



GRUPO 1

Avances en biología molecular en patología neuroendocrina

Justo P. Castaño^a y Raúl M. Luque^a, Alfonso Leal Cerro^b, Mercedes Robledo^c y Laura Sánchez Tejada^d

^aDepartamento de Biología Celular, Universidad de Córdoba, Córdoba, España

^bHospital Virgen del Rocío, Sevilla, España

^cCNIO, Madrid, España

^dHospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

Introducción

La aplicación de nuevas técnicas y metodologías moleculares y celulares está permitiendo alcanzar avances significativos en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la aparición y la persistencia de las diversas enfermedades que afectan a la glándula hipofisaria. Estudios multidisciplinarios, llevados a cabo tanto en modelos animales como en líneas celulares o muestras tumorales humanas, permiten descubrir nuevas moléculas y potenciales dianas terapéuticas.

En los Congresos de la Endocrine Society y de la Pituitary Society celebrados en junio de 2009 en Washington, Estados Unidos, se presentaron numerosos ejemplos de cómo estas nuevas aproximaciones están ayudando a mostrar el camino de las futuras investigaciones clínicas dirigidas a la búsqueda de nuevas terapias, más efectivas. En efecto, en ambos congresos se han dado a conocer nuevas herramientas moleculares que podrían llegar a facilitar el diagnóstico, aportar información sobre el pronóstico y orientar al clínico hacia el tratamiento más efectivo. Actualmente, el desarrollo de nuevas tecnologías como el análisis de curvas de fusión de alta resolución (*high resolution melting*), el análisis de expresión de micro-ARN (miRNAs) y la pirosecuenciación abren un nuevo panorama de estudio que puede aportar información definitiva sobre la oncogénesis de los tumores hipofisarios y ayudar a predecir su comportamiento y su sensibilidad a fármacos en función de su genotipo y su fenotipo molecular. En definitiva, el conocimiento de la biología molecular de las neoplasias hipofisarias ha experimentado en los últimos años avances considerables que permiten cono-

cer muchas de las alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo de estos tumores; sin embargo, aún es necesario continuar esclareciendo las relaciones entre estas alteraciones genéticas y el comportamiento clinicopatológico del tumor. A continuación se presentan de forma resumida las comunicaciones científicas que consideramos más destacadas en este campo, tanto en formato oral como póster, de las que se presentaron en esta reunión.

Comunicaciones presentadas en el "Endocrine Society Meeting 2009"

I. Hallazgos genéticos en tumores hipofisarios

Un grupo de comunicaciones añade nuevos datos a la caracterización molecular de los defectos en distintos genes que están íntimamente relacionados con el desarrollo de diversas variantes de adenomas hipofisarios. Así, Tichomirowa et al (P2-118) describen la detección de cinco mutaciones del inhibidor 1B de la ciclina dependiente de cinasa (CDKN1B) en 86 familias con adenomas hipofisarios familiares aislados (*family isolated pituitary adenomas*) (FIPA). De forma similar, Evang et al (P1-717) analizaron una mutación en el codón 49 del receptor de la hormona del crecimiento en adenomas somatotropos humanos, y demostraron que dichos adenomas no presentan mutaciones en este codón. Peverelli et al (P1-676) encuentran mutaciones germinales en heterocigosis de la fosfodiesterasa 11A (PDE11A) en el 17% de los casos acromegálicos y, si bien no hallan una asociación a fenotipos, sí encuentran tendencia a una mayor agresividad.

En cuanto a las alteraciones del gen de la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (*MEN1*), Cho et al (P2-661) detectaron una nueva mutación en el codón 122 del exón 9 (TGG → TAG). Sin embargo, Waguespack et al (P3-630) apuntan hacia la ausencia de mutaciones en pacientes menores de 24 años con adenomas hipofisarios esporádicos.

Respecto al gen *AIP* (*aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*), Tichomirowa et al (OR39-5) asocian la presencia de mutaciones de este gen a macroadenomas en pacientes de corta edad con una frecuencia del 16%. Además, Fajardo et al (P1-668) encontraron una nueva mutación en un residuo altamente conservado en pacientes con adenomas secretores de tirotropina (TSH), mientras que Occhi et al (P2-751) hallaron una alta frecuencia de mutaciones en el codón 304 en casos de acromegalía esporádica y en una familia FIPA. En contraste, Soares et al (P3-694) apuntan a que la búsqueda de mutaciones en *AIP* no es un buen test de cribado, por la variabilidad en la penetrancia y en su expresión.

II. Alteraciones transcripcionales y transducciónales descritas

Varias comunicaciones aportan nuevos hallazgos sobre los cambios transcripcionales de distintos genes en la oncogénesis y el desarrollo de adenomas hipofisarios. Así, Sakihara et al (P2-584) proponen como método para el diagnóstico diferencial entre el tirotropinoma y el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea (RTH) el análisis de la expresión del receptor endógeno para la ghrelina (GHSR), mucho mayor en los primeros, y su respuesta a la administración del péptido liberador de somatotropina GHRP-2. Por otro lado, Barbieri et al (P2-149) describen una sobreexpresión de los genes *CXCR4* y *SDF1*, involucrados en la proliferación, la migración, la metástasis y la neoangiogénesis de las células tumorales. Con respecto a la alteración de los mecanismos de apoptosis, Pinto et al (P2-119) observaron una disminución de la expresión de iASPP, proteína inhibidora de la subunidad p65 del NF-κB.

En cuanto a la proteómica de los tumores hipofisarios, la cadherina E (E-cad) es protagonista de varias de las comunicaciones. Elston et al (P2-117) no encontraron cambios en su expresión, pero observaron una pérdida de E-cad en la membrana y un aumento en el núcleo, relacionados con un mayor grado de invasividad del tumor, lo que apunta a una regulación postraduccional. Paralelamente, Fougner et al (P3-693) encontraron altas concentraciones de E-cad en relación con una respuesta al test agudo de octreotida en adenomas somatotropos pequeños y poco invasivos con fenotipo epitelial preservado sin tratamiento preoperatorio.

Por otro lado, Noh et al (P1-665) observaron mediante estudios de inmunohistoquímica un aumento de las proteínas ki67, pAkt y pMAPK que se correlacionan directamente con la recurrencia temprana de los adenomas hipofisarios no funcionantes (NFPA) e inversamente con la sobreexpresión de CREB1, factor de transcripción activado por fosforilación dependiente de señales hormonales de la vía del adenosinomonofosfato cíclico (AMPc), y *ZAC1*, un gen supresor de tumores involucrado en la regulación de la vía de p21 a través de su interacción con p53 y HDAC1.

Los estudios *in vitro* de Peverelli et al (OR15-4) prueban que el componente químérico de dopamina y somatostatina

BIM-23A760 ejerce un efecto antiproliferativo por inhibición del crecimiento e induce la activación de la caspasa-3 mediado por la activación de DR2D y las vías de fosforilación de ERK1/2 y p38 en NFPA que expresan los receptores de dopamina DR2D y de somatostatina SST2 y SST5. También *in vitro*, Moran et al (P2-70) apuntan a que la activación del receptor aril hidrocarbono AhR por agonistas induce proliferación celular y producción de hormonas en cultivos de línea celular GH3 somatolactotropa de rata.

III. Hallazgos epigenéticos

Cada vez más publicaciones intentan esclarecer las características y las alteraciones epigenéticas de la enfermedad hipofisaria. Así, Tang et al (P2-116) apuestan por que la sobreexpresión de enzimas epigenéticas, como LSD1 y SMCX, puede contribuir a la silenciación genética de GST y contribuir a la tumorogénesis hipofisaria.

Por otro lado, Butz et al (OR39-3) realizaron un cribado de los miRNAs involucrados en la oncogénesis de adenomas hipofisarios, y encontraron alteraciones en la expresión de miRNAs como el miR-20a y el miR-93, que forman parte del cluster miR-17/20, descrito como el ONCOMIR en carcinoma de pulmón y linfomas, y cuya expresión está correlacionada con el crecimiento celular. También encuentran sobreexpresado el miR-155, que inhibe la apoptosis a través de la caspasa-3 en la línea celular de mama MDA-MB-543. Estos hallazgos permiten proponer la contribución de estos miRNAs al desarrollo de adenomas hipofisarios esporádicos.

Comunicaciones presentadas en el “11th International Pituitary Congress”, celebrado en Washington del 13 al 15 de junio de 2009

En este congreso internacional se repasaron algunos de los aspectos celulares, moleculares y clínicos que están asociados a diversos tipos de afecciones neuroendocrinas-metabólicas como es el caso de enfermedades asociadas a la hipófisis (tumores, deficiencia de somatotropina [GH], etc.), problemas cardiovasculares, obesidad, etc. En concreto, este congreso comenzó con una sesión plenaria de apertura por parte de los Dres. Steven W.J. Lamberts y Joseph A.M.J. Janssen que presentaron la charla titulada “Endocrinology and aging” en la que se repasaron algunas de las afecciones clínicas asociadas al envejecimiento, haciendo especial hincapié en el papel que el factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-I) tiene en diversas enfermedades (obesidad, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de tumores, etc.). Posteriormente, durante todo el congreso se presentaron multitud de trabajos en forma de comunicaciones orales y pósters, entre los que destacan los siguientes:

1. Cuatro presentaciones de temas de actualidad tituladas: “Corticotroph pituitary tumor transforming gene overexpression induce hypercortisolism, glucose intolerance and hepatic steatosis: A zebrafish transgenic model for Cushing’s disease”, en la cual se describió la validez del uso de un modelo transgénico de pez cebra (Zebrafish)

- que sobreexpresa *PTTG* (*pituitary tumor transforming gene*) para el estudio de la enfermedad de Cushing; "Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) induces PTTG expression", donde se demuestra que la proteína STAT3 es esencial para que se produzca una sobreexpresión de *PTTG* y la ulterior formación de tumores y metástasis; "A mouse model of adult-onset, isolated, GH-deficiency (AOiGHD) reveals long-term reductions in GH/IGF1 improve insulin sensitivity but impair the compensatory rise in insulin observed with diet-induced obesity", en la cual se describió el uso de un modelo de ratón transgénico para estudiar el papel real que ejerce la hormona del crecimiento en los cambios que se producen en el metabolismo y la función de diversos órganos endocrinos (hipófisis, páncreas, grasa, hígado, etc.), observados en diversas enfermedades humanas (obesidad, envejecimiento, acromegalia, etc.), y "High prevalence of vertebral fractures despite normal bone mineral density in patients with long term controlled acromegaly", donde se describió la existencia de una mayor prevalencia de fracturas vertebrales en pacientes con acromegalia independientemente de su densidad mineral ósea.
2. Premio al joven investigador, concedido a la Dra. Maria Chiara Zatelli de la Universidad de Ferrara (Italia). El título del trabajo presentado fue "Everolimus (RAD001) blocks IGF-1 effects on human non functioning pituitary adenomas in vitro" y en el se demuestra que RAD001 reduce la viabilidad celular en tumores no funcionantes (NFPA) mediante la inducción de la muerte celular a través de un mecanismo relacionado con la señalización de IGF-1 y que, por lo tanto, el RAD001 se podría usar clínicamente para detener el crecimiento tumoral de los NFPA.
 3. Setenta y cuatro pósters, que se clasificaron en diferentes áreas temáticas: acromegalia (23 pósters), apetito/obesidad (3), investigación básica celular/molecular (4), corticoliberina (CRH)/ACTH/Cushing's (9), GH (5), deficiencia en GH (3), prolactina (4), tumores (18), otros (5). De entre todas estas comunicaciones cabe destacar las siguientes: "Safety of long-term combined therapy with somatostatin analogues (SA) and cabergoline (CAB) on cardiac valve in acromegalia: an echocardiography study", en la cual se demuestra que el tratamiento combinado con SA y CAB es seguro y mejora las funciones cardíacas y las concentraciones hormonales en pacientes acromegálicos que responden parcialmente al tratamiento con SA; en "Pasireotide (SOM230) reduces pituitary tumor volume in patients with active acromegaly: Results from a phase II extension study" se describe el efecto de la extensión del tratamiento con SOM230 en 29 pacientes con acromegalia activa (fase II, dosis: 200-900 µg s.c. hasta un máximo de 28 meses) que respondieron parcialmente al tratamiento inicial (fase I: tratamiento con octreotida y 3 meses con SOM230). La conclusión de este estudio es que la mayoría de los pacientes experimentan una reducción en el volumen tumoral en la fase temprana del tratamiento (fase I), y en la extensión del tratamiento con SOM230 hay una reducción significativa del tamaño del tumor en pacientes con acromegalia activa, y el 35% de los pacientes que no respondieron al tratamiento inicial experimentaron una reducción significativa

del volumen tumoral tras la extensión de tratamiento; "Malocclusion as a first sign of acromegaly: case report" señala que la mala oclusión podría ser un síntoma de acromegalia en un estado temprano de la enfermedad y que, por lo tanto, podría usarse como diagnóstico precoz para prevenir la progresión de dicha enfermedad; en "Plasma apelin level: a new marker of acromegalic cardiac disease?" se indica que la adipocina conocida como apelina podría ser considerada como un nuevo marcador diagnóstico de problemas cardíacos que se producen en acromegálicos curados y, por lo tanto, con concentraciones normales de IGF-I; "Effectiveness and safety of combined therapy with low dose ketoconazole and cabergoline in patients with Cushing's disease partially responsive to monotherapy with cabergoline" demuestra que el tratamiento con cabergolina y dosis bajas de ketoconazol es eficaz y seguro en pacientes con enfermedad de Cushing que no han respondido positivamente al tratamiento quirúrgico y no son candidatos para otro tipo de tratamientos alternativos; "High prevalence of normal tests assessing hypercortisolism in subject with mild and episodic Cushing's syndrome suggests that the paradigm for diagnostic and exclusion of Cushing's syndrome requires multiple testing" señala que ninguna prueba por sí sola es eficaz al 100% para diagnosticar o excluir el síndrome de Cushing, y sobre todo cuando se trata de Cushing episódico, y recomienda que se midan las concentraciones de cortisol en diferentes ocasiones/periodos en pacientes en los que se sospecha síndrome de Cushing; "Silent corticotroph adenomas have unique recurrence characteristics compared with other non-functioning adenomas" muestra que los porcentajes de recurrencia media de los pacientes con corticotropomas silentes y no silentes son similares. Sin embargo, las recurrencias en pacientes con corticotropomas silentes muestran una mayor agresividad que las recurrencias de los otros (NFPA), lo que indica que los pacientes con corticotropomas silentes requieren un seguimiento mucho más exhaustivo y más a largo plazo, especialmente los diagnosticados a edad temprana; "Macroprolactinomas (MAC) in men are more aggressive than in women: Study of clinical features, outcome of patients and Ki-67 in tumor tissue" indica que los MAC son más agresivos, de mayor tamaño, con concentraciones más elevadas de prolactina y testosterona y con mayor expresión del marcador Ki67 en varones que en mujeres; "Low O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression and response to temozolamide in aggressive pituitary tumors" indica que la expresión de MGMT podría predecir la respuesta farmacológica a temozolamida en pacientes con tumores hipofisarios agresivos; además, se demuestra que la metilación del promotor de MGMT podría explicar la baja expresión de MGMT encontrada en algunos, pero no en todos los tipos de tumores analizados; "Changing expression of pituitary erbB receptor tyrosine kinases in progression from benign to aggressive non-functioning adenomas" propone que los receptores erbB deberían ser considerados un objetivo potencial de fármacos inhibidores para tratar los tumores hipofisarios de carácter agresivo, puesto que se ha demostrado que la expresión de los distintos tipos de receptores (EGFR [tipo 1: ErbB-1], erbB2 y erbB3) fue significativamente

mayor, y más intensa, en tumores invasivos que en tumores no invasivos. Además, se ha demostrado que la presencia de receptores erbB se relaciona con el incremento en el diámetro tumoral, la invasividad de la silla turca, la compresión del quiasma óptico, la invasión supraselar y la invasión del seno cavernoso.

Resumen de la discusión

Se ha hablado de un estudio clinicomolecular multicéntrico, iniciado en Andalucía y que se quiere extender a toda España.

El objetivo de este proyecto es profundizar en el conocimiento de la influencia de distintos marcadores moleculares en la expresión clínica y la respuesta terapéutica de los diferentes subtipos de tumores hipofisarios, promoviendo la transferencia biomédica.

Todos los hospitales españoles con actividad neuroquirúrgica hipofisaria pueden participar en esta iniciativa, con el objeto de crear una base de datos española de tumores hipofisarios con correlación clínica/molecular, lo que puede ser útil tanto para los investigadores clínicos como para los básicos.

Bibliografía

Pósters

- [P1-665] Marker predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenoma. T-W Noh, EJ Lee, et al.
- [P1-668] TSH-secreting pituitary adenoma in a male patient with a novel missense aip mutation. C Fajardo Montanana, A Beckers, et al.
- [P1-669] Clinicopathological studies of 7 cases of human pituitary Crooke's cell adenomas (CCAs)-diagnostic, prognostic and therapeutic strategy by immuno-histochemistry. M Takei, A Teramoto, et al.
- [P1-676] Analysis of genetic variants of phosphodiesterase 11A (PDE11A) in acromegalic patients. E Peverelli, A Spada, et al.
- [P1-717] Assessment of somatic mutation in growth hormone receptor codon 49 in human somatotroph adenomas. JA Evang, J Bollersle, et al.
- [P2-70] Aryl hydrocarbon agonists modulate proliferation and impair hormone synthesis in the pituitary. TB Moran, LT Raetzman.
- [P2-111] Increased expression of angiogenic genes in the brains of Meg3-null mice. FKE Gordon, A Klibanski, et al.
- [P2-112] Immunohistochemical expressions of multiple stem cell markers in pituitary adenomas. M Tobita, S Yamada, et al.
- [P2-115] Deletion of Meg3, a gene silenced in human gonadotroph-derived pituitary adenomas, is lethal in mice. Y Zhou, A Klibanski, et al.
- [P2-116] Epigenetic enzymes are upregulated in pituitary adenomas. D Tang, S Xu, R Fang, V Nose, R Carroll, Y Shi, UB Kaiser.
- [P2-117] Nuclear accumulation of E-cadherin is associated with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas. MS Elston, KL McDonald, et al.
- [P2-118] An analysis of the role of cyclin dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) gene mutations in 86 families with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). MA Tichomirowa, A Beckers, et al.
- [P2-119] Signaling pathway in pituitary tumorigenesis: evidence for interaction between iASPP and NFκB p65 subunit. EM Pinto, MD Bronstein, et al.

- [P2-149] SDF1 and CXCR4 expression in pituitary: role in the proliferation of human pituitary adenoma cells. F Barbieri, T Florio, et al.
- [P2-157] Expression of angiogenic and proliferative factors in human pituitary adenomas. C Cristina, D Becu-Villalobos, et al.
- [P2-584] GHRP-2 can stimulate TSH secretion from TSH secreting pituitary adenoma. S Sakihara, T Suda, et al.
- [P2-661] Novel MEN1 gene mutation in a family with multiple endocrine neoplasia type 1. MH Cho, HC Lee, et al.
- [P2-751] Evaluation of mutations in aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) in acromegalic sporadic cases and in one FIPA family. G Occhi, S Carla, et al.
- [P3-578] Suitable housekeeping (HK) genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR (RTqPCR) expression studies of corticotroph pituitary adenomas. LP Brito, MCBV Fragoso, et al.
- [P3-630] Apparently sporadic pituitary adenomas presenting in children and young adults are rarely caused by mutations in the MEN1 gene. SG Waguespack, T Rich, et al.
- [P3-693] High E-cadherin levels in the acute octreotide responsive, the small and the less invasive somatotroph adenomas. SL Fouquer, JP Berg, et al.
- [P3-694] Somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations are absent in sporadic somatotropomas and in familial prolactinoma. BS Soares, MS Sarquis, et al.

Sesiones orales

- [OR15-4] Effect of the dopamine-somatostatin chimeric compound BIM-23A760 on cell proliferation and apoptosis in human non-functioning pituitary adenomas. E Peverelli, A Lania, et al.
- [OR39-3] Screening for over-expressed microRNAs in human sporadic pituitary adenomas. H Butz, I Liko, S Czirjak, P Igaz, V Zivkovic, M Korbonits, et al.
- [OR39-5] High incidence of AIP mutations in sporadic pituitary adenomas in young patients with macroadenomas. MA Tichomirowa, A Beckers, et al.
- [S69-1] Chemotherapy of Aggressive Pituitary Tumors: Pathologic Predictors, A McCormack.

Pituitary Congress

Sesiones orales

- Sesiones plenarias*
Endocrinology and aging. SWJ Lamberts, AMJ Joseph.

Premio al joven investigador

- [YIA] Everolimus (RAD001) blocks IGF-1 effects on human non functioning pituitary adenomas in vitro. MC Zatelli, M Minoia, C Filieri, F Tagliati, M Buratto, D Casini, et al.

Temas de actualidad

- [HT1] Corticotroph Pituitary tumor transforming gene overexpression induce hypercortisolism, glucose intolerance and hepatic steatosis: A zebrafish transgenic model for Cushing's disease. N-A Liu, H Jiang, H Huang, S-G Ren, X-M Fan, A Ben-Shlomo, et al.
- [HT2] Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) induces PTTG expression. C Zhou, K Wawronwsky, S Bannykh, S Melmed.
- [HT3] A mouse model of adult-onset, isolated, GH-deficiency (AOIGHD) reveals long-term reductions in GH/IGF1 improve insulin sensitivity but impair the compensatory rise in insulin observed with diet-induced obesity. RM Luque, Q Lin, J Córdoba-Chacón, T Buch, A Waisman, H Vankelecom, et al.

[HT4] High prevalence of vertebral fractures despite normal bone mineral density in patients with long term controlled acromegaly. N Biermasz, M Wassenaar, N Hamdy, F Roelfsema, M Stokkel, M Kloppenburg, et al.

Pósters

[P3] Safety of long-term combined therapy with somatostatin analogues (SA) and cabergoline (CAB) on cardiac valve in acromegaly: an echocardiography study. RS Auriemma, M Galderisi, M Galdiero, LFS Grasso, MC De Martino, M De Leo, et al.

[P10] Pasireotide (SOM230) reduces pituitary tumor volume in patients with active acromegaly: Results from a phase II extension study. A Farrall, M Ruffin, S Petersenn.

[P20] Malocclusion as a first sign of acromegaly: case report. S Yaraman.

[P22] Plasma apelin level: a new marker of acromegalic cardiac disease? A Gedik, E Tulumen, S Dagdelen, G Kabakci, T Erbas.

[P36] Effectiveness and safety of combined therapy with low dose ketoconazole and cabergoline in patients with Cushing's disease partially responsive to monotherapy with cabergoline. R

Pivonello, M De Leo, MC De Martino, A Cozzolino, RS Auriemma, M Galdiero, et al.

[P38] High prevalence of normal tests assessing hypercortisolism in subject with mild and episodic Cushing's syndrome suggests that the paradigm for diagnostic and exclusion of Cushing's syndrome requires multiple testing. TC Friedman, DE Ghods, S Seasholtz, LT Zachery, E Zuckerbraun, HK Shahinian, et al.

[P57] Macroprolactinomas (MAC) in men are more aggressive than in women: Study of clinical features outcome of patients and Ki-67 in tumor tissue. P Fainstein Day, M Glerean, S Lovazzano, A Kozak, M Balzaretti, S Christiansen, et al.

[P62] Silent corticotroph adenomas have unique recurrence characteristics compared with other non-functioning adenomas. EK Lee, HY Cho, HI Kim, JW Yoon, HY Ahn, JH An, et al.

[P63] Low O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression and response to temozolomide in aggressive pituitary tumors. A McCormack, K McDonald, A Gill, M Burt, M Debono, R Ross, et al.

[P70] Changing expression of pituitary erbB receptor tyrosine kinases in progression from benign to aggressive non-functioning adenomas. O Cooper, V Bonert, K Wawrowsky, S Melmed.