

INTERACCIÓN RADIACIÓN IONIZANTE-HISTAMINA: UN RETO A LA INVASIÓN TUMORAL

Mohamad NA¹, Galarza T¹, Taquez Delgado M¹, Cricco GP¹, Martín GA^{1,2}

¹ Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas

RESUMEN

La radioterapia, un arma terapéutica para muchas enfermedades oncológicas, siendo efectiva puede tener asociados importantes efectos adversos. Las estrategias para mejorar la eficacia terapéutica se concentran en la entrega de la mayor Dosis al tejido tumoral manteniendo la menor Dosis en los tejidos sanos. Sin embargo, dos efectos adversos poco contemplados pueden manifestarse: la adquisición de radio-resistencia (con el aumento de recurrencias) y el incremento de la capacidad proliferativa e invasiva en las células tumorales que sobreviven a la irradiación (con la probabilidad de generar metástasis).

La transición epitelial-mesenquimática (TEM) es un proceso que permite a las células epiteliales adquirir características mesenquimáticas. En las neoplasias epiteliales la inapropiada activación de la TEM contribuye a la invasión y metástasis, con cambios en la adhesión, activación de la motilidad y la capacidad para degradar la matriz extracelular, así como resistencia a la apoptosis.

Previamente demostramos un efecto radiosensibilizante del tratamiento con histamina en líneas celulares tumorales mamarias estrógeno-dependientes e independientes, pero no en líneas de adenocarcinoma pancreático. Cuando todas las líneas se irradiaron (2 gray de radiación gamma) se observó un aumento de la actividad gelatinolítica, la migración y la expresión de marcadores mesenquimáticos (vimentina, N-cadherina, α -SMA). Asimismo se observó un aumento de la expresión nuclear de β -catenina y Slug. Estos resultados señalan una activación de la TEM por la radiación ionizante. El tratamiento de las células con histamina antes y durante la irradiación bloqueó estos efectos sugiriendo que, independientemente de su capacidad para modificar la radiosensibilidad intrínseca, la histamina puede impedir la inducción de procesos relacionados con la expresión del fenotipo invasivo por la radiación ionizante en líneas celulares tumorales de mama y páncreas.

Así, la histamina podría mejorar la eficacia de la radioterapia a través de un abordaje múltiple del tratamiento que considere la radiorresistencia intrínseca y la invasividad.

1. INTRODUCCIÓN

La radioterapia se utiliza para el tratamiento de pacientes con cáncer acompañando en muchos casos a la cirugía o la quimioterapia, tanto para tumores primarios como en el tratamiento paliativo de cánceres avanzados y metastásicos. Sin embargo, los efectos de las radiaciones no son específicos y se manifiestan también sobre los tejidos sanos causando distintos efectos colaterales que incluyen reacciones agudas locales o sistémicas y el aumento del riesgo de desarrollo de nuevos tumores primarios. Los esfuerzos para mejorar la eficacia terapéutica de la radioterapia se han centrado clásicamente en la capacidad de las radiaciones ionizantes para destruir las células tumorales tratando de afectar lo menos posible a los tejidos normales mediante distintos abordajes. Sin embargo, estas estrategias no consideran dos efectos adversos importantes que comprometen el éxito del tratamiento: la adquisición de radiorresistencia (con el aumento de recurrencias) y el incremento de la capacidad proliferativa e invasiva en las células tumorales que sobreviven a la irradiación (con la probabilidad de generar metástasis) [1].

La metástasis es un proceso que ocurre en múltiples pasos en los cuales las células deben degradar la membrana basal, invadir los tejidos del entorno, entrar y sobrevivir en el torrente sanguíneo. Estas células deben luego extravasarse, colonizar un nuevo tejido e iniciar el crecimiento de una micrometástasis y un nuevo tumor. La transición epitelial-mesenquimática (TEM) es un proceso fisiológico asociado con la remodelación tisular. Su inapropiada activación en los carcinomas epiteliales contribuye a la invasión y metástasis, confiriendo a las células de carcinoma cambios en la adhesión, activación de la motilidad y la capacidad para degradar la matriz extracelular, así como resistencia a la apoptosis.

La radiación ionizante afecta tanto a las células neoplásicas como a las células asociadas del huésped que sobreviven a la irradiación, y puede inducir la TEM en las células tumorales y activar las estromales produciendo la secreción de metaloproteasas, factores de crecimiento, proangiogénicos y proinflamatorios, y modulación de la expresión de moléculas de adhesión [2].

La histamina es una amina biógena que participa en reacciones alérgicas e inflamatorias, en la secreción ácida estomacal, en la inmunomodulación y en la neurotransmisión. Ejerce sus funciones por activación de cuatro subtipos de receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G [3,4]. Estos se expresan tanto en tejidos normales como neoplásicos, habiéndose también determinado su presencia en varias líneas celulares malignas. La histamina posee una acción moduladora sobre la adhesión celular en células endoteliales, epiteliales y estromales y también sobre la expresión de MMPs [5]. Además estimula la migración en células hematopoyéticas, inmunológicas y fibroblastos [6]. La mayoría de los reportes sobre este tema se refieren a células normales, existiendo muy poca información sobre células tumorales, siendo nuestro trabajo pionero en la determinación de la capacidad de la histamina de modular la TEM en células neoplásicas.

La hipótesis del presente trabajo plantea que la histamina puede modular la señalización inducida por la radiación ionizante en relación a la TEM, alterar la interacción célula tumoral-entorno y consecuentemente la capacidad metastásica.

2. RESULTADOS y DISCUSIÓN

Alrededor del 90% de las neoplasias humanas son carcinomas epiteliales en los cuales la inapropiada activación de la TEM contribuye a la invasión y metástasis, confiriendo a las células de carcinoma cambios en la adhesión, activación de la motilidad y la capacidad para degradar la matriz extracelular, así como resistencia a la apoptosis. Típicamente las células adquieren una morfología ahusada acompañada por la remodelación del citoesqueleto y la formación de fibras de estrés de actina. La molécula de adhesión E-cadherina se requiere para el mantenimiento del fenotipo epitelial y la pérdida de la expresión o su relocalización citoplasmática es uno de los indicadores del inicio del programa de TEM, junto a la acumulación nuclear de la β -catenina. Ésta tiene una función dual: mantiene la adhesión celular cuando se encuentra unida a la E-cadherina de membrana celular, pero puede funcionar como coactivador transcripcional conduciendo a la represión de la E-cadherina. Los factores de transcripción Snail, Slug y Twist actúan como represores de la expresión de la E-cadherina y otras proteínas de las uniones oclusivas, y su expresión y/o traslocación nuclear aumentan durante la transición en diversos tipos celulares. Estos cambios se acompañan con un incremento de la expresión de marcadores mesenquimáticos como N-cadherina, vimentina y α -actina de músculo liso (α -SMA). Asimismo se regulan positivamente la expresión y secreción de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular (MMPs) como MMP2 y MMP9 [7].

2.1. Efecto de la radiación ionizante sobre la TEM en líneas celulares tumorales

Para evaluar si histamina puede inhibir el proceso de TEM inducido por la radiación ionizante en las células tumorales que sobreviven a la irradiación se emplearon líneas tumorales epiteliales con diferentes características en cuanto al fenotipo epitelial:

- de carcinoma mamario humano MCF-7 y MDA-MB-231, y
- de carcinoma epitelial de páncreas humano PANC-1.

Las células MDA-MB-231 y PANC-1 presentan morfología con algunas características mesenquimáticas, comportamiento invasivo y baja expresión de E-cadherina, mientras que la línea MCF-7 exhibe morfología epitelial, menor capacidad migratoria y alta expresión de E-cadherina.

Para los experimentos los 3 tipos celulares se sembraron y al día siguiente recibieron o no histamina (HA) 20 μ M. Al cabo de 24 h las placas de cultivo se irradiaron o no con una dosis de 2 Gy con una fuente de ^{137}Cs (Tasa de dosis: 7,1 Gy/min, irradiador tipo IBL 437C H). El tratamiento con HA se continuó por otras 48 h a 96 h.

La irradiación de las 3 líneas celulares con una dosis de 2 Gy arrojó los siguientes resultados respecto de las células no irradiadas (controles):

- *Cambios morfológicos*

Después de 96 h las células MCF-7 y PANC-1 irradiadas perdieron su morfología poligonal y adquirieron otra ahusada, tipo fibroblástica/mesenquimática y se dispersaron. Mientras que el cambio fenotípico que exhibieron las células MDA-MB-231 no fue tan marcado respecto de los controles ya que estas células no son poligonales, observándose dispersión celular.

- *Marcadores moleculares*

Por inmunofluorescencia indirecta (IFI) se observó en las células PANC-1 y MCF-7 irradiadas un desplazamiento de la proteína E-cadherina desde la membrana celular hacia el citoplasma. Además, por Western blot se determinó una disminución significativa de la expresión total de dicha proteína que se visualizó a las 48 h. En las células MDA-MB-231 irradiadas se evidenció solamente E-cadherina citoplasmática por IFI.

Por su parte, 48 h después de la irradiación se observó por IFI una relocalización de la proteína β -catenina que abandonó la membrana celular para acumularse en el núcleo o en zonas perinucleares en las 3 líneas celulares.

También se registró por inmunoblot un aumento significativo de los marcadores mesenquimáticos (vimentina y α -SMA). Las células PANC-1 y MDA-MB-231 que fueron irradiadas mostraron una expresión aumentada entre un 30-50% de vimentina y de α -SMA. Mientras que sólo se observó un aumento significativo de α -SMA en las células MCF-7 que recibieron 2 Gy.

Por su parte, el factor de transcripción Slug no sólo aumentó en forma significativa su nivel de expresión en las 3 líneas celulares sino que los ensayos por IFI revelaron una acumulación nuclear después de las 48 h de irradiación (Figura 1).

- *Marcadores funcionales*

Actividad gelatinolítica: Las metaloproteasas MMP2 y MMP9, también conocidas como gelatinasas A y B, son parte de una familia de endopeptidasas dependientes de Zn que participan de la degradación proteolítica de la membrana basal y de proteínas de la matriz extracelular. Su expresión está involucrada tanto en procesos fisiológicos como patológicos (inflamación y metástasis) y puede considerarse uno de los marcadores funcionales de la

TEM. El estudio de la actividad de las MMPs secretadas se realiza mediante la zimografía de los medios obtenidos a partir de cultivos celulares que, 48 h después de haber recibido 2 Gy o no (controles), son privados de suero fetal bovino por 24 h. En las células PANC-1 la actividad gelatinolítica corresponde principalmente a MMP2 mientras que en MCF-7 y MDA-MB-231 se observaron ambas metaloproteasas. La irradiación aumentó significativamente la actividad gelatinolítica de las MMPs en las 3 líneas celulares respecto de las no irradiadas.

Otros marcadores funcionales de la TEM son el aumento de la capacidad migratoria e invasiva celular.

Capacidad migratoria: Se emplearon insertos con poros de 8 μm . Se evidenció un incremento muy significativo en el número de células migradas hacia la cara inferior del inserto del 50-100% respecto de los controles en las 3 líneas celulares después de las 48 h de irradiación.

Capacidad invasiva: Los insertos empleados se recubrieron con matrigel (membrana basal sintética). Se realizó el recuento de células que, habiendo invadido el matrigel, se adhirieron a la cara inferior del inserto. La exposición de las 3 líneas celulares a 2 Gy de radiación ionizante arrojó un aumento importante en el número de células que invadieron el matrigel. Los incrementos variaron entre 30% y 70%.

Nuestros resultados demuestran que la radiación ionizante induce algunos de los parámetros característicos de la TEM en células PANC-1, MCF-7 y MDA-MB-231.

2.2. Estudio de la interacción radiación ionizante-histamina en la TEM de líneas celulares

El tratamiento previo de las 3 líneas celulares con HA 20 μM y el mantenimiento de la HA en los medios de cultivo durante 48-96 h post-irradiación, bloqueó las respuestas inducidas por la radiación ionizante en relación a la TEM. Así, las células de las 3 líneas tratadas con HA e irradiadas con 2 Gy dejaron de estar dispersas entre sí y recuperaron su morfología original similar a los controles (no irradiados).

En cuanto a los marcadores moleculares en las células tratadas con HA e irradiadas, los niveles de expresión de E-cadherina, α -SMA y Slug fueron similares a los valores que presentaron las células controles o no irradiadas (Figura 1). Además, la E-cadherina y la β -catenina se relocalizaron en la membrana celular en los 3 tipos celulares tratados con e irradiados.

Asimismo los marcadores funcionales registrados para los 3 tipos celulares tratados con HA e irradiados mostraron comportamientos similares a los que exhibieron sus pares no irradiados.

En resumen, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con HA 20 μM puede bloquear las respuestas biológicas inducidas por la radiación ionizante relacionadas con el aumento de la capacidad invasiva de células neoplásicas en las líneas de tumor mamario MCF-7 y MDA-MB-231 y en la línea de tumor pancreático PANC-1.

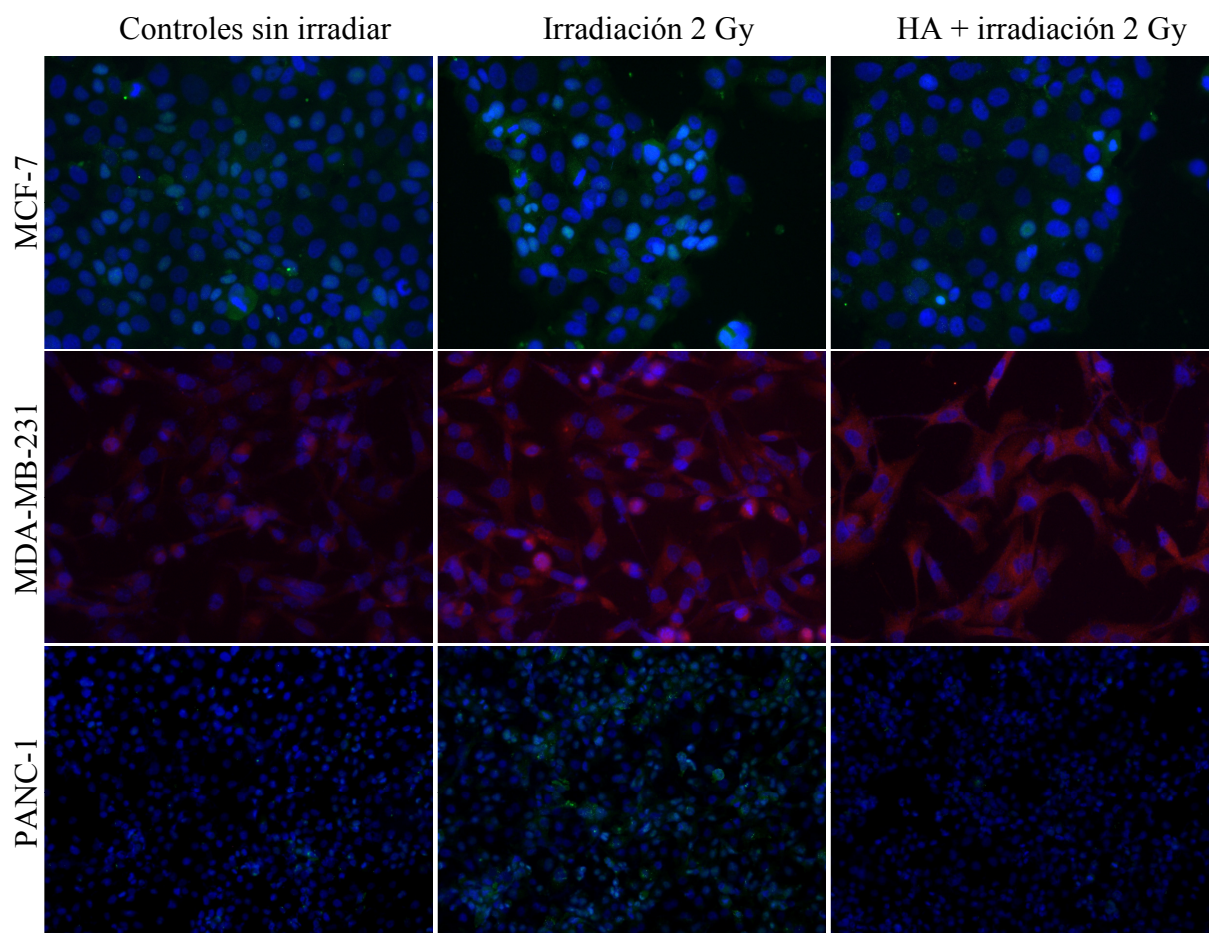


Figura 1. Se evaluó por inmunofluorescencia indirecta la localización intracelular de Slug en tres líneas de carcinoma epitelial humano para células control sin tratar, células irradiadas con 2 Gy y células irradiadas y tratadas con HA. MCF-7: anticuerpo primario anti Slug, anticuerpo secundario conjugado a fluorescente verde y tinción nuclear azul con DAPI, 630x. MDA-MB-231: ídem MCF-7 excepto el anticuerpo secundario conjugado a fluorescente rojo. PANC-1: ídem MCF-7, 100x.

3. CONCLUSIONES

Profundizar el entendimiento de las bases moleculares del cáncer en relación a la capacidad invasiva de las células tumorales aumentaría las posibilidades de modificar biológicamente el curso de la enfermedad oncológica generando nuevas estrategias terapéuticas al combinar la radioterapia con drogas que bloquean simultáneamente el crecimiento tumoral y el proceso de transición epitelial-mesenquimática en relación a la progresión del tumor hacia a la metástasis.

4. REFERENCIAS

1. Madani I., De Neve W., Mareel M., “Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis?”, *Bull Cancer*, **95**(3):292-300 (2008).
2. Park J.K., Jang S.J., Kang S.W., Park S., Hwang S.G., Kim W.J., Kang J.H., Um H.D., “Establishment of animal model for the analysis of cancer cell metastasis during radiotherapy”, *Radiat Oncol*, **7**:153 (2012).
3. Hill S.J., Ganellin C.R., Timmerman H., Schwartz J.C., Shankley N.P., Young J.M., Schunack W., Levi R., Haas H.L., “International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors”. *Pharmacol Rev*, **49**(3):253-78 (1997).
4. Zhu Y., Michalovich D., Wu H., Tan K.B., Dytko G.M., Mannan I.J., Boyce R., Alston J., Tierney L.A., Li X., Herrity N.C., Vawter L., Sarau H.M., Ames R.S., Davenport C.M., Hieble J.P., Wilson S., Bergsma D.J., Fitzgerald L.R., “Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor”, *Mol Pharmacol*, **59**(3):434-41 (2001).
5. Tetlow L.C., Woolley D.E. “Effect of histamine on the production of matrix metalloproteinases-1, -3, -8 and -13, and TNF α and PGE(2) by human articular chondrocytes and synovial fibroblasts in vitro: a comparative study”, *Virchows Arch*, **445**(5):485-90 (2004).
6. Kohyama T., Yamauchi Y., Takizawa H., Kamitani S., Kawasaki S., Nagase T., “Histamine stimulates human lung fibroblast migration”, *Mol Cell Biochem*, **337**(1-2):77-81 (2010).
7. Cannito S., Novo E., di Bonzo L.V., Busletta C., Colombatto S., Parola M., “Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease”, *Antioxid Redox Signal*, **12**(12):1383-430 (2010).