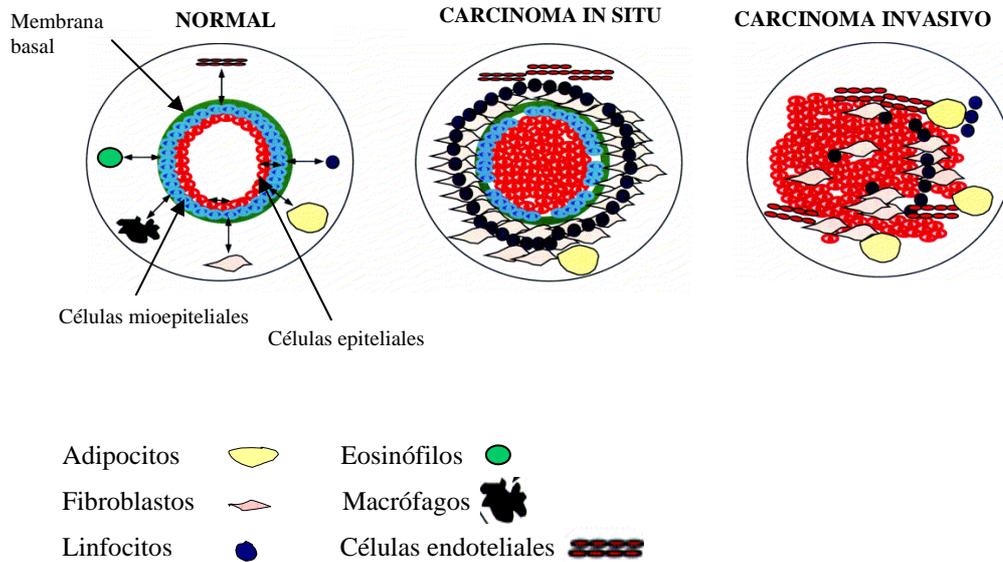
- No invasivo (*in situ*), es decir, el cáncer permanece limitado a los conductos o lobulillos y no ha invadido el tejido adiposo circundante.
- Invasivo o infiltrante, en el que, las células cancerosas invaden el tejido adiposo. Dentro de este grupo, el carcinoma ductal infiltrante, originado en los conductos

galactóforos y que invade el tejido adiposo originando posteriormente una metastasis, es el responsable del 80% de las neoplasias mamarias. Aproximadamente entre el 10% y 15% de los cánceres invasivos son carcinomas lobulillares infiltrantes, que se origina en las glándulas productoras de leche. Existen otros tipos de cánceres invasivos como el carcinoma medular, carcinoma coloide o carcinoma tubular, pero menor incidencia (DeVita *et al.*, 1997).

#### **2.4. Desarrollo del tumor**

Los conductos mamarios están formados por células epiteliales localizadas hacia el lumen y células mioepiteliales, que las rodean y separan de la membrana basal y del estroma. Esta estructura celular cerrada permite interacciones autocrinas y paracrinas mediadas por factores secretados por estas células. El cáncer de mama es el resultado de una serie de alteraciones moleculares en las células mioepiteliales que constituyen los conductos mamarios. Estas células son necesarias para mantener la estructura de los conductos mamarios a la vez que producen factores paracrinos con actividad anti-proliferativa, anti-invasiva y anti-angiogénica (Xiao *et al.*, 1999, Nguyen *et al.*, 2000). Una de las hipótesis propuestas como inicio del tumor indica una pérdida de estas propiedades seguida de la activación de la proliferación, invasión y angiogénesis. En el caso de carcinomas no invasivos, las células epiteliales pierden la capacidad de mantener una única capa de células y comienzan a proliferar hacia el lumen del conducto. Al mismo tiempo descienden el número de células mioepiteliales y se incrementan las células endoteliales, linfocitos y fibroblastos, contribuyendo estos últimos a la formación de la matriz extracelular, importante en la diferenciación celular y morfogénesis mamaria (Boudreau *et al.*, 1998). Experimentos *in vitro* indican que, los fibroblastos derivados de tejido normal inhiben el crecimiento del tumor mientras que los procedentes de tejido tumoral lo estimulan (Dong-Le Bourhis *et al.*, 1997).

En los carcinomas invasivos, las células mioepiteliales y la membrana basal desaparecen y las células tumorales se dispersan por el estroma (Figura 3) (Polyak, 2001).



**Figura 3.** Modelo representativo del desarrollo tumoral en la glándula mamaria (Polyak, 2001).

## 2.5. Factores de riesgo

Estudios epidemiológicos muestran que entre los factores de riesgo que originan el cáncer de mama se encuentran la edad, una temprana menarquia, una menopausia tardía, número de partos, antecedentes familiares con cáncer de mama, la obesidad y factores hormonales (estrógenos, progesterona, prolactina y la hormona de crecimiento). Se ha observado que una exposición prolongada a estrógenos y progesterona originada por una menarquia temprana, menopausia tardía o haber tenido varios partos está relacionada con un incremento en el riesgo de desarrollar un carcinoma mamario (Begg *et al.*, 1987). En mujeres postmenopáusicas, en las que el ovario deja de ser funcional, la producción de estrógenos se debe a la acción de la aromatasa que convierte a los

andrógenos de las glándulas suprarrenales en estrógenos, aumentando así el riesgo de desarrollar un tumor (Santner *et al.*, 1984).

Estudios realizados sobre la relación existente entre la PRL y el riesgo de desarrollar cáncer de mama parecen indicar que un elevado nivel sérico de esta hormona incrementa el riesgo de padecer esta enfermedad (Hankinson *et al.*, 1999). Se ha demostrado que tanto los tumores mamarios como las líneas celulares de cáncer de mama expresan el receptor de prolactina. Observaciones realizadas por Fuh y Wells en el año 95 muestran que el bloqueo este receptor descinde la proliferación celular. Otra hormona hipofisaria relevante es la hormona de crecimiento, que actúa estimulando la síntesis de IGF-I en hígado, el cual actuará posteriormente sobre la mama. Además IGF-I es secretado por la propia glándula mamaria actuando de forma autocrina-paracrina sobre la producción de IGF-I mamario y sobre la proliferación celular. Se ha observado una correlación entre los niveles en plasma de esta hormona con un mayor riesgo de desarrollar una neoplasia mamaria (Wennbo *et al.*, 2000).

El cáncer de mama es por tanto, una enfermedad hormonodependiente, donde tanto las hormonas ováricas como hipofisarias juegan un importante papel no sólo en el desarrollo normal de la glándula mamaria sino también en el desarrollo y progresión del cáncer de mama.

### **3. HORMONA DE CRECIMIENTO**

En 1921 se descubrió por primera vez la presencia de una actividad estimulante del crecimiento en extractos del lóbulo anterior de hipófisis bovina (Evans y Long, 1921), aunque fue posteriormente cuando Li consiguió aislar de forma purificada el compuesto responsable (Li *et al.*, 1945).

#### **3.1. Estructura**

La hormona de crecimiento (GH) es sintetizada fundamentalmente por las células somatotropas de la adenohipófisis. Desde el punto de vista bioquímico, es una

molécula peptídica, formada por 191 aminoácidos dispuestos en una sola cadena en la que existen dos puentes disulfuro que unen las cisteínas que ocupan las posiciones 53 y 182 con las localizadas en las posiciones 165 y 189. Esta estructura, con un peso molecular de 22 kDa, es la forma principal de secreción de la hormona por la hipófisis anterior y la más abundante, tanto en el plasma como en las propias células somatotropas. Se han identificado además una serie de variantes, siendo la más importante, ya que representa un 20% del total de GH en la hipófisis, es forma de 20 kDa, que es el resultado de la eliminación de los aminoácidos situados desde la posición 32 hasta la 46 (Daughaday, 1989).

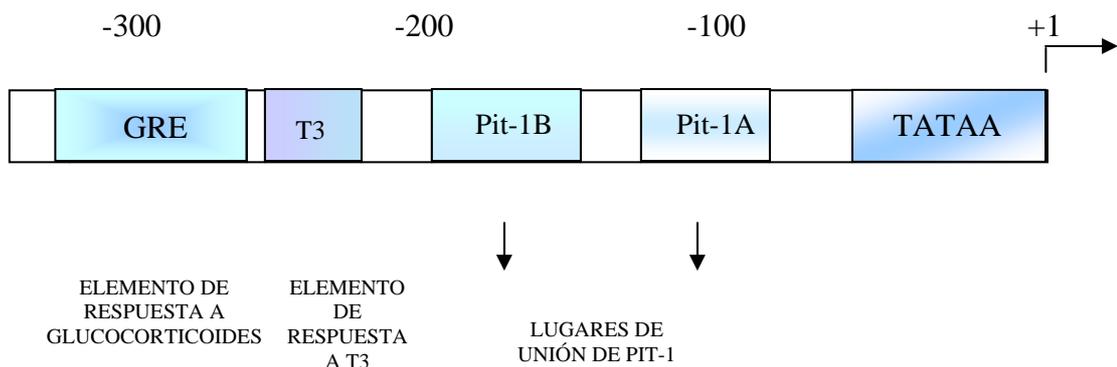
La GH está codificada por un único gen, localizado en el brazo largo del cromosoma 17. Este gen forma parte de una familia de cinco genes relacionados entre sí, que constituyen el denominado cluster de genes GH. Los genes que forman parte de esta familia son: el gen hGH-N (*human Growth Hormone-Normal*) o gen hGH-1; el gen hCS-L (*human Chorionic Somatomammotropin-Like*) o gen hPL-1; el gen hCS-A (*human Chorionic Somatomammotropin-A*) o gen hPL-4; el gen hGH-V (*human Growth Hormone-Variant*) o gen hGH-2 y el gen hCS-B (*human Chorionic Somatomammotropin- B*) o gen hPL-3. El gen hGH-N es el gen que codifica la GH hipofisaria, leucocitaria y, probablemente, la sintetizada en la glándula mamaria; el resto de miembros del cluster se expresan en las células del sincitiotrofoblasto, y codifica las somatotropinas placentarias. Todos los genes de este cluster proceden de un gen ancestral común que probablemente se diversificó por medio de duplicaciones hace aproximadamente 350 millones de años, dando origen a los genes de GH y prolactina (PRL). Posteriores duplicaciones del gen de GH dieron origen al resto de genes de la familia (Theill y Karin, 1993).

Debido a su origen común, todos los miembros del cluster presentan una elevada homología en su secuencia de nucleótidos (superior al 90% tanto en las regiones codificantes como en las reguladoras) y una serie de características comunes: están dispuestos en la misma orientación transcripcional dentro del locus, y muestran una organización similar, con 5 regiones codificantes o exones separados entre sí por 4 intrones. Por último, en todos estos genes se producen una serie de procesamientos alternativos del ARNm, de forma que cada gen codifica varios péptidos, cuyo

significado biológico es, en muchos casos, desconocido. Es ésta la primera de las razones por las que la familia GH presenta una gran heterogeneidad molecular (Karin *et al.*, 1990).

El gen de la hormona de crecimiento, hGH-N, está formado por 2300 pares de bases organizadas en tres regiones (Figura 4):

- Una región 5' no codificante o promotor de alrededor de 500 pb, que contiene los elementos reguladores del gen entre los que se incluyen los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), hormonas tiroideas (TRE), vitamina D y el factor de transcripción Pit-1, uno proximal denominado GH1 o Pit-1 y uno distal GH2 o dPit-1. Trabajos realizados *in vitro* muestran que, probablemente, para la completa activación del promotor sea necesaria la unión de este factor a los dos lugares de unión (Bodner y Karin, 1987).
- Una región que codifica el ARN primario formado por 1600 pb que da lugar a una ARN mensajero constituido por 5 exones.
- Una región 3' no codificante, en la que se encuentra la secuencia de poliadenilación.



**Figura 4.** Estructura del promotor del gen que codifica la hormona de crecimiento humana, en la que se muestran los lugares de unión de distintos elementos reguladores.

Como resultado del procesamiento alternativo del gen hGH-N se origina un ARNm codificante de la forma GH de 20 kDa además de la principal de 22 kDa. En los tejidos diana se origina un tercer grupo de formas moleculares de GH. Tras unirse a sus receptores de membrana, GH es internalizada, y translocada a diversos compartimentos intracelulares, donde puede ser procesada enzimáticamente a formas de menor peso, capaces a su vez de ejercer una acción directa a nivel intracelular o bien pasar al plasma dando lugar a un tercer grupo de formas moleculares de GH de pequeño tamaño y con efectos biológicos diferenciados.

Todas las formas de hGH, al ser un producto de secreción hipofisaria, pueden encontrarse en el plasma, medio en la que la hormona circula, en su mayor parte ligada a dos proteínas transportadoras o GHBP (Growth Hormona Binding Protein), GHBP-1 y GHBP-2 (Baumann *et al.*, 1986). La forma principal es GHBP-1 que se trata de una glicoproteína de 61 kDa, cuya estructura es idéntica a la del dominio extracelular del receptor de GH, ya que aparece en el plasma como resultado de proteólisis del receptor de GH, y transporta sobre todo la forma GH de 22 kDa, aunque también se une a la de 20 kDa pero con menor afinidad. Tras su unión de alta afinidad a la hormona, forma un complejo de 80-85 kDa (Baumann, 1991).

### **3.2. Receptor de la hormona de crecimiento**

El receptor de la hormona de crecimiento (GH-R) es una proteína transmembrana formada por 620 aminoácidos, con un peso molecular de 130 kDa. Está constituida por un dominio extracelular de 246 aminoácidos, un dominio transmembrana de 24 aminoácidos y un dominio intracelular de 350 aminoácidos (Leung *et al.*, 1987). Pertenece a la superfamilia de los receptores hematopoyéticos, implicados en procesos de crecimiento y división celular (Bazan, 1990). El gen que codifica GH-R se localiza en el cromosoma 5.

En cuanto a su distribución, el hígado es el principal órgano de producción, aunque se ha descrito la expresión de GH-R en células embrionarias, células T, células B, monocitos, riñón, hueso, músculo, en regiones cerebrales entre las que se encuentran el hipotálamo, y en la glándula mamaria, donde mediante RT-PCR y Western blot, se ha

demostrado su presencia tanto en tejido normal y tumoral como, en líneas celulares de cáncer de mama entre las que se encuentra la línea celular de adenocarcinoma de mama humano, MCF-7. Mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de GH-R se ha localizado en el citoplasma de las células del estroma y en el epitelio mamario (Gebre-Medhin, 2001).

Mediante un procesamiento alternativo del ARN, que da lugar a dos transcritos que difieren en la presencia o ausencia de 66 pb localizadas en el tercer exón del gen, se originan dos isoformas del receptor de la hormona de crecimiento, siendo una de ellas idéntica a la presente a nivel hepático. En la línea celular MCF-7 se detectan ambas isoformas. Las diferencias estructurales observadas entre las dos isoformas del receptor parecen ser las responsables de las distintas intensidades de la señal de transducción originada al unirse su ligando, GH (Decouvelaere *et al.*, 1995).

### 3.3. Mecanismo de acción

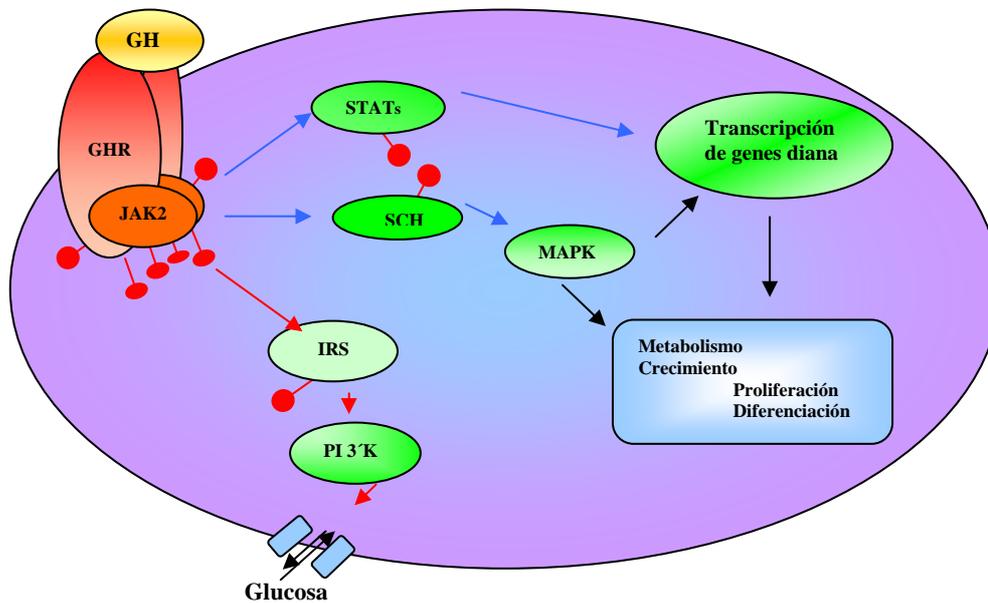
La unión de la hormona a su receptor se produce con una estequiometría 1:2, es decir, una molécula de la hormona debe unirse a dos moléculas del receptor para poder originar un complejo activo. Este modo de unión permite un mayor efecto de la hormona a concentraciones menores de las que serían necesarias para ocupar todos los receptores si la unión fuese 1:1.

El paso inicial tras la unión de la hormona a su receptor es la activación de JAK2, una tirosina quinasa que se asocia físicamente al GH-R tras el cambio conformacional ocurrido en éste por la unión a GH, e induce su fosforilación; seguidamente comienza la fosforilación de una serie de proteínas intracelulares, como las MAP quinasas, las STAT (transductores de la señal y activadores de la transcripción). Tras la unión de la hormona al receptor se activan también otras vías de segundos mensajeros dependientes de proteínas quinasas C y  $Ca^{+2}$  (Argetsinger *et al.*, 1996) (Figura 5).

Se ha observado también que en diversos tipos celulares se produce la

internalización de la hormona junto con el receptor, de tal forma que este complejo actuaría a nivel nuclear (Lobie *et al.*, 1994). Así, la inducción de los efectos biológicos de la GH ocurre al menos mediante dos mecanismos:

- Mecanismo clásico de la generación de segundos mensajeros activados tras la unión de la hormona a su receptor en la membrana plasmática.
- Actuación a nivel nuclear tras la internalización de GH acoplada a su receptor.



**Figura 5.** Cascada de señalización tras la unión de GH a su receptor. (Herrington and Carter-Su 2001).

### 3.4. Efectos fisiológicos de la hormona de crecimiento

Las acciones de la GH pueden dividirse en dos grupos: acciones directas y acciones indirectas.

Los efectos directos son el resultado de la unión de la hormona de crecimiento a su receptor en las células diana. Entre ellos se encuentra la estimulación de la producción de IGF en el hígado y otros tejidos, la estimulación de hidrólisis de

triglicéridos en tejido adiposo, y la estimulación de la producción de glucosa en el hígado (Davidson, 1987). Por otro lado, los efectos indirectos están mediados principalmente por el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) (Figura 6).

El papel más importante conocido de GH es la estimulación del crecimiento corporal activando en el hígado y otros tejidos la secreción de IGF-I, que estimula la condrogénesis y el crecimiento del hueso. Por otro lado, IGF-I actúa sobre la diferenciación y proliferación de los mioblastos, favoreciendo el crecimiento muscular .

La GH además de ser el principal regulador del crecimiento longitudinal en mamíferos, actúa sobre el metabolismo de carbohidratos, de lípidos, el metabolismo del nitrógeno y mineral (Davidson, 1987). Desempeña también un importante papel en el desarrollo de las estructuras linfoides y en el mantenimiento del inmune (Jeay *et al.*, 2002) y en desarrollo del corazón (Lombardi *et al.*, 1997).

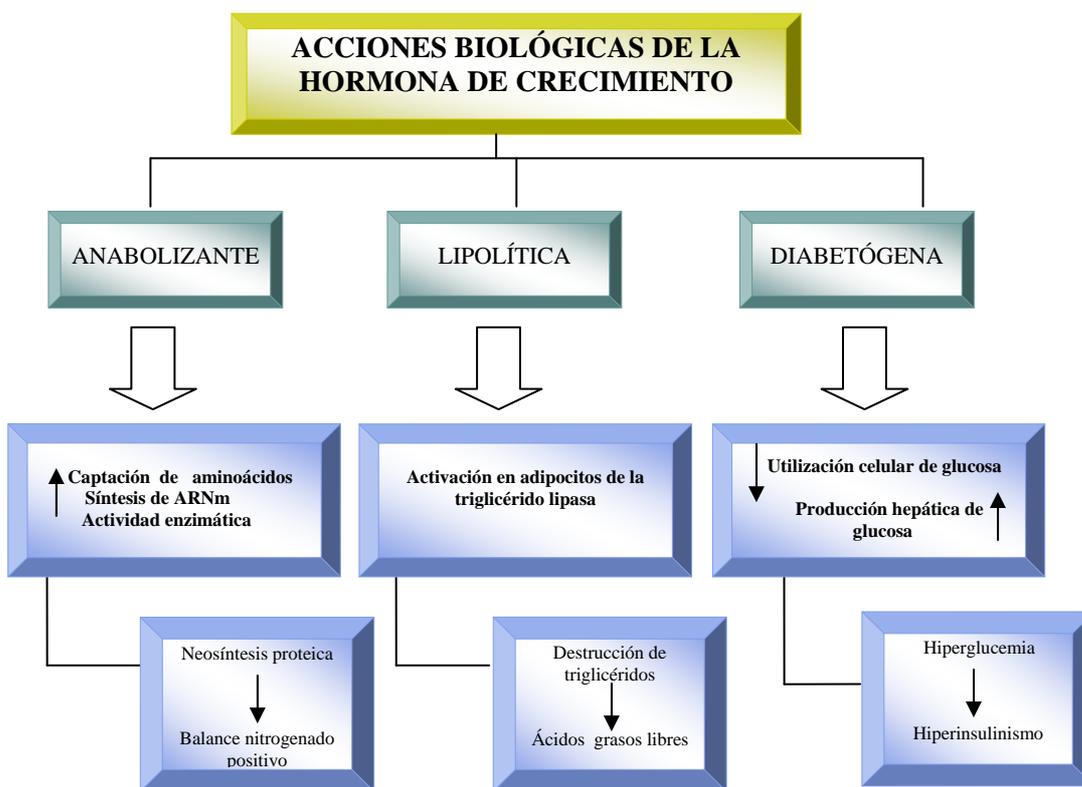


Figura 6. Efectos biológicos de la hormona de crecimiento.

### 3.5. Regulación de la secreción de la hormona de crecimiento

La GH producida por las células somatotropas de la hipófisis anterior, se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso como una prohormona que posteriormente es hidrolizada pasando al aparato de Golgi donde es empaquetada en los gránulos de secreción. La producción de GH está regulada por múltiples factores, incluidos el estrés, el ejercicio, la nutrición, el sueño y la propia hormona de crecimiento. Sin embargo, sus principales reguladores son a nivel hipotalámico: la somatostatina, de carácter inhibitor y la hormona liberadora de la hormona de crecimiento y otra hormona, a nivel estomacal, identificada recientemente y denominada Ghrelin (Figura 7).

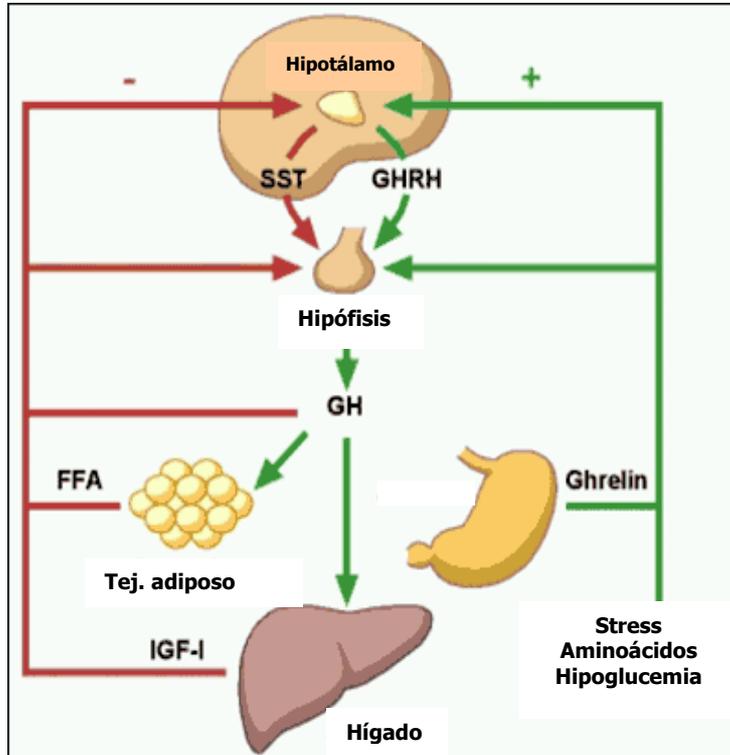
La hormona liberadora de la hormona de crecimiento, GHRH, es un péptido hipotalámico que estimula tanto la síntesis como la secreción de la hormona de crecimiento. La GHRH fue aislada y caracterizada por primera vez en tumores pancreáticos humanos (Guillemin *et al.*, 1982). El gen que la codifica se encuentra en el brazo largo del cromosoma 20, abarca aproximadamente 10 kb y consta de 5 exones. El producto de transcripción es un ARNm de aproximadamente 750 bases cuya traducción da lugar a una proteína inmadura constituida por 107-108 aminoácidos (Mayo *et al.*, 1983). La proteína madura está formada por 44 aminoácidos y es sintetizada en los cuerpos celulares de neuronas secretoras en los núcleos arcuato y ventromedial del hipotálamo. Cuando estas neuronas reciben un estímulo para su secreción, descargan GHRH desde sus terminales a la circulación portal-hipofisaria y por tanto hacia la hipófisis. GHRH se une a receptores, acoplados a la adenilciclase por una proteína G estimulante, en la membrana plasmática de las células somatotropas. La interacción de la GHRH con sus receptores estimula la adenilciclase, aumentando la concentración de AMPc en las células somatotropas. Este aumento activa la proteína-quinasa A que a su vez fosforila proteínas que estimulan la secreción de GH (Muller *et al.*, 1999).

La somatostatina (SS) es un péptido hipotalámico que inhibe la secreción de la hormona de crecimiento en respuesta a GHRH u otros factores estimuladores, como por

ejemplo la baja concentración de glucosa en sangre. Es un péptido de pequeño tamaño, aislado y secuenciado por el grupo de Guillemin en 1973 (Brazeau *et al.*, 1973), a partir de hipotálamos bovinos. El gen codificante se encuentra en el cromosoma 3 y está compuesto por 2 exones separados por un intrón. Tras su descubrimiento se han detectado varias isoformas de SS aunque son dos, SS-28 y SS-14 las biológicamente relevantes. El producto de expresión del gen que codifica la SS es la pre-pro-somatostatina, una molécula de 116 aminoácidos que da origen a una prohormona, la pro-somatostatina (proSS). La proSS, que consta de 92 aminoácidos, con un peso molecular de 10,3 kDa, da origen a dos péptidos distintos, la SS-28 y SS-14. Aunque se ha detectado expresión de SS en varias partes del hipotálamo, las neuronas que la sintetizan son especialmente abundantes en la región paraventricular anterior. Los axones de estas células terminan en las redes capilares que constituyen la circulación portal-hipofisaria, donde liberan la somatostatina a la sangre (Muller *et al.*, 1999). La somatostatina se une a receptores en la membrana plasmática de las células somatotropas inhibiendo la expresión de GH. Estos receptores, al igual que los de GHRH, están acoplados a la adenilciclase, pero mediante una proteína G inhibidora. La interacción de la somatostina con su receptor inhibe la acción estimulante de GHRH sobre la adenilciclase, disminuyendo la producción de AMPc, y como consecuencia, GHRH no puede estimular la secreción de GH. Existe otra vía de inhibición en la que tras la unión hormona-receptor se reduce la entrada de  $Ca^{+2}$ , hiperpolarizándose la membrana e impidiendo la secreción.

Ghrelin es una hormona peptídica, secretada mayoritariamente en células epiteliales del estómago, que se une a su receptor en las células somatotropas de la hipófisis anterior estimulando la secreción de la hormona de crecimiento. Fue aislada a finales del año 1999 por Kojima y colaboradores en el estómago de rata y posteriormente en humanos. Se trata de un péptido formado por 28 aminoácidos que posee además importantes acciones sobre la ingesta. Su expresión se ha detectado en tejidos tales como: hipófisis, hipotálamo, intestino delgado, intestino grueso, ovario, testículo y corazón (Kojima *et al.*, 1999, Korbonits *et al.*, 2001). En humanos se ha

demostrado su expresión en placenta (Gualillo *et al.*, 2001), células del sistema inmune (Hattori *et al.*, 2001) y próstata (Jeffery *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Regulación de la secreción de la hormona de crecimiento.

Además de estos tres principales reguladores de la expresión de la GH, existen otros moduladores, como neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas (glucocorticoides, hormonas tiroideas, leptina, glucosa...) y el factor de crecimiento tipo insulina, IGF-I. Elevados niveles en sangre de IGF-I disminuye la secreción de la hormona de crecimiento, no sólo ejerciendo su acción directamente sobre las células somatotropas, inhibiendo la acción estimulante de la GHRH, sino también estimulando la liberación de somatostatina e inhibiendo la secreción de GHRH a nivel hipotalámico.

Sin embargo, para la activación del gen de la GH es necesaria la presencia del factor de transcripción hipofisario-1 (Pit-1 o GHF-1)

#### 4. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HIPOFISARIO-1 (Pit-1/GHF-1)

Los factores de transcripción son proteínas que se unen a elementos reguladores localizados en la región promotora del ADN estimulando o inhibiendo la transcripción génica. Concretamente, la activación específica de los genes de GH, prolactina y la subunidad  $\beta$  de TSH en tres tipos celulares específicos, somatotropas, lactotropas y tirotropas respectivamente, requiere la presencia del factor de transcripción Pit-1 (Castrillo *et al.*, 1991, Li *et al.*, 1990). Pit-1, desempeña además, una función importante en la diferenciación celular durante el desarrollo de la hipófisis (De la Hoya *et al.*, 1998). En 1988 fue aislado y secuenciado por primera vez por dos grupos de investigación independientes (Bodner *et al.*, 1988; Ingraham *et al.*, 1988).

##### 4.1. Estructura

El gen que codifica el factor de transcripción Pit-1, conocido también como GHF-1, se localiza en humanos, en el cromosoma 3p11. Está formado por seis exones, constituidos a su vez por un número variable de pares de bases, que oscilan desde 61 que conforman el exón 5, hasta 225 pb del exón 3 (Ohta *et al.*, 1992).

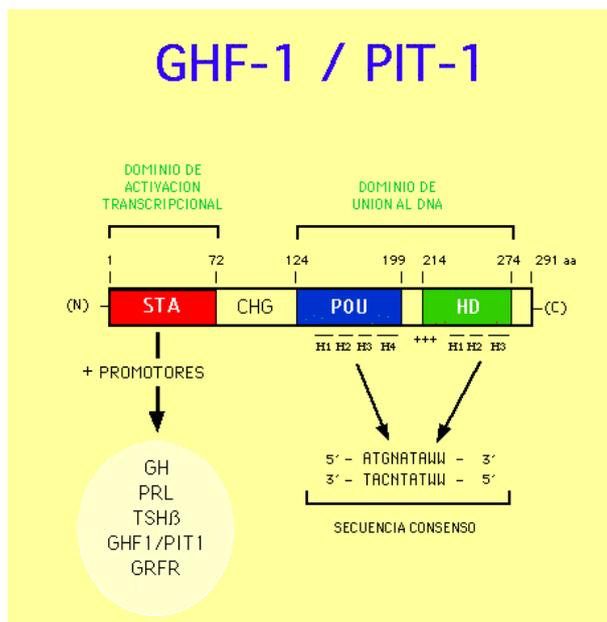
Pit-1 pertenece a la familia de proteínas POU, caracterizadas por la presencia de una región altamente conservada conocida como dominio POU. Este dominio es una región constituida por 155-162 aminoácidos que se divide a su vez en dos regiones, el homeodominio POU (POU<sub>DH</sub>), formado por 60 aminoácidos y el dominio POU específico (POUs), constituido por 75-82 aminoácidos. Ambas regiones permiten la unión de la proteína al ADN con una elevada afinidad y especificidad (Figura 8).

Dentro del gen que codifica para Pit-1 se han descrito dos lugares de inicio de la transcripción dando lugar a dos variantes de ARN mensajero de Pit, Pit-1 y Pit-2 y en función de dónde comience la traducción se originan a su vez dos isoformas de Pit-1.

- **Pit-1** es una proteína formada por 291 aminoácidos. Dentro de su secuencia se distinguen dos codones de inicio de la traducción, dando lugar a dos proteínas de

distinto peso molecular, 33 kDa y 31 kDa. Ambas difieren en la presencia o ausencia de 27 aminoácidos entre la primera y segunda metionina en la secuencia aminoacídica primaria. La isoforma de 33 kDa es la más abundante, encontrándose en una relación 2:1 con respecto a la de 31 kDa (Voss *et al.*, 1991).

- **Pit-2**, también llamada GHF-2, Pit-1a o Pit-1 β. Se origina como consecuencia de un procesamiento alternativo del ARN, en concreto del primer intrón (Theill *et al.*, 1992). El ARN mensajero que codifica para Pit-2 es igual que el que codifica para Pit-1 pero con una inserción de 78 pb entre el primer y segundo exón, añadiendo 26 aminoácidos en el dominio de transactivación, región rica en serina y treonina, tras el aminoácido en posición 47. Por tanto, la isoforma Pit-2 es una proteína formada por 317 aminoácidos alcanzando un peso molecular de 36 kDa (Voss *et al.*, 1991; Konzak *et al.*, 1992; Delhase *et al.*, 1995). En hipófisis de rata, esta isoforma de Pit activa la expresión del gen de la GH pero no activa los genes de PRL y la subunidad β de TSH, a diferencia de lo que ocurre con la isoforma Pit-1 que activa los tres genes (Ohta *et al.*, 1992; Vila *et al.*, 1993; Sanno *et al.*, 1996). Esta isoforma se encuentra en la mismos tipos celulares que Pit-1 sin embargo es menos abundante que Pit-1, encontrándose aproximadamente en una relación 7:1 con respecto a Pit-1.



**Figura 8.** Estructura proteica de Pit-1. Se distinguen cuatro dominios estructurales:  
 STA: Responsable de la actividad transcripcional.  
 CHG: Interviene, probablemente en la actividad transcripcional.  
 POU y HD: intervienen en la unión específica al DNA.

## 4.2. Pit-1 y su papel fisiológico

Estudios realizados por Castrillo y colaboradores en el año 1991 describen el papel de Pit-1 sobre la proliferación de células hipofisarias. Utilizando oligonucleótidos antisentido diseñados sobre la secuencia que codifica Pit-1, no sólo bloquean la expresión de los genes de GH y PRL sino que, también inhiben la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en células somatotropas y lactotropas, sugiriendo que Pit-1 regularía la replicación del ADN y la proliferación celular. Además, presenta una función determinante en la diferenciación celular durante el desarrollo de la hipófisis anterior ya que ha observado una gran correlación espacio-temporal entre la expresión de Pit-1 y la activación de los genes de GH y PRL.

La principal función de este factor de transcripción es la activación de los genes que codifican la hormona de crecimiento, prolactina y la subunidad  $\beta$  de TSH. Ratones enanos “*Snell*” y “*Jackson*”, con mutaciones en el gen de Pit-1 muestran una deficiencia en estos tres genes a la vez que, presentan una hipófisis anterior hipoplásica (Camper *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1990; Voss y Rosenfeld, 1992).

Otro gen regulado por Pit-1 es el gen que codifica el receptor de la hormona liberadora de GH, GHRH-R (Lin *et al.*, 1992), que juega un importante papel en el desarrollo y proliferación de adenomas hipofisarios, estimulando la producción de GH. Por tanto, Pit-1 presenta una implicación indirecta sobre la proliferación celular a través del efecto mitogénico de GH (Osamura *et al.*, 2004).

En humanos la expresión de Pit-1 ya se detecta a las seis semanas de gestación y se localiza específicamente en tres tipos celulares de la adenohipófisis, células somatotropas, lactotropas y tiotropas (Puy y Asa 1996). El grupo de Friend detecta, mediante Northern blot, la expresión de Pit-1 en tumores hipofisarios humanos secretores de GH, PRL y TSH (Friend *et al.*, 1993), aunque es Pelligrini y colaboradores quienes observan una mayor expresión de Pit-1 en tumores hipofisarios secretores de GH, PRL y TSH en relación al tejido normal y que, tanto este tejido como el neoplásico expresan la isoforma de Pit-1 $\beta$ , originada por procesamiento alternativo del ARN (Pellegrini *et al.*, 1994). Además, mediante estudios de hibridación in situ, se

observa que la expresión de Pit-1 en tumores está correlacionada con la expresión de GH, PRL y TSH (Asa *et al.*, 1993).

Existen varias mutaciones en el gen que codifica para Pit-1 responsables del denominado déficit combinado de hormonas hipofisarias, CPHD (*Combined Pituitary Hormone Deficiency*) presente en humanos. Muchas de estas mutaciones están localizadas en el dominio POU de Pit-1, implicado en la unión al ADN, y sólo dos se localizan en el dominio de transactivación de dicho gen. En ambos casos lo que se origina son niveles de GH, PRL y TSH inferiores a los normales (Radovick, 1992; Reynaud *et al.*, 2004).

## **5. GH Y Pit-1 EXTRAHIPOFISARIO**

### **5.1. GH extrahipofisaria**

Tradicionalmente, la expresión de la GH se localizaba en las células somatotropas de la hipófisis anterior. Sin embargo, en los últimos años se ha observado su expresión en tejidos extrahipofisarios como en células endoteliales (Wu *et al.*, 1996), fibroblastos (Palmetshofer *et al.*, 1995), timocitos (Maggiano *et al.*, 1994), células del sistema inmune como macrófagos, células B y linfocitos T (Weigent *et al.*, 1991), en la línea celular de leucemia mieloide humana, HL60 (Costoya *et al.*, 1996) y en la glándula mamaria (Mol *et al.*, 1995).

La expresión de GH a nivel de ARNm en tejido mamario humano fue descrita inicialmente por Mol y colaboradores en el año 1995, aunque posteriormente, y mediante técnicas inmunohistoquímicas e hibridación *in situ*, el grupo de Raccurt demuestran la expresión de GH en muestras de tejido mamario normal o patológicas como fibroadenoma, concretamente en las células epiteliales y mioepiteliales que constituyen los ductos. Sin embargo, en muestras tumorales, se observa además síntesis

*de novo* de GH en células del estroma mamario, asociando esta nueva localización a la progresión del cáncer de mama. En este estudio se detecta también una mayor expresión de GH en tejidos tumorales en relación a los niveles presentes en tejido mamario normal (Raccurt *et al.*, 2002).

## 5.2. Pit-1 extrahipofisario

Los estudios iniciales sobre la expresión de Pit-1 localizaban a este factor de transcripción únicamente a nivel hipofisario, por eso fue denominado “factor de transcripción específico de hipófisis” (Bodner y Karin, 1987). Posteriormente la expresión de Pit-1 ha sido detectada en tejidos extrahipofisarios entre los que se encuentran placenta (Lee *et al.*, 1996; Schanke *et al.*, 1997), tejidos linfoides y hematopoyéticos (Delhase *et al.*, 1993) y en la línea celular HL60 (leucemia promielocítica humana) (Costoya *et al.*, 1998).

En todos estos tejidos la expresión de Pit-1 parece estar asociada a la expresión de GH, lo cual, parece indicar que al igual que ocurre a nivel hipofisario, Pit-1 podría mediar en la regulación del gen de GH. No obstante, estudios realizados en glándula mamaria de perros tratados con progesterona, los niveles de Pit-1 detectados por Northern Blot eran muy bajos o inexistentes, mientras que los niveles de GH si son detectables, lo que parecía indicar que, Pit-1 era independiente o no era necesario para la transcripción del gen que codifica la hormona de crecimiento (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 1999).

Otra de las funciones descritas para Pit-1 es su efecto estimulador sobre la proliferación celular. Existen dos estudios que reflejan esta función. Uno de ellos, realizado por Castrillo y colaboradores en células hipofisarias, donde la inhibición de la expresión de Pit-1 inhibe la proliferación celular (Castrillo *et al.*, 1991). El otro estudio que refleja una relación entre proliferación y Pit-1, es el realizado en la línea celular HL60, donde la proliferación está asociada a un aumento de la expresión de Pit-1, tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel proteico (Costoya *et al.*, 1998).



### **III. OBJETIVOS**



Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

**Estudio *in vitro*:**

- 1.- Determinar, en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7), la expresión de Pit-1 y GH tanto a nivel de de ARNm como a nivel proteico.
- 2.- Evaluar la regulación de GH por Pit-1 en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7).
- 3.- Determinar el posible papel de Pit-1 sobre la proliferación de las células de adenocarcinoma mamario humano.

**Estudio *in vivo*:**

- 4.- Determinar la expresión del factor de transcripción Pit-1 en glándula mamaria normal y en carcinomas mamaros ductales infiltrantes humanos.



## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. CULTIVO CELULAR**

La línea celular de adenocarcinoma mamario humano, MCF-7, procedente de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC), se cultiva en placas Petri de 90 mm<sup>2</sup> en medio de cultivo esencial (DMEM) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de aminoácidos no esenciales (L-glutamina) a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>.

La rutina del subcultivo consiste en el cambio de medio cada 3 días previo lavado con tampón fosfato salino (PBS). Una vez que las células llegan a un estado de confluencia se recogen con una solución que contiene tripsina-EDTA (Sigma, St Louis, USA) diluida en PBS (1:4) sembrándose alrededor de 10<sup>6</sup> células por placa de 90 mm<sup>2</sup>.

## **2. TEJIDOS HUMANOS**

Las muestras de tejido mamario normal y tumoral, proceden de piezas quirúrgicas obtenidas en el servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Los tejidos tumorales, carcinomas ductales infiltrantes, se seleccionan por su frecuencia clínica. Una parte del tejido se guarda a -80°C para el análisis de ARNm y de proteína, y el resto, se fija en formol tamponado para la realización del análisis inmunohistoquímico. La hipófisis humana procede de una autopsia, mientras que la placenta humana se obtiene en el servicio de Ginecología y Obstetricia del CHUS. El uso de tejidos humanos en este trabajo tiene la aprobación del Comité Ético de Investigación.

## **3. ESTUDIO DEL ARNm**

### **3.1. Extracción de ARN**

Las células MCF-7 cuando llegan a un estado de confluencia se recogen con tripsina-EDTA diluida en PBS en relación 1:4. El precipitado obtenido tras la centrifugación de la suspensión celular durante 5 minutos a 700 rpm, se lava con PBS y

se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones. El precipitado celular se resuspende en TRIZol (Invitrogen, Scotland, UK).

El tejido se homogeniza mecánicamente en un homogenizador (*Polytron*), en 1 ml de TRIZol. La suspensión obtenida se centrifuga durante 10 minutos a 14000 rpm para eliminar fragmentos de tejido no disgregado. A continuación, las muestras se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente y se le añaden 250  $\mu$ l de cloroformo. Tras una fuerte agitación, las muestras se centrifugan a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La superior y transparente, donde se encuentra el ARN, se retira a un tubo limpio y se le añade isopropanol. El precipitado de ARN se obtiene centrifugando las muestras durante 10 minutos a 4°C y 14000 rpm. El sobrenadante obtenido se desecha y el precipitado, una vez seco, se resuspende en agua tratada con DEPC (agua destilada con dietilpircarbonato al 0.1%), y se guarda a -80°C hasta su procesamiento.

Para la cuantificación del ARN se utiliza el espectrofotómetro ajustado a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorción a 260 nm proporciona la cantidad de ácido nucleico y a 280 nm la cantidad de proteína. La pureza del ARN viene dada por el cociente A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, considerándose aceptable una oscilación 1.8-2.

### 3.2. RT-PCR

La síntesis de ADNc (ADN complementario) se lleva a cabo en un volumen total de 30  $\mu$ l, con los siguientes componentes: 2  $\mu$ g de ARN total, 6  $\mu$ l de tampón (5X First Strand Buffer, Invitrogen conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 500 ng de *random primers* (Invitrogen), 20 unidades de inhibidor de RNasa (*RNasin*, GeneCraft, Germany), 400 unidades de M-MLV reversotranscriptasa (Invitrogen). La mezcla se incuba durante 50 minutos a 37°C, 15 minutos 45°C y, finalmente, 5 minutos a 95°C.

5  $\mu$ l de ADNc se amplifican en un volumen total de 50  $\mu$ l bajo las siguientes condiciones: 5  $\mu$ l de tampón de PCR (10X PCR Buffer, GeneCraft que contiene 10 mM

Tris-HCl pH 8.4, 50 KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 25 pM de cada oligonucleótido, 2 unidades de Taq ADN polimerasa (GeneCraft). Los oligonucleótidos se diseñan sobre la secuencia que codifica para ARN mensajero de cada uno de los genes estudiados tal y como se indica en siguiente tabla:

ARNm	Oligonucleótido	Secuencia	Producto
GH	Sentido	5'CCGACACCCTCCAACAGGGA 3'	344pb
	Antisentido	5'CCTTGTCATGTCCTTCCTG 3'	
Pit-1A	Sentido	5'GTGTCTACCAGTCTCCAACC 3'	247pb
	Antisentido	5'ACTTTCCGCCTGAGTTCTTC 3'	
Pit-1B	Sentido	5'GCAACTCTGCCTCTGATAATG 3'	295pb
	Antisentido	5'CCACCAATTTACTTTTCCGCC 3'	
18S	Sentido	5'GTAACCCGTTGAACCCATT3'	131 pb
	Antisentido	5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3'	
IGF-I	Sentido	5'AGCAGTCTTCCAACCCAATTATTT3'	83 pb
	Antisentido	5' AGATGCGAGGAGGACATGGT3'	

Las condiciones de amplificación que se utilizan son las siguientes: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 54°C para Pit-1B, 58°C para Pit-1A, 64°C para IGF-I, 55°C para GH y 60°C para 18S y 72°C durante 1 minuto y 10 minutos de extensión final a 72°C. El número de ciclos utilizado es de 27 ciclos para 18S y 35 ciclos para Pit-1, IGF-I y GH.

Los productos de PCR se visualizan en un gel de agarosa al 1,5% en TAE 1X (TAE 50X: 2 M Trizma Base, 50 mM EDTA, 8 mM ácido acético glacial) teñidos con bromuro de etidio bajo una luz ultravioleta acoplada a un sistema de imagen digital (Molecular Analyst, Biorad) que permite cuantificar la densidad óptica de las bandas.

Los fragmentos obtenidos mediante la PCR se comprueban mediante cortes con los siguientes enzimas de restricción: Mbo II y Pvu II (Promega, UK) para Pit-1 y Bgl II (Promega, UK) para GH.

### 3.3. Secuenciación

El primer paso antes de realizar la secuenciación de los productos PCR, consiste en la purificación de los mismos. Para ello, se utiliza el kit ExoSAP-IT (USB, USA), que contiene un enzima con actividad exonucleasa que elimina todas las cadenas sencillas de los oligonucleótidos, obteniendo únicamente el producto PCR de interés. La reacción se realiza a 37° C durante 15 minutos con otros 15 minutos de inactivación de la actividad enzimática a 80°C.

El proceso de secuenciación consiste en una reacción mediada por una ADN polimerasa (secuencasa) que junto con 5µl de producto purificado, dNTPs marcados y 2µl del oligonucleótido correspondiente (GH/Pit-1), se mantienen durante 15 segundos a 95° C, 15 segundos a 55° C y 1 minuto a 60° C en el *fmol DNA sequencing system* (Promega). Finalmente se purifica este producto de reacción y se somete a una electroforesis capilar.

### 3.4. PCR a tiempo real

Los niveles de ARN mensajero de Pit-1 presentes en la glándula mamaria normal y en los carcinomas ductales infiltrantes de mama y los niveles de ARNm de IGF-I en la línea celular MCF-7 tras la sobreexpresión de Pit-1 se detectan mediante la técnica de PCR a tiempo real en un termociclador fluorescente (LightCycler, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Se utiliza, en la reacción de retrotranscripción 2 µg de ARN. La PCR se realiza en un volumen total 20 µl conteniendo: 2 µl de cada reacción de RT, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada oligonucleótido y 2 µl de LightCycler DNA Master SYBR Green I *mix* (Roche Molecular Biochemicals). Tras la desnaturalización inicial de 95°C durante 30 s, las condiciones de amplificación utilizadas son: desnaturalización a 95°C durante 15 s, hibridación a 60°C para 18S, 58°C para Pit-1 y 64°C para IGF-I durante 15 s y

extensión a 72°C durante 15 s. Para confirmar los productos obtenidos las muestras se enfrían a 42°C y se aumenta la temperatura a 95°C. La emisión de fluorescencia de cada ciclo es monitorizada y se cuantifica usando un método derivado del *software* de LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). Los niveles de Pit-1 e IGF-I se normalizan respecto a los niveles obtenidos de 18S.

## **4. ESTUDIO DE LA PROTEÍNA**

### **4.1. Extracción de proteína**

Las placas de cultivo se lavan tres veces con PBS frío. A continuación, se despegan con 100 µl de SDS al 1% a 95° C. Los extractos celulares se pasan a un tubo limpio y se incuban durante 5 minutos a 95°C, finalmente se vuelven a incubar en hielo durante 20 minutos con 500 µl de tampón de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% SDS, 10% glicerol, 1% Tritón X-100), al que se adicionó en fresco 10mM NaVO<sub>4</sub>, aprotinina 50mg/ml y 4 mM PMSF. Tras un breve sonicado, las muestras se centrifugan a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas que se cuantifican mediante el método de Bradford.

El tejido de glándula mamaria normal y carcinomas mamarios se homogeniza mecánicamente en *polytron*, en 1 ml de tampón de lisis. El homogenado se mantiene 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugan durante 10 minutos a 4°C y 14000 rpm. El sobrenadante obtenido contiene las proteínas que se cuantifican mediante el método de Bradford.

### **4.2. Inmunoprecipitación**

La cantidad de proteína utilizada en la inmunoprecipitación procedente de la línea celular MCF-7 y tumores mamarios es de 1.5 mg de proteína mientras que para el tejido mamario normal es de 2 mg. A todos ellos se les añadió 1 µg de anticuerpo monoclonal anti-Pit-1 (Transduction Lab. Lexington, KY, USA), incubándose toda la noche a 4°C en un agitador orbital. A continuación, se añadieron 30µl de una suspensión de proteína –G -Sepharosa (Amersham Pharmacia, Sweden) que se va a unir

al anticuerpo, incubándose 45 minutos a 4°C y en agitación. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 1 minuto a 14000 rpm y se lavaron 5 veces con tampón HNTG (20mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol y 0,1% triton X-100). Tras la última centrifugación el precipitado obtenido se resuspende en tampón de carga 1X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.1% de azul de bromofenol), se hierve durante 5 minutos, se agita y finalmente se vuelve a centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El sobrenadante resultante contiene las proteínas que van a ser cargadas en el gel de poliacrilamida.

### **4.3. Western blot**

La electroforesis se realiza en geles de SDS-PAGE. El porcentaje de los geles utilizado es del 12% para Pit-1 y del 15% para GH. La cantidad de proteína que se carga en el gel es variable: para la detección de Pit-1 en extractos proteicos de la línea celular MCF-7, en tumores mamarios humanos y en tejido de glándula mamaria normal es el resultado de la inmunoprecipitación, mientras que para la detección de GH en la línea celular se parte de extracto proteico total (80  $\mu$ g). La electroforesis se realiza a 120 V durante 2-3 horas en el tampón de electroforesis que contiene: 25 mM Trizma Base, 192 mM glicina y 0.1% SDS (p/v).

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas se transfirieren a una membrana de nitrocelulosa en una cubeta de electrotransferencia y en tampón de transferencia compuesto por: 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 20% metanol. La transferencia se realiza a 4°C y 0.2 A durante 3 horas.

Para la detección de las proteínas se utiliza un kit de quimioluminiscencia (Tropix, PE Biosystem, Bedford, MA, USA). El protocolo a seguir fue el siguiente: La membrana se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación en solución de bloqueo (0.2% I-Block (p/v) y Tween 20 al 0.1% en PBS). Tras la incubación durante toda la noche en agitación constante con el primer anticuerpo: anti-Pit-1 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, USA) a una dilución 1:1000 y anti-GH policlonal (NIDDK, USA) a una dilución 1:4000 en solución de bloqueo diluida 1:10

con PBS, se hacen 5 lavados de 5 minutos en solución de lavado (0.1% Tween 20 en PBS). A continuación se añade el segundo anticuerpo a una dilución 1:5000, en solución de bloqueo y se dejó incubando 1 hora con agitación constante. Se lava de nuevo 5 veces con solución de lavado y se incuban 2 veces de 8 minutos con tampón de ensayo en agitación. Finalmente la membrana se sumerge en el sustrato quimioluminiscente durante 5 minutos y sin agitación, posteriormente se coloca en un casete autoradiográfico. Los tiempos de exposición variaron según el anticuerpo utilizado.

Las membranas que se rehibridaron con el anticuerpo de  $\beta$ -actina (Sigma), que se utiliza como control interno de carga, se sumergen en la solución de glicina 0.2M pH 2.2, SDS 0.1%, Tween 1% durante 1 hora en agitación constante, y se lavan 3 veces de 8 minutos cada una en solución de lavado, antes de incubar la membrana con la solución de bloqueo.

#### **4.4. Inmunohistoquímica**

Las células se fijan en portas estériles, según el protocolo siguiente: 15 minutos en PBS al 3.7% de formaldehído, 5 minutos en PBS, 4 minutos en metanol a  $-20^{\circ}$  C y 2 minutos en acetona a  $-20^{\circ}$  C. Las muestras de tejido tumoral y tejido normal de glándula mamaria humana son fijadas en paraformaldehído al 4% y tras la obtención de los bloques de tejido se procede a la realización de cortes de 4  $\mu$ m con un microtomo (Microm; Walldorf, Alemania) sobre los que se detecta la expresión de Pit-1. Los cortes se recogen en portaobjetos silanizados (Histobond adhesión Micro Slides, Marienfeld, Alemania) y se dejan secar una noche a  $45^{\circ}$ C. Tras desparafinarlos e hidratarlos se continua con el protocolo. Como pretratamiento se realiza una incubación con tampón citrato sódico 10mM pH 6 en el microondas a 750 wátios durante 20 minutos. Los cortes, una vez enfriados, se lavan dos veces en TBS (Tampón Buffer Salino, 0.05 mol/L pH 7.9 con 0.3 mol/L NaCl). A continuación se incuban con el primer anticuerpo policlonal anti-Pit-1 (X-7, Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:10 y el anticuerpo policlonal anti-GH (Dako, Denmark) diluido 1:100, en función de las muestras a

estudiar, durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo se elimina realizando dos lavados con tampón TBS durante 5 minutos. El método seleccionado para la detección inmunohistoquímica es el *EnVision* que consiste en bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (Merck) durante 10 minutos. A continuación los cortes se lavan dos veces durante 5 minutos con TBS y se incuban con el polímero de dextrano conjugado con Ig de cabra anti – conejo/ratón y con el enzima peroxidasa (*EnVision* peroxidase, Dako; CA) durante 30 minutos. Los cortes se vuelven a lavar dos veces con TBS durante 5 minutos y finalmente se revela con DAB (Merck). Las muestras se lavan con agua destilada y tras la deshidratación, aclarado y montaje se observan al microscopio. Los controles negativos se realizan incubando el primer anticuerpo con su antígeno homólogo, el péptido Pit-1 y GH recombinante respectivamente, en agitación durante toda la noche a 4° C.

#### **4.5. ELISA GH**

Esta técnica permite cuantificar la secreción de hGH por las células de adenocarcinoma mamario al medio de cultivo mediante una reacción colorimétrica. Para ello se prepara, sobre placas de 96 pocillos que contienen el anticuerpo anti-hGH en su superficie, una curva de concentraciones conocidas entre 2 y 50 pg/ml de GH y las muestras que contienen el medio de cultivo de las células en las que se transfectó con el plásmido de expresión de Pit-1, pRSV-hPit-1 durante 24, 48 y 72 horas. Como control se utiliza el medio de las células sin tratar. Se incuban durante 1 hora a 37° C. Tras varios lavados se incuban con el anticuerpo anti-hGH unido a digoxigenin (anticuerpo anti-hGH-DIG) durante 1 hora a 37° C. El exceso de anticuerpo se elimina con un lavado y se le añaden 200 µl de anti-DIG-POD (anticuerpo anti-digoxigenin conjugado con peroxidasa) incubándose durante una hora a 37° C. Finalmente se añade el sustrato *ABST* que cataliza el enzima dando lugar a un producto colorimétrico. Esta reacción se desarrolla entre 15 - 20° C y en agitación. La absorbancia de las muestras se cuantifica en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm.

## 5. PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES

### 5.1. Preparación de bacterias competentes y transformación

Para obtener plásmidos a gran escala es necesario transformar las bacterias con cada uno de ellos. Para ello se realiza un cultivo de las bacterias DH5 $\alpha$  en 5 ml de LB en agitación toda la noche a 37°C. A 100 ml de medio SOB con Mg<sup>+</sup> (bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>) se le añade 1 ml de este medio de cultivo y se incuba, en agitación, a 37° C hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de entre 0.3 - 0.5. El cultivo se reparte en dos tubos y se incuba durante 10-15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspende en 1/3 del volumen inicial de FSB (100 mM KCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 3 mM HAcOCl<sub>3</sub>, 10 mM acetato K, 10% glicerol p/v), y se incuba durante 10-15 minutos en hielo. A continuación, se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos a 4° C y el precipitado obtenido se resuspende en 1/12.5 del volumen inicial de FSB. Se añade 3.5% (v/v) de DMSO y se agita inmediatamente. Tras incubarse en hielo durante 5 minutos a la mezcla se le añade DMSO hasta obtener una concentración final de 7% y se incuba 10-15 minutos en hielo. Finalmente se alicuetean y se guardan a -80° C.

Las bacterias DH5 $\alpha$  competentes se transforman con cada uno de los siguientes plásmidos: pRSVhPit-1 (plásmido de expresión de Pit-1), pRc/pRSV (plásmido sin la secuencia que codifica para Pit-1), pEPuro (plásmido de resistencia a puromicina) y pGL3B-GH<sub>300</sub>, tal y como se indica a continuación: 1 $\mu$ l del plásmido se añade a 100  $\mu$ l de bacterias competentes. La reacción se incuba a 4°C durante 30 minutos seguida de otra incubación a 37° C durante 10 minutos. A cada una de las reacciones se le añaden 250  $\mu$ l de LB y se mantienen en agitación a 37° C durante 45 minutos. Una vez que las bacterias han crecido se siembran en placas de LB-agar con ampicilina y se incuban a 37°C toda la noche en un incubador de bacterias. En las colonias que crecieron se confirma la expresión de cada uno de los plásmidos y se pasa a la obtención a gran escala, utilizando el kit: Maxiprep Jet Star (Genomed, Roche).

## 5.2. Obtención de plásmidos a gran escala

Las bacterias se crecen a 37°C y en agitación durante toda la noche en un volumen de 500 ml de LB - ampicilina (10g/l NaCl<sub>2</sub>; 5g/l extracto de levaduras; 10g/l bacto triptona. La solución se autoclava a 121°C, antes de usarla se le añade el antibiótico, en este caso ampicilina (50mg/ml). A la mañana siguiente se procede a la obtención del plásmido. El primer paso consiste en añadir a la columna 30 ml de tampón equilibrante y se deja drenar por flujo gravitatorio. Las bacterias se recogen tras una centrifugación de 15 minutos a 4000 rpm y a 20° C. El precipitado obtenido se resuspende en 10 ml de tampón de resuspensión hasta obtener una solución homogénea. A continuación se añade 10 ml del tampón de lisis y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se añade 10 ml de solución de neutralización mezclándose inmediatamente por inversión del tubo cinco veces. La mezcla se centrifuga a 7000 rpm, 20°C 15 minutos. El sobrenadante obtenido en el paso anterior se añade a la columna previamente equilibrada. Se deja que el lisado drene por flujo gravitatorio. A continuación se añade 60 ml de la solución de lavado. Finalmente el plásmido se eluye añadiendo a la columna 15 ml de tampón de elución. La precipitación del plásmido se realiza con 10,5 ml de isopropanol, seguida de una centrifugación a 9000 rpm y a 4°C durante 30 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado de ADN plasmídico se lava con etanol al 70% y se vuelve a centrifugar a 9000rpm a 4° C durante 10 minutos. El ADN obtenido se disuelve en 500 µl de TE pH 8.0 (Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA).

## 5.3. Transfecciones

*FuGene* (Roche Biochemicals), un reactivo formado por una mezcla de lípidos disueltos en un 80% de etanol ha sido el método elegido para la realización de las transfecciones. Por cada µg de plásmido transfectado se utilizan 3µl de *FuGene*. En un tubo estéril se hace la mezcla del *FuGene* con DMEM estéril y posteriormente se incuba con el ADN durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se pipetea sobre la placa de cultivo a tratar.

En las transfecciones se utilizan diferentes concentraciones del plásmido de expresión de Pit-1 (pRSVhPit-1), una vez transcurrido el tiempo elegido de tratamiento se extrae ARN y proteína para su análisis posterior.

#### 5.4. Ensayos de luciferasa y $\beta$ -galactosidasa

Tras tripsinizar y contar, las células se siembran en placas de 6 pocillos (150.000 células por pocillo) y se tratan con distintas concentraciones de plásmido pRSV-hPit-1 (100 ng, 250 ng, 500 ng y 1000 ng), 500 ng del plásmido que contiene el promotor del gen de hGH (pGL3B-GH<sub>300</sub>) y 0.3  $\mu$ g del plásmido pRSV- $\beta$ -gal (plásmido con actividad  $\beta$ -galactosidasa) durante 72 horas. Para cada uno de los tratamientos se realizan sus respectivos controles, que contienen el plásmido vacío (pRc/RSV). Una vez transcurridos los tiempos de tratamiento, las células se lavan 2 veces con PBS frío. A continuación se añaden 100  $\mu$ l de tampón de extracción (*Passive Lysis 5X Buffer*, Promega) y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente. Se recoge el lisado celular y se centrifuga durante 5 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante obtenido se utiliza en los ensayos de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa.

Para la realización del ensayo luciferasa se pipetea 20  $\mu$ l de cada muestra y se les añade 35  $\mu$ l de tampón de ensayo (25mM glicilglicina, 15 mM fosfato potásico pH 7.8, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT). A continuación las muestras se colocaron en el luminómetro que inyectó 25  $\mu$ l de solución de luciferina (1mM D-Luciferina, 25 mM glicilglicina, 10 mM DTT) a cada una de ellas. Ésta se preparó diluyendo el stock de luciferina a una concentración de 145  $\mu$ M en glicilglicina 25mM pH 7.8. Finalmente se midió la luz emitida durante 30 segundos.

Para el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se pipetearon 50  $\mu$ l de cada muestra y se les añadió 100  $\mu$ l de tampón Z (60 mM NaPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, se ajustó a pH 7.0) y 40  $\mu$ l de la solución stock de ONPG (tampón fosfato pH 7.0, 4 mg/ml ONPG). Las muestras se colocaron en un baño a 37°C hasta que se observa color amarillo. Una vez que adquieren color la

reacción se detiene añadiendo 100  $\mu$ l/ muestra de 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se mide la absorbancia a 420 nm.

## **6. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN: INCORPORACIÓN DE BrdU.**

Las células de adenocarcinoma mamario humano se siembran sobre discos colocados en placas de 24 pocillos. Sobre ellas se realizan transfecciones con el plásmido de expresión de Pit-1, pRSVhPit-1 y el plásmido de resistencia a puromicina (pEPuro) en una relación 10:1, y posteriormente se tratan con puromicina (1 $\mu$ g/ml) (Sigma; St. Louis, USA). De este modo se pueden seleccionar las células que incorporan ambos plásmidos y observar el efecto del incremento de Pit-1 sobre la proliferación celular en las células que han incorporado el plásmido pRSVhPit-1. Se realiza un tratamiento inicial con 250 ng de pRSVhPit-1 durante 24 horas, 48 horas y 72 horas y se cuantifican los núcleos que han entrado en división. Paralelamente, se realiza otro experimento con distintas concentraciones de plásmido de expresión de Pit-1 (10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 1000 ng.) durante 72 horas. Como control de cada una de ellas se transfecta con el plásmido pRc/pRSV. Una vez transcurridos los tiempos designados para cada experimento las células se incuban durante 30 minutos con una solución 10  $\mu$ M bromodeoxiuridina que será incorporada por las que están en fase S del ciclo celular. A continuación, los discos se lavan con PBS y se fijan durante toda la noche en etanol a 4°C. Se desnaturalizan 2 minutos con una solución 0.07 N de  $\text{Na}_2\text{OH}$ , se lavan 3 veces con PBS y se bloquean durante 15 minutos con una solución 0.5% de BSA y 0.5 de Tween 20 en PBS a temperatura ambiente. Se lavan de nuevo con PBS y se incuban durante toda la noche con el anticuerpo anti-BrdU (BD Biosciences Pharmingen, UK) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo, a 4° C en una cámara húmeda. El exceso de anticuerpo se elimina lavando cada una de las muestras 3 veces con PBS. Finalmente se incuban con el segundo anticuerpo F(ab) IgG FICT (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) en una dilución 1:150 en PBS y DAPI (tiñe los núcleos) en una cámara húmeda durante 45 minutos y en oscuridad. A continuación se realiza un lavado en PBS seguido de otro lavado con etanol al 70%. Los discos, una vez secos, se colocan en un portaobjetos y se analizan en un microscopio fluorescente.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Cada experimento fue realizado al menos tres veces. Los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las medias fueron comparadas utilizando el “t” test o el análisis de la varianza con el test de múltiples comparaciones de Tukey-Kramer o Mann-Whitney. Los datos significativos se indican como \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  o \*\*\* $p < 0.001$  dependiendo del nivel de significación de cada caso.



## **V. RESULTADOS**

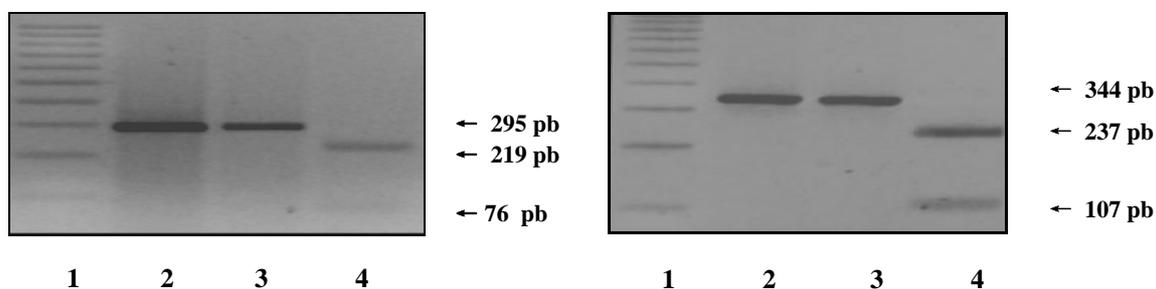
---



## 1. ESTUDIO *in vitro*: LÍNEA CELULAR MCF-7

### 1.1. Detección de ARNm de Pit-1 y GH por RT-PCR

En las células de adenocarcinoma mamario humano se determina la expresión de Pit-1 y GH mediante RT-PCR. El producto obtenido correspondiente a Pit-1 está constituido por 295 pb mientras que el correspondiente a GH está formado por 344 pb. Ambos productos se visualizan en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se confirma que corresponden a los productos amplificados mediante digestión enzimática. Así, el enzima de restricción Mbo II es el utilizado para la digestión del producto de amplificación para Pit-1 dando lugar a fragmentos de 219 pb y 76 pb, tal y como se muestra en la figura 9. En el caso de GH el enzima de restricción seleccionado es Bgl II que da lugar a fragmentos de 237 pb y 107 pb (Fig. 10). Ambos productos de PCR fueron también secuenciados demostrándose que la secuencia amplificada es idéntica a la presente a nivel hipofisario.



**Figura 9.** Detección de ARNm de Pit-1 en la línea celular MCF7 mediante RT-PCR. Calle 1: marcador de pesos moleculares. Calle 2: control positivo (hipófisis humana). Calle 3: línea celular MCF-7. Calle 4: digestión enzimática del producto PCR con el enzima Mbo II, que origina fragmentos de 219 y 76 pb.

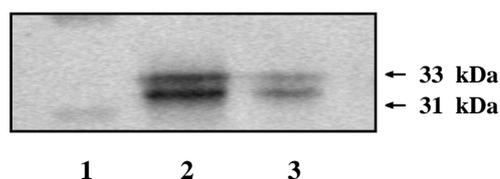
**Figura 10.** Expresión del ARNm que codifica GH en la línea celular MCF-7. En la calle 1 se muestra el marcador de pesos moleculares. Calle 2: control positivo (hipófisis humana). Calle 3: MCF-7. Calle 4: digestión enzimática del producto de PCR por el enzima de restricción Bgl II, dando lugar a dos fragmentos constituidos por 237 y 107 pb.

## 1.2. Expresión proteica de Pit-1 y GH

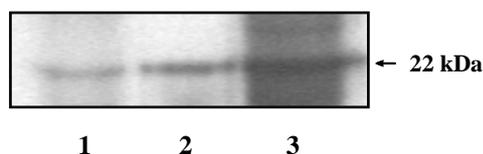
### 1.2.1. Inmunoprecipitación y Western blot

La expresión, a nivel proteico, de Pit-1 se detectó en extractos obtenidos de la línea celular MCF-7 mediante una inmunoprecipitación seguida de Western blot. Tras la inmunodetección se distinguen dos isoformas de Pit-1, una de 33 kDa y otra de 31 kDa originadas por un procesamiento alternativo del ARNm (Voss *et al.*, 1991). Como control positivo se utilizó el extracto proteico obtenido a partir de hipófisis humana (Fig. 11).

La expresión de la hormona de crecimiento en las células de adenocarcinoma mamario humano se determina mediante Western blot. Tras la incubación con el anticuerpo anti-hGH se observa una banda constituida por 22 kDa que corresponde al peso molecular de la GH. Se observa también una banda del mismo peso molecular en los controles positivos utilizados: GH recombinante (Fig. 12, línea 2) y extracto proteico de hipófisis humana (Fig. 12 línea 3).



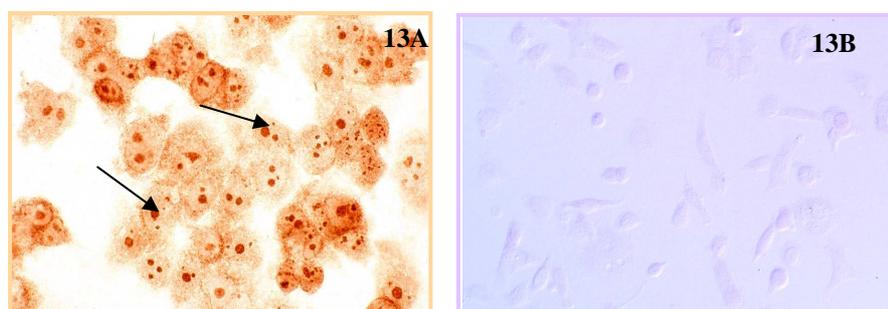
**Figura 11.** Western blot para Pit-1 en el cultivo celular. Calle 1: marcador de pesos moleculares. Calle 2: extracto proteico de hipófisis humana. Calle 3: extracto proteico de la línea celular de adenocarcinoma mamario humano (MCF-7).



**Figura 12.** Western blot para GH. Calle 1: extracto proteico de la línea celular MCF-7. Calle 2: control positivo (GH recombinante humana). Calle 3: control positivo (extracto proteico de hipófisis humana).

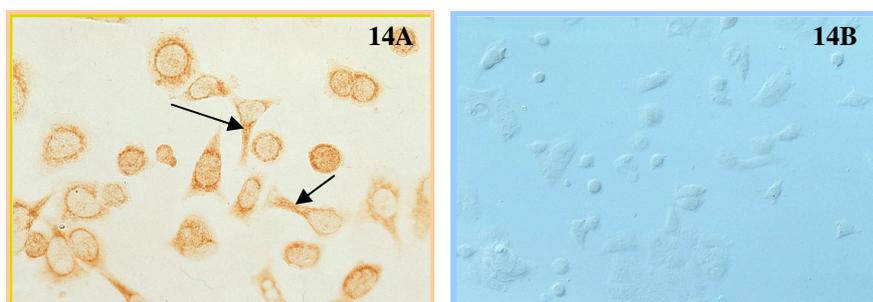
### 1.2.2. Inmunohistoquímica

Los resultados obtenidos mediante PCR y Western blot se confirman por un análisis inmunohistoquímico. Para la inmunoreactividad frente a Pit-1, se observa una señal punteada localizada en el núcleo, concretamente en los nucleolos (Fig.13A). No se observa señal cuando el anticuerpo primario es preabsorbido utilizando su antígeno homólogo, proteína purificada Pit-1 (Fig. 13B).



**Figura 13.** Inmunohistoquímica para Pit-1. **13A:** Detección de Pit-1 a nivel nucleolar (40X). **13B:** Control negativo para Pit-1. El anticuerpo se preabsorbe con su antígeno homólogo, el péptido Pit-1 (20X).

La inmunoreactividad frente a GH en la línea celular MCF-7, tal y como se observa en la figura 14A, se localiza en el citoplasma. No se observa señal cuando el anticuerpo frente a GH se preabsorbe con GH recombinante (Fig. 14B).

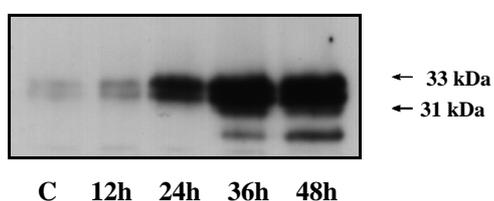


**Figura 14.** Inmunohistoquímica para GH en la línea celular MCF-7. **14A:** Inmunoreactividad para GH. Se observa expresión de la hormona de crecimiento a nivel citoplasmático (40X). **14B:** Control negativo para GH (20X).

### 1.3. Efecto de Pit-1 sobre la expresión de GH en la línea celular MCF-7

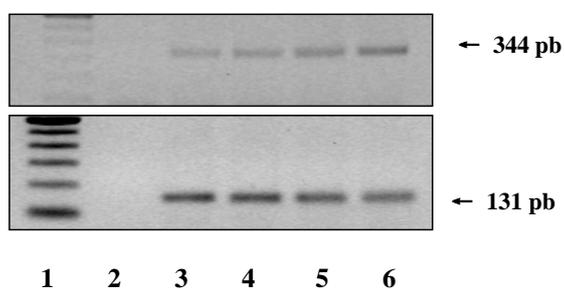
#### 1.3.1. Estudio de la expresión a nivel de ARNm

Tras demostrar la expresión del factor de transcripción Pit-1 y de GH en la línea celular MCF-7 el siguiente paso consiste en determinar si, al igual que ocurre a nivel hipofisario, Pit-1 regula la expresión de la hormona de crecimiento en esta línea celular. Para ello se realiza una transfección con el plásmido de expresión, pRSVhPit-1 y se observa el incremento de Pit-1 a distintos tiempos mediante Western blot (Fig. 15).



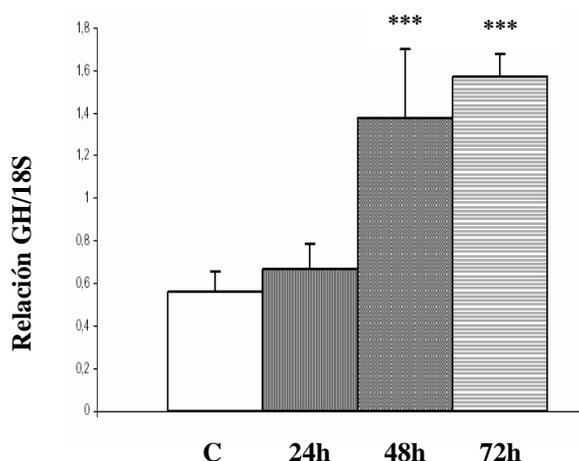
**Figura 15.** IP - Western blot para Pit-1. Se observa un incremento de la proteína Pit-1 en la línea celular MCF-7 transfectada con pRSVhPit-1 durante 12, 24, 36 y 48 horas.

Una vez confirmado el incremento de Pit-1, se realizan tratamientos con el plásmido de expresión de Pit-1 durante 24, 48 y 72 horas y se estudia la expresión de GH por RT-PCR. El producto obtenido, constituido por 344 pb. y secuenciado posteriormente, corresponde a GH (Fig. 16).



**Figura 16.** RT-PCR para GH. El producto de PCR se visualiza en un gel de agarosa y las bandas obtenidas se densitometran. La expresión se corrige utilizando como control interno 18S. Calle 1: marcador de pesos moleculares. Calle 2: control negativo de la PCR. Calle 3: MCF-7 sin tratar. Calle 4, 5 y 6: Células MCF-7 tratadas con Pit-1 durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente.

Los valores obtenidos por densitometría muestran que el incremento de la expresión de GH en la línea celular MCF-7 es significativo, con una  $p < 0.001$  a las 48 horas ( $1.38 \pm 0.32$ ) y 72 horas ( $1.57 \pm 0.11$ ) tras la transfección en relación a las células control, no transfectadas con pRSVhPit-1 ( $0.56 \pm 0.1$ ) y las células tratadas con pRSVhPit -1 durante 24 horas ( $0.67 \pm 0.12$ ) (Fig.17).

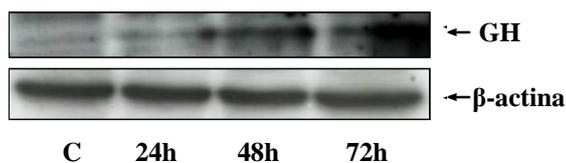


**Figura 17.** Resultados obtenidos tras densitometrar las bandas correspondientes a la expresión de GH en la línea celular MCF-7 transfectada con pRSVhPit-1 en relación a células no tratadas. Se utilizó como control de carga 18S. \*\*\* $p < 0.001$ .

### 1.3.2. Expresión de GH a nivel proteico

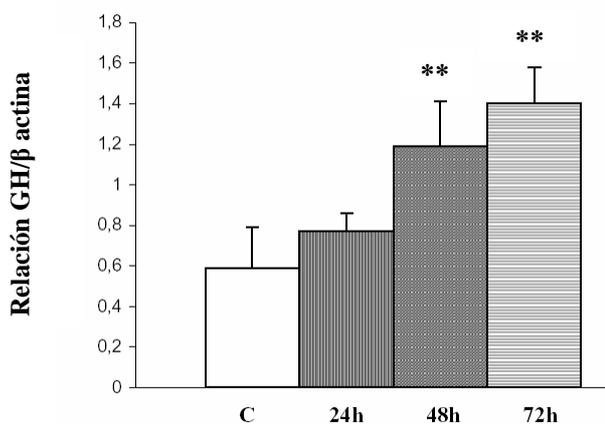
#### 1.3.2.1. Western blot

Para valorar si Pit-1 incrementa los niveles proteicos de GH en la línea celular MCF-7, estas células se transfectaron con el plásmido pRSVhPit-1 y tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento se procede a la extracción de la proteína y posterior análisis de la expresión de GH mediante Western blot (Fig. 18).



**Figura 18.** Expresión de GH en la línea celular MCF-7 tras el tratamiento con pRSVhPit-1. Se utiliza como control de carga  $\beta$ -actina.

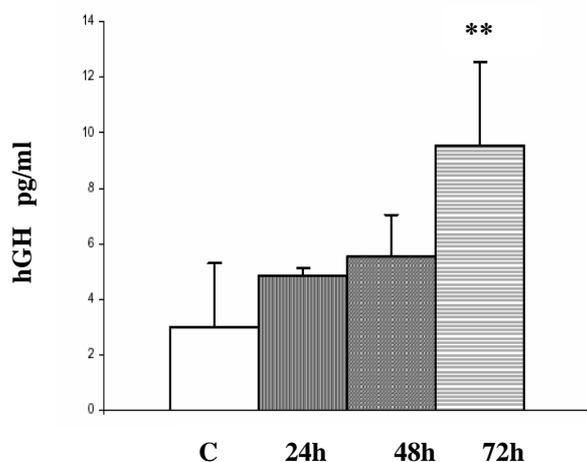
Los valores obtenidos por densitometría muestran un incremento significativo en la expresión de GH a las 48 y 72 horas de la transfección con respecto a las células control (no transfectadas con pRSVhPit-1) con una  $p < 0.01$  (control:  $0.59 \pm 0.2$ ; 24 horas:  $0.77 \pm 0.09$ ; 48 horas:  $1.19 \pm 0.22$  y 72 horas:  $1.4 \pm 0.18$ ) (Fig. 19).



**Figura 19.** Valores obtenidos tras la densitometría del Western blot .  $**p < 0.01$ .

### 1.3.2.2. ELISA GH

Se determina también, mediante la técnica de ELISA, la secreción de la hormona de crecimiento al medio de cultivo tras transfectar las células MCF-7 con pRSVhPit-1. Las células que no sobreexpresan Pit-1, es decir, aquellas que no han sido transfectadas con el plásmido (células control), presentan un bajo nivel de GH en el medio de cultivo, mientras que, cuando son tratadas con el plásmido de expresión de Pit-1 los niveles de hormona de crecimiento en el medio extracelular se incrementan. Así, los valores que se obtienen son los siguientes: control:  $3.01 \pm 2.3$ , 24 horas:  $4.85 \pm 0.28$ , 48 horas:  $5.52 \pm 1.53$  y 72 horas:  $9.52 \pm 3.03$  (Fig. 20).

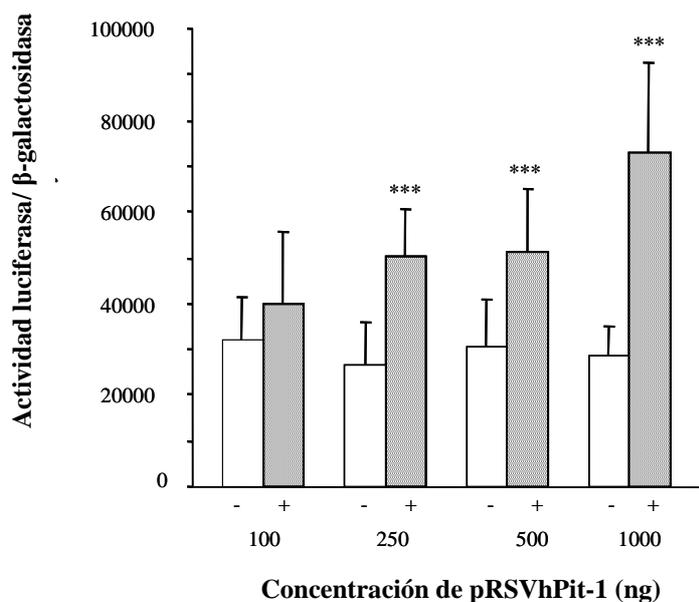


**Figura 20.** ELISA para GH. Las células transfectadas muestran un nivel detectable pero no significativo en la secreción de GH al medio a las 24 y 48 horas, sólo tras 72h de transfección los niveles de GH se ven significativamente incrementados con respecto a los niveles de GH presentes en el medio de cultivo de las células control. \*\* $p < 0.01$ .

### 1.3.3. Análisis de la actividad transcripcional del promotor de GH

Para demostrar que Pit-1 actúa a nivel transcripcional sobre el promotor de GH en la línea celular MCF-7 se realiza una cotransfección con el plásmido pGL3-basic-GH<sub>300</sub>, que presenta la secuencia del promotor del gen de la GH, desde las posiciones -300 a -1, que contiene los dos lugares de unión para Pit-1, unido al gen *reporter* con actividad luciferasa y distintas concentraciones del plásmido de expresión pRSVhPit-1 (100ng, 250 ng, 500 ng y 1000 ng). Transcurridas 72 horas tras la transfección las células se recogen en tampón de lisis y se cuantifica la actividad transcripcional. Como se muestra en la figura 22, se observa un incremento significativo entre células control (no transfectadas con el plásmido pRSVhPit-1), y aquellas transfectadas con 250 ng o concentraciones superiores del plásmido pRSVhPit-1 (Figura 21). Los resultados de tres experimentos independientes se muestran en la siguiente tabla:

	100 ng	250 ng	500 ng	1000 ng
CONTROL	31971,8 ± 9620	26797 ± 9161	30603 ± 10252	28734 ± 6332
TRATADO	40082 ± 15405	50492 ± 10328	51332 ± 13648	73074 ± 19501

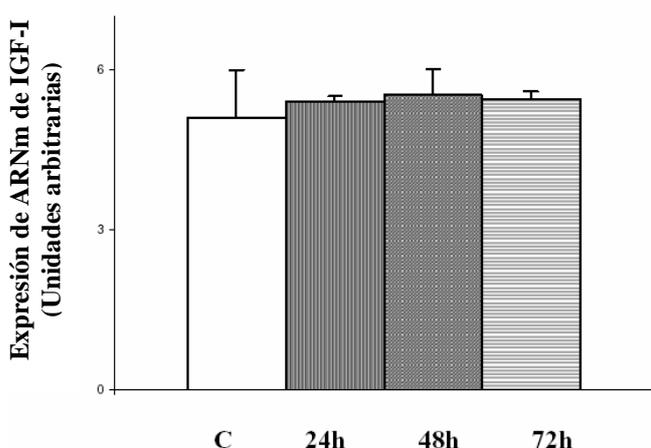


**Figura 21.** Efecto de pRSVhPit-1 sobre la expresión de p-GH<sub>300</sub>Luc. Los resultados muestran una relación dosis-dependiente entre la concentración del plásmido de expresión de Pit-1 y la transcripción de GH. Los datos se expresan la actividad luciferasa corregida con la actividad β-galactosidasa. \*\*\*p<0.001.

#### 1.4. Efecto de Pit-1 sobre la expresión de IGF-I mediante PCR a tiempo real

Para evaluar si Pit-1 incrementa los niveles de IGF-I (directamente o a través de GH), en la línea celular MCF-7, se sobreexpresa Pit-1 durante 24, 48 y 72 horas y se analiza posteriormente la expresión de IGF-I mediante PCR a tiempo real. Los valores obtenidos se corrigen utilizando como control de carga el ARN ribosómico 18S. Tal y

como se muestra en la figura 22, no se observan diferencias entre los niveles de IGF-I entre células control (no transfectadas con el plásmido pRSVhPit-1) y las transfectadas con el plásmido de expresión de Pit-1 (control  $5.1 \pm 0.9$ ; 24 horas  $5.42 \pm 0.09$ ; 48 horas  $5.53 \pm 0.49$  y 72 horas  $5.45 \pm 0.15$ ) (Fig.22).

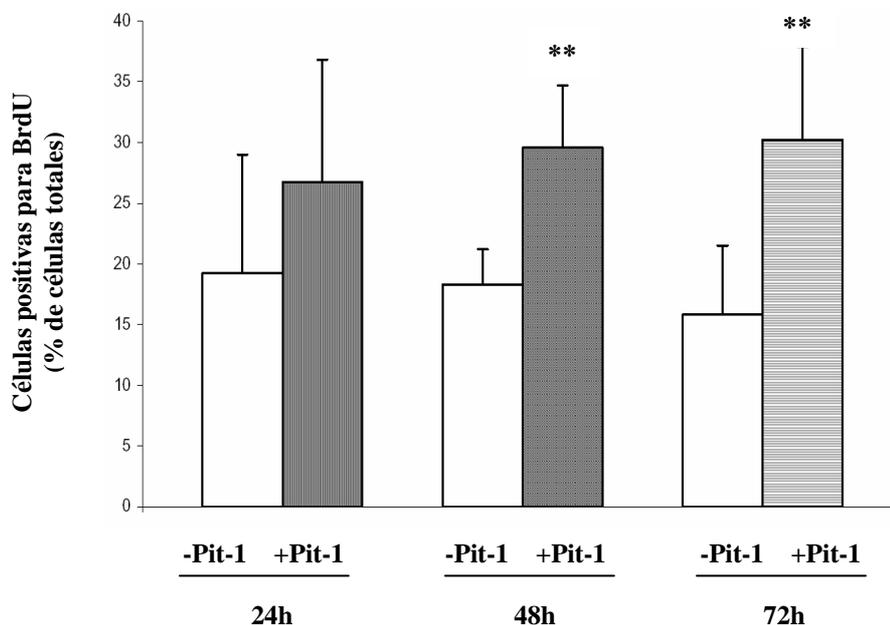


**Figura 22.** PCR a tiempo real para IGF-I. No se observa diferencias entre las células tratadas con el plásmido de expresión de Pit-1 y las células control (no tratadas).

### 1.5. Papel de Pit-1 en proliferación celular

Para determinar el papel de Pit-1 sobre proliferación celular, las células de adenocarcinoma mamario humano se cotransfectan con 250 ng del plásmido de expresión de Pit-1 (pRSVhPit-1) y el plásmido que codifica para puromicina (pEPuro) en relación 1:10, y posteriormente se seleccionan añadiendo  $1 \mu\text{g/ml}$  de puromicina. Se incuban con bromodeoxiuridina, que será incorporada por aquellas células que estén sintetizando ADN, es decir, que estén en fase S. Mediante microscopia de fluorescencia se cuantifican los núcleos en fase S frente a los núcleos totales teñidos con DAPI a diferentes tiempos (24h, 48h, 72h). Se observa un incremento significativo de proliferación celular a las 48 horas ( $18.3 \pm 2.9\%$  vs  $29.6 \pm 5.1\%$ ) y a las 72 horas ( $15.8 \pm 5.7$  vs  $30.2 \pm 7.7$ ) de la transfección, respecto a las células control, transfectadas con

el plásmido pRc/RSV. Mientras que no se observa un incremento estadísticamente significativo tras 24 horas de transfección ( $19.2 \pm 9.8$  vs  $26.7 \pm 10.1$ ) (Fig.23).

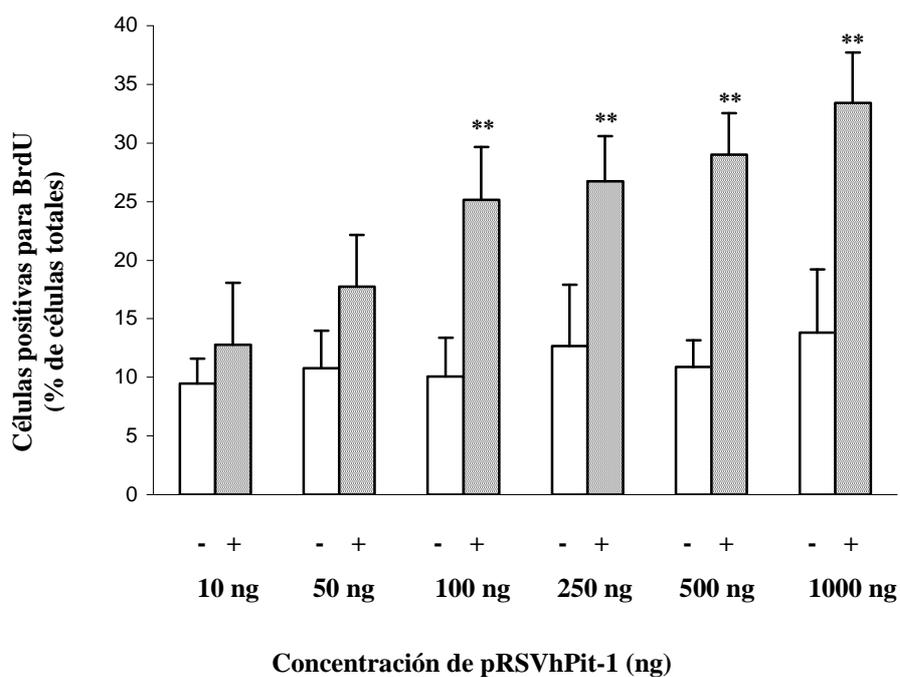


**Figura 23.** Se observa incremento significativo en la proliferación celular a las 48 y 72 horas de transfectar las células MCF-7 con el plásmido pRSVhPit-1 (\*\* $p < 0.01$ ) en relación a las células control tratadas con el plásmido pRc/RSV y seleccionadas posteriormente con puromicina.

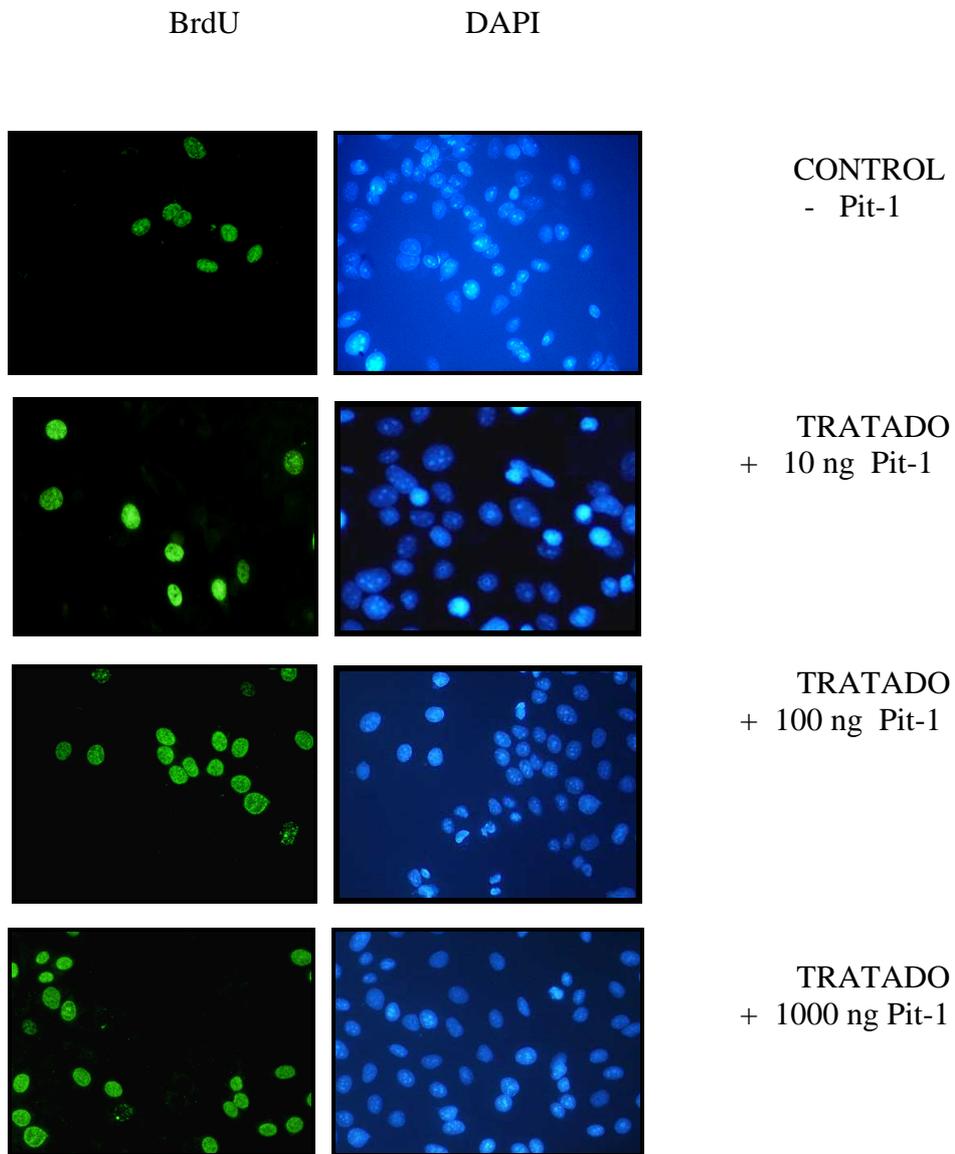
Paralelamente se realiza otro experimento donde se analiza la proliferación celular frente a distintas concentraciones del plásmido (10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng y 1000 ng) durante 72 horas. Como controles se utiliza el plásmido pRc/RSV, es decir, sin la secuencia que codifica para Pit-1. Las células son seleccionadas con  $1\mu\text{g}$  de puromicina y sometidas a un pulso de BrdU durante 30 minutos. Finalmente se procede al conteo de los núcleos totales, teñidos con DAPI y los que son positivos para BrdU (indicador de proliferación) (Fig. 25). Como se muestra en la figura 24, el incremento de proliferación es paralelo al incremento en la concentración de plásmido de expresión de Pit-1.

Los valores obtenidos, controles vs tratados, se muestran en la siguiente tabla:

	CONTROL	TRATADO	
10 ng	9.4 ± 2.1%	12.8 ± 5.3%	
50 ng	10.7 ± 3.2%	17.7 ± 4.4%	
100 ng	10.1 ± 3.3%	25.1 ± 4.5%	p<0.01
250 ng	12.7 ± 5.2%	26.7 ± 3.9%	p<0.01
500 ng	10.9 ± 2.3%	29.0 ± 5.3%	p<0.01
1 µg	13.8 ± 5.4%	33.4 ± 4.3%	p<0.01



**Figura 24.** Como se observa gráficamente, el incremento de la proliferación está correlacionado con un incremento en la expresión de Pit-1, y comienza a ser significativo con un tratamiento de 100 ng de pRSVhPit-1 durante 72 horas. El porcentaje de proliferación se calcula cuantificando el número de núcleos totales, teñidos con DAPI en relación a los núcleos positivos para BrdU (\*\*p<0.01).

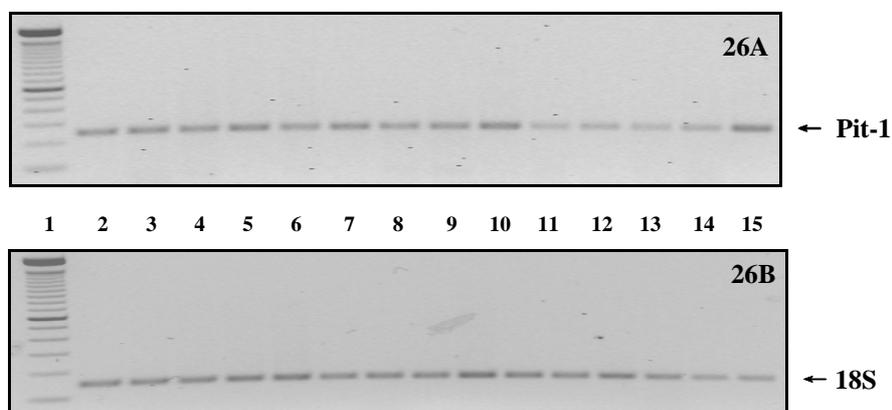


**Figura 25.** En el estudio de la proliferación de cuantifican los núcleos totales, teñidos con DAPI (en azul) en relación a los que han incorporado BrdU (en verde). Imagen representativa de los distintos tratamientos (40X).

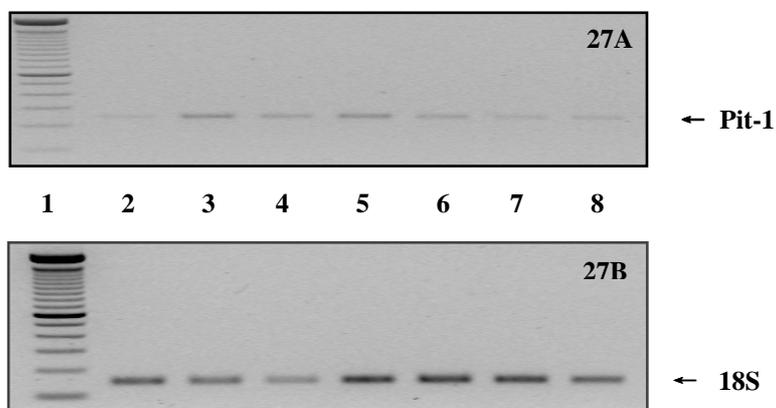
## 2. ESTUDIO *in vivo*: GLÁNDULA MAMARIA NORMAL Y CARCINOMAS DUCTALES INFILTRANTES

### 2.1. Detección de ARNm de Pit-1 por RT-PCR

Estudios anteriores han demostrado que en tejido mamario normal como tumoral humano se expresa GH. Sin embargo, no existe ningún estudio donde analicen la expresión de su principal regulador, Pit-1. Nuestras investigaciones se centran ahora en la determinación de la expresión de este factor de transcripción en muestras humanas de mama normal y carcinomas mamarios tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico. Así, a partir del ARNm del tejido mamario normal y tumores ductales infiltrantes y tras realizar una RT-PCR, el producto obtenido se visualiza en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, observándose una banda constituida por 247 pb correspondiente a la región esperada, tanto en la glándula mamaria normal como en tumores mamarios (Figs. 26 y 27). La secuenciación del producto obtenido por PCR indica que es idéntico al presente a nivel hipofisario. 18S se seleccionó como control de carga.

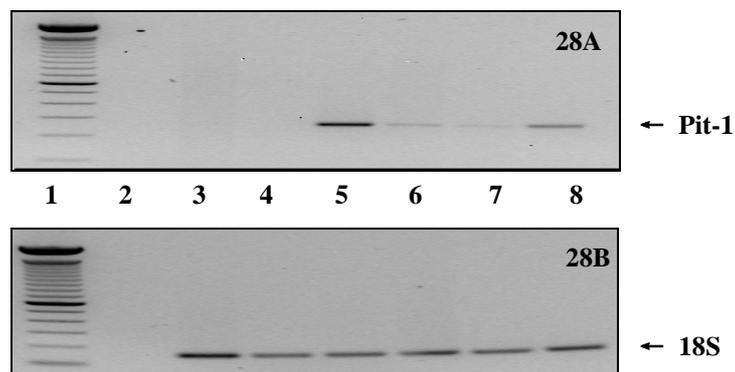


**Figura 26.** Expresión del ARNm que codifica a Pit-1 y a 18S en 14 carcinomas ductales infiltrantes humanos (Figs. **26A** y **26B**). Calle 1: marcador de pesos moleculares (100-1000 pb). Calles 2-15: Productos PCR correspondientes a Pit-1 y 18S en 14 tumores de mama.



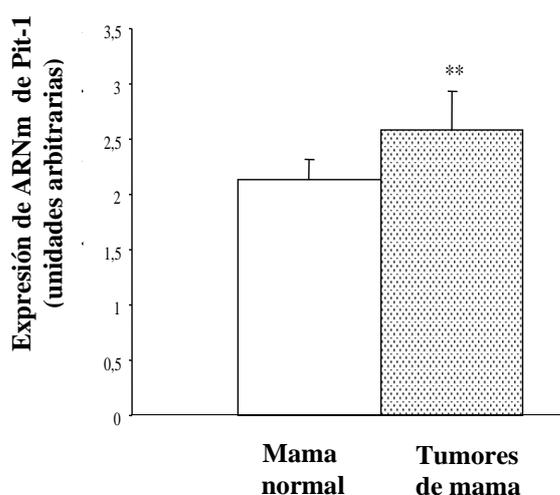
**Figura 27.** Expresión del factor de transcripción Pit-1 en tejido mamario normal humano (Figs. 27A y 27B). Calle 1: marcador de pesos moleculares. Calles 2-8: Producto PCR de Pit-1 y 18S en 7 glándulas mamarias normales.

Como controles positivos de la expresión de Pit-1 en la RT-PCR se utilizaron los siguientes tejidos: hipófisis y placenta humana y como controles negativos: glándula adrenal de rata y la línea celular Saos-2 (osteosarcoma humano). Tras visualizar los productos de PCR en un gel de agarosa se observa una banda de 247 pb correspondiente a Pit-1, en hipófisis y placenta, mientras que en la glándula adrenal de rata y en la línea celular Saos-2 no hay producto PCR (Fig. 28).



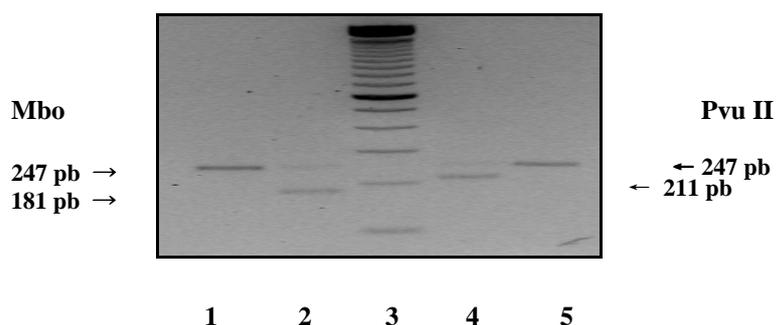
**Figura 28.** Controles positivos y negativos de Pit-1 utilizados en la RT-PCR. **28A y 28B:** Productos PCR para Pit-1 y 18S. Calle 1: marcador de pesos moleculares. Calle 2: control negativo de PCR. Calle 3: línea celular Saos-2. Calle 4: glándula adrenal de rata. Calle 5: hipófisis humana. Calle 6: placenta humana. Calle 7: mama normal. Calle 8: tumor de mama.

Los niveles de ARNm de Pit-1 presente en cada uno de los tejidos se determinaron cuantitativamente mediante PCR a tiempo real, los valores obtenidos se corrigen utilizando como control de carga el ARN ribosómico 18S (Fig. 29). Se observa que la expresión del factor de transcripción Pit-1 es significativamente mayor en el tejido tumoral en relación al tejido normal ( $2.58 \pm 0.36$  vs  $2.14 \pm 0.17$ ,  $**p<0.01$ ).



**Figura 29.** Expresión a nivel de ARNm de Pit-1 en la glándula mamaria normal y en los carcinomas ductales infiltrantes obtenidos mediante PCR a tiempo real. Se utilizó como control de carga 18S.

Para verificar el producto obtenido por PCR correspondiente a Pit-1 en el tejido mamario normal y tumoral se realizó un corte con dos enzimas de restricción (Pvu II y Mbo II) seleccionadas sobre la secuencia amplificada. Tras la digestión enzimática con el enzima Pvu II se obtienen dos fragmentos constituidos por 211 y 36 pb, respectivamente, mientras que el enzima Mbo II origina otros dos fragmentos pero constituidos por 181 y 66 pb. (Fig. 30).



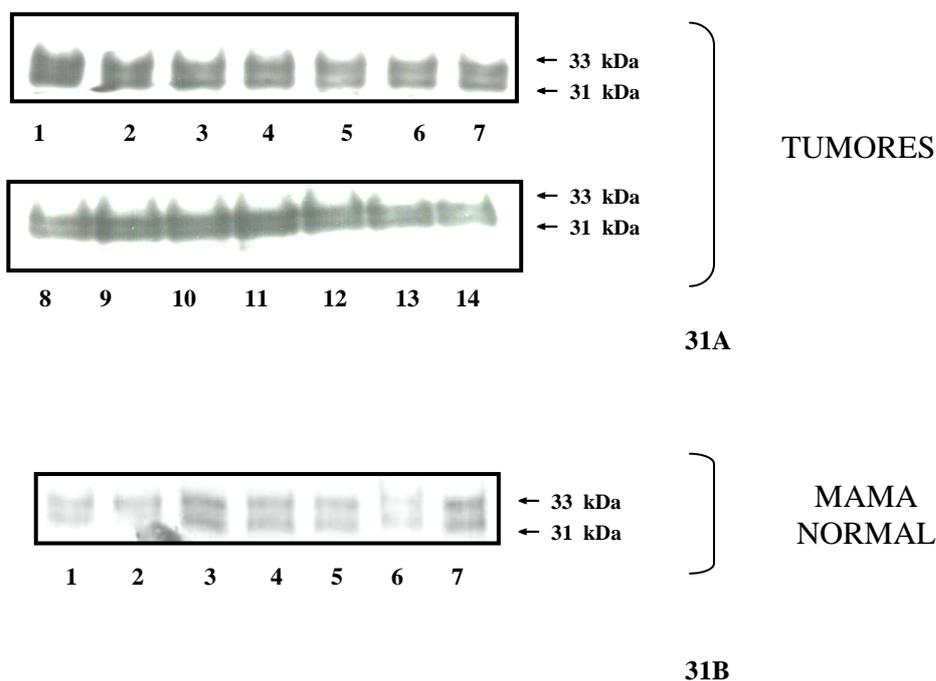
**Figura 30.** Digestión enzimática del producto PCR. Las calles 1 y 5 representan el producto sin cortar. Calle 2: digestión con el enzima Mbo II. Calle 3: marcador de pesos moleculares. Calle 4: digestión con el enzima Pvu II.

## 2.2. Detección proteica de Pit-1

### 2.2.1. Inmunoprecipitación y Western blot

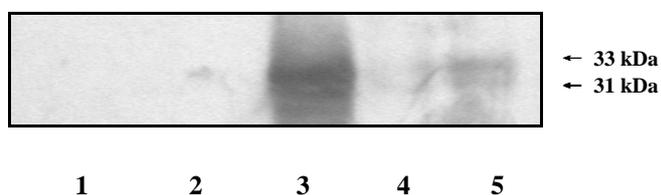
La expresión a nivel proteico de Pit-1 se detectó en extractos obtenidos de tejido mamario normal y carcinomas ductales infiltrantes humanos mediante una inmunoprecipitación seguida de Western blot. En ambos casos se pueden distinguir dos isoformas de Pit-1, una de 33 kDa y otra de 31 kDa originadas por un procesamiento alternativo del ARN (Voss *et al.*, 1991) (Fig. 31).

A pesar de que la cantidad de proteína de la se partió en la glándula mamaria normal es de 2 mg, mientras que en los carcinomas mamarios se utilizó 1.5 mg, se observa una mayor expresión de Pit-1 en los tumores mamarios en relación a la glándula mamaria normal.



**Figura 31.** Inmunoprecipitación - Western blot para Pit-1. Se detectan dos bandas constituidas por 33 y 31 kDa y correspondientes a las dos isoformas de Pit-1. **31A y 31B:** expresión de Pit-1 en 14 carcinomas mamarios ductales infiltrantes y en 7 glándulas mamarias normales.

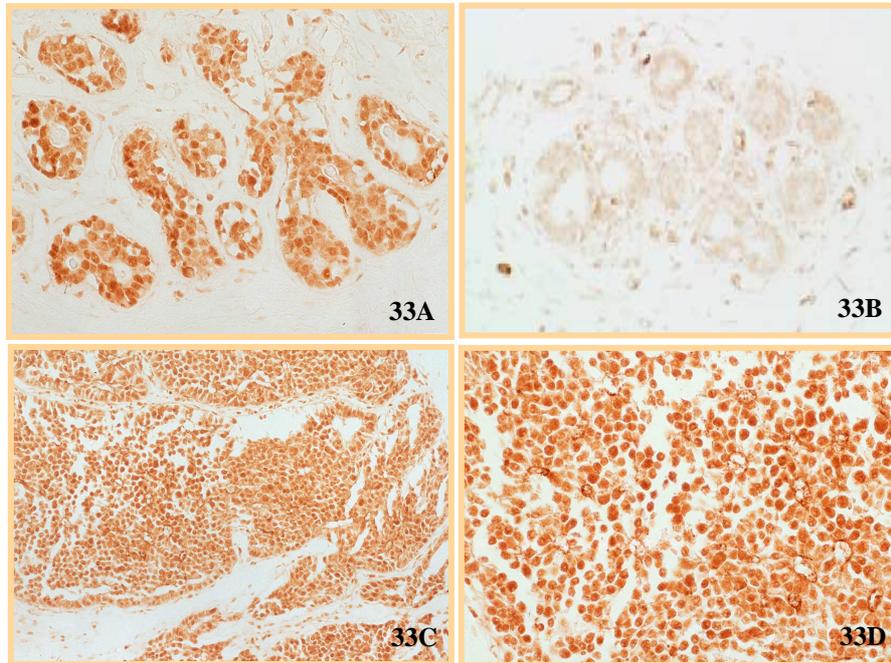
Como controles negativos de la inmunoprecipitación-western blot para Pit-1 se utilizó la proteína obtenida a partir de glándula adrenal de rata y la línea celular Saos-2 y como positivos proteína purificada de Santa Cruz Biotecnology y placenta humana (Fig. 32).



**Figura 32.** Control positivo y negativo de la IP-WB frente a Pit-1. Calle 1: Proteína Saos-2. Calle 2: glándula adrenal de rata. Calle 3: proteína purificada de Pit-1 (Santa Cruz Biotecnology). Calle 4: mama normal. Calle 5: tumor de mama.

### 2.2.2. Inmunohistoquímica

Estudios previos han demostrado que GH se expresa en las células que constituyen los ductos mamarios, por lo que, nuestro siguiente objetivo fue determinar cuales son las células que expresan Pit-1 en la glándula mamaria normal y en tumores de mama. Para ello se realiza un estudio inmunohistoquímico. Así, tras incubar las diferentes muestras de tejido con el anticuerpo anti-Pit-1 y posterior detección mediante el método *EnVision*, se observa que el tejido mamario normal presenta una tinción del núcleo de las células epiteliales y mioepiteliales que constituyen los ductos y alveolos de la glándula mamaria (Fig.33A). Esa misma tinción, a nivel nuclear, se observa también en los carcinomas mamarios ductales infiltrantes (Figs. 33C y 33D). Esta señal desaparece cuando el anticuerpo se preabsorbe con su antígeno homólogo, el péptido Pit-1 (control negativo) (Fig.33B).



**Figura 33.** Inmunohistoquímica para Pit-1.

**33A:** Inmunopositividad para Pit-1 en la glándula mamaria normal. Se observa una tinción nuclear tanto en células epiteliales como mioepiteliales que constituyen los ductos, mientras que el estroma no expresa Pit-1 (40X). **33B:** Control negativo. Se realizó una preabsorción del anticuerpo primario con su antígeno homólogo, proteína Pit-1, y no se observa señal (40X). **33C:** Inmunodetección para Pit-1 en los carcinomas ductales infiltrantes. (20X). **33D:** Se observa en las células tumorales una tinción nuclear. (40X).



## **VI. DISCUSIÓN**



Tradicionalmente, la síntesis de GH se localizaba en las células somatotropas de la hipófisis anterior, actuando como un factor endocrino sobre tejidos periféricos. Posteriormente, se ha demostrado su expresión en tejidos extrahipofisarios humanos, por ejemplo cerebro, tejidos linfoides (Wu *et al.*, 1996), colon, piel, riñón, pulmón y músculo (Kyle *et al.*, 1981; Kao *et al.*, 1992; Kooijman *et al.*, 1997). GH también se expresa en tejidos reproductores como testículos (Untergasser *et al.*, 1997), ovarios (Schwarzler *et al.*, 1997), placenta y glándula mamaria tanto normal como tumores de mama (Mol *et al.*, 1995). En estos tejidos extrahipofisarios, GH ejerce funciones de tipo autocrino/paracrino. Así, GH está implicada en el desarrollo y diferenciación del epitelio mamario (Plaut *et al.*, 1993) ejerciendo su función a través de su propio receptor, GH-R, que también se expresa en células mamarias (Feldman *et al.*, 1993; Decouvlaere *et al.*, 1995). Kaulsay y col. en el año 99, utilizando la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) demuestran que GH incrementa el número de las células mamarias como consecuencia de una activación de la mitogénesis y un descenso de la apoptosis, actuando como un potente estimulador de la motilidad celular. Estas acciones son significativamente más evidentes si GH actúa de forma autocrina, en relación a la administración exógena de esta hormona. Estos efectos los ejerce al unirse a su propio receptor y no al de PRL, ya que si se bloquea el receptor de GH se inhibe la proliferación y motilidad celular (Kaulsay *et al.*, 2001). Debido a la gran homología de los receptores de GH y PRL se activan rutas de señalización muy similares. Así, además de activarse la vía Jun Kinasa 2 y los activadores de transcripción STAT5 y STAT3, se activa también fosfolipasa C y fosfatidil-inositol-3 kinasa. Todas estas rutas incrementan proliferación celular, supervivencia y motilidad. Además, la activación de ERK está implicada en metástasis (Waters y Conway-Campbell, 2004).

Estudios también realizados en la línea celular MCF-7 demuestran que GH autocrina regula la expresión de HOXA1, un potente oncogen necesario para el incremento de la expresión de c-myc, ciclina D1 y Bcl-2 (Zhang *et al.*, 2003). Además, GH regula gadd153 (CHOP) que activa la protección frente a apoptosis (Mertani *et al.*, 2001). Más recientemente, se ha observado que la producción autocrina de GH incrementa los niveles del ARNm que codifica para la subunidad catalítica de la

telomerasa (TERT), inmortalizando las células epiteliales mamarias humanas (Lobie, 2004). La producción autocrina de GH confiere un fenotipo invasivo en células de carcinoma mamario como resultado de la transición epitelio-mesénquima (Mukhina *et al.*, 2004). Todos los datos experimentales reflejados hasta el momento, utilizando la línea celular MCF-7, han sido obtenidos al transfectar estas células con un vector de expresión de GH. Sin embargo, y aunque pueda parecer sorprendente, no existe ningún estudio sobre la expresión endógena de GH por esta línea celular.

Nuestro primer objetivo, por tanto, fue el comprobar si la línea celular MCF-7 expresaba GH. Para ello, a partir de ARN de células MCF-7 y utilizando oligonucleóticos específicos diseñados sobre la secuencia que codifica para GH, amplificamos por PCR una región constituida por 344 pares de bases, que corresponde a GH, tal y como se confirma por análisis con enzimas de restricción específicos. Además, tras secuenciar el producto PCR obtenido, demostramos que es idéntica a la GH producida a nivel hipofisario. Una vez determinada la presencia de GH a nivel de ARNm, analizamos su expresión proteica por Western blot. Nuestros resultados muestran una banda inmunoreactiva de 22 kDa en el extracto proteico de células MCF-7 que corresponde a GH. Para completar el estudio y localizar su expresión en la célula, se realiza una inmunohistoquímica, observándose inmunoreactividad frente a GH a nivel citoplasmático. Al contrario, no se observa señal cuando el anticuerpo es pre-incubado con el antígeno homólogo (GH recombinante), de manera que se elimina cualquier señal inespecífica que pudiese originar un error.

Dado que nuestros resultados indicaban que la línea celular MCF-7 expresaba GH, el siguiente objetivo en nuestro estudio fue el determinar si esta línea celular expresaba también su principal regulador hipofisario, el factor de transcripción hipofisario-1 o Pit-1.

Pit-1, también conocido como GHF-1 (*Growth Hormone Factor-1*), es una proteína que actúa como un factor de transcripción en las células de la hipófisis anterior estimulando la expresión de los genes de GH y PRL, así como de la subunidad  $\beta$  de

TSH, en tres tipos celulares específicos: somatotropas, lactotropas y tirotropas respectivamente. Así mismo, desempeña una función determinante en la diferenciación celular durante el desarrollo de la hipófisis anterior (De la Hoya *et al.*, 1998). Esta proteína se aisló, purificó y secuenció por primera vez a finales de los años 80 de forma simultánea por dos grupos independientes (Lefevre *et al.*, 1987, Nelson *et al.*, 1988). Mientras los primeros defendían la hipótesis de que Pit-1 era el determinante primario de la expresión de GH y que su localización *in vivo* era específica en células de la línea somatotropa, los datos obtenidos por el segundo grupo confirmaban que Pit-1 era capaz de unirse tanto al gen de GH como al de PRL, estimulando la transcripción de ambos genes. Durante algún tiempo, se pensó que se trataba de dos proteínas distintas, debido a la discordancia de resultados entre ambos grupos. Estudios posteriores confirmaron la identidad de ambas proteínas como un solo factor de transcripción que se expresaba en la hipófisis anterior y que es capaz de unirse a regiones reguladoras en el gen de GH y PRL y de la subunidad  $\beta$  de TSH, así como en el propio promotor del gen Pit-1, autorregulando su expresión (González-Parra *et al.*, 1994). Aunque inicialmente, como en el caso de GH, su expresión se localizaba en la hipófisis, también se encuentra en tejidos y líneas celulares extrahipofisarias, entre las que se encuentran placenta humana (Bamberger *et al.*, 1995, Schanke *et al.*, 1997), tejidos hematopoyéticos y linfoides (Delhase *et al.*, 1993), y en la línea celular HL60, leucemia promielocítica humana (Costoya *et al.*, 1998).

Para valorar la expresión de Pit-1 en la línea celular MCF-7, se utilizó el mismo protocolo experimental que en el caso anterior, es decir, se realizó un estudio a nivel de ARNm y a nivel proteico. Utilizando oligonucleótidos específicos, diseñados sobre la secuencia que codifica Pit-1, por medio de RT-PCR se amplifica una región constituida por 295 pares de bases que corresponde, tal y como se confirma por análisis con enzimas de restricción, a Pit-1. La secuenciación del producto PCR nos indica además que el factor de transcripción Pit-1 expresado en células MCF-7 es idéntico al que se expresa en hipófisis. Para determinar su presencia a nivel proteico, se inmunoprecipita el extracto proteico de las células MCF-7 utilizando un anticuerpo monoclonal y

posteriormente se realiza un Western blot con un anticuerpo policlonal, observándose dos bandas correspondientes a las isoformas de Pit-1 (31 y 33 kDa). Nuestros resultados demuestran que esta línea celular expresa Pit-1. Utilizando técnicas inmunohistoquímicas, localizamos su expresión a nivel nuclear.

En resumen, nuestros datos indican que GH y su principal regulador, el factor de transcripción Pit-1, se expresan tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico en células de adenocarcinoma de mama humano, MCF-7, siendo esta línea celular un buen modelo para el estudio *in vitro* de las funciones de GH autocrina, es decir, expresada en la glándula mamaria. Tomando, por tanto, como modelo experimental la línea celular MCF-7, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si, al igual que ocurre a nivel hipofisario, Pit-1 regula la expresión de GH en células de mama.

Si bien a nivel hipofisario la presencia de Pit-1 es necesaria para la expresión del gen que codifica para GH y PRL, el papel que puede jugar Pit-1 en tejidos extrahipofisarios no ha sido muy estudiado y los pocos resultados obtenidos son controvertidos. Así, en algunos casos, la expresión de GH y PRL parece ser independiente de Pit-1 y regulada por otros factores de transcripción (Harvey *et al.*, 2000). Por ejemplo, en células de médula ósea de ratón “*Snell*”, en las cuales Pit-1 presenta una mutación y por tanto no se une al ADN, los niveles de GH son similares a los que se detectan en células de médula ósea de ratones normales (Kooijman *et al.*, 1997). Algo similar ocurre en las células de sarcoma de útero, donde la expresión del gen que codifica para PRL parece ser independiente de Pit-1 (Gellersen *et al.*, 1995). De la misma forma, la expresión de PRL en linfocitos y en endometrio parece ser independiente de Pit-1, a pesar de que existen lugares de unión para Pit-1 en el promotor del gen de PRL extrahipofisario (Melen *et al.*, 1997). Por el contrario, estudios realizados en placenta humana, donde se ha detectado la expresión de GH-V, se observa también (por RT-PCR e inmunohistoquímica) la presencia del factor de transcripción Pit-1 por lo que parece que en este tejido, al igual que ocurre en hipófisis, Pit-1 podría regular la expresión de GH (Bamberger *et al.*, 1995, Schanke *et al.*, 1997). Al igual que en los tejidos mencionados, la relación Pit-1-GH en tejido mamario es controvertida. En estudios realizados en tejido mamario de perros tratados con

progestágenos, se demuestra expresión de ARNm que codifica GH, pero no hay expresión de transcritos que codifican Pit-1 (Lantinga-van Leeuwen *et al.*, 1999). Sin embargo, y sorprendentemente, en tejido tumoral que también se expresa GH, si se detecta la expresión de Pit-1, lo que sugiere que este factor de transcripción podría estar involucrado en la expresión de GH mamaria al menos en tumores.

Nuestra aproximación experimental consistió en transfectar la línea celular MCF-7 con el plásmido de expresión de Pit-1, pRSVhPit-1 (y de esta manera sobreexpresar Pit-1) y valorar entonces los niveles de GH a las 24, 48 y 72 horas. Nuestros resultados demuestran que, tanto a nivel de ARNm (utilizando RT-PCR) como a nivel proteico (por Western blot) se produce un significativo incremento en la expresión de GH. Se valoró también, tras sobreexpresión de Pit-1, la secreción de GH al medio de cultivo (utilizando ELISA), observándose un incremento significativo de GH a las 72 horas de transfección. Para valorar si el mecanismo de acción por el cual Pit-1 incrementaba los niveles de GH era a nivel transcripcional, se realizaron experimentos en los que se co-transfectan las células MCF-7 con el vector de expresión de Pit-1 (pRSVhPit-1) y un vector que contiene la región promotora de GH unido a un gen reportador (pGL3-GH<sub>300</sub>). Nuestros datos indican un incremento dosis-dependiente en la actividad transcripcional de GH, es decir, a medida que incrementamos las concentraciones del Pit-1, se incrementa la respuesta de GH.

En resumen, nuestros resultados indican que en la línea celular MCF-7, Pit-1 incrementa los niveles de GH, tanto de ARNm como proteína. Esta regulación positiva de GH por Pit-1 es realizada a nivel transcripcional.

Una vez demostrada la presencia de Pit-1 en la línea celular MCF-7, nuestro siguiente objetivo fue el realizar un estudio para valorar si Pit-1 se expresaba en glándula mamaria normal y en tumores de mama humanos, concretamente en carcinomas ductales infiltrantes, que son los tumores que presentan una mayor frecuencia clínica.

Por medio de RT-PCR a tiempo real se cuantifica la expresión de este factor de transcripción a nivel de ARNm entre muestras normales y tumores de mama. Nuestros resultados confirman que en ambos tipos de tejido existe expresión de Pit-1, y tras el análisis estadístico de los datos se demuestra que la expresión de Pit-1 es significativamente mayor en tejido tumoral en relación a tejido mamario normal. Del estudio a nivel proteico, mediante una inmunoprecipitación seguida de Western blot se demuestra de la misma forma que la expresión de Pit-1 es mayor en tumores que en mama normal. Para completar el estudio y determinar la localización de la expresión de Pit-1 en estas muestras, se realiza un análisis inmunohistoquímico, que revela que Pit-1 es expresado por las células epiteliales y mioepiteliales que constituyen los ductos mamaros, mientras que el estroma es negativo para Pit-1. Todo ello hace pensar que Pit-1 podría jugar un importante papel en la tumorigénesis mamaria, bien directamente o a través del incremento de la expresión de otros factores, como por ejemplo GH o IGF-1.

La posibilidad de que el factor de transcripción Pit-1 esté implicado en patogénesis tumoral hipofisaria ha sido debatida por varios grupos investigadores. Pellegrini y colaboradores no observan ninguna relación entre la expresión de Pit-1 y tumores hipofisarios (Pellegrini *et al.*, 1994), concluyendo que Pit-1 está sobreexpresado en tumores secretores de PRL y GH en relación con el tipo celular predominante en esos tumores. Sin embargo, otros estudios sugieren que Pit-1 está directamente implicado en proliferación celular hipofisaria y posiblemente en la patogénesis de adenomas hipofisarios (Delhase *et al.*, 1993, Asa *et al.*, 1993, Sanno *et al.*, 1996). Pit-1 ejerce una función determinante en la proliferación de las células somatotropas y lactotropas, tal y como se demuestra en las investigaciones realizadas por Castrillo y colaboradores, en las cuales inhibiendo la expresión de Pit-1 con oligonucleótidos antisentido disminuye la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por las células somatotropas y lactotropas, disminuyendo la proliferación celular (Castrillo *et al.*, 1991). A nivel extrahipofisario, concretamente en la línea celular HL60 (leucemia mieloide humana), se observa un incremento en la expresión de este factor de transcripción paralelo al incremento en la proliferación celular (Costoya *et al.*, 1998).

Durante los últimos años, una serie de estudios epidemiológicos han estudiado la relación entre niveles séricos elevados de GH e IGF-I y un mayor riesgo de padecer cáncer de mama. Emerman y colaboradores fueron los primeros en establecer una relación directa entre mujeres con cáncer de mama y elevados niveles de GH (Emerman *et al.*, 1985). Posteriormente, Peyrat y colaboradores, observaron que las concentraciones de IGF-1 estaban también incrementadas en pacientes con tumores de mama en relación a mujeres sanas (Peyrat *et al.*, 1993). A nivel experimental, el tratamiento con GH a primates jóvenes provoca una hiperplasia mamaria, debido a un incremento de la proliferación de las células epiteliales mamarias (Ng *et al.*, 1997). Sin embargo todas estas investigaciones se centran en los niveles circulantes de estas hormonas sin tener en cuenta el posible papel que pueda desempeñar la secreción autocrina de GH en el desarrollo del tumor, ya que la propia glándula mamaria y tumores humanos, tanto benignos como malignos, expresan GH (Mol *et al.*, 1995). Posteriormente, el grupo de Morel y colaboradores, demuestran la localización de GH en diferentes estadios del tumor. Así, GH en la glándula mamaria normal se expresa en las células epiteliales y mioepiteliales que constituyen los ductos. En una lesión benigna como puede ser un fibroadenoma, la síntesis de GH se localiza en las células epiteliales que están proliferando y observan síntesis *de novo* de GH en el estroma. Ya en un estado muy avanzado, carcinoma mamario metastático, la expresión de GH a nivel de ARNm es mucho mayor que la presente en tejido mamario normal. Los autores concluyen en este estudio que la GH autocrina presenta un papel hiperproliferativo sobre las células epiteliales mamarias. Observan también un incremento en la expresión del GH-R tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico lo que sugiere un efecto autocrino/paracrino de GH sobre la propia glándula mamaria durante el desarrollo del tumor (Raccurt *et al.*, 2002).

Otro de los componentes de este eje que puede presentar gran relevancia en el desarrollo tumoral es IGF-1, que juega un importante papel en la regulación de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y transformación celular. Estimula la

síntesis de DNA y la expresión de ciclina D1, que acelera la progresión del ciclo celular pasando de la fase G1 a fase S. IGF-1 no sólo estimula la proliferación celular sino que también inhibe apoptosis, incrementando la expresión de Bcl2. De esta forma, una combinación de ambos efectos estimularía el desarrollo tumoral (Gooch *et al.*, 1999). En tejido mamario normal, se ha detectado expresión de IGF-1 a nivel de ARNm. Sin embargo, los datos obtenidos en tejido tumoral son contradictorios, mientras que algunos autores indican que la expresión de IGF-I se localiza en células del estroma mamario (Yee *et al.*, 1989), otros investigadores la detectan en las células epiteliales que constituyen los ductos (Mizukami *et al.*, 1990). En cuanto a su expresión, a nivel de ARNm, existen datos que indican que el tejido mamario normal presenta niveles más elevados de IGF-I en relación al tejido tumoral (Voskuil *et al.*, 2004). Con respecto a la expresión de su receptor, IGF-1R, existen datos que indican que se expresa tanto en tejido mamario normal como en tejido tumoral, siendo significativamente mayor en carcinomas (Surmacz *et al.*, 1998). Su expresión se localiza en las células epiteliales que constituyen el ducto, existiendo una gran correlación entre la expresión de IGF-R y el pronóstico de cáncer de mama (Peyrat *et al.*, 1990). Las proteínas que unen IGF-1 también son sintetizadas por tumores mamaros, modulando la actividad local de este factor de crecimiento (Pekonen *et al.*, 1992).

En relación con este último punto, es decir la supuesta vinculación de IGF-1 con cáncer de mama, y una vez demostrado que Pit-1 regula GH, nos planteamos si la sobreexpresión de Pit-1 aumentaría también la expresión de IGF-1. Para ello y tras transfectar la línea celular MCF-7 con el vector de expresión de Pit-1, realizamos una RT-PCR a tiempo real, para valorar los niveles de ARNm que codifican IGF-1. Nuestros resultados demuestran que los niveles de expresión de IGF-1 no varían entre las muestras control (tratadas con el vector vacío) y aquellas en las que se sobreexpresa Pit-1. De nuestros resultados podemos concluir, por tanto, que si bien GH es regulada por Pit-1 a nivel transcripcional, incrementando su expresión, IGF-1 no parece estar bajo el control directo o indirecto de Pit-1, al menos en la línea celular MCF-7.

Dada la implicación del eje Pit-1/GH en tumorigénesis mamaria, nuestro siguiente objetivo fue el determinar el papel de Pit-1 en la proliferación de las células de carcinoma mamario humano. Para ello, tras transfectar las células MCF-7 con distintas concentraciones del plásmido de expresión de Pit-1 (10 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng y 1 µg), observamos la incorporación de bromodeoxiuridina por las células que están en fase S, es decir, en división, tras 72 horas de tratamiento. Los resultados obtenidos indican que la proliferación de estas células está en relación directa con el grado de expresión de Pit-1, de tal forma que a partir de transfecciones a concentración de 100 ng de plásmido pRSVhPit-1 se observa un incremento significativo en la proliferación celular, que se duplica respecto a las células control. Este incremento en la proliferación celular se mantiene al menos hasta los 1000 ng de pRSVhPit-1. Por tanto, y según nuestros datos, se puede concluir que Pit-1 juega un importante papel en la proliferación de las células de adenocarcinoma mamario humano. Este efecto estimulador de Pit-1 sobre la proliferación celular puede ser debido a un efecto directo del propio factor de transcripción o bien mediado por otros factores (como GH, pero no IGF-1), ya que en esta línea celular, como se ha comentado previamente Pit-1 incrementa la expresión de GH y ésta hormona presenta un efecto proliferativo sobre las células mamarias.

Nuestros datos experimentales demuestran que GH y Pit-1 se expresan en la línea celular MCF-7. En esta línea celular, Pit-1 incrementa los niveles de GH pero no de IGF-1 e induce proliferación celular. En tejido mamario humano tanto normal como tumoral, existe también expresión de Pit-1, siendo más elevada en tumores que en glándula normal. El incremento de Pit-1 en carcinomas mamarios podría estar, por tanto, incrementando los niveles de GH en dichos tumores, y ésta hormona, a su vez, podría estar en relación con la adquisición del fenotipo mesenquimático, observado por otros investigadores, en presencia de elevados niveles de GH. Así, ha sido demostrado que una sobreexpresión de GH endógena en la línea celular MCF-7 provoca que las células cancerosas mamarias no invasivas adquieran la capacidad de colonizar órganos distantes, presentando características de las células metastásicas, tal como agrupaciones

celulares múltiples, pérdida del contacto célula-célula y ausencia de adhesión, no observándose este efecto tras la administración exógena de GH (Mukhina *et al.*, 2004). Pit-1 actuaría como un importante factor en el desarrollo y progresión de los tumores de mama, de tal forma que una desregulación de la expresión de Pit-1 aumentaría la expresión de GH (¿y/o PRL?) y por tanto se incrementaría el riesgo de cáncer de mama. El bloqueo de la síntesis de este factor de transcripción, probablemente disminuiría la síntesis de GH (y/o de otros factores dependientes de Pit-1) en la propia glándula mamaria disminuyendo por tanto, la proliferación celular originada por incremento de ambas hormonas o bien directamente por el propio factor de transcripción.

## **VII. CONCLUSIONES**



Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

**Estudio *in vitro* sobre la línea celular MCF-7:**

- 1.- La línea celular MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) expresa el gen que codifica para GH y el factor de transcripción Pit-1.
- 2.- La expresión de Pit-1 se localiza a nivel nuclear, concretamente en los nucleolos, mientras que la expresión de GH es citoplasmática.
- 3.- Al igual que ocurre a nivel hipofisario, el factor de transcripción Pit-1 regula la transcripción del gen de la GH.
- 4.- Dosis crecientes en la concentración del plásmido de expresión de Pit-1 ejercen un efecto proliferativo sobre la línea celular MCF-7.

**Estudio *in vivo*:**

- 5.- La glándula mamaria normal y los carcinomas ductales infiltrantes procedentes de muestras humanas expresan Pit-1, observándose una expresión significativamente mayor en tejido tumoral en relación al tejido normal.
- 6.- Mediante inmunohistoquímica la expresión de Pit-1 en estos tejidos se localiza en los núcleos las células epiteliales y mioepiteliales que constituyen los ductos y alveolos de la glándula mamaria.



## **VIII. BIBLIOGRAFIA**



Ankarberg-Lindgren C., Elfving M., Wikland K.A., Norjavaara E. 2001. Nocturnal application of transdermal estradiol patches produces levels of estradiol that mimic those seen at the onset of spontaneous puberty in girls. J. Clin. Endocrinol. Metab., **86**: 3039-44.

Arai M., Utsunomiya J., Miki Y. 2004. Familial breast and ovarian cancers. Int. J. Clin. Oncol., **9**: 270-82.

Argetsinger L.S, Carter-Su C. 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. Physiol. Rev., **76**: 1089-107.

Asa S., Puy L., Lew A., Sundmark V., Elsholtz H. 1993. Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator Pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. J. Clin. Endocrinol. Metab., **77**: 1275-1280.

Bamberger A.M., Bamberger C.M., Pu L.P., Puy L.A., Loh Y.P. Asa S.L. 1995. Expression of Pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. J. Clin. Endocrinol. Metab., **80**: 2021–2026.

Baumann G. 1991. Metabolism of growth hormone (GH) and different molecular forms of GH in biological fluids. Horm. Res., **36**: 5-10.

Baumann G., Stolar M.W., Amburn K., Barsano C.P., DeVries B.C. 1986. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. J. Clin. Endocrinol. Metab., **62**: 134-41.

Bazan J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**: 6934-38.

Begg L., Kuller L.H., Gutai J.P., Caggiula A.G., Wolmark N., Watson C.G. 1987. Endogenous sex hormone levels and breast cancer risk. Genet. Epidemiol., **4**: 233-47.

Bodner M., Castrillo J. L., Theill L.E., Deerinck T., Ellisman M., and Karin M. 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. Cell, **55**: 505-18.

Bodner M., Karin M. 1987. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. Cell,**50**:267-75.

Boudreau N. and Bissell M.J. 1998. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. Curr. Opin. Cell Biol., **10**: 640–46.

Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R. 1973. Hypotalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. Science, **179**: 77-9.

Camper S.A., Saunders T.L., Katz R.W., Reeves R.H. 1990. The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. Genomics, **8**: 586-90.

Castrillo J.L., Theill L.E., Karin M. 1991. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. Science, **253**: 197-9.

Castrillo J.L., Bodner M., Karin M. 1989. Purification of growth hormone-specific transcription factor GHF-1 containing homeobox. Science, **243**: 814-17.

Cortez D., Wang Y., Qin J., Elledge S.J. 1999. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. Science, **286**: 1162-6.

Costoya J.A., García-Barros M., Gallego R., Señarís R., Arce V.M., Devesa J. 1998. Correlation of Pit-1 gene expression and Pit-1 content with proliferation and differentiation in human myeloid leukemic cells. Exp. Cell Res., **245**: 132-6.

Costoya J.A., Vidal A., García-Barros M., Arce V., Devesa J. 1996. Expression of the human growth hormone normal gene (hGH-N) in proliferating and differentiated HL-60 cells. Exp. Cell Res., **228**: 164-7.

Couse J.F., Korach K.S. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. Endocr. Rev., **20**: 358-417.

Crowley W.R., Armstrong W.E. 1992. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. Endocr. Rev., **13**: 33-65.

Daughaday W.H. 1989. Growth hormone: normal synthesis, secretion, control and mechanism of action. Endocrinology. W. B. Saunders Co, Philadelphia 568-72.

Davidson M.B. 1987. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. Endocr. Rev., **8**: 115-31.

De la Hoya M., Vila V., Jimenez O., Castrillo J.L. 1998. Anterior pituitary development and Pit-1/GHF-1 transcription factor. Cell Mol. Life Sci., **54**: 1059-66.

Decouvlaere C., Peyrat J.P., Bonnetterre J., Djiane J., Jammes H. 1995. Presence of the two growth hormone receptor messenger RNA isoforms in human breast cancer. Cell Growth Differ., **6**: 477-83.

Deis R.P., Delouis C. 1983. Lactogenesis induced by ovariectomy in pregnant rats and its regulation by oestrogen and progesterone. J. Steroid. Biochem., **18**: 687-90.

DeLeo A.B., Jay G., Appella E., Dubois G.C., Law L.W., Old L.J. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**: 2420-24.

Delhase M., Vergani P., Malur A., Hooghe-Peters E.L., Hooghe R.J. 1993. The transcription factor Pit-1/GHF-1 is expressed in hemopoietic and lymphoid tissues. Eur. J. Immunol., **23**: 951-5.

Delhase M., Vila V., Hooghe-Peters E.L., Castrillo J.L. 1995. A novel pituitary transcription factor is produced by alternative splicing of the human GHF-1/PIT-1 gene. Gene, **155**: 273-5.

De Vita. Cancer: principles & practice of oncology. 1997. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia.

Dong-Le Bourhis X., Berthois Y., Millot G., Degeorges A., Sylvi M., Martin P.M., Calvo F. 1997. Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. Int. J. Cancer, **71**: 42-8.

Emerman J.T., Leahy M., Gout P.W., Bruchovsky N. 1985. Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients. Horm. Metab. Res., **17**: 421-4.

Evans H.M., Long J.A. 1921. The effect of the anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity, and oestrus cycles of the rat. Anat. Rec., **21**: 62.

Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K. J., Wilson J. D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L. 1998. Harrison. Principios de medicina interna. 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana, España. pag. 641-2.

Feldman M., Ruan W., Cunningham B.C., Wells J.A., Kleinberg D.L. 1993. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. Endocrinology, **133**: 1602-8.

Flux D.S. 1954. Growth of the mammary duct system in intact and ovariectomized mice of the CHI-strain. J. Endocrinol., **11**: 223-237.

Friend K.E., Chiou Y.K., Laws E.R. Jr, Lopes M.B., Shupnik M.A. 1993. Pit-1 messenger ribonucleic acid is differentially expressed in human pituitary adenomas. J. Clin. Endocrinol. Metab., **77**: 1281-6.

Fuh G., Wells J.A. 1995. Prolactin receptor antagonists that inhibit the growth of breast cancer cell lines. J. Biol. Chem., **270**: 13133-7.

Flux DS. 1954. Growth of the mammary duct system in intact and ovariectomized mice of the CHI-strain. J. Endocrinol., **11**: 223-237.

Gebre-Medhin M., Kindblom L.G., Wennbo H., Tornell J., Meis-Kindblom J.M. 2001. Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer. Am. J. Pathol., **158**: 1217-22.

Gellersen B., Kempf R., Telgmann R. DiMattia G.E. 1995. Pituitary-type transcription of the human prolactin gene in the absence of Pit-1. Mol. Endocrinol., **9**: 887-901.

Gonzalez-Parra S., Chowen J.A., García Segura L.M., Argente J. 1996. Ontogeny of pituitary transcription factor-1(Pit-1), growth hormone (GH) and prolactin (PRL) mRNA levels in male and female rats and the differential expression of Pit-1 in lactotrophs and somatotrophs. J. Neuroendocrinol., **8**: 211-25.

Gooch J.L., Van Den Berg C.L., Yee D. 1999. Insulin-like growth factor (IGF-I) rescues breast cancer cells from chemotherapy induced cell death an anti-apoptotic effects. Breast Cancer Res. Treat., **56**: 1-10.

Gualillo O., Caminos J., Blanco M., García-Caballero T., Kojima M., Kangawa K., Diéguez C., Casanueva F. 2001. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology, **142**: 788-94.

Guillemin R., Brazeau P., Bohlen P., Esch F., Ling N., Wehrenberg W.B. 1982. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. Science, **218**: 585-7.

Hall J.M., Lee M.K., Newman B. Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science, **250**: 1684-9.

Harvey S., Azumaya Y. Hull K.L. 2000. Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? Canadian J. Physiol. Pharmacol. **78**: 1013–1028.

Hankinson S.E., Willett W.C., Michaud D.S., Manson J.E., Colditz G.A., Langcope C., Rosner B., Speizer F.E. 1999. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. J. Natl. Cancer Inst., **91**: 629–634

Hattori N., Saito T., Yagyu T., Jiang B.H., Kitagawa K., Inagaki C. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. J. Clin. Endocrinol. Metab., **86**: 4284-91.

Herrington J., Carter-Su C. 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. Trends Endocrinol. Metab., **12**: 252-7.

Hofmann W., Schlag P.M. 2000. BRCA1 and BRCA2 breast cancer susceptibility genes. J. Cancer Res. Clin. Oncol., **126**: 487-96.

Humphreys R.C., Lydon J.P., O'Malley B.W., Rosen J.M. 1997. Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development. J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia, **2**: 343-54.

Ingraham H.A., Chen R.P., Mangalam H.J., Elsholtz H.P., Flynn S.E., Lin C.R., Simmons D.M., Swanson L., Rosenfeld M.G. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. Cell, **55**: 519-29.

Jeay S., Sonenshein G.E., Postel-Vinay M.C., Kelly P.A., Baixeras E. 2002 Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signalling pathways. Mol. Cell. Endocrinol., **188**: 1-7.

Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. 2003. The potential autocrine/paracrine roles of ghrelin and its receptor in hormone-dependent cancer. Cytokine Growth Factor Rev., **14**: 113-22.

Kao T.L., Supowit S.C., Thompson E.A., Meyer W.J. 3rd. 1992. Immunoreactive growth hormone production by human lymphocyte cell lines. Cell Mol. Neurobiol., **12**: 483-98.

Karin M., Castrillo J.L., Theill L.E. 1990. Growth hormone gene regulation: a paradigm for cell-type-specific gene activation. Trends Genet., **6**: 92-6.

Kaulsay K.K., Mertani H.C., Lee K.O., Lobie P.E. 1999. Autocrine human growth hormone enhancement of human mammary carcinoma cell spreading is Jak2 dependent. Endocrinology, **141**: 1571-84.

Kaulsay K.K., Zhu T., Bennett W., Lee K.O., Lobie P.E. 2001. The effects of autocrine human growth hormone (hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor. Endocrinology, **142**: 767-77.

Kleinberg D.L. 1997. Early mammary development: growth hormone and IGF-1. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, **2**: 49-57.

Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature, **402**: 656-60.

Konzak K.E., Moore D.D. 1992. Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. Mol. Endocrinol., **6**: 241-7.

Kooijman R., Berus D., Malur A., Delhase M., Hooghe-Peters E.L. 1997. Human neutrophils express GH-N gene transcripts and the pituitary transcription factor Pit-1b. Endocrinology, **138**: 4481-4.

Korbonits M., Kojima M., Kangawa K., Grossman A.B. 2001. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. Endocrine, **14**: 101-4.

Kyle C.V., Evans M.C., Odell W.D. 1981. Growth hormone-like material in normal human tissues. J. Clin. Endocrinol. Metab., **53**: 1138-44.

Lantinga-van Leeuwen I.S., Oudshoorn M., Mol J.A. 1999. Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific start site in the absence of Pit-1. Mol. Cell Endocrinol., **150**: 121-8.

Lee B.J., Jeong J.K., Kim J.H., Kang S.G., Kim M.O., Choi W.S. 1996. Local expression of a POU family transcription factor, Pit-1, in the rat placenta. Mol. Cell. Endocrinol., **118**: 9-14.

Lefevre C., Imagawa M., Dana S., Grindlay J., Bodner M., Karin M. 1987. Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. EMBO J., **6**: 971-81.

Leung D.W, Spencer S.A, Cachianes G, Hammonds R.G, Collins C., Henzel W.J., Barnad R., Waters M.J., Wood W.I. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. Nature, **330**: 537-43.

Li C.H, Evans H.M., Simpsom M.E. 1945. Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. J. Biol. Chem., **159**: 353-56.

Li S., Crenshaw E.B. 3rd, Rawson E.J., Simmons D.M., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature, **347**: 528-33.

Lin C., Lin S.C., Chang C.P., Rosenfeld M.G. 1992. Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. Nature, **360**: 765–768.

Lobie P.E., Wood T.J., Chen C.M., Waters M.J., Norstedt G. 1994. Nuclear translocation and anchorage of the growth hormone receptor. J. Biol. Chem., **269**: 31735-46.

Lobie P.E. 20º Congreso Internacional de Endocrinología. 2004. Lisboa.

Lombardi G., Colao A., Ferone D., Marzullo P., Orio F., Longobardi S., Merola B. 1997 Effect of growth hormone on cardiac function. Horm. Res., **48**: 38-42.

Lyons W.R., Li C.H., Johnson R.E. 1958. The Hormonal Control of Mammary Growth and Lactation. Recent Progress in Hormone Research., **14**: 219-254.

Maggiano N., Piantelli M., Ricci R., Larocca L.M., Capelli A., Ranelletti F.O. 1994. Detection of growth hormone-producing cells in human thymus by immunohistochemistry and non-radioactive in situ hybridization. J. Histochem Cytochem., **42**: 1349-54.

Mayo K.E., Vale W., Rivier J., Rosenfeld M.G., Evans R.M. 1983. Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. Nature, **306**: 86-8.

Mertani H.C., Zhu T., Goh E.L., Lee K.O., Morel G., Lobie P.E. 2001. Autocrine human growth hormone (hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH-stimulated human mammary carcinoma cell survival. J. Biol. Chem., **276**: 21464-75.

Melen L., Hennen G., Dullaart R.P., Heinen E., Igout A. 1997. Both pituitary and placental growth hormone transcripts are expressed in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Clin.Exp. Immunol., **110**: 336-40.

Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D. 1994. A strong candidate for breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science, **266**: 66-71

Mizukami Y., Nonomura A., Yamada T., Kurumaya H., Hayashi M., Koyasaki N., Taniya T., Noguchi M., Nakamura S., Matsubara F. 1990. Immunohistochemical demonstration of growth factors, TGF-alpha, TGF-beta, IGF-I and neu oncogene product in benign and malignant human breast tissues. Anticancer Res., **10**: 1115-26.

Mol J.A., Henzen-Logmans S.C., Hageman P., Misdorp W., Blankenstein M.A., Rijnberk A. 1995. Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. J. Clin. Endocrinol. Metab., **80**: 3094-6.

Mol J.A., van Garderen E., Selman P.J., Wolfswinkel J., Rijnberk A., Rutteman G.R. 1995. Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. J. Clin. Invest., **95**: 2028-34.

Mukhina S., Mertani H.C., Guo K., Lee K.O., Gluckman P.D, Lobie P.E. 2004. Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **101**: 15166-71.

Muller E.E., Locatelli V., Cocchi D. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. Physiol. Rev., **79**: 511-607.

Nelson C., Albert V.R., Elsholtz H.P., Lu L.I., Rosenfeld M.G. 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. Science, **239**: 1400-5.

Ng S.T., Zhou J., Adesanya O.O., Wang J., LeRoith D., Bondy C.A. 1997. Growth hormone treatment induces mammary gland hyperplasia in aging primates. Nat. Med., **3**: 1141-44.

Nguyen M., Lee M.C., Wang J.L., Tomlinson J.S., Shao Z.M., Alpaugh M.L., Barsky S.H. 2000. The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype. Oncogene, **19**: 3449-59.

Ohta K., Nobukuni Y., Mitsubuchi H., Ohta T., Tohma T., Jinno Y., Endo F., Matsuda I. 1992. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. Gene, **122**: 387-8.

Osamura RY, Egashira N, Miyai S, Yamazaki M, Takekoshi S, Sanno N, Teramoto A. 2004. Molecular pathology of the pituitary. Development and functional differentiation of pituitary adenomas. Front. Horm. Res., **32**: 20-33.

Palmetshofer A., Zechner D., Luger T.A., Barta A. 1995. Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. Mol. Cell Endocrinol., **113**: 225-34.

Pellegrini I., Barlier A., Gunz G., Figarella-Branger D., Enjalbert A., Grisoli F. and Jaquet P. 1994. Pit-1 gene Expression in the human pituitary and pituitary adenomas. J. Clin. Endocrinol. Metab., **79**: 189-196.

Peyrat J.P., Bonneterre J., Vennin P.H., Jammes H., Beuscart R., Hecquet B., Djiane J., Lefebvre J., Demaille A. 1990. Insulin-like growth factor 1 receptors (IGF1-R) and IGF1 in human breast tumors. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., **37**: 823-7.

Peyrat J.P., Bonneterre J., Hecquet B., Vennin P., Louchez M.M., Fournier C., Lefebvre J., Demaille A. 1993. Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer. Eur. J. Cancer, **29**: 492-7.

Pekonen F., Nyman T., Ilvesmaki V., Partanen S. 1992. Insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer tissue. Cancer Res., **52**: 5204-7.

Plaut K., Ikeda M., Vonderhaar B.K. 1993. Role of growth hormone and insulin-like growth factor-I in mammary development. Endocrinology, **133**: 1843-8.

Polyak K. 2001. On the birth of breast cancer. Biochim. Biophys Acta, **1552**: 1-13.

Puy L. and Asa S. 1996. The ontogeny of Pit-1 expression in the human fetal pituitary gland. Neuroendocrinology, **63**: 349-55.

Raccurt M., Lobie P.E., Moudilou E., Garcia-Caballero T., Frappart L., Morel G., Mertani H.C. 2002. High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. J. Endocrinol., **175**: 307-18.

Radovick S., Nations M., Du Y., Berg L.A., Weintraub B.D., Wondisford F.E. 1992. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. Science, **257**: 1115-8.

Reynaud R., Saveanu A., Barlier A., Enjalbert A., Brue T. 2004. Pituitary hormone deficiencies due to transcription factor gene alterations. Growth Horm. IGF Res., **14**: 442-8.

Rose S.R., Municchi G., Barnes K.M., Kamp G.A., Uriarte M.M., Ross J.L, Cassorla F., Cutler G.B. Jr. 1991. Spontaneous growth hormone secretion increases during puberty in normal girls and boys. J. Clin. Endocrinol. Metab., **73**: 428-35.

Ross J.S., Fletcher J.A. 1999. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. Am. J. Clin. Pathol., **112**: S53-67.

Russo J., Russo I.H. 1987. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. Lab. Invest., **57**: 112-37.

Sanno N., Teramoto A., Matsuno A., Itoh J., Takekoshi S., Osamura R.Y. 1996. In situ hybridization analysis of Pit-1 mRNA and hormonal production in human pituitary adenomas. Acta Neuropathol., **91**: 263-8.

Santner S.J, Feil P.D., Santen R.J. 1984. In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. J. Clin. Endocrinol. Metab., **59**: 29-33.

Schanke J.T, Conwell C.M, Durning M., Fisher J.M., Golos T.G. 1997. Pit-1/growth hormone factor 1 splice variant expression in the rhesus monkey pituitary gland and the rhesus and human placenta. J. Clin. Endocrinol. Metab., **82**: 800-7.

Schwarzler P., Untergasser G., Hermann M., Dirnhofer S., Abendstein B., Madersbacher S., Berger P. 1997. Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. J. Clin. Endocrinol. Metab., **82**: 3337-41.

Surmacz E., Guvakova M.A., Nolan M.K., Nicosia R.F., Sciacca L. 1998. Type I insulin-like growth factor receptor function in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat., **47**: 255-67.

Tavtigian S.V, Simard J., Rommens J., Couch F., Shattuck-Eidens D., Neuhausen S., Merajver S., Thorlacius S., Offit K., Stoppa-Lyonnet D., Belanger C., Bell R., Berry S., Bogden R., Chen Q., Davis T., Dumont M., Frye C., Hattier T., Jammulapati S., Janecki T., Jiang P., Kehrer R., Leblanc J.F., Mitchell J.T., McArthur-Morrison J., Nguyen K., Peng Y., Samson C., Schroeder M., Snyder S.C., Steele L., Stringfellow M., Stroup C., Swedlund B., Swense J., Teng D., Thomas A., Tran T., Tranchant M., Weaver-Feldhaus J., Wong A.K., Shizuya H., Eyfjord J.E., Cannon-Albright L., Tranchant M., Labrie F., Skolnick M.H., Weber B., Kamb A., Goldgar D.E. 1996. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. Nat. Genet., **12**: 333-7.

Theill L.E., Hattori K., Lazzaro D., Castrillo J.L., Karin M. 1992. Differential splicing of the GHF1 primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. EMBO J., **11**: 2261-9.

Theill L.E., Karin M. 1993. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. Endocr. Rev., **14**: 670-89.

Untergasser G., Kranewitter W., Schwarzler P., Madersbacher S., Dirnhofer S., Berger P. 1997. Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. Mol. Cell Endocrinol., **130**: 53-60.

Vila V., Jimenez O., Guell A., Castrillo J.L. 1993. Pit-1 and Pit-2 role in growth hormone gene regulation. J. Pediatr. Endocrinol., **6**: 225-8.

Voskuil D.W., Bosma A., Vrieling A., Rookus M.A., van 't Veer L.J. 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-system mRNA quantities in normal and tumor breast tissue of women with sporadic and familial breast cancer risk. Breast Cancer Res. Treat., **84**: 225-33.

Voss J.W., Rosenfeld M.G. 1992. Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. Cell, **70**: 527-30.

Voss J.W., Yao T.P., Rosenfeld M.G. 1991. Alternative translation initiation site usage results in two structurally distinct forms of Pit-1. J. Biol. Chem., **266**: 12832-5.

Waters M.J. y Conway-Campbell B.L. 2004. The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **101**:14992-3.

Weigent D.A., Blalock J.E. 1991. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. Cell. Immunol., **135**: 55-65.

Wennbo H., Tornell J. 2000. The role of prolactin and growth hormone in breast cancer. Oncogene, **19**: 1072-6.

Wilde CJ, Knight CH, Flint DJ. 1999. Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia, **4**: 129-36.

Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature, **378**: 789-92.

Wu H., Devi R., Malarkey W.B. 1996. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system. Clinical Research Center study. J. Clin. Endocrinol. Metab., **81**: 1278-82.

Wysolmerski J.J., Cormier S., Philbrick W.M., Dann P., Zhang J.P., Roume J., Delezoide A.L., Silve C. 2001. Absence of functional type 1 parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptors in humans is associated with abnormal breast development and tooth impaction. J. Clin. Endocrinol. Metab., **86**: 1788-94.

Xiao G., Liu Y.E., Gentz R., Sang Q.A., Ni J., Goldberg I.D., Shi Y.E. 1999. Suppression of breast cancer growth and metastasis by a serpin myoepithelium-derived serine proteinase inhibitor expressed in the mammary myoepithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **96**: 3700-5.

Yee D., Paik S., Lebovic G.S., Marcus R.R., Favoni R.E., Cullen K.J., Lippman M.E., Rosen N. 1998. Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. Mol. Endocrinol., **3**: 509-17.

Yoshida K., Miki Y. 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. Cancer Sci., **95**: 866-71.

Zhang X., Zhu T., Chen Y., Mertani H. C., Lee K.O., Lobie P.E.. 2003. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. J.Biol. Chem., **278**: 7580-90.

