

EFECTO DE NUEVAS TERAPIAS ANTI-ERBB-2 Y ÁCIDO RETINOICO EN EL MOVIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

Vanderhoeven F., Flamini M.

Registro en RENIS N°: IS001395

mflamini@mendoza-conicet.gob.ar

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de mama se clasifica en subtipos moleculares de acuerdo a la presencia/ausencia de receptores de estrógenos (RE), receptor de progesterona y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (ErbB-2, también conocido como HER-2). Los tumores que presentan sobreexpresión de HER-2 son más agresivos y metastásicos, debido a que la señalización a través de este receptor contribuye a la transformación oncogénica, teniendo las pacientes mal pronóstico. Se han desarrollado nuevas estrategias anti-HER-2 que se utilizan actualmente en la clínica, un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de HER-2 llamado trastuzumab (Tz) o Herceptin®.

A pesar de este progreso, entre el 40-60% de los pacientes no responden a la terapia o desarrollan resistencia a la misma. Todo esto, lleva a la necesidad de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos basados en la combinación de distintas drogas. Los retinoides, y principalmente el ácido retinoico (AR) han sido propuestos en el tratamiento adyuvante del carcinoma de mama por su capacidad para inhibir el crecimiento e inducir la diferenciación morfológica o fenotípica. Su actividad antitumoral está mediada principalmente por los receptores de ácido retinoico (RAR), que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. El proceso de adhesión y migración celular es crítico para que la célula se propague, invada y realice metástasis en otro sitio. Moesin induce la despolimerización de la actina y su translocación hacia el borde de la membrana celular, siendo responsable de la formación de complejos corticales de actina. Otra proteína clave es la quinasa de adhesión focal (FAK), la cual participa en el ensamblaje y desensamblaje de los complejos de adhesiones focales, reorganizándolos en la dirección de la migración; su sobreexpresión esta correlacionada con tumores más agresivos.

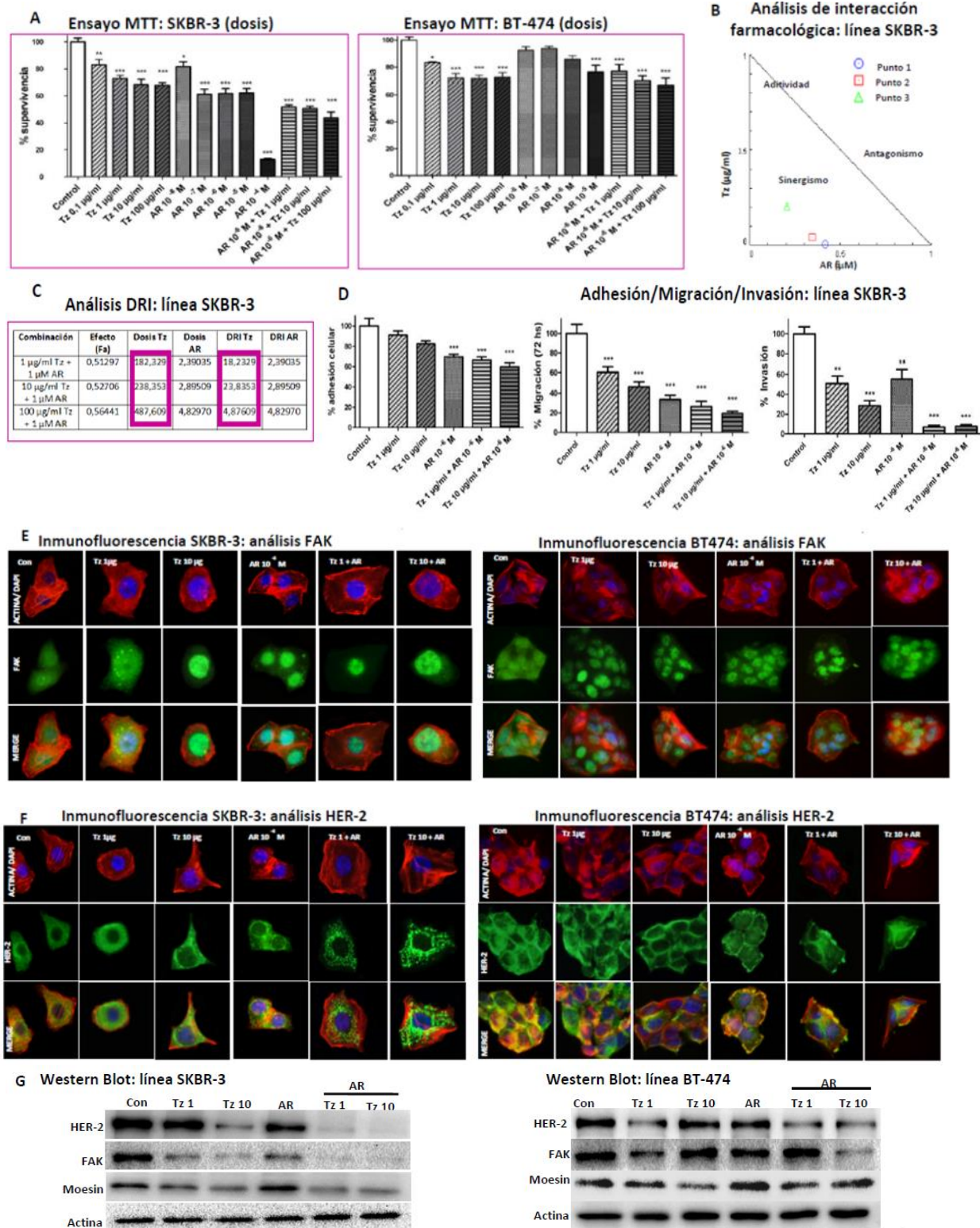
La hipótesis de este proyecto es que la combinación de trastuzumab (Tz) y ácido retinoico (AR) tiene un efecto sinérgico en la disminución de la viabilidad, adhesión y migración de células de cáncer de mama humano HER-2⁺/RAR⁺ mediante modificaciones en la expresión/localización de proteínas vinculadas en el movimiento celular como moesin y FAK. Específicamente proponemos 1) Evaluar el efecto de terapias anti-ErbB-2 en combinación o no con el AR en la viabilidad, adhesión y migración de células de cáncer de mama. 2) Investigar la morfología de células tumorales mamarias, mediante el estudio del citoesqueleto actínico luego de los tratamientos con nuevas terapias anti-ErbB-2 en combinación o no con AR. 3) Identificar el posible mecanismo molecular por el cual las terapias anti-ErbB-2 regularían/modularían, la expresión de proteínas vinculadas en procesos claves del movimiento celular como moesin, FAK y el receptor HER-2. Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama humano SKBR-3 (RE⁻/HER-2⁺/RAR⁺) y BT-474 (RE⁺/HER-2⁺/RAR⁺) para un

análisis comparativo, ya que se ha demostrado que el tratamiento con Tz tiene un menor efecto en pacientes que presentan tumores RE⁺ comparado con las que son RE⁻.

Se realizaron tratamientos durante 72 horas con Tz 1 y 10 µg/ml, AR 10⁻⁶ M y la combinación de ambas drogas y luego ensayos de MTT, análisis de interacción farmacológica, inmunofluorescencia, ensayos de adhesión, migración e invasión celular, silenciamientos con ARN de interferencia, uso del inhibidor de FAK y western blot. Se demostró que el tratamiento durante 72 horas con distintas dosis de Tz (0,1 – 1 – 10 – 100 µg/ml) y de AR (10⁻⁸ – 10⁻⁷ – 10⁻⁶ – 10⁻⁵ M) disminuye la proliferación celular de manera dosis-dependiente en ambas líneas celulares (**Fig. A**). En la línea SKBR-3 el tratamiento con Tz 1 – 10 – 100 µg/ml en combinación con AR 10⁻⁶ M el efecto es sinérgico (**Fig. B**). Por otro lado, en la línea celular BT-474 el tratamiento con Tz 10 – 100 µg/ml en combinación con AR 10⁻⁶ M ejerce un efecto sinérgico a diferencia del tratamiento con Tz 1 µg/ml combinado con AR 10⁻⁶ M que genera un efecto aditivo en la disminución de la proliferación celular. El índice de reducción de dosis (DRI), obtenido para la línea SKBR-3 indica que dentro de las combinaciones sinérgicas Tz 1 – 10 µg/ml + AR 10⁻⁶ M podemos disminuir 10 veces la dosis de Tz logrando el mismo efecto mientras que para la combinación Tz 100 µg/ml + AR 10⁻⁶ M la reducción de la dosis de Tz es de 100 veces (**Fig. C**). En la línea BT-474, en la combinación Tz 10 µg/ml + AR 10⁻⁶ M, la dosis de Tz utilizada es 10 veces menor cuando se lo usa dentro de ésta combinación sinérgica y para la combinación Tz 100 µg/ml + AR 10⁻⁶ M, el DRI indica que dentro de este escenario sinérgico el efecto es 100 veces más potente comparado con Tz sólo. La coadministración de las drogas disminuyó significativamente la adhesión, migración e invasión en ambas líneas celulares (**Fig. D**). La migración también se encontró disminuida luego del tratamiento con el inhibidor de FAK o transfectadas con el ARN interferente para FAK en combinación con los tratamientos. Mediante inmunofluorescencia se observó que Tz 10 µg/ml, AR 10⁻⁶ M y la combinación de ambas drogas, induce la translocación de FAK desde el citosol al núcleo en ambas líneas celulares (**Fig. E**). Además, se observó una distribución granular del receptor HER-2 luego de los tratamientos combinados (**Fig. F**).

Mediante microscopía confocal pudimos confirmar que en las células control HER-2 se encuentra en la membrana celular y la coadministración de ambas drogas induce la internalización de éstos, en mayor medida en la línea SKBR-3. Los tratamientos combinados de AR y Tz disminuyen fuertemente la expresión de FAK, Moesin y HER-2 (**Fig. G**). En conclusión, en modelos celulares de cáncer de mama HER-2⁺/RAR⁺, la coadministración de Tz y AR, ejercen un efecto sinérgico en la disminución de la proliferación celular, lo que permite reducir las dosis utilizadas, disminuyendo la toxicidad mientras se mantiene la eficacia. Además la coadministración de Tz y AR inducen la relocalización de FAK al núcleo y la disminución de la adhesión/migración/invasión celular en mayor medida en la línea RE⁻. La internalización y posterior degradación del receptor HER-2 tendría un efecto benéfico al desactivar la cascada de activación de éstas vías altamente oncogénicas. La combinación Tz más AR resultó en una potente disminución de la expresión de las proteínas esenciales para la migración, FAK/Moesin y del receptor HER-2.

Estos hallazgos sugieren que la coadministración de ambas drogas, en pacientes con este tipo de cáncer podría contribuir a mejorar su pronóstico y a disminuir los efectos adversos de la terapia debido a que las dosis de Tz aplicadas serían menores gracias al efecto adyuvante de AR.



A) Ensayo de viabilidad celular (MTT) en células SKBR₃ (izq) y BT-474 (der) tratadas con dosis crecientes de Tz, AR y la combinación de Tz con AR 10⁻⁶ M durante 72 horas. Control 100% de supervivencia. *** P < 0.05 vs. Control. **B)** Análisis de la interacción farmacológica entre Tz y AR en la línea SKBR-3. Los tratamientos durante 72 horas del ensayo de MTT se utilizaron para calcular la aditividad/antagonismo o sinergismo, a través del programa CompuSyn. Isoblograma para la combinación Tz + AR. Punto 1: Tz 1 µg/ml + AR 10⁻⁶ M; punto 2: Tz 10 µg/ml + AR 10⁻⁶ M; punto 3: Tz 100 µg/ml + AR 10⁻⁶ M. **C)** Tabla con los índices de reducción de dosis (DRI) de cada una de las combinaciones. **D)** Ensayos de adhesión, migración e invasión para la línea SKBR-3. Adhesión: luego

del tratamiento las células se incubaron por 1 hora. Las células adheridas fueron teñidas con cristal violeta y se midió el porcentaje de absorbancia luego de la tinción. La migración se monitoreó con el ensayo de la herida mediante la toma de fotografías. La invasión se realizó siguiendo el protocolo del kit BD BioCoatGrowth Factor Reduced Matrigel TM Invasion Chamber (BD Bioscience) durante 72 horas y el recuento de células que invadieron se realizó mediante la captura de imágenes. Control 100% adhesión/migración/invasión.*** P < 0.05 vs. Control.

E) Inmunofluorescencia con triple marcación para FAK, actina y núcleo. Se cultivaron las líneas SKBR-3 (izq) y BT-474 (der) durante 72 horas en presencia de los tratamientos. Se incubaron con el Ac. primario Anti-Fak y el Ac. secundario Alexa Fluor 488 (verde). Además se marcó la actina con Texas Red-phalloidin (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Las imágenes fueron capturadas utilizando el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E200 con accesorio de EPI fluorescencia (Tokyo, Japan).

F) Inmunofluorescencia con triple marcación para HER-2, actina y núcleo. Ídem al anterior excepto el Ac. Primario utilizado: Anti-HER-2.

G) Western Blot para la línea SKBR-3 (izq) y BT-474 (der). Se sembraron 30 µg de proteínas luego de los tratamientos. Se evaluó la expresión de HER-2, FAK, moesin y actina. La expresión de actina se utiliza como control de carga. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.