

Resumen # 168

Caracterización de células iniciadoras de tumores con marcadores de cancer stem cell en el desarrollo de adenomas hipofisarios experimentales

<sup>1</sup>Guido C, <sup>1</sup>Vaca A, <sup>1</sup>Sosa L, <sup>2</sup>Velazquez F, <sup>2</sup>Caputto B, <sup>1</sup>Mukdsi J, <sup>1</sup>Torres A  
<sup>1</sup>Centro de Microscopia Electrónica - INICSA - CONICET; <sup>2</sup>CIQUIBIC-CONICET

**Área:**

Básica

**Resumen:**

La población de cancer stem cells (CSC), ha sido postulada como iniciadora de tumores malignos. Un desafío en endocrinología es conocer factores implicados en la neogénesis de adenomas hipofisarios en los que participarían células iniciadoras de tumores (CIT) con fenotipo CSC. El objetivo fue evaluar posibles cambios de los marcadores asociados a CSC: Nestin, CD133, CD44 y a células stem (CS): GFRa2, Sox2, Oct4; durante el desarrollo de tumores hipofisarios y posterior aislamiento y caracterización de las CIT. Los tumores fueron obtenidos en ratas hembras Fischer tratadas con pellets de 30mg de benzoato de estradiol (BE), durante 5 (BE5), 10 (BE10), 20 (BE20) y 30 (BE30) días. Como control (C) se utilizaron ratas en diestro. El desarrollo del adenoma fue evaluado mediante trama de reticulina. La expresión de Nestin y CD133 en adenomas fue analizada por inmunofluorescencia. La expresión de CD44, Nestin y GFRa2 fue evaluada por Western Blot. Para los estudios in vitro, se aislaron pituesferas formadas por CS a partir de suspensiones celulares de adenomas (BE30), en cultivo suplementado con EGF, FGFb y B27. La caracterización fue realizada con marcadores específicos en secciones de crioultramicrotomo. Tanto Nestin como CD133, presentaron variaciones en su distribución dentro de la glándula durante el tratamiento. En la zona marginal (ZM) que limita el cleft hipofisario donde se describe la presencia de CS, se observaron núcleos Nestin+, células CD133+ y escasa inmunomarcación de ambos en adenohipófisis (AH) de ratas C. En contraposición, en BE30 la expresión de los marcadores mencionados disminuyó en ZM y aumentó en AH, observándose nichos de células Nestin+ y CD133+, indicando una movilización de CS de ZM hacia el parénquima adenomatoso. Además, la expresión de CD44, Nestin y GFRa2, incrementó significativamente (ANOVA, significancia  $p < 0.05$ ) en hipófisis de ratas BE5 con respecto al C y demás tiempos de tratamiento, lo cual permite involucrar a estos marcadores en la neogénesis del adenoma. Las pituesferas en cultivo fueron positivas para: GFRa2, Sox2, Oct4, Nestin, CD133 y CD44. Los resultados obtenidos permiten postular la participación de CIT en el desarrollo de adenomas hipofisarios.

**Palabras Clave:**

ADENOMAS HIPOFISARIOS, CANCER STEM CELL, NESTIN, CD44, CD133

Characterization of tumor initiating cells with cancer stem cell markers throughout the development of an experimental pituitary adenoma

<sup>1</sup>Guido C, <sup>1</sup>Vaca A, <sup>1</sup>Sosa L, <sup>2</sup>Velazquez F, <sup>2</sup>Caputto B, <sup>1</sup>Mukdsi J, <sup>1</sup>Torres A  
<sup>1</sup>Centro de Microscopia Electrónica - INICSA - CONICET; <sup>2</sup>CIQUIBIC-CONICET

**Abstract:**

Cancer stem cells (CSC) have been recently postulated as tumor initiating cells (TIC). An important challenge in endocrinology is to find out the factors involved in the neogenesis of pituitary tumors and the role of TIC with CSC phenotype. Our objective was to evaluate possible changes in the expression of CSC associated markers, Nestin, CD133, CD44, and stem cells (SC) related markers GFRA2, Sox2, Oct-4 throughout the development of an experimental pituitary tumor, and subsequent isolation and characterization of the TIC. The experimental model in vivo were performed in female Fischer rats, treated with 30 mg of estradiol benzoate (EB) during 5 (EB5), 10 (EB10), 20 (EB20) and 30 (EB30) days as different tumor development stages. Control group (C) included rats in diestrous. To provide histological evidence that these animals developed pituitary adenoma the reticulin network was analyzed. Nestin and CD133 expression was detected by immunofluorescence (IF) in cryosections. The protein levels of CD44, Nestin and GFRA2 were quantified by Western Blot. In vitro studies were done using EB30 adenomatous pituitary cell suspensions. TIC were isolated forming pituspheres in culture medium supplemented with EGF, bFGF and B27. These spheres were characterized using CSC and CS markers identifying them by IF in ultracryosections. Nestin and CD133 showed variations in their distribution within the gland during treatment. In the marginal zone (MZ), where the presence of CS is described, we observed nucleus Nestin + and CD133+ and low immunostaining of both markers in adenohipophysis (AH) of C. In contrast, their expression was remarkable in AH of BE30 rats, showing Nestin+ and CD133+ cells, indicating a mobilization of CS from the MZ to the adenomatous parenchyma. Furthermore, the expression of CD44, Nestin and GFRA2, increased significantly (ANOVA, significance  $p < 0.05$ ) in BE5 rats compared to C and other periods of treatment, which allows to engage these markers in the neogenesis of the pituitary tumors. The pitusferes in culture were positive for: GFRA2, Sox2, Oct-4, Nestin, CD133 and CD44. These results suggest the participation of TIC in the development of pituitary adenomas.

**Keywords:**

PITUITARY ADENOMAS, CANCER SEM CELL, NESTIN, CD44, CD133