

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA TRANSICIÓN EN EPITELIO-MESEQUIMAL DE CÉLULAS DE MAMA IRRADIADAS COM HAZ DE MAMOGRAFÍA

Pereira, L.¹, Ferreira-Machado, S.C.^{2,3}, Almeida, C.E.B¹ e de Almeida, C.E.²

1 Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD/CNEN)

2 Laboratório de Ciências Radiológicas (IBRAG/UERJ)

3 Universidade Federal Fluminense (GBG/UFF)

RESUMEN

Introducción: La radiación ionizante se utiliza en la salud, tanto para el diagnóstico como en la terapia. Este es un agente físico que puede causar alteraciones en las células del tejido expuestas a la radiación. Estudios recientes demuestran que células de mama irradiadas con dosis de 1 a 2 Gy pueden pasar por una transición epitelio-mesenquimal. Este proceso se define como cambios morfológicos y moleculares en el fenotipo de células de epitelio a mesenquimal, caracterizada por una reducción en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina y CK-18) y la inducción de marcadores mesenquimales (vimentina y fibronectina), que son relevantes en la progresión del tumor y la metástasis. Hoy en día, la información sobre la radiación inducida por cáncer son provenientes, en particular, de estudios epidemiológicos de sobrevivientes de las bombas atómicas, es decir de altas dosis. Hay limitaciones metodológicas para cuantificar directamente el riesgo de cáncer en poblaciones humanas expuestas a dosis inferiores a 100 mGy, como es el caso de la mamografía cuyas dosis absorbidas son de aproximadamente 8 mGy en cada exposición. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en células mamarias expuestas a dosis de radiación de 8 mGy y 16 mGy.

Metodología: Se irradió la línea de células epiteliales de mama MCF-10 en mamógrafo convencional, con dosis de 8 mGy y 16 mGy, y se analizó 4h y 72h después de la exposición. En el grupo de control, para los dos días mencionados, no se irradiaron las células. Las células se irradiaron en un matraz de cultivo de 25 cm² colocado dentro de una fantona de acrílico. El análisis de la expresión del gen de la E-cadherina, CK-18, vimentina, MMP-9, GAPDH (constitutiva) fue hecho por PCR en tiempo real.

Resultados: No hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) en la expresión de genes analizados en los grupos irradiados en comparación con el grupo control.

Conclusión: La exposición de la línea celular MCF-10 a bajas dosis de radiación, en las condiciones experimentales propuestas, no indujo la expresión de genes vinculados a la transición epitelial-mesenquimal.

1. INTRODUCCIÓN

Se considera el cáncer de mama (CM) un problema de salud pública muy grave, que requiere mayores recursos financieros para resolver problemas relacionados con el diagnóstico y el tratamiento [1]. Es una enfermedad progresiva y esta progresión puede ser alterada mediante la temprana detección, que es cuando se puede tratar de forma más adecuada. La mamografía es un examen de radiodiagnóstico y se ha utilizado, en especial, en pacientes asintomáticos con el fin de obtener imágenes radiográficas de la mama y detectar precozmente neoplasias, todavía en estado inicial. La técnica utiliza el estándar de oro para este fin y es capaz de mostrar lesiones en una etapa prematura (lesiones subclínicas con apenas algunos milímetros de diámetro). Actualmente, existe una controversia en cuanto al comienzo y el tiempo indicado para llevar a cabo el llamado cribado mamográfico. El Ministerio de Salud de Brasil, recomienda la mamografía de cribado, en todas las mujeres entre los 50 a 69 años, con un intervalo máximo de dos años entre los exámenes.

Debido a que es una prueba que usa radiación ionizante (rayos-X), su práctica debe ser justificada en relación a otras pruebas alternativas y que tenga sobretodo un beneficio positivo para la sociedad. En este caso, el beneficio puede ser inferido a partir de la tasa de detección del CM y el número de vidas salvadas a través del conocimiento del tumor por la intervención del programa de cribado mamográfico [2].

Aunque esta práctica está justificada, se sabe que la radiación ionizante tiene suficiente energía para causar ionización y cambios en moléculas importantes en el entorno biológico, que puede generar diversas consecuencias para la célula. Entre éstas, las mutaciones, que pueden interferir en las vías metabólicas de la célula y contribuir en el proceso de carcinogénesis. Por tanto, los beneficios deben superar los riesgos de inducción del cáncer por la radiación.

La Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP) ha dado mucha énfasis a la obra de Preston *et al.*, de 2002. Estos autores, con base experimental y estudios epidemiológicos, asociaron el aumento del riesgo de cáncer con la exposición a la radiación ionizante [3].

El riesgo de inducción de cáncer por exposición por debajo de 100 mSv, dosis consideradas relativamente bajas, todavía es muy discutido. Aún, existen limitaciones metodológicas para cuantificar directamente el riesgo de cáncer en poblaciones humanas expuestas a este rango de dosis [4,5].

Las consecuencias indeseables sobre la exposición de células a bajas dosis de radiación son también objeto de un intenso debate e investigación [6]. La comprensión de las alteraciones en la expresión de genes promovidos por bajas dosis de radiación es relevante para el entendimiento de los riesgos asociados con esta condición. Es de destacar que exposiciones de esa naturaleza está relacionada a diversos exámenes de diagnóstico por imagen, incluyendo la mamografía.

Así, en estudios usando linfocitos de pacientes sometidos a la mamografía digital y a la tomosíntesis fueron detectados aumento de la fosforilación en la variante de la histona H2AX y modificación post-traduccional, considerada una de las primeras respuestas de la célula a la presencia de daño en el DNA de tipo de roturas de doble [7]. Además del análisis de roturas

de dobles y de los micronúcleos, considerados marcadores para estudios de los efectos de la radiación ionizante, otros modelos experimentales están siendo aplicados a células humanas tumorales y no tumorales con la finalidad de identificar el mecanismo potencial de la radiación ionizante en la activación de dianas celulares que están relacionadas con la progresión del tumor [8, 9]. La identificación de los genes posiblemente responsables por el proceso carcinogénesis radioinducido es un paso importante en la identificación del mecanismo.

Transición epitelio-mesenquimal (EMT), que es definida como cambios morfológicos y moleculares de un fenotipo epitelial para mesenquimal, han sido observados en células de cáncer de mama irradiadas con dosis de 1 a 2 Gy, que corresponden a dosis terapéuticas [10, 11]. Este fenómeno se caracteriza por la pérdida de la molécula de adhesión, reducción en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina y CK-18) y inducción en la transcripción de marcadores mesenquimales (vimentina y fibronectina), que son relevantes en la progresión tumoral y metástasis [12]. Las células en este proceso pierden su polaridad basal y muestran cambios fenotípicos, ganando mayor capacidad de migración en la matriz extracelular. Los estudios demuestran que los factores de transcripción Snail y Torsión actúan como reguladores del fenotipo mesenquimal a través de la represión de la E-cadherina. La sobreexpresión de estos represores transcripcionales se ha relacionado con tumores en etapas avanzadas, de mayor potencial metastásico, juntamente con la expresión de las metaloproteinasas (MMP) y de los factores angiogénicos.

Dada la controversia entre los efectos observados con dosis bajas de radiación y la necesidad de la realización de cribado mamográfico en mujeres, este estudio tiene como objetivo evaluar la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesenquimal en células humanas de mama no tumorales (MCF-10) expuestas a bajas dosis de radiación.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

- La línea MCF-10, células no tumorales de mama humana, se cultivaron en el **DMEM**, suplementado con 10% de suero fetal de caballo, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), EGF (200 mg/mL), hidrocortisona (5 µg/mL) y insulina (5 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37°C en una estufa con una atmósfera de 5% de CO₂, para el crecimiento y durante el tiempo de incubación requerido después de la irradiación (4 h y 72 h). Los experimentos fueron realizados en forma de monocapa, con una confluencia de 70%.
- Equipo de mamografía - se irradiaron las células usando el equipo del Hospital Universitario Pedro Ernesto (SIEMENS - Mamomat 3000).
- Equipo de PCR - en tiempo real fue utilizado el termociclador 7500 PCR real time, PCR System/Applied Biosystems.
- El kit para el análisis de PCR, en tiempo real, fue el SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems StepOne).

2.2 Método

- El experimento fue organizado de la siguiente forma: grupos irradiados a 8 mGy; grupos irradiados a 16 mGy; y grupos de control (células no irradiadas). Los análisis fueron realizadas después de 4 h y 72 h de las irradiaciones. Los experimentos se repitieron tres veces.
- Para irradiación de células de mamas fue seleccionado el haz de rayos-X estándar, establecido por protocolos internacionales en la práctica de la mamografía para una mama de composición promedio (50% tejido mamario + 50% grasa). Es decir, un haz con los siguientes parámetros: tensión de 28 kV, corriente de 63 mA y la combinación ánodo/filtro de Mo/Mo, resultando en una dosis de 8 mGy. Para la dosis de 16 mGy fueron dos exposiciones en secuencia, simulando las dos exposiciones que las mujeres reciben cuando se hace la mamografía.
- Las células en cultivo en monocapa se irradiaron en matraz de 25 cm² llenos de PBS 1X, dentro de un simulador de acrílico con 4 cm de espesor, y los espacios llenos con un gel conductor (ver Figura 1).

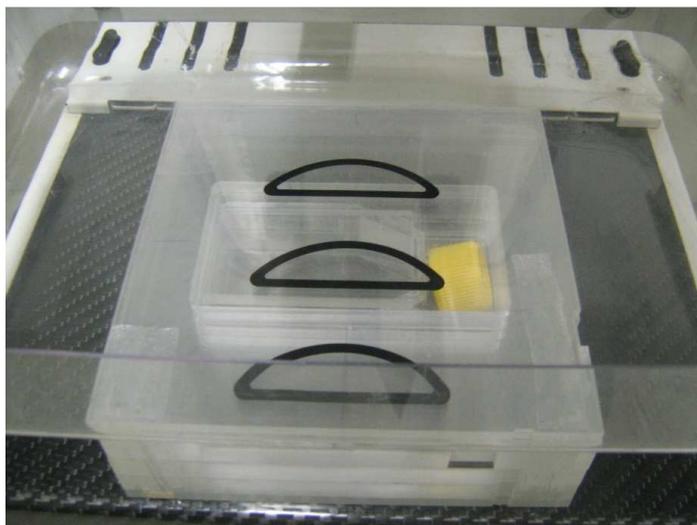


Figura 1: Simulador para la irradiación de las células de la mama.

- Después de la irradiación las células se mantuvieron en su matraz en medio de cultivo a 37°C con 5% de CO₂, hasta el tiempo de 4 h y 72 h, posteriormente a la irradiación.
- La extracción del RNA total de las células MCF-10 en los diferentes grupos se realizó con Trizol, siguiendo la indicación del fabricante (Invitrogen). En seguida, la reacción de RT-qPCR se realizó usando primers específicos para el análisis de la expresión de CK-18 gen, E-cadherina, Vimentina y MMP9. Las muestras se sometieron a la incubación inicial en el termociclador a 50°C durante 2 minutos, seguido de una incubación de 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos de *threshold cycle* (Ct), para cada punto experimental, en sus diferentes condiciones fueron normalizados con Cts estandarizado del gen de la GAPDH (genes constitutivos). Una vez normalizado, la variación en los niveles de mRNA correspondiente a cada gen de interés, se determinó en relación con los puntos experimentales, en comparación con las muestras de control.

- Los datos obtenidos en este trabajo están expresados en promedio con su respectiva desviación estándar (error asociado). La homogeneidad de las varianzas se confirmó por la prueba de Bartlett. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por ANOVA, usando el teste *one-way*, y por el teste de *post-hoc* de Tukey. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism, versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California EE.UU.)

3. RESULTADOS

- Como puede verse en la Figura 2, no hubo estadísticamente diferencias significativas ($p > 0,05$), con relación a los respectivos grupos de control, para los datos de RT-qPCR para CK-18, E-cadherina, vimentina y MMP9, tanto para los grupos irradiados con dosis de 8 mGy y 16 mGy, en sus respectivos tiempos de 4h y 72h.

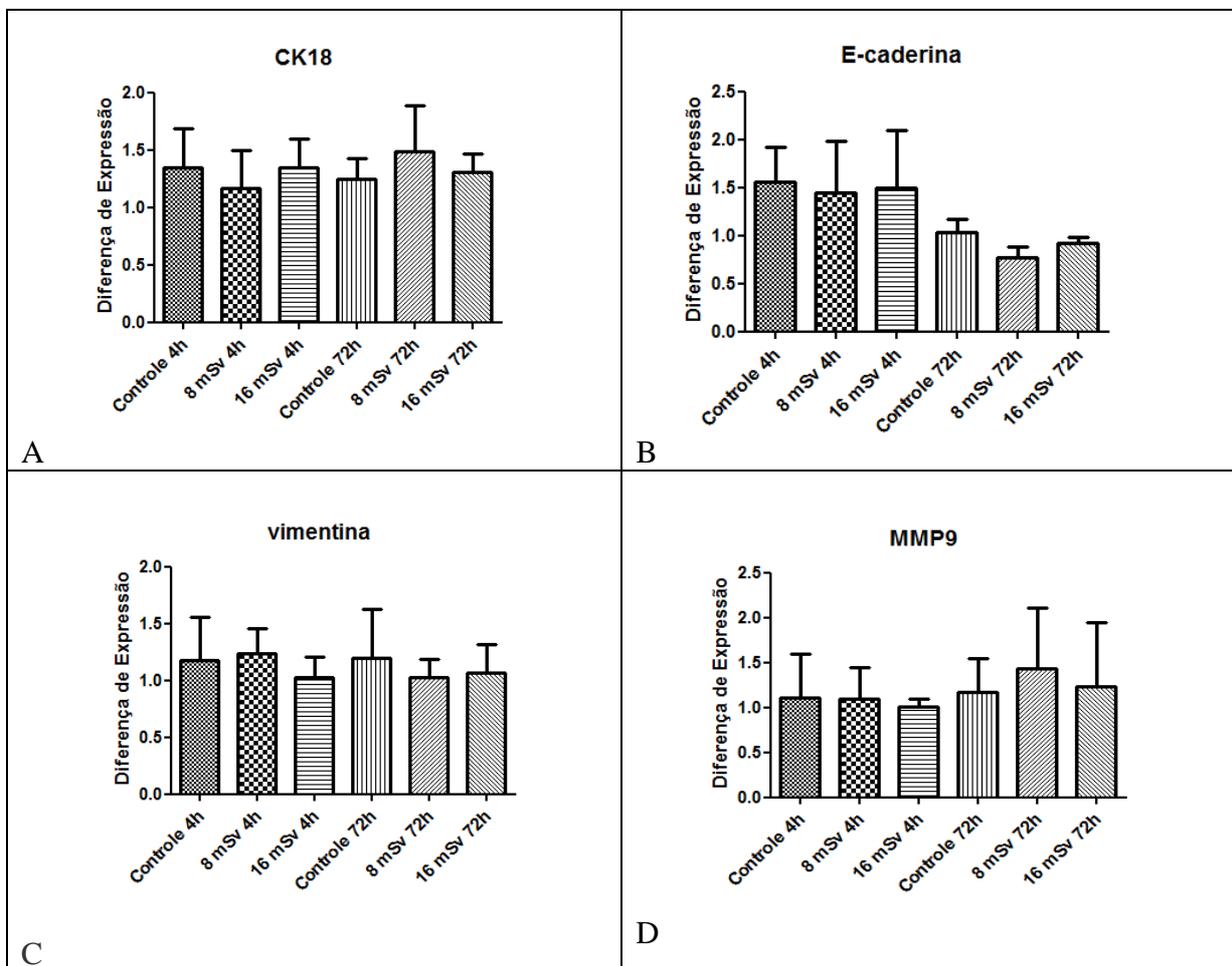


Figura 2: Nivel de expresión de mRNA de CK-18 (A), E-cadherina (B), vimentina (C), MMP9 (D) en la línea MCF-10 en el grupo de control, 8 y 16 mGy y el tiempo de 4h y 72h después de irradiación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3. CONCLUSIÓN

Existe un interés por diversos grupos de investigadores de identificar posibles dianas celulares, que cuando alterados por la radiación ionizante, puedan estimular la progresión tumoral y la metástasis. El aumento de la expresión de metaloproteinasas y de los genes envueltos en la angiogénesis, indican que son un posible factor contribuyente para el aumento del potencial metastásico de células. Sin embargo, los mecanismos de acción siguen siendo inciertos. La transición epitelial-mesenquimal parece ser importante en estos eventos. Contrariamente a lo que ha sido expuesto en algunos estudios con dosis superiores a 1 Gy, en el presente estudio no se ha encontrado, en la línea no-tumoral de mama MCF-10, cambios significativos en la expresión de marcadores epiteliales, mesenquimales y MMP9 cuando las células fueron expuestas a dosis iguales aquellas que son normalmente recibidas por pacientes durante el examen de mamografía. Un análisis más detallado se llevará a cabo por nuestro grupo de trabajo utilizando líneas de células tumorales.

4. REFERENCIAS

1. Stojacić-Djenić S, Kerkez M, Jović D, Maksimović Z, Jeftović I, Milić Z, Perisić M, Jurisić V. Comparison of clinical data, ultrasonography, mamography and histological findings obtained by ex tempore biopsy for breast cancer diagnosis]. *Acta Chir Iugosl.* 2008;55(4):37-41.
2. Heyes, G. J., Mill, A. J., Charles, M. W., Enhanced biological effectiveness of low energy X-rays and implications for the UK breast screening programme. *The British Journal of Radiology*, 79, 195–200, (2006).
3. Preston, D. L., Mattsson, A., Holmberg, E., Shore, R., Hildreth, N. G., and John D.Boice Jr., Radiation Effects on Breast Cancer Risk: A Pooled Analysis on Cohorts. *Radiation Research*, 158(2):220-235. (2002).
4. Pochin, E. E., Problems involved in detecting increased malignancy rates in areas of high natural radiation background. *Health Phys.* 31, 148–151, (1976).
5. International Commission on Radiological Protection (1991) 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection (Pergamon, Oxford).
6. UNSCEAR, *Sources and Effects of Ionizing Radiation: 2010 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes*. United Nations, New York, (2010).
7. Brand M, Sommer M, Achenbach S, Anders K, Lell M, Löbrich M, Uder M, Kuefner MA. X-ray induced DNA double-strand breaks in coronary CT angiography: comparison of sequential, low-pitch helical and high-pitch helical data acquisition. *Eur J Radiol.* 2012 Mar;81(3).
8. Stankevicins L, Almeida da Silva AP, Ventura Dos Passos F, Dos Santos Ferreira E, Menks Ribeiro MC, G David M, J Pires E, Ferreira-Machado SC, Vassetzky Y, de Almeida CE, de Moura Gallo CV. MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells. *Radiat Oncol.* 2013 Oct 5;8(1):231.

9. Sofia Vala I, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, Carvalho LM, Rüegg C, Grillo IM, Barata JT, Mareel M, Santos SC Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. PLoS One. 2010 Jun 21;5(6).
10. Zhang X, Li X, Zhang N, Yang Q, Moran MS. Low doses ionizing radiation enhances the invasiveness of breast cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition. Biochem Biophys Res Commun. 2011 , 19;412(1):188-92.
11. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2010 Jun;15(2):253-60.
12. Heyes GJ., Mill AJ., Charles MW., Mammography-oncogenecity at low doses. J Radiol Prot, 29 (2A): A123 – A132, (2009).