

## NUEVOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGENESIS DE ADENOMAS HIPOFISARIOS\*

DAMIANA GIACOMINI, MARCELO PAEZ-PEREDA, DAMIAN REFOJO<sup>o</sup>, ALBERTO CARBIA NAGASHIMA<sup>o</sup>,  
ALBERTO CHERVIN<sup>#</sup>, VICTORIA GOLDBERG<sup>##</sup>, EDUARDO ARZT<sup>o</sup>

*Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales;*  
*##Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina,*  
*Universidad de Buenos Aires; <sup>#</sup>Hospital Santa Lucía, Buenos Aires*

**Resumen** Analizamos molecularmente tumores formados por clones estables de la línea lactosomatotrofa GH3 Smad-4 (transductor de señales de la proteína morfogénica de hueso-4, BMP-4) dominante negativo (Smad-4dn que bloquea el transductor Smad) que desarrollan tumores de menor tamaño que los controles en ratones nude, pero que presentaron un crecimiento tardío. Encontramos que en éstos la expresión/control de Smad-4dn se perdió y que sobreexpresan c-Myc. Concordantemente, BMP-4 se sobreexpresa y estimula la expresión de c-Myc en prolactinomas humanos pero no en otros adenomas o en hipófisis normales. Además en células GH3, ICI 182,780 (bloqueante de estrógenos) inhibe la estimulación de c-Myc por BMP-4 y el cotratamiento BMP-4/estrógenos posee un efecto aditivo sobre la proliferación celular. Al bloquear BMP-4 con ICI y estrógenos (E2) con Smad-4dn se bloquea significativamente cada efecto estimulador sobre la proliferación. A su vez Smad-4 interacciona físicamente con los dos subtipos de receptores de estrógenos, ER<sub>a</sub>/ER<sub>b</sub>. Demostramos por primera vez el rol de BMP-4 en la tumorigénesis de prolactinomas, involucrando un *crossstalk* funcional BMP-4/estrógenos.

**Palabras clave:** prolactinoma, c-Myc

**Abstract** *New mechanisms involved in the pathogenesis of pituitary adenomas.* We studied Smad-4dn tumors generated from lactosomatotrophic GH3 cells stably transfected with a dominant negative form of Smad-4 (a bone morphogenetic protein-4, BMP-4, signal co-transducer) which had reduced tumorigenicity in nude mice, but had showed a late increase in tumor size. We found that they had lost *in vivo* the expression of Smad-4dn and had recovered c-Myc expression. In accordance, BMP-4 is overexpressed and stimulates the expression of c-Myc in human prolactinomas, but not in other human pituitary adenomas or normal pituitary. In addition ICI 182,780 inhibited BMP-4 stimulated c-Myc expression and BMP-4 and 17 $\beta$ -estradiol in combination had an additive effect on GH3 cell proliferation. Their action was inhibited by blocking BMP-4 with ICI 182,780 or 17 $\beta$ -estradiol with Smad-4dn. Furthermore, co-immunoprecipitation studies demonstrate that Smad-4 physically interacts with the ER<sub>a</sub>/ER<sub>b</sub>. We show for the first time the role of BMP-4 in prolactinoma pathogenesis, involving a functional cross-talk BMP-4/E2.

**Key words:** prolactinoma, c-Myc

El desarrollo de tumores hipofisarios es un proceso en el cual células estimuladas por esteroides, factores hipotalámicos o de crecimiento se transforman dando lugar a un fenotipo tumoral, y luego se expanden de manera monoclonal generando adenomas<sup>1, 2</sup>. Sin embargo, los mecanismos moleculares que llevan a la aparición de estos tumores se encuentran en estudio actualmente.

Las proteínas morfogénicas de hueso, BMPs, son miembros de la superfamilia de factores transformantes de crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que fueron originalmente descubiertos por su habilidad de inducir la formación ectópica de cartílago y hueso al inyectarlos en animales experimentales<sup>3</sup>. Actualmente se sabe que no sólo promueven la diferenciación a linajes óseos, sino que también regulan la división celular, la apoptosis, la determinación celular, diferenciación y morfogénesis<sup>3</sup>. BMP-4 es uno de los miembros de esta familia más estudiado debido a su participación en numerosos eventos embrionarios<sup>3</sup>. Existen evidencias que otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  poseen efectos sobre la hipófisis adulta, inhibiendo el desarrollo de prolactinomas<sup>4</sup>. Por el contrario se desconoce el posible rol de BMP-4 en hipófisis adultas.

Se ha detectado la presencia de receptores de estrógenos (ERs) en la hipófisis anterior y en adenomas hipo-

<sup>o</sup> Miembros de la Carrera del Investigador y Becarios del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

\* Trabajo que mereció el Premio Lucio Cherny en la reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre 2002.

fisarios; en la pituitaria normal, las poblaciones de gonadotrofos y lactotrofos presentan la mayor expresión de ERs<sup>5</sup>. En concordancia con esto, se ha informado la presencia de ERs en la mayoría de los tumores secretores de PRL<sup>6</sup>. Los estrógenos aumentan la expresión de prolactina (PRL)<sup>7</sup> y estimulan la proliferación de los lactotrofos tanto normales como transformados<sup>8</sup>.

Con el objetivo de encontrar genes involucrados en la tumorigénesis hipofisaria, en trabajos recientes nuestro grupo comparó el patrón de expresión génica de hipófisis anteriores normales versus los prolactinomas provenientes de ratones hembras D2KO (*differential display* PCR). Sólo en las hipófisis normales se identificó una banda correspondiente a Noggin, antagonista específico de BMP-4, el cual no inhibe a otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ <sup>9</sup>. Por RT-PCR comparativa no solo se encontró que la expresión de Noggin está disminuida en estos prolactinomas sino que BMP-4 está sobreexpresado, lo cual se confirmó en diferentes modelos animales de prolactinomas. Los ratones *nude* inyectados con clones estables de la línea tumoral lactosomatotrofa GH3-Smad-4dn (bloqueante de los receptores BMP-4/TGF- $\beta$ ) presentan tumores de menor tamaño y con una tasa de crecimiento menor que los controles.

En este trabajo demostramos la expresión de BMP-4 en tumores humanos, su rol en la tumorigénesis de prolactinomas y la participación de un *crossstalk* funcional entre BMP-4 y los estrógenos.

Trabajamos con tumores hipofisarios provenientes de pacientes con hiperprolactinemia, acromegalia, enfermedad de Cushing o adenomas no funcionantes y con la línea celular tumoral lactosomatotrofa GH3. Se estudiaron la expresión de c-Myc y Smad-4, la proliferación celular, el crecimiento tumoral en ratones *nude*, la interacción proteína-proteína Smad-4-ER y la actividad transcripcional del promotor de BMP-4. Se utilizó la construcción pBMP-4-Luc, la cual contiene un fragmento de 2.6 kb del promotor IA de BMP-4 de ratón (región flanqueante 5' desde -2371/+258) río arriba del gen reporter LUC. Para la generación de clones estables GH3 Smad-4 dominante negativo (GH3 Smad-4-dn), se utilizó un vector de expresión que contiene un fragmento del cDNA (1-514) del factor DPC-4 fusionado a un FLAG. Las transfecciones se realizaron mediante el método de lipofectamina con 2  $\mu$ g del ADN plasmídico apropiado. La actividad transcripcional se determinó a través de la actividad luciferasa de los extractos y la normalización se llevó a cabo por  $\beta$ -galactosidasa. Para la proliferación celular se utilizó el método de WST-1. En las coimmunoprecipitaciones que determinan la interacción proteica, las células fueron tratadas con anticuerpos contra Smad-4, ER-a o ER-b, y en los *Western Blot* los lisados celulares fueron revelados con anti-BMP-4, anti-Smad-4, anti-ER-a, anti-ER-b, anti-c-Myc o anti-FLAG y como control se utilizó un anti-actinab. Los resultados

están expresados como el promedio  $\pm$  ES. La significación estadística de los datos fue calculada por análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y el test de Scheffé.

Habíamos demostrado que ratones *nude* inyectados con clones GH3-Smad-4dn o GH3-Noggin, presentan tumores de menor tamaño y una tasa de crecimiento menor, que aquellos tumores generados por células GH3-control. Hubo dos ratones inyectados con células GH3 Smad-4dn que desarrollaron tumores que durante los últimos días de la medición tumoral crecieron significativamente hasta igualar a los ratones controles. En primer lugar analizamos molecularmente dichos tumores por *Western Blot* y observamos que dichas células tumorales perdieron la expresión de Smad-4dn y proliferaron como las controles. A su vez, los tumores controles presentan una sobreexpresión de c-Myc (uno de los reguladores más importantes del ciclo celular), la cual no se detectó en los tumores Smad-4dn de crecimiento lento. Sin embargo, los tumores Smad-4dn que escaparon al control negativo recuperaron la sobreexpresión de c-Myc a niveles similares a los controles. Estos resultados aportan evidencia directa de la participación de BMP-4/Smad-4 *in vivo* en la tumorigénesis.

Luego estudiamos la capacidad de BMP-4 (200ng/ml) de estimular la expresión de c-Myc en tumores hipofisarios humanos. Encontramos que sólo aumenta en prolactinomas y que el tratamiento con Noggin 1  $\mu$ g/ml disminuye la expresión basal de c-Myc. Determinamos la expresión de BMP-4 en tumores hipofisarios humanos. Se estudiaron 48 tumores y se encontró que BMP-4 se sobreexpresa en los prolactinomas humanos (n=12), pero no en Cushing (n=11), acromegálicos (n=12), no funcionantes (n=13) o hipófisis humanas normales (n=3). El nivel de expresión fue mayor en seis prolactinomas que presentaban infiltración al seno cavernoso, hueso o *dura mater*, en oposición a seis prolactinomas restringidos a la sella, encapsulados o sin signos de infiltración.

Al estudiar la estimulación de c-Myc en las células GH3, se observó que el tratamiento con BMP-4 200ng/ml induce la expresión c-Myc (al igual que en prolactinomas humanos), dicha inducción es similar a la ejercida por los E2 100nM. El cotratamiento de BMP-4 con ICI 10<sup>-6</sup>M, un antagonista del ER, inhibe el efecto estimulador de BMP-4. Estos resultados sugieren un *crossstalk* entre BMP-4 y E2 que decidimos profundizar en ensayos de proliferación. Al estimular las GH3 con BMP-4 y E2 se observa un efecto aditivo del 35% (p<0.01) sobre la proliferación celular (Tabla 1). El bloqueo de cada estímulo con el antagonista contrario, BMP-4 con ICI y E2 con Smad-4dn, resulta en una inhibición parcial pero significativa de la proliferación celular (p<0.01) (Tabla 1), confirmando que BMP-4 y E2 actúan vía caminos intracelulares de señalización solapantes. Efectivamente, ensayos de coimmunoprecipitación de-

TABLA 1.– Crosstalk entre BMP-4 y E2 sobre la proliferación celular

Estímulo	D.O.± ES
Basal	0.30 ± 0,01
BMP-4 10ng/ml	0.51 ± 0,03*
E2 1nM	0.49 ± 0,03*
BMP-4 10ng/ml+E2 1nM	0.78 ± 0,03**
Basal	0.34 ± 0,02
BMP-4 200ng/ml	0.90 ± 0,01*
ICI 10nM	0.35 ± 0,02
BMP-4 200ng/ml+ICI 10nM	0.48 ± 0,02●

Las células GH3 fueron tratadas con BMP-4 10ng/ml-200ng/ml, 17β-estradiol (E2) o ICI 182,780 (ICI), y la combinación de ambos durante 72 horas y la proliferación celular fue determinada por el método de WST-1. Resultados similares se obtuvieron al contar el número total de células. Cada valor representa la media de cuatro wells con su correspondiente error estándar de un experimento representativo de un total de cuatro experimentos independientes con resultados similares. ANOVA con test de Scheffe \* p<0.01 con respecto al basal; \*\* p<0.01 con respecto a la estimulación por BMP-4 10 ng/ml o 17β-estradiol; ● p<0.01 con respecto a la estimulación por BMP-4 200ng/ml.

muestran una interacción física entre ER (a y b) y Smad-4 tanto en presencia de BMP-4 100ng/ml como de E2 100nM, que no se observa con anticuerpos controles.

E2 induce la síntesis de BMP-4 por células lactosomatotrofas aumentando la actividad transcripcional del promotor de BMP-4, efecto que es bloqueado con el agregado de tamoxifeno 1 μM (bloqueante ER); este aumento también se observa a nivel proteico (Fig. 1).

Durante mucho tiempo existió controversia acerca de las bases moleculares de la tumorigénesis hipofisaria. Demostramos que los estrógenos, factores que favorecen el crecimiento de prolactinomas, aumentan la actividad transcripcional del gen y los niveles proteicos de BMP-4. Esta sobreexpresión de BMP-4 a su vez induce la expresión de c-Myc y la proliferación tumoral mediante un mecanismo que involucra un *crosstalk* de su transductor Smad-4 con E2, que es fundamental para el desarrollo de tumores *in vivo*.

c-Myc es un proto-oncogen que media los efectos tanto de los estrógenos como de TGF-β en el ciclo celular<sup>9-11</sup>. En nuestro trabajo demostramos que tanto los tumores controles, los Smad-4dn que escapan a la regulación negativa, como las células GH3 y prolactinomas estimulados con BMP-4, presentan altos niveles de c-Myc. De esta manera determinamos por primera vez la participación de BMP-4 en un nuevo mecanismo *in vivo* que promueve el desarrollo de prolactinomas hipofisarios. Se desconocía el posible rol de BMP-4 en la hipófisis adulta, y dada la importancia de éste durante el desarrollo hipofisario<sup>12</sup> su participación en la tumorigénesis hipofisaria constituye un mecanismo sumamente novedoso.

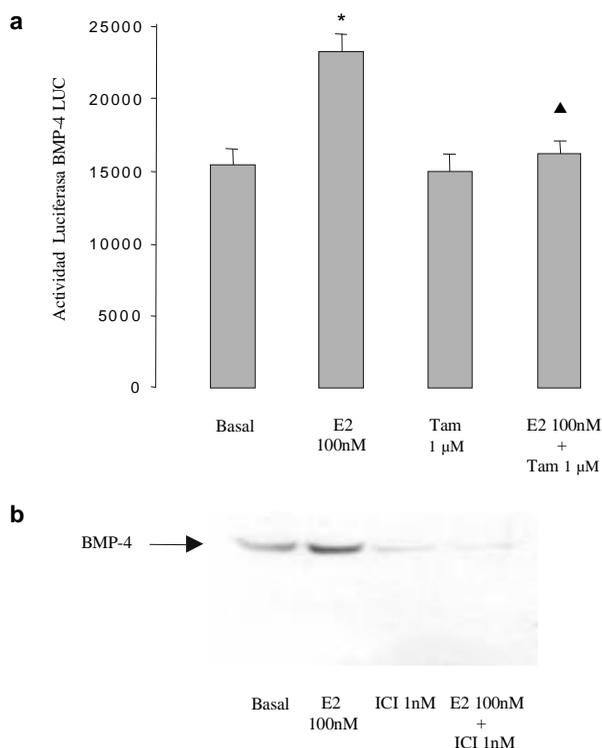


Fig. 1.– Regulación de la expresión de BMP-4 en la línea lactosomatotrofa GH3. a) Las células fueron transfectadas con la construcción reportera del promotor de BMP-4 (-2371/+258), después de 18hs fueron estimuladas con E2 1 nM y tamoxifeno 1 μM y fueron ensayadas las actividades de luciferasa y total de los extractos celulares a las 24 horas. Cada barra representa la media, estandarizada de tres wells de transfección con su correspondiente error estándar de un experimento representativo de un total de tres experimentos con resultados similares. Los resultados se encuentran expresados como valores relativos con respecto al basal. ANOVA con test de Scheffé \* p < 0.01 con respecto al basal; ▲ p < 0.01 con respecto al estímulo de E2 b) Las células GH3 fueron tratadas con 17 β-estradiol (E2), ICI 182,780 (ICI), o la combinación de ambos por 24 horas. BMP-4 se detectó por la técnica de *Western Blot* a partir de lisados celulares. Los resultados son representativos de un total de tres experimentos con resultados similares.

A su vez describimos un *crosstalk* funcional entre BMP-4 y los E2 tanto a nivel de la estimulación de c-Myc como de la proliferación celular, que se corrobora por la interacción física de los correspondientes transductores de señales, Smad-4 y ER. Recientemente se ha identificado una interacción física entre ER y la proteína Smad 3 activada por TGF-β en la línea celular 293T<sup>13</sup>. Tanto BMP-4 y otros miembros de la familia TGF-β como los E2 cumplen funciones importantes en diferentes tipos tumorales y en la fisiología del hueso. Nosotros demostramos la existencia de un mecanismo molecular regulatorio BMP-4-Smad-4-ER que puede participar en el desarrollo de otras enfermedades. Muchas células

tumorales logran escapar al efecto inhibitorio que los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  poseen sobre la proliferación celular, y este hecho se ha convertido en un interrogante central para entender la regulación del crecimiento tumoral<sup>9</sup>. En base a nuestros resultados, proponemos que los prolactinomas, en los cuales BMP-4 estimula la proliferación celular, constituyen un modelo útil para investigar este mecanismo.

## Bibliografía

1. Arzt E. *gp130* cytokine signaling in the pituitary gland: a paradigm for cytokine-neuro-endocrine pathways. *J Clin Invest* 2001; 108: 1729-33.
2. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998; 19: 798-827.
3. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-94.
4. Delidow BC, Billis WM, Agarwal P, White BA. Inhibition of prolactin gene transcription by transforming growth factor-beta in GH3 cells. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1716-22.
5. Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 1998; 139: 3976-83.
6. Friend KE, Chiou YK, Lopes MB, Laws ER, Hughes KM, Shupnik MA. Estrogen receptor expression in human pituitary: correlation with immunohistochemistry in normal tissue, and immunohistochemistry and morphology in macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1497-1504.
7. Lieberman ME, Maurer RA, Laude P, Wiklund J, Wertz N, Gorski J. Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Adv Exp Med Biol* 1981; 138: 151-63.
8. Chaidarun SS, Eggo MC, Stewart PM, Barber PC, Shepard MC. Role of growth factors and estrogen as modulators of growth, differentiation and expression of gonadotropin subunit genes in primary cultured sheep pituitary cells. *Endocrinology* 1994; 134, 935-44.
9. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169-78.
10. Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, et al. C-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 854-61.
11. Prall OWJ, Rogan EM, Sutherland RL. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1998; 65: 169-74.
12. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 2002; 295: 2231-5.
13. Matsuda T, Yamamoto T, Muragushi A, Saatcioglu A. A cross-talk between transforming growth factor- and estrogen receptor signaling through Smad3. *J Biol Chem* 2001; 276: 42908-14.

-----

La hermosa idea del héroe que combate y muere por la patria, la mujer y los hijos, no corresponde a esta época; es hablando claro un puro sin sentido. La mujer y los hijos serían probablemente las primeras víctimas de las bombas atómicas, antes que el soldado que se encuentra en los refugios, fortines o tanques, y la patria salvada se asemejaría al final de la contienda a un paisaje lunar.

Max Born (1882-1970)

*La responsabilidad del científico*, Buenos Aires: Editorial Labor, 1968