

## RADIOSENSIBILIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE TIROIDES POR INHIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASAS

Perona M.<sup>1</sup>, Dagrosa M.A.<sup>1,2</sup>, Rossich L.<sup>1,2</sup>, Casal M.<sup>1</sup>, Pisarev M.A.<sup>1,2,3</sup>, Thomasz L.<sup>1,2</sup>, Juvenal G.J.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dpto de Radiobiología (CNEA), <sup>2</sup>CONICET, <sup>3</sup>Dpto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

### Abstract

**Introduction:** Thyroid cancer is the most common endocrine neoplasia. Surgical resection and radioactive iodine is an effective treatment for well-differentiated tumors. Histone deacetylase inhibitors (HDAC-I) are agents that cause hyperacetylation of histone proteins and as a consequence remodeling of chromatin structure. They can induce growth arrest, differentiation and apoptotic cell death in different tumor cells. The use of HDAC-I agents could be of utility to enhance the response to external radiation therapy of those thyroid cancers that are refractory to most conventional therapeutic treatments. **Objective:** To study the effect of HDAC-I as radiosensitizers for the treatment of thyroid cancer and their ability to induce differentiation of thyroid cancer cells. **Materials and methods:** The human thyroid follicular (WRO) and papillary (TPC-1) carcinoma cell lines were seeded and incubated with increasing doses (0, 0.3, 0.5, 1 and 1.5 mM) of the HDAC-I sodium butyrate (NaB) and valproic acid (VA) to evaluate cell proliferation and iodide uptake. Cells were irradiated with a <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -ray source ( $1 \pm 5\%$  Gy/min) and postirradiation survival was quantified with the colony formation assay. Survival fraction at 2 Gy (SF2) was calculated for each cell line. Cell cycle and cell death were evaluated at a dose of 3 Gy. Iodide uptake, PCR analysis and transient transfection studies were performed. **Results:** Cell proliferation was not significantly suppressed after 24 hours of incubation with both drugs at all assayed doses. Iodide uptake was not modified after incubation with HDAC-I of both cell lines. SF2 was reduced from  $68 \pm 1.6\%$  in the control WRO cells to  $42 \pm 3.8\%$  ( $P < 0.001$ ) in NaB-treated cells. In TPC-1 SF2 was reduced from  $32 \pm 1.1\%$  in the control cells to  $24 \pm 0.8\%$  ( $P < 0.01$ ). In VA-treated cells SF2 was reduced from  $69 \pm 0.02\%$  in control WRO cells to  $56 \pm 0.01\%$  ( $P < 0.01$ ) and from  $31 \pm 2\%$  in control TPC-1 cells to  $11 \pm 1\%$  ( $P < 0.01$ ). There was an arrest in G2/M and G1 cell phases with the addition of the HDACI in WRO and TPC-1 cells, respectively ( $P < 0.05$ ). HDACI also increased irradiation induced cell death at both times in both cell lines ( $P < 0.05$ ). There was no effect of the compounds in the restoration of iodide uptake and NIS expression. **Conclusions:** There was a radiosensitizing effect of both HDACI in WRO and TPC-1 cell lines. On the other hand, they didn't induce differentiation of thyroid cancer cells at the used dose.

### Introducción

El cáncer de tiroides es una de las formas más comunes de tumores endocrinos, representando alrededor del 0,5 al 1,5% de los tumores. El consenso general es que el cáncer tiroideo debe ser tratado quirúrgicamente, con una casi total ablación de la glándula. La tiroidectomía total es luego completada por la administración de <sup>131</sup>I. Esta combinación suele representar un tratamiento efectivo para tumores bien diferenciados.

Los inhibidores de histonas deacetilasas (HDACI) son compuestos que han emergido como posibles agentes antineoplásicos. No sólo poseen actividad antitumoral debido a su comportamiento como inductores de la expresión de genes, sino también que se ha

demostrado que tienen actividad radiosensibilizadora. La ventaja de estos compuestos es que se podrían llegar a utilizar para aquellos tumores que captan pobremente yodo (1,2).

Los radiosensibilizadores son sustancias que aumentan la radiosensibilidad de las células administradas durante o luego de la irradiación (3). La búsqueda de fármacos radiosensibilizadores ha sido una preocupación permanente de numerosos investigadores. Sólo unos pocos han logrado ser incorporados a la práctica médica, fundamentalmente en radioterapia (4).

## **Materiales y Métodos**

### Línea Celular

Se cultivaron células de cáncer papilar de tiroides humano (TPC-1) y cáncer folicular de tiroides humano (WRO) las cuales fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM F-12 y RPMI suplementados con 5% y 10% de suero fetal bovino, respectivamente, a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad.

### Ensayo Clonogénico

Células en fase de crecimiento exponencial fueron divididas en los siguientes grupos: 1) irradiadas y 2) incubadas 24 h con los HDACI butirato de sodio (NaB) y ácido valproico (AV) e irradiadas. Luego de la irradiación, se sembraron las células en placas de cultivo de 60-mm a diferentes densidades de acuerdo con la dosis de radiación recibida previamente. Entre 9 y 14 días después, las colonias fueron fijadas con glutaraldehído 5% y teñidas con violeta cristal 0,5%. Se contaron las colonias formadas por más de 50 células. Las curvas fueron ajustadas según el modelo cuadrático lineal ( $FS = \exp^{-\alpha(D) - \beta(D)^2}$ ) utilizando el programa Origin 7,5 (OriginLab, USA). Se calculó la fracción de sobrevivencia a 2 Gy.

### Características de la Irradiación

Las células fueron irradiadas con rayos *gamma* emitidos por una fuente de Cobalto-60 (Instituto de Oncología “Ángel Roffo”, Buenos Aires, Argentina), con una tasa de dosis de 1 Gy/min  $\pm$  5%.

### Evaluación de la Muerte Celular

La muerte celular se evaluó morfológicamente por microscopía de fluorescencia (Olympus BX51, 40X) y con un kit para la medición de la actividad de Caspasa-3 (Sigma, CASP-3-C). Las células se irradiaron a una dosis de 3 Gy y 6, 24 y 48 horas post irradiación se realizaron las mediciones. Para microscopía, se utilizaron 3 colorantes: Hoechst 33258 (solución de tinción de cromatina), 4,5-*diaminofluorescein* (DAF) (solución de tinción de citoplasma de células vivas) e ioduro de propidio (IP) como solución de contraste de células necróticas. Los resultados se expresan como porcentaje de células vivas, apoptóticas o muertas por 200 células totales.

### Análisis del Ciclo Celular

Para la determinación de la distribución de las fracciones de células en las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> del ciclo celular, células en proliferación se irradiaron a una dosis de 3 Gy y 6, 24 y 48 horas post irradiación se levantaron en PBS 1X frío y se fijaron en Etanol Absoluto. Luego las células se tiñeron con IP y fueron analizadas en citómetro de flujo (BD FACSCalibur).

### Análisis de la expresión de NIS

Se midió la expresión del transportador de yodo NIS a través del análisis de PCR semicuantitativa y cuantitativa.

### Captación de <sup>125</sup>I

Se incubaron las células con diferentes concentraciones de NaB y AV (0, 0,3, 0,5, 1 y 1,5 mM) durante 24 horas. Se agregó además en cada ensayo un tratamiento con KClO<sub>4</sub> y otro con KClO<sub>4</sub> más los HDACI. Luego se incubaron 40 minutos con <sup>125</sup>I (1 µCi/0,5 ml), se

lavaron con PBS 1X frío dos veces, se agregaron 0,2 ml de NaOH (0,3 M) y se midió la radioactividad con un contador gamma manual.

#### Ensayo de transfección transiente

El ensayo de transfección transientes se realizó utilizando el reactivo LipofectAMINE 2000. La actividad de la luciferasa se midió con el sistema de ensayo con luciferasa reportero. La eficiencia de transfección se analizó mediante cotransfección con el vector pCMV-beta-gal.

#### Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  ES. Las diferencias entre los grupos experimentales se determinaron mediante ANOVA y el test a posteriori de Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

La incubación con NaB produjo una disminución en la sobrevivencia celular en las células WRO. La fracción de sobrevivencia a 2 Gy (FS2) se redujo de  $68,4 \pm 1,4$  del control a  $42,0 \pm 2,7$  en las incubadas con NaB ( $p < 0,001$ ) (Figura 1). Por otra parte, la incubación con AV también produjo una disminución en la FS2 de  $69,2 \pm 0,2$  del control, a  $56,3 \pm 1,6$  en aquellas células incubadas con la droga ( $p < 0,01$ ) (Figura 2). En las células TPC-1, el NaB redujo los valores de FS2 de  $32,1 \pm 1,1$  del control a  $24,1 \pm 0,8$  en aquellas células tratadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Por otra parte el AV disminuyó también los valores de FS2 de  $31,5 \pm 1,9$  del control a  $10,8 \pm 0,8$  en las tratadas ( $p < 0,001$ ) (Figura 4).

En ambas células, la irradiación sola produjo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas a las 24 y 48 horas. Como muestra la Figura 5, en las células WRO, el NaB aumentó el porcentaje de células apoptóticas a las 24 y 48 horas respecto a las células irradiadas sin tratamiento y al control tratado con NaB sin irradiar ( $p < 0,001$ ). El AV por su parte, aumentó también el número de células apoptóticas a ambos tiempos, siendo este aumento significativo a las 24 horas respecto de su control sin irradiar ( $p < 0,01$ ). La incubación previa a la irradiación con NaB aumentó ulteriormente el número de células muertas, respecto a las irradiadas solas y a su control sin irradiar, a ambos tiempos. El AV aumentó el porcentaje respecto a su control sin irradiar, pero igualó el de las células irradiadas solas a las 24 horas. A las 48 horas, disminuyó respecto a estas últimas. En las células TPC-1, el NaB produjo un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas a las 24 ( $p < 0,05$ ) y a las 48 horas ( $p < 0,01$ ) post irradiación respecto de su control sin irradiar. El AV aumentó significativamente el porcentaje a las 48 horas post irradiación ( $p < 0,05$ ) respecto de su control no irradiado. El tratamiento con NaB aumentó significativamente el porcentaje de células necróticas a las 48 horas ( $p < 0,05$ ) respecto de su control no irradiado (Figura 6).

Cuando se midió la actividad de la enzima caspasa-3 como segundo método para la evaluación de la apoptosis, se observó un aumento de la muerte celular en las células irradiadas. El NaB y el AV potenciaron el efecto de la radiación a las 24 horas respecto de sus controles sin irradiar ( $p < 0,05$ ). A las 48 horas post irradiación se observó un aumento en todas las células irradiadas ( $p < 0,05$ ), sin observarse diferencias entre aquellas incubadas con los HDACI y aquellas irradiadas solamente (Figura 7 y 8).

El estudio de la distribución en las fases del ciclo celular mostró que la irradiación produjo un arresto en la fase G2/M en las células WRO y en G1 en las TPC-1 (Figura 9 y 10, respectivamente). Los HDACI incrementaron el porcentaje de células arrestadas a las 24 y 48 horas en ambas líneas celulares (NaB en WRO,  $p < 0,05$  para 24 horas y  $p < 0,001$  para 48 horas y AV en TPC-1,  $p < 0,05$  a ambos tiempos).

Cuando se midió la expresión de NIS por PCR semicuantitativa y cuantitativa, no fue posible detectar por ninguno de los dos métodos la expresión de NIS en las células tratadas con los HDACI. La incubación con NaB y AV no produjo un aumento de la captación de yodo

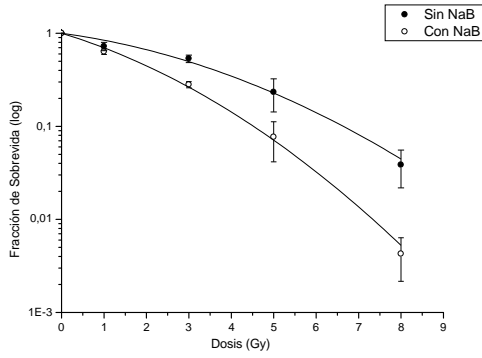
en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 11). Estos resultados confirman lo observado previamente respecto a la expresión de NIS.

### **Conclusiones**

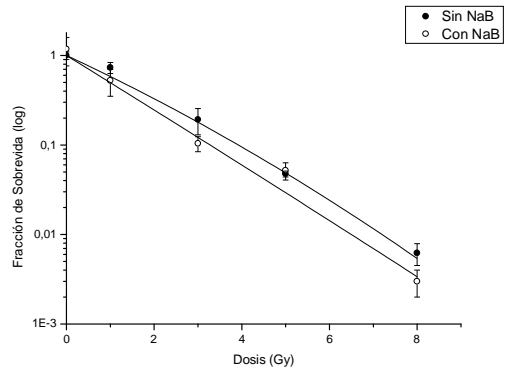
Los HDACI butirato de sodio y ácido valproico, actuaron como radiosensibilizadores *in vitro* de la radioterapia en líneas celulares de cáncer diferenciado de tiroides humano (folicular y papilar). Se observó un aumento de la muerte celular (apoptosis y necrosis) así como un aumento del arresto en distintas fases del ciclo celular. Por otra parte no se observó un efecto rediferenciador de los mismos a las concentraciones usadas en ninguna de las dos líneas celulares utilizadas.

### **Referencias**

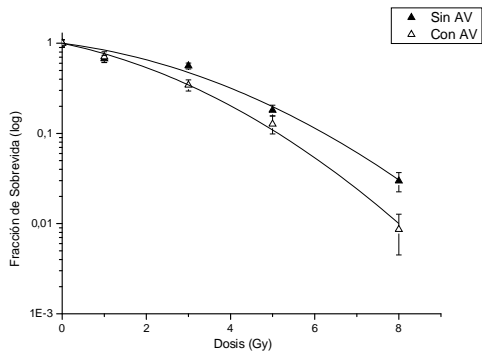
- (1) Shen WT, Chung WY, Thyroid, 15: 594, 2005.
- (2) Puppin C et al, Endocrinology, 146: 3967, 2005.
- (3) Prasad KN. Handbook of Radiobiology, Second Edition, 1995.
- (4) Deutsch E et al, Nature Clin. Pract. Oncol., 2: 456, 2005.



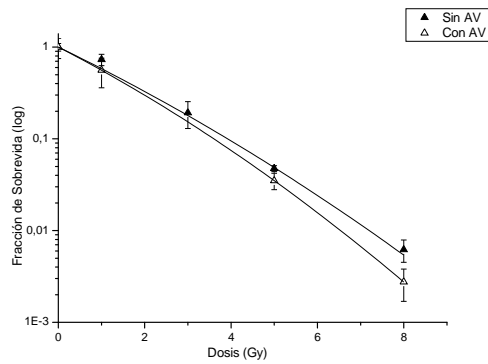
**Figura 1.** Sobrevida celular luego de la exposición a diferentes dosis de radiación en células WRO incubadas con NaB.



**Figura 3.** Sobrevida celular luego de la exposición a diferentes dosis de radiación en células TPC-1 incubadas con NaB.

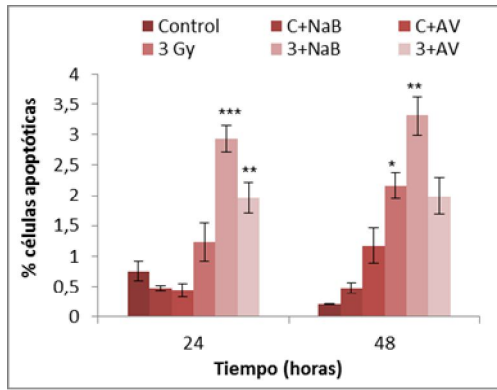


**Figura 2.** Sobrevida celular luego de la exposición a diferentes dosis de radiación en células WRO incubadas con AV.

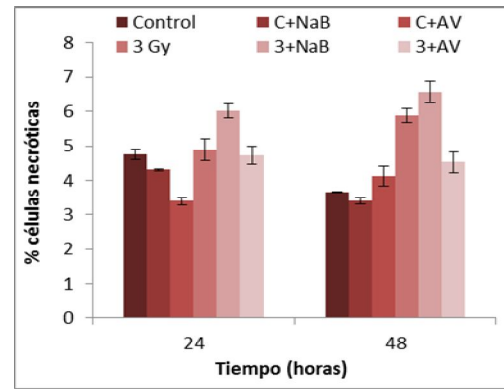


**Figura 4.** Sobrevida celular luego de la exposición a diferentes dosis de radiación en células TPC-1 incubadas con AV.

a)

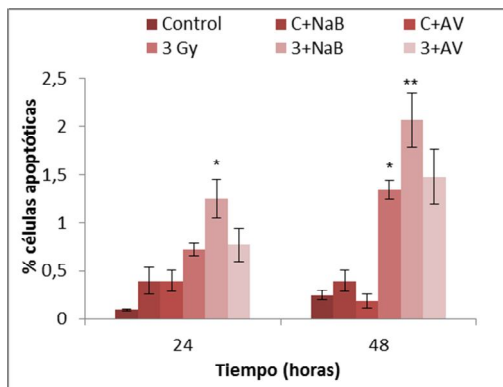


b)

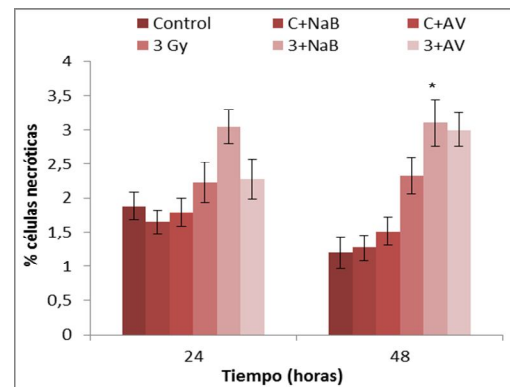


**Figura 5.** Detección de niveles de muerte celular por análisis de la morfología nuclear en células a las 24 y 48 horas post irradiación (3 Gy). Se observan los porcentajes de células apoptóticas (a) y necróticas (b) en células WRO. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controles sin irradiar incubados con o sin las drogas.

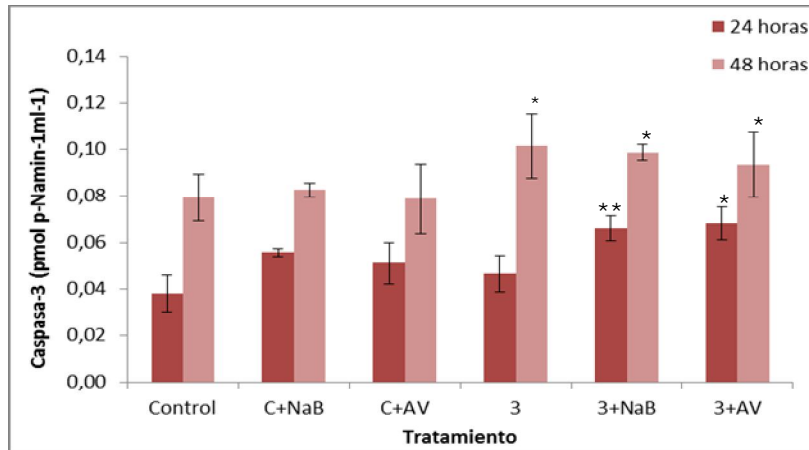
a)



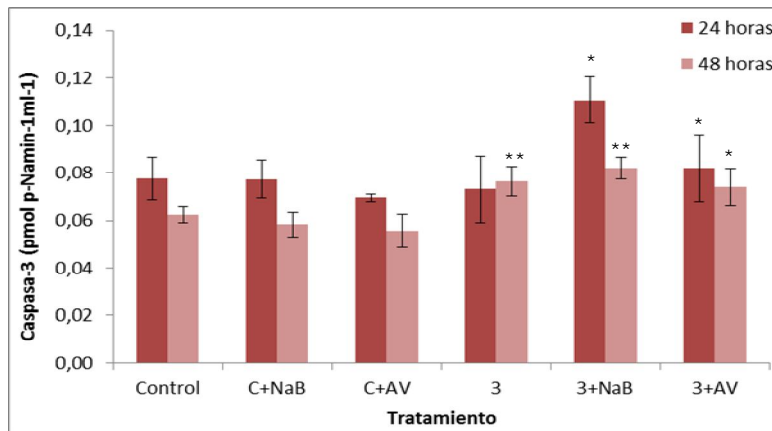
b)



**Figura 6.** Detección de niveles de muerte celular por análisis de la morfología nuclear en células TPC-1 a las 24 y 48 horas post irradiación (3 Gy). Se observan los porcentajes de células apoptóticas (a) y necróticas (b) en células TPC-1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs controles sin irradiar incubados con o sin las drogas.

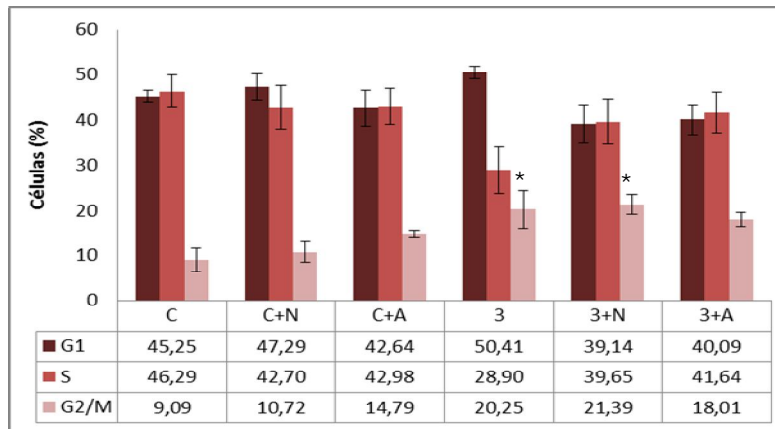


**Figura 7.** Detección de la activación de la caspasa-3 en células WRO 24 y 48 horas post irradiación. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 vs controles sin irradiar incubados con o sin las drogas.

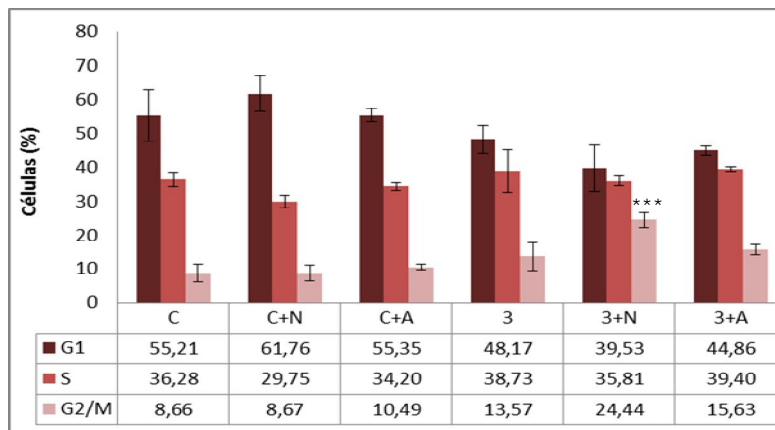


**Figura 8.** Detección de la activación de la caspasa-3 en células TPC-1 tratadas con NaB y AV 1 mM durante 24 horas e irradiadas a 3 Gy. La actividad se midió 24 y 48 horas post irradiación. \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs controles sin irradiar incubados con o sin las drogas.

a)



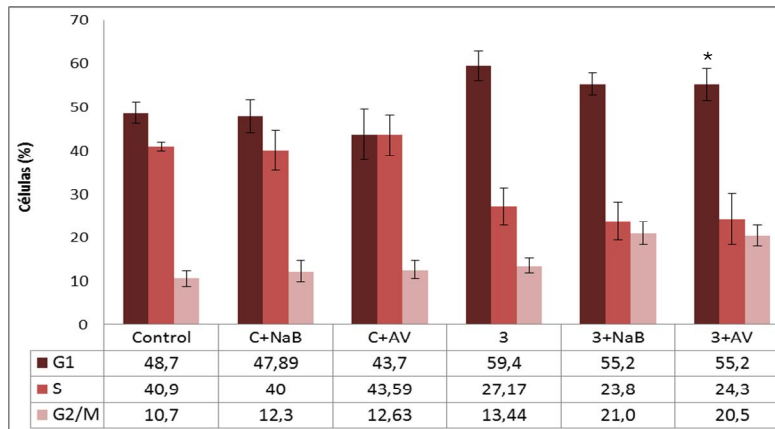
b)



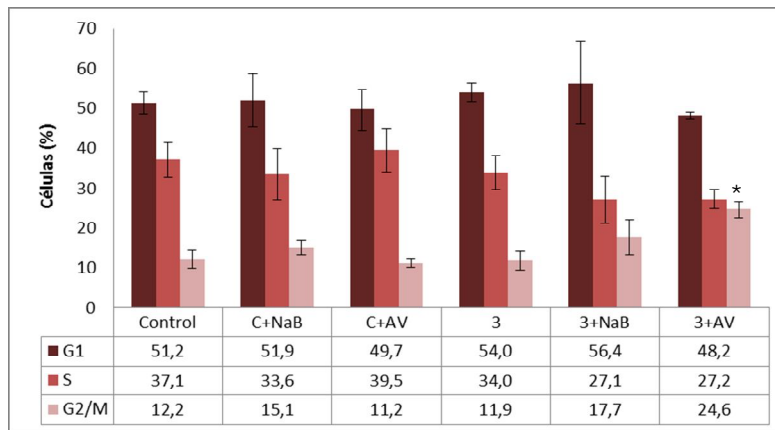
**Figura 9.** Análisis del ciclo celular: a) 24 y b) 48 horas post irradiación en células WRO. Se muestra el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. \* $p < 0,05$  para 3 y 3+NaB vs Control y C+NaB a las 24 horas; \*\*\* $p < 0,001$  para 3+N vs C+N a las 48 horas.



a)

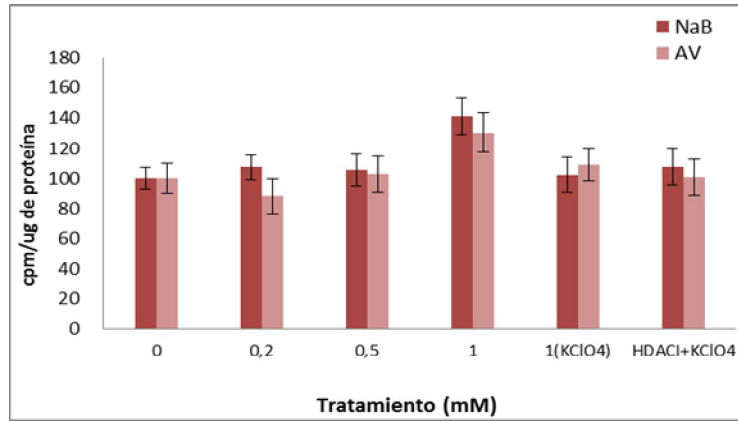


b)

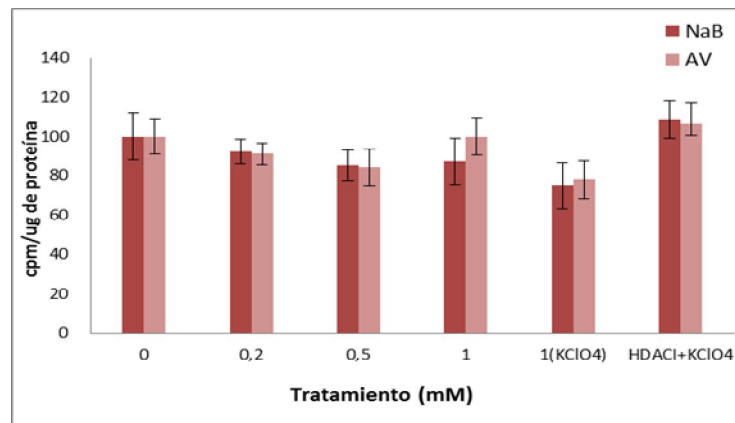


**Figura 10.** Análisis del ciclo celular: a) 24 y b) 48 horas post irradiación en células TPC-1. Se muestra el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. \* $p < 0,05$  para 3+AV vs C+AV a las 24 y vs C+AV y 3 Gy a las 48 horas.

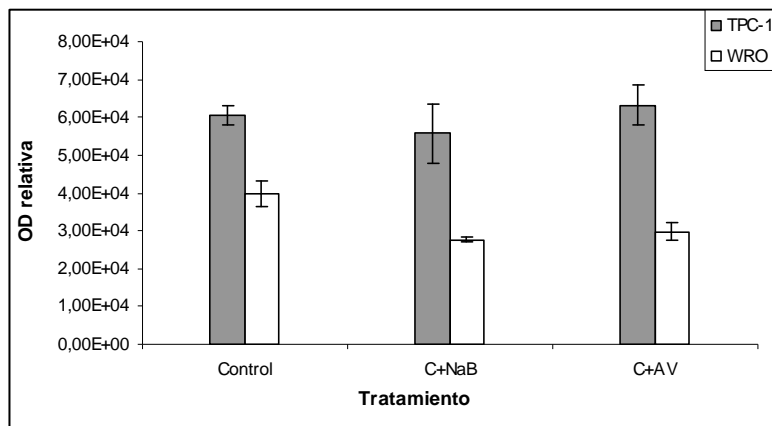
a)



b)



**Figura 11.** Captación de  $^{125}\text{I}$  en células WRO (a) y TPC-1 (b). Se incubaron las células con dosis crecientes de NaB y AV. La captación del halógeno se evaluó 24 horas luego.



**Figura 12.** Ensayo de transfección transiente en células WRO y TPC-1 para evaluar la actividad transcripcional sobre la región promotora del gen NIS.