

DAÑO AL ADN CAUSADO POR BNCT EN DOS LÍNEAS TUMORALES

**Rodríguez C¹; Carpano M¹; Thorp S², Curotto P³, Pozzi E³, Casal M⁴, Pawlak E⁵,
Juvenal G^{1,6}, Pisarev M^{1,6}, Dagrosa A^{1,6}.**

¹Departamento de Radiobiología (CAC, CNEA), ²Departamento de Instrumentación y Control (CAE, CNEA),
³RA-3-Reactores de Investigación y Producción (CAE, CNEA), ⁴Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo",
(UBA), ⁵Centro Regional de Referencia para Dosimetría-Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis
(CAE, CNEA), ⁶Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

RESUMEN

La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer se basa en la reacción nuclear $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ en el tumor que daña principalmente al ADN. Cuando afecta a ambas hebras, se activan sistemas de reparación especializados: la reparación por Recombinación Homóloga (HRR, Rad51) y la Reparación por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ, Ku70). Previamente demostramos que BNCT puede ser una alternativa a los tratamientos del cáncer de tiroides y del melanoma cutáneo en estadios avanzados y con escasa respuesta a terapias convencionales. El objetivo de estos estudios fue caracterizar los mecanismos de daño y reparación inducidos por BNCT en cáncer de tiroides y melanoma *in vitro*. Se utilizaron células de las líneas humanas de carcinoma tiroideo (WRO) y melanoma (MEL J) que fueron distribuidas en los grupos 1) BNCT; 2) Neutrones; 3) Gamma. Fueron irradiadas en el reactor RA-3 (flujo= 1.10^{10} n/cm² seg) o con un irradiador Gammacell con una dosis de 3 Gy ($\pm 10\%$). El daño fue cuantificado por inmunofluorescencia de la histona γH2AX y la expresión de ARNm de las enzimas Rad51 y Ku70 fue analizada por PCR. Las células del grupo BNCT presentaron los focos más grandes a partir de los 30 minutos postirradiación (N vs BNCT, *** $p < 0.001$) en ambos modelos. Los ARNm de Rad51 aumentaron luego del tratamiento con BNCT, en comparación con el grupo gamma o neutrones en ambos modelos luego de 2 horas de la irradiación. Los ARNm de Ku70 no mostraron cambios en tiroides mientras que hubo un leve descenso en el grupo gamma y un leve aumento en los grupos neutrones y BNCT 2 horas luego de la irradiación en el modelo de melanoma. Concluimos que la respuesta inducida por BNCT es diferente y específica para cada línea tumoral, pudiendo esto deberse a la radiosensibilidad propia de cada tejido.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) es un tipo de radioterapia para el tratamiento del cáncer que ha sido propuesta como una alternativa para tratar tumores no susceptibles a terapias clásicas (1). Se basa en la administración de ^{10}B ligado a algún compuesto capaz de ser captado preferencialmente por las células tumorales. La borofenilalanina (BPA) es el compuesto más ampliamente utilizado hasta el momento (1). Al ser un aminoácido esencial es captado por todas las células y en mayor medida por las células tumorales debido a su ritmo metabólico exacerbado. Una vez incorporado el ^{10}B , se irradia con un haz de neutrones térmicos lo que provoca la reacción de captura $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ (1). Las

partículas resultantes, ambas de alto LET, depositan gran cantidad de energía en su corta trayectoria provocándole daño a la célula que las contienen sin dañar al tejido sano periférico. El ADN es uno de los blancos más susceptibles dentro del núcleo celular. La radiación ionizante provoca lesiones en el ADN. De estas lesiones las que afectan a ambas cadenas son las más peligrosas ya que pueden llevar a la formación de rearrreglos cromosómicos o pérdida de información genética pudiendo ser letales para la célula (2). Durante una terapia oncológica, este es el efecto deseado en las células malignas que se desean erradicar. Sin embargo estas muchas veces logran recuperarse disminuyendo la eficacia de la terapia.

Cuando el ADN sufre una lesión de este tipo inmediatamente se produce la fosforilación de la histona H2AX lo cual provoca la descondensación de la cromatina y el reclutamiento de la maquinaria de reparación de lesiones doble cadena en el ADN (3). La reparación por Recombinación Homóloga (HRR) y la reparación por Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ) son las vías principales por las cuales se lleva a cabo en células de mamífero (4,5).

Los cánceres indiferenciado y el pobremente diferenciado de tiroides pierden la capacidad de captar yodo conforme aumenta su grado de indiferenciación volviéndolos resistentes al tratamiento con yodo radiactivo (6).

El melanoma es un tumor muy agresivo que de ser diagnosticado a tiempo puede ser controlado con terapias convencionales. Sin embargo, en etapas muy avanzadas la efectividad de estas terapias es pobre (7).

Esta característica en ambos tipos de tumores los vuelve potenciales candidatos para el tratamiento con BNCT. En el presente trabajo nos propusimos caracterizar las similitudes y diferencias respecto al daño causado luego del tratamiento con BNCT y de los mecanismos de reparación del ADN que se activan en dos líneas celulares humanas de origen tumoral: un carcinoma folicular de tiroides y un melanoma.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Líneas celulares

Para estos estudios se utilizaron células de la línea humana de cáncer folicular de tiroides WRO, cedidas amablemente por el Dr. G. Juillard (UCLA, USA) y células de melanoma humano MelJ cedidas amablemente por el Dr. José Mordoh (Instituto de Investigaciones Bioquímicas Leloir). Las células WRO fueron crecidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 154 mg/L de piruvato de sodio, 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 100 mg/L de estreptomycin, 1.000.000 UI/L de penicilina y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células Mel J fueron crecidas en DMEM High Glucosa suplementado con 3,7 g/L de bicarbonato de sodio, 5 mg/L de insulina, 100 mg/L de estreptomycin, 1.000.000 UI/L de penicilina, suero fetal bovino (SFB) al 10% y L-glutamina 2 mM. Se mantuvieron en estufa a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y humedad a saturación.

2.2 Solución de BPA

La BPA (Boron Biologicals Inc., Raleigh, USA) se preparó en una concentración de 30 mg/ml (0,14 M). Este compuesto de boro (L-fenilalanina enriquecido con 95% de átomos de ^{10}B fue combinado en PBS 1X con fructosa en una relación 1:1 y llevado a pH 9,5-10 con hidróxido de sodio 10N hasta su disolución y finalmente reajustado a 7,4 con ácido clorhídrico 6N.

2.3 Diseño Experimental

El día previo a las irradiaciones ambas líneas fueron sembradas en placas T25 o p60 hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (50-70% de confluencia). La adición de BPA (10 μg ^{10}B /ml, 10 ppm de ^{10}B) al medio se realizó 16 horas antes de cada irradiación. El tiempo de incubación fue seleccionado basándose en estudios previos de captación de boro en los cuales se observó un pico en la concentración de BPA en el tumor (8).

Las irradiaciones se llevaron a cabo en la facilidad de la columna térmica del reactor RA-3 (flujo= 1.1010 n/cm².sec) y con una fuente de cobalto-60 del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo" o con un irradiador Gammacell-220, marca Nordion perteneciente al Laboratorio de Dosimetría de Altas Dosis (CAE,CNEA).

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) *Irradiación con el haz de neutrones (N).*
- 2) *Irradiación con neutrones en presencia de BPA (BNCT).*
- 3) *Irradiación gamma (gamma)*
- 4) *Control sin irradiar (C)*

2.4 Dosimetría

Los cálculos correspondientes a la dosimetría de la irradiación fueron realizados en la facilidad del RA-3. Todas las irradiaciones fueron realizadas a una potencia de 8 MW. El flujo neutrónico térmico se determinó usando un detector autoenergizado en base a rodio, el cual fue calibrado usando hojuelas de cobalto. Las determinaciones del flujo neutrónico epitérmico y rápido se realizaron con hojuelas de activación bajo cadmio y una hojuela de indio bajo cadmio y esfera de boro respectivamente. Los resultados de estas mediciones mostraron ser varios órdenes de magnitud menores a las obtenidas para el flujo térmico, motivo por cual no fueron tenidas en cuenta para el cálculo de la dosis. Finalmente, para la medición de la dosis presente en el haz neutrónico se utilizó una cámara de ionización de grafito, blindada con un capuchón de litio. La irradiación gamma se llevó a cabo durante los tiempos necesarios para alcanzar una dosis absorbida de 3Gy ($\pm 10\%$).

2.5 Inmunofluorescencia (γ H2AX)

A distintos tiempos luego de las irradiaciones: 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas, cada placa p60 fue fijada en 3 ml de paraformaldehído 4% en PBS 1X durante 15 minutos. Luego fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% en PBS 1X durante 15 minutos a 4°C y bloqueadas con suero fetal bovino 5% en PBS 1X durante 30 minutos. Se realizó una incubación ON con una solución 1:500 de anticuerpo monoclonal anti- γ H2AX (Upstate, LakePlacid, NY) en agua miliQ. Al día siguiente se incubaron con una solución 1:200 de anticuerpo secundario acoplado a FITC (Upstate, LakePlacid, NY) en agua miliQ por una hora en oscuridad. Pasado ese tiempo cada placa fue teñida y montada con antifade Vectashield con DAPI. Finalmente fueron examinadas en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51 con una lente 100X (UPlanApo 100 X/1.35 oil). Para cada tratamiento se obtuvieron imágenes con la cámara CCD (Olympus DP70) tanto para FITC como para DAPI y se analizaron en promedio más de 100 células por placa. El número de focos y los diámetros por núcleo de γ H2AX fueron medidos con el programa Image Pro Plus.

2.6 Determinación de la expresión de mRNA

Luego de las irradiaciones, las células fueron mantenidas en estufa a 37°C por 2, 4, 6, 24 y 48 horas y se extrajo ARN total con el protocolo de TRIZOL (Life Technologies). La cuantificación se llevó a cabo por densidad óptica a 260 y a 280 nm en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se utilizaron 2,5 μ g de ARN total para la síntesis de cDNA. Los primers utilizados para la PCR fueron: Ku70: 5'-CATGGCAACTCCAGAGCAG-3' (forward) y 5'-GCTCCTTAAACTCATCCACC-3' (reverse) y un programa de 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 56 °C por 45 s y 72°C por 45 s (9). Rad51: 5'-CTTTGGCCCCACAACCCATTTC-3' (forward) y 5'-ATGGCCTTTCTCACCTCCAC3' (reverse) y un programa de 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 59 °C por 45 s y 72 °C por 45 s (10). Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2%, las imágenes fueron obtenidas en un analizador de imágenes UVP BioImaging Systems y la intensidad de cada banda medida con el programa Image J y relativizadas a la expresión de GADPH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga.

3. RESULTADOS

3.1 Determinación del daño al ADN mediante la detección de la histona γ -H2AX

3.1.1 WRO

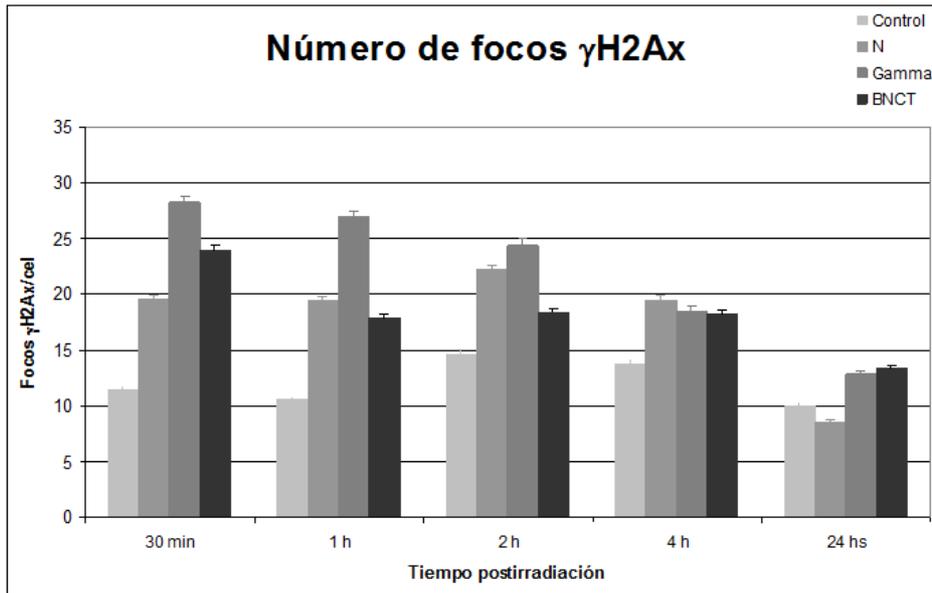


Figura 1: Número de focos γ H2AX por núcleo en células WRO expuestas a 3Gy de neutrones (N), radiación gamma (gamma) y neutrones + BPA (BNCT) a 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas luego de la irradiación y en controles sin irradiar.

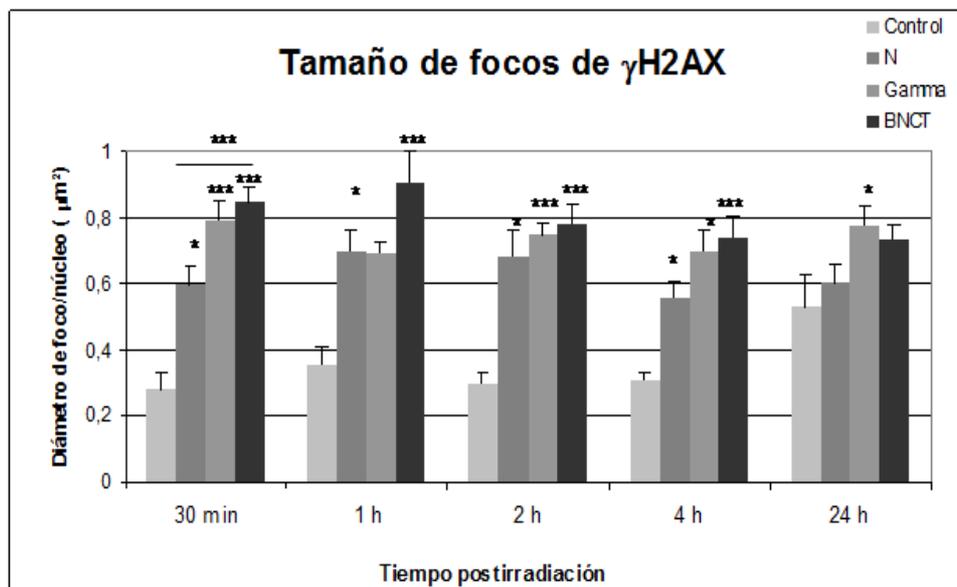


Figura 2: Tamaño de focos γ H2AX por núcleo en células WRO expuestas a 3Gy de neutrones (N), radiación gamma (gamma) y neutrones + BPA (BNCT) a 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas luego de la irradiación y en controles sin irradiar (Control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NCT vs BNCT, *** $p < 0.001$)

La Figura 1 muestra que el número de focos de la histona γ H2AX es mayor en el grupo gamma en comparación a los irradiados con neutrones (N y BNCT) a todos los tiempos estudiados. Sin embargo como se observa en la Figura 2 el tamaño de cada foco es significativamente mayor para el grupo BNCT desde los 30 minutos hasta las 2 horas.

3.1.2 Mel J

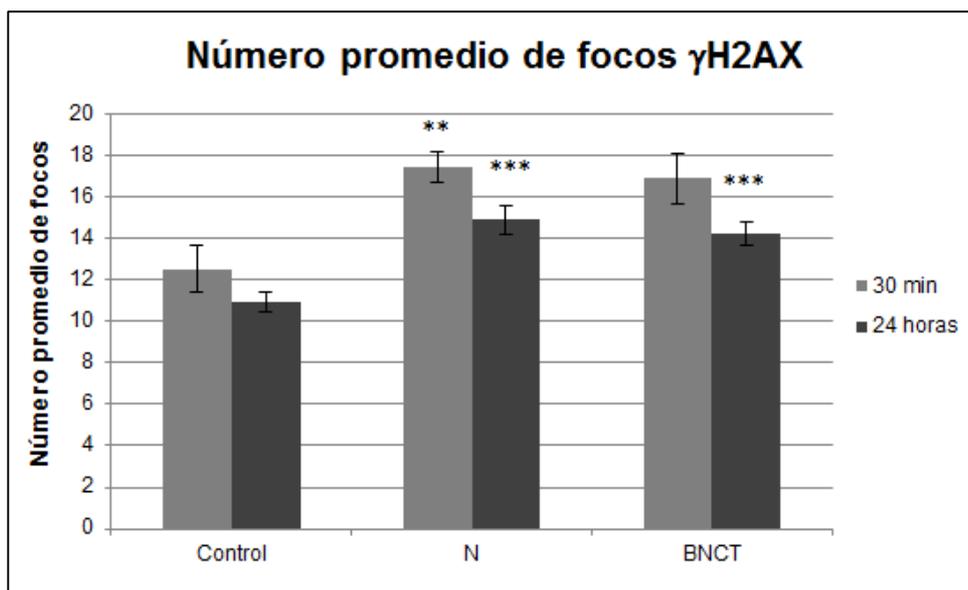


Figura 3: Determinación del número promedio de focos γ H2AX en células Mel J expuestas a 3Gy de Neutrones (N) y neutrones + BPA (BNCT) a 30 minutos y 24 horas luego de la irradiación (Control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

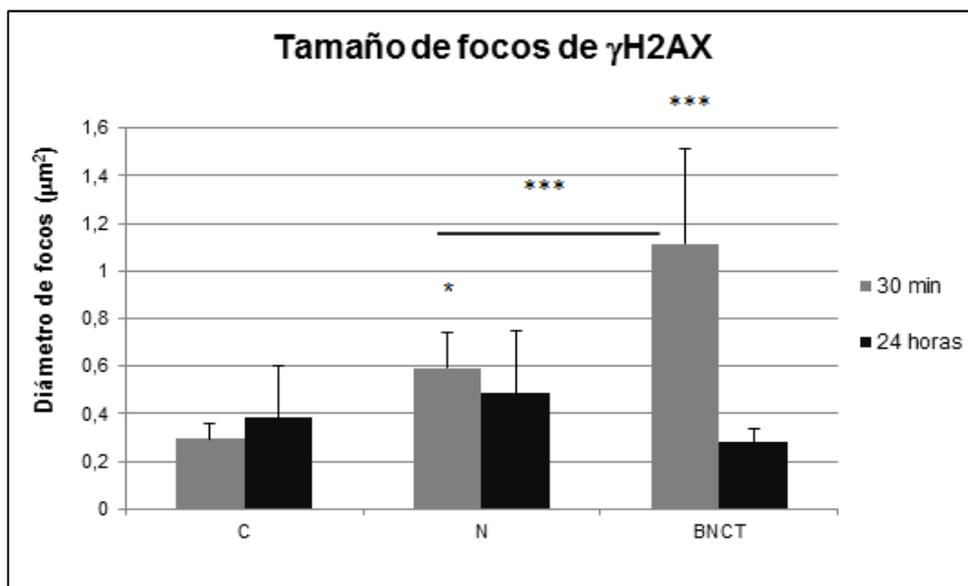


Figura 4: Determinación del diámetro promedio de los focos de γ H2AX en células Mel J expuestas a 3Gy de Neutrones (N) y neutrones + BPA (BNCT) a 30 minutos y 24 horas luego de la irradiación (Control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, N vs BNCT, *** $p < 0.001$)

En la línea Mel J El número de focos de γ H2AX aumenta a partir de los 30 minutos luego de la irradiación (Figura 3). Puede observarse también que el tamaño de estos focos es significativamente mayor en el grupo BNCT. Luego de 24 horas el tamaño de los focos disminuye en todos los grupos indicando que la reparación ha concluido (Figura 4). Los resultados observados en la línea Mel J son consistentes con los resultados observados previamente en la línea WRO.

3.2 Expresión de ARNm de Rad51 y Ku70

3.2.1 WRO

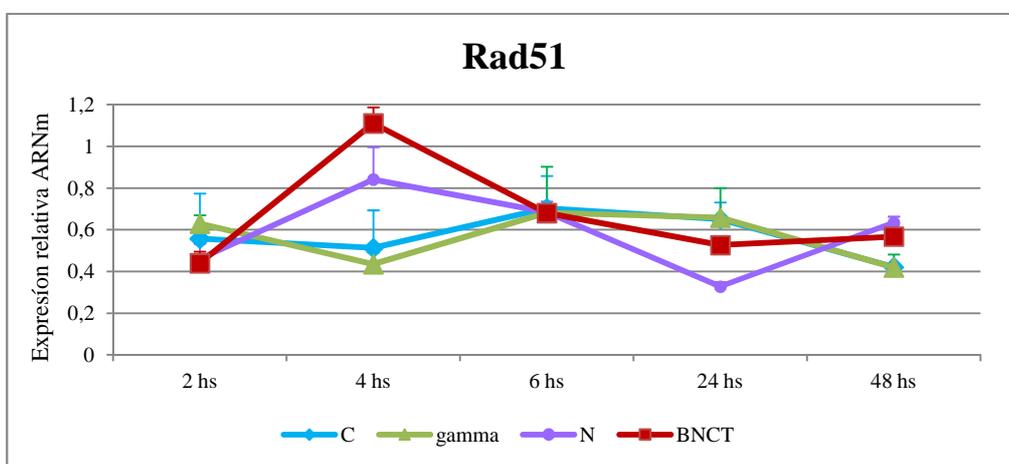


Figura 5: Expresión de ARNm de Rad51 en función del tiempo post irradiación en células WRO sin irradiar (C), células irradiadas con radiación γ (gamma), células irradiadas con neutrones sin BPA (N) y células irradiadas con neutrones en presencia de BPA (BNCT).

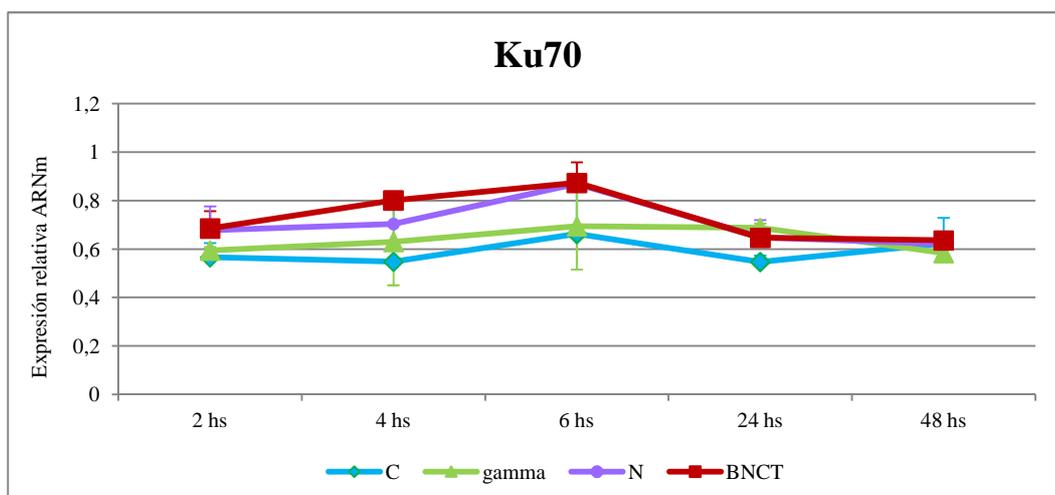


Figura 6: Expresión de ARNm de Ku70 en función del tiempo post irradiación en células WRO sin irradiar (C), células irradiadas con radiación γ (gamma), células irradiadas con neutrones sin BPA (N) y células irradiadas con neutrones en presencia de BPA (BNCT).

A las 4 horas se observa un aumento en la expresión de ARNm de la proteína Rad51 para los grupos N y BNCT respecto al grupo C (Control vs BNCT * $p < 0,05$) y un descenso en el grupo gamma (gamma vs BNCT * $p < 0,05$). Los niveles de expresión de ARNm vuelven a descender para estabilizarse luego de 24 horas de la irradiación (Figura 5).

Puede observarse que no hay diferencias significativas en los niveles de expresión de Ku70 entre los distintos tratamientos a ninguno de los tiempos estudiados (Figura 6)

3.2.2 Mel J

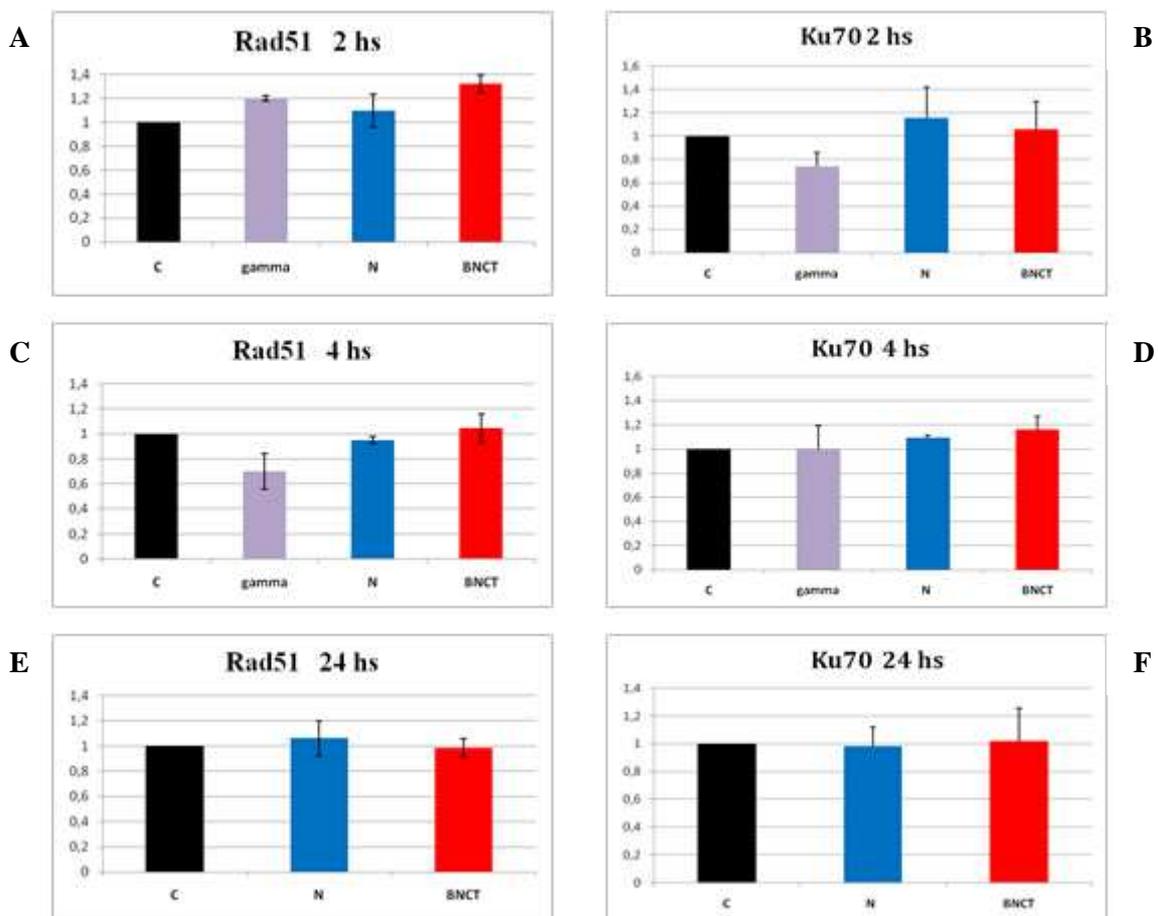


Figura 6: Expresión de ARNm de Rad51 y Ku70 en células Mel J sin irradiar (C), células irradiadas con radiación γ (gamma), células irradiadas con neutrones sin BPA (N) y células irradiadas con neutrones en presencia de BPA (BNCT) a las 2 horas (A-B), 4 horas (C-D) y 24 horas (E-F) luego de la irradiación.

Los niveles de expresión de ARN mensajero de la enzima Rad51 aumentaron luego del tratamiento con BNCT en comparación con el grupo gamma o neutrones a todos los tiempos estudiados. Los niveles más elevados se detectan luego de las 2 horas de la irradiación. Pasadas 24 hs los niveles de estos mensajeros decrecen hasta equiparar a los del control.

Los niveles de ARNm de Ku70 muestran un leve descenso en el grupo gamma y un leve aumento en los grupos neutrones y BNCT a las 2 horas luego de la irradiación equiparándose con el control a las 4 horas. A tiempos largos los niveles de ARNm de todos los grupos se encuentran estabilizados.

4. CONCLUSIONES

Los estudios de determinación de daño al ADN demuestran que el número de eventos de daño doble cadena es mayor luego de la irradiación gamma mientras que el tratamiento con BNCT provoca la formación de focos de mayor tamaño en ambas líneas celulares. Esto indica que el daño que se produce localmente sobre la molécula de ADN es más severo y complejo al irradiar con neutrones y aún más si se añade BPA. Concluimos que existe un patrón en cuanto a la respuesta frente al daño causado por BNCT

Rad51 es la enzima principal en la reparación de las lesiones doble cadena del ADN mediante la vía de recombinación homóloga (HR). El aumento de los niveles de expresión de los ARNm de esta proteína luego de las irradiaciones es consistente con la activación de este sistema y además pueden observarse las diferencias que existen en la respuesta ante los diferentes tipos de radiación. En ambas líneas celulares estudiadas se observó un aumento de la expresión de Rad51 indicando activación de este mecanismo de reparación.

Ku70 lleva a cabo la reparación del daño doble cadena del ADN a través de la unión de extremos no homólogos, proceso de menor complejidad que el de recombinación homóloga. Por lo tanto la unión de extremos no homólogos puede ejecutarse en cualquier momento del ciclo celular mientras que la recombinación homóloga no, ya que precisa de zonas de homología para recuperar información genética. Dada la practicidad del mecanismo, Ku70 puede hallarse más bien regulada a nivel proteico y no a nivel transcripcional de manera de poder actuar rápidamente. Esto se condice con los niveles invariables de ARNm en los distintos grupos en la línea de carcinoma de tiroides.

Sin embargo existen diferencias en la expresión de Ku70 en el grupo BNCT en la línea de melanoma. A las 2 horas post irradiación observamos aumento en la expresión de ARNm de Ku70 mientras que en el grupo gamma la expresión desciende. Por lo tanto mientras en tiroides un único mecanismo de reparación se activa preferentemente, en melanoma habría activación de ambos.

Estos resultados muestran un patrón de daño similar y un patrón de reparación del ADN distinto para las dos líneas celulares estudiadas hasta el momento (tiroides y melanoma), sugiriendo mayor radiosensibilidad del melanoma y por lo cual habría activación de ambas vías de reparación (NHEJ y RH) mientras que en el carcinoma de tiroides solo se estaría activando una (HR).

5. REFERENCIAS

- 1) Coderre JA, Morris GM. *Radiat. Res.* 1999; 151:1-18.
- 2) Sandeep Burman, Benjamin p. Chen, Michael Murphy, Akihiro Kurimasa y David J. Chen. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, **Vol 276**, N°45, pp 42462-42467.
- 3) Irene Ibañez, Candelaria Bracalante, Beatriz Molinari, Monica A. Palmieri, Lucía Policastro, Andrés J. Kreiner, Alejandro A. Burlon, Alejandro Valda, Daniela Navalesi, Jorge Davidson, Miguel Davidson, Mónica Vazquez, Mabel Ozafrán y Hebe Durán. *Int. J Radiat. Oncol. Phys* 2009. **Vol 74**, N°4, pp. 1226-1235.
- 4) Olive PL. *Radiat Res.* 1998; 150: 842-851.
- 5) Stefan Sigurdsson, Stephen Van Komen, Galina Petukhova and Patrick Sung. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, **Vol 277**, N°45, pp 42790-42794.
- 6) Pasiaka JL. *Current opinion in Oncology* 2003; 15: 78-83.
- 7) Menéndez, P.R. et al, 2009. *Applied Radiation and Isotopes* 67,S50–S53.
- 8) Dagrosa A, Carpano M, Perona M, Thomasz L, Nievas S, Cabrini R, Juvenal G, Pisarev M. *Appl Radiat Isot.* 2011;69(12):1752-5.
- 9) Monika Korabiowaska, Thomas Quentin, Thilio Schlott, Hanne Bauer, Ekkehard Kunze. *World J Uro* 2004; 22: 431-440.
- 10) Jen-Chung Ko, Shih-Ci Ciou, Chau-Ming Cheng, Lyu-Han Wang, Jhao-Hao Hong, Ming-Yan Jheng, Szu-Ting Ling, Yun-Wei Lin. *Carcinogenesis* 2008; **Vol.29**, N° 7 1448-1458.