

EL RECEPTOR HER2 REGULA LA PROLIFERACIÓN TUMORAL ADENOHIPOFISARIA Y MODULA LA SEÑAL TGF β 1/SMAD2/3

Juan Pablo Petiti, Jean Arévalo Rojas, Picech Florencia, Sosa Liliana, Torres Alicia.

(1) Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET, Fac. Cs. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. juanpetiti@yahoo.com.ar

Los adenomas hipofisarios son tumores relativamente comunes representando el 10-15% de todas las neoplasias intracraneales [1]. Un número significativo de tumores hipofisarios, 25-55% dependiendo de los criterios utilizados, pueden mostrar signos de invasión de la duramadre, hueso y/o estructuras anatómicas circundantes [2]. Estos adenomas llamados “agresivos” poseen un comportamiento benigno. Sin embargo, es frecuente que tengan resistencia a los tratamientos convencionales y recurrencia temprana [3]. En general los tratamientos anti-neoplásicos en tumores adenohipofisarios están dirigidos a estimular receptores de señales que inhiben la secreción hormonal y poseen acciones anti-mitogénicas, tal como los agonistas del receptor de dopamina para los prolactinomas, o los agonistas de los receptores de somatostatina para los tumores secretantes de la hormona de crecimiento (GH)[4]. La alteración en los niveles de expresión de receptores de señales pro y anti-mitogénicas ha sido propuesta como un mecanismo por el cual las células pueden escapar del control normal y convertirse en células tumorales. En este sentido se ha observado una baja expresión de los receptores de la señal inhibitoria TGF β (T β RI, T β RII), en contraposición a los elevados niveles del receptor del factor de crecimiento EGF (HER2) en células tumorales hipofisarias. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el efecto anti-mitogénico de TGF β 1 en células tumorales adenohipofisarias es contrabalanceado por las cascadas de señalización proliferativas ERK1/2 y Akt, modulando la activación de Smad2/3 [5]. Si bien es conocido que los receptores de TGF β y EGF tienen efectos opuestos en la regulación de la secreción de PRL y en la proliferación de prolactinomas, el “crosstalk” entre estas dos señales es poco conocido. Es por ello que nos planteamos como objetivo determinar la presencia de una regulación entre las señales desencadenadas por receptores de TGF β y EGF en células tumorales adenohipofisarias y en prolactinomas experimentales tratados con el inhibidor de HER2.

Los estudios fueron realizados utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*:

In vitro: Se emplearon células tumorales hipofisarias somatolactotrópicas de rata GH3 y GH4C1, las cuales fueron estimuladas con TGF β 1 (4ng/ml), EGF (10ng/ml) o trastuzumab (inhibidor del receptor HER2) a diferentes tiempos (30 min y 24h) solos o en co-incubación. Se analizó la proliferación celular mediante cuantificación de células positivas para BrdU por citometría de flujo, la activación de Smad2/3, ERK1/2 y Akt por western blot y la localización nuclear de Smad2/3 por microscopía confocal.

In vivo: Se usaron ratas machos de la cepa Fischer 344 de tres meses de edad, las cuales fueron implantadas subcutáneamente con pellets conteniendo 30 mg de benzoato de estradiol por 45 días con la finalidad de generar un prolactinoma. En forma paralela un grupo de animales fue tratado con trastuzumab (Herceptin 6mg/Kg, actualmente utilizado en cáncer de mama) durante los últimos 15 días del tratamiento estrogénico. Se cuantificó la proliferación celular mediante la marcación de Ki67 por inmunocitoquímica y se determinó la expresión de proteínas relacionadas con la estimulación (pERK1/2, CDK4 y Ciclina D1) o inhibición de la proliferación (T β RI, T β RII y pSmad2/3) por western blot. Además, se analizó la localización subcelular de los receptores T β RI, T β RII por microscopía electrónica de transmisión (MET). Estadística: ANOVA-Fisher.

Con la finalidad de determinar si el receptor de EGF, el cual activa las señales proliferativas MEK/ERK1/2 y PI3K/Akt, también regula la respuesta al TGF β 1, las células GH3 y GH4C1 fueron estimuladas con TGF β 1 por 24h en presencia o ausencia del inhibidor específico de HER2. El tratamiento con TGF β 1 por 24h inhibió la proliferación celular, efecto que fue potenciado cuando ambas líneas celulares fueron co-incubadas con trastuzumab. Habiendo demostrado que en las células tumorales GH3 y GH4C1, trastuzumab moduló la respuesta al TGF β 1, decidimos investigar si esta regulación ocurre a nivel de la activación de Smad2/3, mediadores canónicos de TGF β 1. Observamos que el tratamiento con el inhibidor de HER2 aumentó considerablemente la fosforilación de Smad2/3 en ambas líneas celulares, sugiriendo que el receptor HER2 normalmente bloquea la activación de Smad2/3. Con el objetivo de obtener mas evidencias del efecto antagónico

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

de EGF sobre la activación de Smad2/3 inducida por TGF β 1, analizamos la expresión de pSmad2/3, y de las quinasas pERK1/2 y pAkt en células GH3. Observamos que EGF aumenta la expresión de ambas quinasas proliferativas y bloquea la activación de Smad2/3 inducida por TGF β 1. En forma paralela analizamos si la estimulación con EGF altera la translocación nuclear de Smad2/3 inducida por TGF β 1 mediante microscopía confocal en células GH3. Como muestra la fig. 1, en células controles pSmad2/3 se localizó predominantemente en el citoplasma. La incubación con TGF β 1 por 30 min indujo una acumulación nuclear de p-Smad2/3, efecto que fue atenuado cuando las células fueron incubadas con TGF β 1 en presencia de EGF.

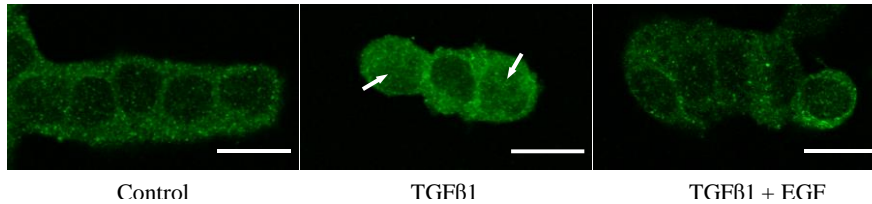
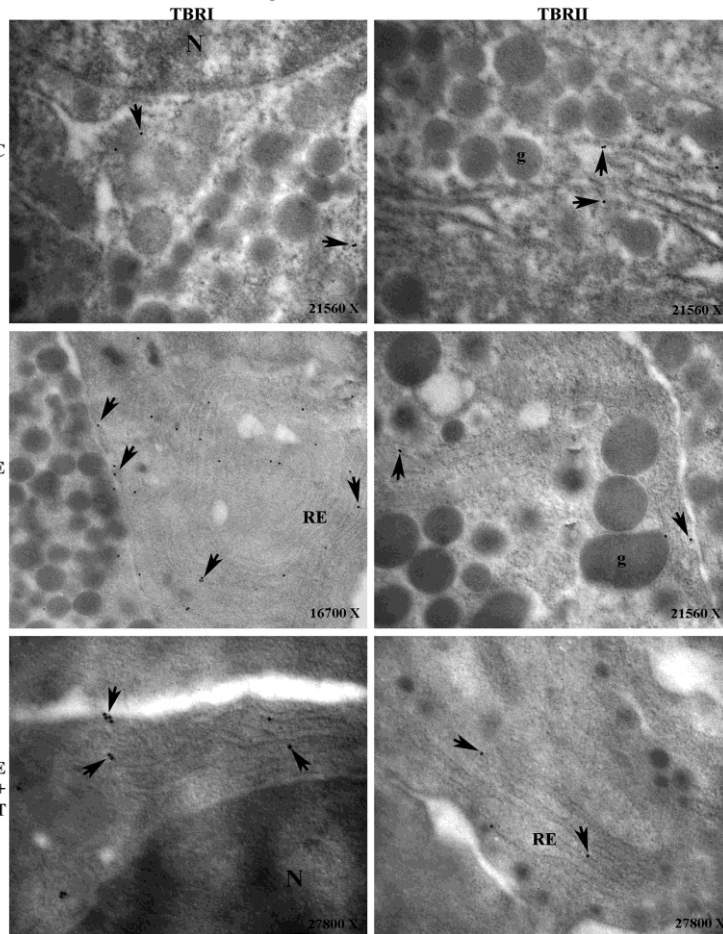


Fig. 1. Inmunofluorescencia de pSmad2/3 en células GH3 luego de los diferentes tratamientos.

En relación a los resultados obtenidos mediante ensayos *in vivo*, observamos que la estimulación estrogénica por 45 días incrementó significativamente los valores de Ki67, mientras que el tratamiento con trastuzumab por 15 días revirtió este efecto. Esta inhibición de la proliferación por el bloqueo del receptor HER2 estuvo acompañada por una disminución en la expresión pERK1/2, CDK4 y Ciclina D1. En relación a los componentes de señales inhibitorias, se observó una baja expresión de T β R1 y pSmad2/3 en animales estrogénizados como así también en aquellos tratados con trastuzumab en comparación al grupo control.



Mediante microscopía electrónica (fig.2) se observó la presencia de los receptores T β R1, T β R1I en membrana plasmática y en retículo endoplásmico, sin detectarse diferencias entre los modelos experimentales.

En conclusión en el presente trabajo hemos demostrado que la inhibición del receptor HER2 por trastuzumab, disminuyó la proliferación tumoral adenohipofisaria a través de la inhibición de las cascadas de señalización proliferativas y de la modulación de la señal TGF β 1/Smad2/3, convirtiéndolo en un atractivo blanco terapéutico.

Fig. 2. Localización subcelular de los receptor T β R1 y T β R1I por MET. Las partículas de oro coloidal de 15nm (flechas) indican la localización de los receptores en los distintos grupos experimentales. N: núcleo, RER: retículo endoplásmico rugoso, g: gránulo.

REFERENCIAS

- [1] Kaltsas GA., et al., (2005) "Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas" *J Clin Endocrinol Metab.* 90(5): 3089-3099.
- [2] Thapar K, (1996) "Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody" *Neurosurgery.* 38(1):99-106.
- [3] Chatzellis, E., et al., (2015) "Aggressive Pituitary Tumors". *Neuroendocrinology.*
- [4] Di Ieva, A., et al., (2014) "Aggressive pituitary adenomas diagnosis and emerging treatments" *Nat Rev Endocrinol.* 10(7): 423-435.
- [5] Petiti, J.P., et al., (2015) "Involvement of MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in the refractory behavior of GH3B6 pituitary tumor cells to the inhibitory effect of TGFbeta1" *Endocrinology.* 156(2):534-547.