

Resistencia a la Radiación Ionizante en Células de Melanoma Humano. Papel de las Enzimas Antioxidantes y de los Radicales Libres del Oxígeno.

**V. Medina, G. Cricco, N. Massari, M. Núñez, G. Martín, N. Mohamad, A. Gutiérrez,
R. Bergoc, E. Rivera.**

*Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junín 956, Buenos Aires, Argentina.,
vmedina@ffyb.uba.ar, erivera@ffyb.uba.ar.*

E. Crescenti, M. Croci,
*Instituto de Inmunooncología
Córdoba 3200, Buenos Aires, Argentina
crescentilab@fibertel.com.ar*

Resumen

El melanoma maligno es un tipo altamente agresivo y potencialmente letal de cáncer de piel. Anteriormente hemos reportado que las líneas celulares humanas de melanoma WM35 y M15 son resistentes a la radiación ionizante (RI). La histamina (HA) si bien tiene un efecto regulador de la proliferación celular en estas líneas, no es capaz de modificar la respuesta a la RI como lo hace con otras líneas celulares malignas.

Para investigar las bases de la radioresistencia de las líneas de melanoma hemos estudiado en la WM35 la producción de radicales libres de oxígeno (ROS), la actividad de las enzimas antioxidantes y sus modificaciones por acción de la RI y de la HA.

En estudios *in vitro* las células se trataron con HA 10 μ M desde 20 hs antes de ser irradiadas con una dosis de 2 Gy (fuente ^{137}Cs , tasa de dosis 7.7 Gy/min). Los niveles de ROS, anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se midieron por citometría de flujo empleando colorantes fluorescentes y la actividad de Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutatión Peroxidasa (GPx) se determinó por técnicas espectrofotométricas y los niveles de proteína por Western blot.

Los resultados indican que en las células WM35 la HA aumenta en un 96% la producción de H_2O_2 y disminuye ligeramente (17%) los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por el contrario, la RI disminuye los niveles de H_2O_2 en un 47% y aumenta en un 46% los de $\text{O}_2^{\cdot-}$. En las células irradiadas la HA potencia la disminución de H_2O_2 producida por la RI. La variación de la actividad de las enzimas es coincidente con estos cambios en los niveles de ROS: el tratamiento con HA aumenta la actividad de SOD y disminuye la de CAT en células sin irradiar; en cambio, en las células irradiadas la HA disminuye significativamente la SOD.

Sobre la base de estos resultados podemos concluir que los niveles de H_2O_2 están directamente relacionados con la sensibilidad de las células WM35 a la RI. La HA es capaz de modular la actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de ROS. La RI activa mecanismos celulares que llevan a la radioresistencia de estas células y que interfieren y/modifican la respuesta biológica mediada por la HA.

Tema: Aplicaciones Médicas

1. INTRODUCCIÓN

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos. Representa el 2,5% de todos los tipos de cáncer y es responsable del 1-2% de las muertes por esta enfermedad. Las células de melanoma son relativamente resistentes a los efectos citotóxicos de la radiación ionizante (RI) limitando de esta manera el uso de la radioterapia para el tratamiento del melanoma [1]. Por lo tanto, es vital desarrollar nuevas estrategias para aumentar la radiosensibilidad de las células de melanoma. Una de las claves para la eficacia de la radioterapia es lograr un efecto selectivo produciendo el máximo daño a las células tumorales sin afectar los tejidos normales del paciente [2].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están directamente asociadas con la citotoxicidad producida por la RI y con la radiosensibilidad de los tejidos. Las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) principalmente y la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), tienen un papel central en la protección de las células frente a los efectos de la radiación [3,4].

Hemos reportado previamente que la histamina es capaz de regular selectivamente la respuesta inducida por la RI produciendo una protección de tejidos como médula ósea e intestino, y una radiosensibilización de células tumorales mamarias [5]. La histamina es una amina biogénica sintetizada a partir de la L-histidina por la enzima histidina decarboxilasa (HDC), con múltiples funciones fisiológicas que ejerce a través de la activación de 4 subtipos diferentes de receptores localizados en gran variedad de tejidos [6]. Además, determinamos que las líneas celulares humanas de melanoma WM35 y M15 son resistentes a la RI [7] y que la histamina tiene un efecto regulador de la proliferación celular en estas líneas [8].

Para investigar las bases de la radioresistencia de las líneas de melanoma, en el presente trabajo estudiamos en las células WM35 la producción de ROS, la actividad de las enzimas antioxidantes y sus modificaciones por acción de la RI y de la histamina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo Celular

La línea celular de melanoma humana WM-35 se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina 0,03%, fungizona 0,001% y gentamicina 0,004% (Gibco BRL, NY, USA). Se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

2.2. Irradiación y Ensayos de Proliferación Celular

Las células se irradiaron con una dosis de 2 Gray (Gy) utilizando una fuente de ¹³⁷Cs de 189 TBq, y tasa de dosis 7.7 Gy/min. (CEBIRSA, Buenos Aires, Argentina). Este equipo (IBL 437C tipo H número 90330) es calibrado y certificado periódicamente por la Autoridad Regulatoria Nuclear Argentina con un TLD 700 en polvo contenido en cápsulas de polietileno.

Para la evaluación de la proliferación celular por el método clonogénico, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (1.5 x 10³ células/pocillo) y se trataron con histamina 10 µM (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA). La mitad de las placas se irradiaron al cabo de 24 horas. Después de 8 días de crecimiento todas las células (irradiadas y controles) se fijaron con formaldehído al 10% en buffer fosfato (PBS), se colorearon con azul de Toluidina 1% y el crecimiento clonogénico, se determinó contando el número de colonias formadas por 50 células o más. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del valor control.

2.3. Determinación de los Niveles Intracelulares de ROS

Las células se incubaron con diacetato de diclorodihidrofluoresceína 5 μM (DCF, colorante fluorescente sensible a peróxido de hidrógeno- H_2O_2) o con dihidroetidio 5 μM (HE, colorante fluorescente sensible a anión superóxido- $\text{O}_2^{\cdot-}$) durante 30 minutos a 37° C (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en PBS. El contenido intracelular de ROS se analizó mediante citometría de flujo.

2.4. Determinación de la Actividad de Enzimas Antioxidantes

Las células se colectaron en PBS (pH 7.8), se sonicaron en hielo por 1 minuto y posteriormente se centrifugaron a 10000g por 10 minutos a 4°C. La actividad enzimática se estudió en los extractos proteicos celulares. Los resultados se normalizaron de acuerdo al contenido de proteínas determinado por el método de Bradford.

La actividad de CAT se determinó midiendo la velocidad de descomposición del H_2O_2 a 240 nm por espectrofotometría. Una unidad de CAT se define como la desaparición de 1 μmol de H_2O_2 /minuto.

La actividad de SOD se evaluó mediante el ensayo de reducción del *nitroblue tetrazolium* con el sistema xantina/xantina oxidasa. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe la producción de azul de diformazan en un 50%.

2.5. Western Blot

Las células se lisaron utilizando un buffer apropiado y las proteínas extraídas (50 μg) se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA). Las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos: anti-catalasa obtenido en ratón, anti β -actina obtenido en ratón (1:1000; Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA), anti-MnSOD y anti-CuZnSOD obtenidos en oveja (1:1000; Calbiochem, USA), y luego con los anticuerpos secundarios específicos (anti-ratón o anti-oveja según corresponda) conjugados con peroxidasa de rábano. Las bandas inmunoreactivas se detectaron por quimioluminiscencia. El análisis densitométrico se realizó usando el programa ImageJ 1.32J (NIH, USA).

2.6. Análisis Estadísticos

El análisis de la significación estadística de los resultados obtenidos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 4 (CA, USA). Las evaluaciones se efectuaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de la Histamina sobre la Proliferación

Se reportó previamente que la línea celular derivada de melanoma primario, WM35, expresa los receptores de histamina H1, H2 y H3 [9] y dado que numerosos trabajos describen a la histamina como un factor de crecimiento autocrino/paracrino en células neoplásicas, se propuso estudiar las respuestas biológicas inducidas por el tratamiento con histamina exógena en combinación con la RI.

Como se puede observar en la figura 1, la histamina reduce significativamente la proliferación obteniéndose una sobrevivencia del $60 \pm 5\%$ en las células no irradiadas mientras que la radiación ionizante reduce el crecimiento celular al $53 \pm 3\%$ y el tratamiento con histamina no modifica significativamente el efecto sobre la proliferación ejercido por la RI como previamente demostramos [5].

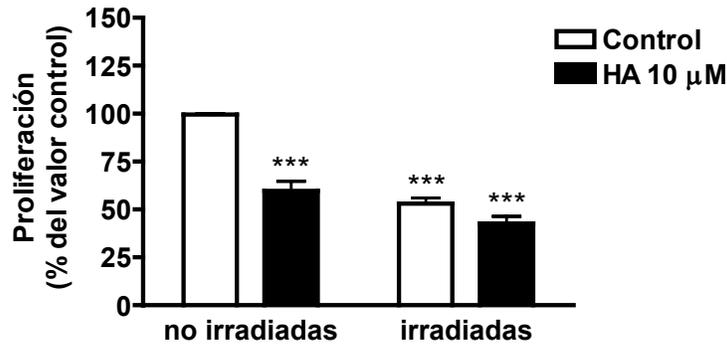


Figura 1: Efecto de la histamina y la RI sobre la proliferación celular. HA: histamina. Las barras representan el error Standard de la media, ESM. (***) $P < 0.001$ vs. control. ANOVA de un factor y test de Newman Keuls).

3.2. Modulación de la Respuesta a la Radiación Ionizante por Histamina

Luego de la extirpación quirúrgica del tumor, la radioterapia es sin duda la modalidad terapéutica más ampliamente utilizada para el tratamiento del cáncer, especialmente para aquellos tumores que no se han diseminado [10]. Sin embargo, algunos tipos de tumor son muy resistentes como es el caso del melanoma. En este trabajo se investigó si la histamina podía modular el efecto biológico producido por la radiación ionizante en las células WM-35.

3.2.1 Evaluación de las especies reactivas del oxígeno

Aproximadamente el 75% del daño inducido por la RI de baja transferencia lineal de energía, es debido a la formación de radicales libres [3]. Con el fin de esclarecer los mecanismos de radioresistencia en estas células, se evaluó la producción de ROS.

3.2.1.1. Determinación de los niveles intracelulares de H_2O_2

Se determinaron los niveles intracelulares de H_2O_2 usando el colorante fluorescente DCF como se indica en materiales y métodos. Los resultados muestran que la histamina aumenta significativamente los niveles intracelulares de H_2O_2 en las células no irradiadas mientras que intensifica la disminución de los mismos producida por la RI (Figura 2).

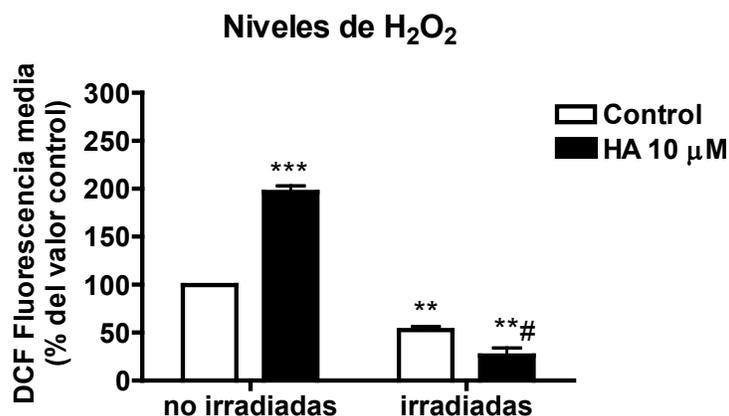


Figura 2: Efecto de la histamina sobre los niveles intracelulares de H₂O₂.

Los niveles de H₂O₂ se evaluaron luego del tratamiento con histamina 10 μM (HA) por 24 horas en células irradiadas y no irradiadas. Las barras representan el ESM. (**P<0.01, ***P<0.001 vs. control; #P<0.05 vs. células control irradiadas. ANOVA de un factor y test de Newman Keuls)

3.2.1.1. Determinación de los niveles intracelulares de O₂⁻.

Se determinaron los niveles intracelulares de O₂⁻ usando el colorante fluorescente HE como se indica en materiales y métodos. Los resultados indican que la histamina disminuye ligeramente (17%) los niveles de O₂⁻. Por el contrario, la RI aumenta en un 46 ± 3% los niveles de O₂⁻ y el tratamiento con histamina no modifica el efecto producido por la RI (Figura 3).

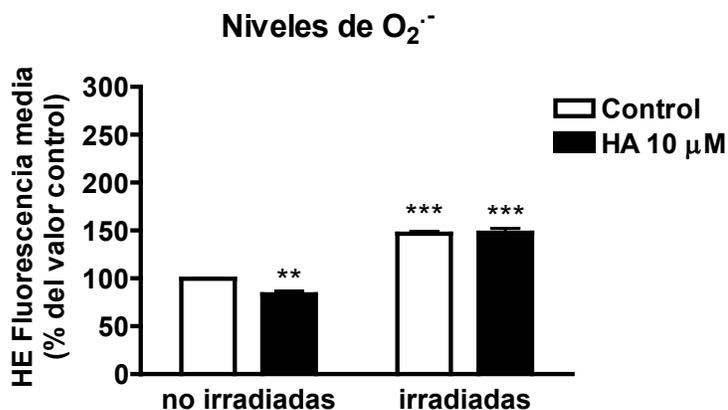


Figura 3: Efecto de la histamina sobre los niveles intracelulares de O₂⁻.

Los niveles de O₂⁻ se evaluaron luego del tratamiento con histamina 10 μM (HA) por 24 horas en células irradiadas y no irradiadas. Las barras representan el ESM (**P<0.01 vs. control. ANOVA de un factor y test de Newman Keuls)

3.2.2. Estudio de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes

La enzima superóxido dismutasa es la responsable de la dismutación de los radicales O_2^- a H_2O_2 que es luego degradado por otras enzimas como la catalasa.

3.2.2.1. Determinación de la expresión y actividad de SOD

La actividad de SOD y la expresión de MnSOD y CuZnSOD se determinaron luego del tratamiento por 24 horas con histamina 10 μM , irradiación con una dosis de 2 Gy y posterior incubación por 4 horas. Los resultados muestran que el tratamiento con histamina aumenta la actividad de SOD en las células no irradiadas mientras que la disminuye en las células irradiadas. Por otra parte, la irradiación aumenta la actividad de esta enzima (Figura 4). Este efecto se debe fundamentalmente a un aumento de la actividad de la enzima y no a un aumento de su expresión (Figura 5).

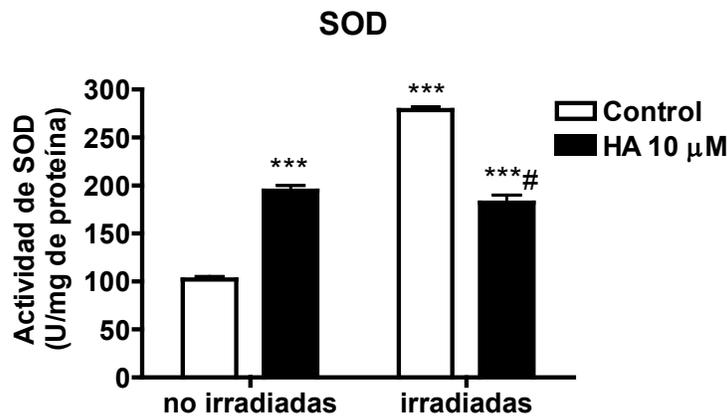


Figura 4: Efecto de la histamina sobre la actividad de SOD.

Las barras representan el ESM. (***) $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.001$ vs. células control irradiadas. ANOVA de un factor y test de Newman Keuls)

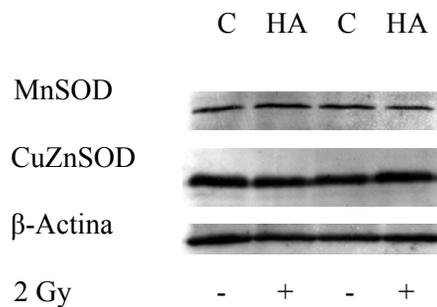


Figura 5: Efecto de la histamina sobre la expresión de las proteínas MnSOD y CuZnSOD.

La expresión de β -actina se utilizó como control de carga.

3.2.2.2. Determinación de la expresión y actividad de CAT

La actividad y la expresión de CAT se determinaron luego del tratamiento por 24 horas con histamina 10 μM , irradiación con una dosis de 2 Gy y posterior incubación por 4 horas. La RI produce una moderada disminución de la actividad de CAT y el tratamiento con histamina reduce la actividad de CAT en las células no irradiadas y acrecienta la disminución de la misma por parte de la RI (Figura 6). Es interesante destacar que ni la irradiación ni el tratamiento con histamina modificaron la expresión de la proteína a los mismos tiempos de incubación (Figura 7).

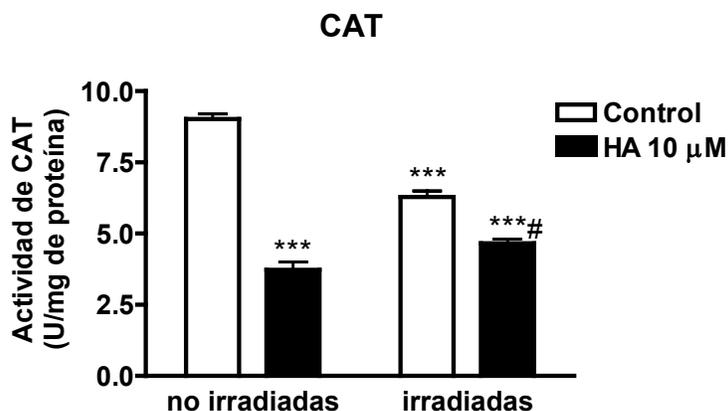


Figura 6: Efecto de la histamina sobre la actividad de CAT.

Las barras representan el ESM. (***) $P < 0.001$ vs. control; # $P < 0.01$ vs. células control irradiadas. ANOVA de un factor y test de Newman Keuls)

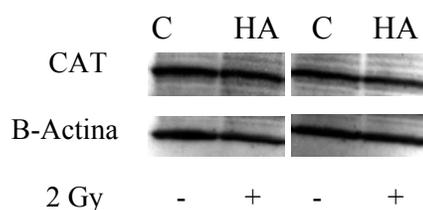


Figura 7: Efecto de la histamina sobre la expresión de la proteína CAT.

La expresión de β -actina se utilizó como control de carga.

4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se describe uno de los posibles mecanismos de radioresistencia de células de melanoma. Un gran número de estudios confirma la acción citotóxica del H_2O_2 , acción que depende de la

magnitud del aumento y de las defensas antioxidantes de las células. El H_2O_2 puede ser aún más tóxico que el O_2^- debido a que es un potente oxidante, altera el estado redox celular y participa de la reacción de Fenton que lleva a la formación del radical hidroxilo que es altamente nocivo para las células [11].

El tratamiento con histamina (10 μM) reduce la proliferación y este efecto está asociado a un aumento de los niveles de H_2O_2 que son el resultado del incremento de la actividad de SOD y disminución de la actividad de CAT. Esta modulación de la actividad enzimática produce también una ligera disminución en los niveles del anión superóxido. En ambos casos, el efecto de la histamina se traduce en variaciones de la actividad enzimática pero sin cambios en la expresión de las proteínas. Llamativamente, en las células WM35, la exposición a la RI disminuye considerablemente el contenido intracelular de peróxidos. Sin embargo, la actividad de SOD aumenta mientras que la de CAT disminuye en respuesta a la RI lo que indicaría que otras enzimas antioxidantes están involucradas en la disminución de H_2O_2 . Resultados preliminares indican que la expresión de la enzima glutatión peroxidasa, que degrada peróxidos, está incrementada por la RI pudiendo contribuir a la disminución de H_2O_2 observada.

En trabajos previos, demostramos que la histamina (10 μM) es capaz de aumentar la radiosensibilidad de células tumorales mamarias [5] y este efecto es mediado por un incremento en los niveles de H_2O_2 [resultados no presentados]. Por el contrario, en esta línea celular de melanoma, la histamina a pesar de producir una modulación de las enzimas antioxidantes en respuesta a la RI, no es capaz de modificar los parámetros radiobiológicos en estas células. Si postulamos que el H_2O_2 es responsable en parte de los efectos citotóxicos de la RI, la disminución de los niveles intracelulares explicaría en parte la radioresistencia de las células de melanoma así como también la incapacidad de la histamina de modificar la respuesta a la RI como lo hace en otras líneas celulares malignas.

Sobre la base de estos resultados podemos concluir que los niveles de H_2O_2 están directamente relacionados con la sensibilidad de las células WM35 a la RI. La HA es capaz de modular la actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de ROS, sin embargo la RI activa mecanismos celulares que llevan a la radioresistencia de estas células y que interfieren y/o modifican la respuesta biológica mediada por la histamina.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los subsidios ANPYCT - PICT 12250, UBACYT- B112 y los aportes de la Fundación Ernesto Crescenti.

REFERENCIAS

1. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Chiao PJ, Andreeff M, Meyn RE, "Inhibition of constitutively activated nuclear factor- κB radiosensitizes human melanoma cells", *Mol Cancer Ther*, **3**, p. 985-992 (2004).
2. Grdina DJ, Murley JS, Kataoka Y. "Radioprotectants: current status and new directions", *Oncology*, **63**, p. 2-10 (2002).
3. Das UN, "A radical approach to cancer", *Med Sci Monit*, **8**, p.79-92 (2002).
4. Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Colavitti R, Palazzotti B, Borello S, Galeotti T, "Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p-53-deficient cells", *Cancer Res*, **60**, p. 4654-4660 (2000).
5. Medina VA, Cricco GP, Mohamad N, Crocci M, Nuñez M, Martin G, Cocca C, Bergoc RM, Rivera ES, "Histamine is a selective protector against cellular damage produced by ionizing radiation", *Inflamm Res*, **54**, S17-S18 (2005).

6. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M, “Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis”, **23**, p. 255-263 (2002).
7. Bergoc RM, Medina V, Cricco G, Mohamad N, Martín G, Núñez M, Croci M, Crescenti EJ, Rivera ES, “Radiosensitivity of Human Melanoma Cell Lines”, editado en soporte magnético por la International Radioprotection Association (IRPA), CD 836, code 1-7 (2004).
8. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Pállinger E, Kovács P, Tóth S, Fitzsimons C, Cricco G, Martin G, Bergoc RM, Darvas Z, Rivera ES, Falus A, “Inhibition of human primary melanoma cell proliferation by histamine is enhanced by interleukin-6”, *European J Clinical Invest*, **32**, p. 743-749 (2002).
9. Hegyesia H, Horvath B, Pallinger E, Pós Z, Molnár V, Falus A, “Histamine elevates the expression of Ets-1, a protooncogen in human melanoma cell lines through H2 receptor”, *FEBS Letters*, **579**, p. 2475–2479 (2005).
10. Steel G. Gordon, *Basic Clinical Radiobiology*, Ed. Arnold, London, Bg. Br. (1997).
11. Droge W, “Free radicals in the physiological control of cell function”, *Physiol Rev*, **82**, p. 47-95 (2002).