

ESTUDIO DEL EFECTO DEL PROPRANOLOL EN CULTIVOS CELULARES DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE VON HIPPEL-LINDAU

Los cultivos primarios de hemangioblastomas de SNC se obtuvieron de acuerdo al protocolo diseñado por Serrano-Heras y colaboradores de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Entre Marzo del 2013 y 2014 muestras de 4 pacientes (3 hombres y 1 mujer) de 31.5 ± 15.6 de edad y rango de edades entre 13–45) diagnosticados de la enfermedad de Von Hippel-Lindau se obtuvieron del departamento de Neurocirugía de la “Fundación Jiménez Díaz”, Madrid. Se obtuvo un consentimiento informado antes de la intervención de todos los pacientes. El protocolo fue previamente aprobado por el comité de Ética de acuerdo con las guías aceptadas para el uso de muestras humanas. Los excedentes tumorales se lavaron varias veces con PBS, se cortaron en piezas de 1 mm^3 en placas de cultivo donde se sometieron a digestión enzimática con colagenasa I y dispasa II a una concentración final de 1mg/ml en EBSS durante 45 minutos a 37°C . Posteriormente los trozos se disgregaron completamente mediante pipeteo suave y se digirieron durante 15 minutos con tripsina a 37°C . Las muestras se centrifugaron y los pellets celulares se resuspendieron en medio de crecimiento (RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 20 % de suero fetal bovino, 1% de Pen/Strep y 4 mM de glutamina. Las células una vez confluentes se pasaron y se caracterizaron mediante Citometría de Flujo. El análisis demostró que los cultivos tenían células estromales (30-50% de células CD99+), células endoteliales entre un 15 y un 25% (CD34+) y un 30-40% de células NG2+ (pericitos). Se analizaron en total los cultivos de los siguientes

hemangioblastomas: HB2, procedente de bulbo raquídeo; HB3 del lóbulo temporal; HB7 de médula espinal y HB11 de lóbulo temporal.

RESULTADOS

1. El propranolol disminuye la activación dependiente de HIF en la línea celular 9XHRE HeLa

El propranolol a dosis de 50 y 100 μ M, es capaz de disminuir la unión de la proteína HIF a sus sitios consenso diana, del reportero HRE-luc presente de manera estable en el genoma de la línea HeLa, tal y como se muestra en el esquema a de la Figura 1, más abajo. La proteína luciferasa, actúa como reportero, bajo el control de los elementos de respuesta a HIF y puede medirse cuantitativamente por luminometría, de modo que a mayor activación por HIF, mayor luciferasa se detectaría en las células. En condiciones de normoxia, apenas hay proteína HIF presente en el núcleo y por tanto no hay prácticamente activación del reportero. La hipoxia tanto inducida por DFO como por incubación de las células en atmósfera de 1% de oxígeno, activa la transcripción de la luciferasa dependiente de la unión de HIF a los elementos HRE, tal y como se ve en la parte b de la Figura 1. Cuando se tratan las células con propranolol, se observa una disminución de la estimulación del reportero por HIF en hipoxia, tal y como se ve por la bajada de la actividad luciferasa en células HeLa tratadas con propranolol, tanto a 50 como a 100 μ M (Figura 6).

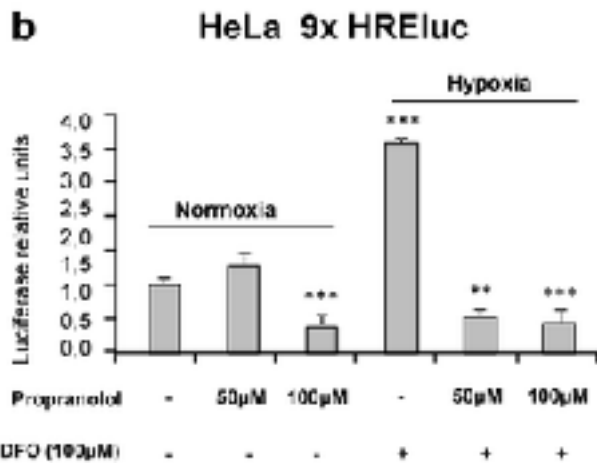


Figura 6

2. El propranolol disminuye la activación dependiente de HIF al bajar la concentración proteica de HIF presente en las células

Pudimos establecer que la disminución de la transcripción promovida por HIF en hipoxia, a través de los elementos de respuesta HRE en las células HeLa se debía a que el propranolol desestabilizaba y bajaba la concentración de proteína HIF presente en las células en hipoxia, mediante Western Blot. Como se muestra en la Figura 7, más abajo, la cantidad de las proteínas HIF1α y HIF2α inducidas en hipoxia en HeLa, bajaban tras tratamiento con propranolol. Por tanto, con este primer modelo estábamos confirmando que el propranolol, tenía como diana HIF, y que actuaba bajando los niveles de la proteína que se inducía en esta línea celular tras hipoxia.

Pero además, el propranolol induce muerte celular por apoptosis en hipoxia en esta misma línea celular, como demostramos a continuación.

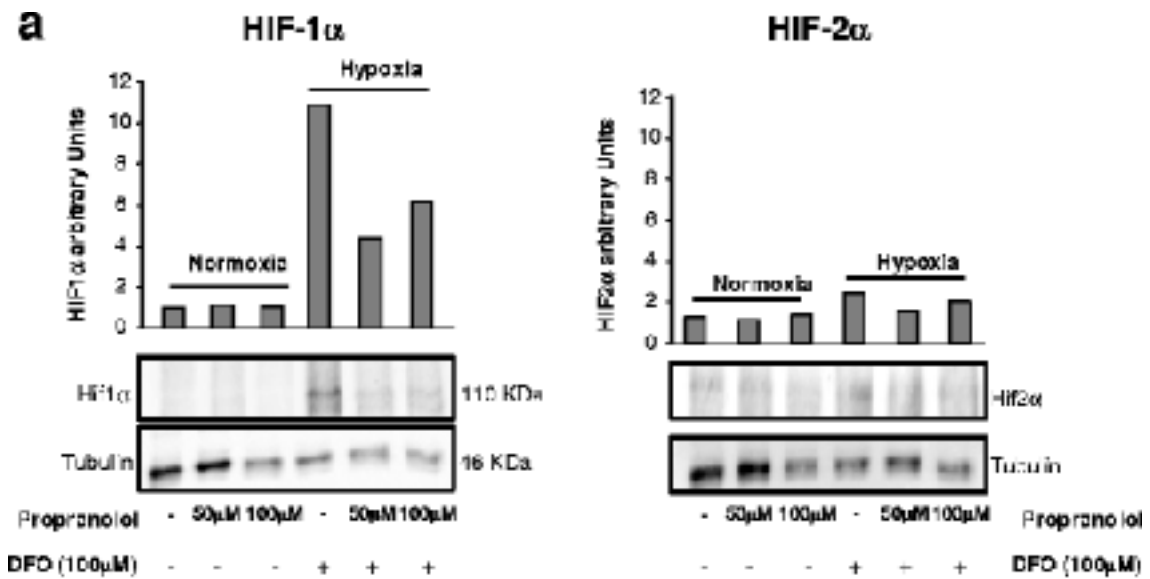


Figura 7

3. El Propranolol disminuye la viabilidad de células tumorales HeLa e induce la muerte celular por apoptosis en hipoxia

Cuando las células HeLa son sometidas a hipoxia química, con o sin tratamiento con propranolol, se observa que el propranolol disminuye la viabilidad de las células, a la dosis más alta de propranolol, 100 μ M. Además, el propranolol induce su muerte celular por apoptosis. Como se muestra en la Figura 8a, el propranolol disminuye la viabilidad de las células HeLa hasta el 20% tras 48 horas de tratamiento con 100 μ M de propranolol. Y esta muerte se produce por apoptosis, como lo muestra la figura 8b donde se expresan los datos de actividad caspasa 3/7. En conjunto la interpretación de esta figura es que las células dejan de proliferar a 24 horas y tras 48 horas de tratamiento con propranolol, la actividad caspasa es la responsable de la muerte celular.

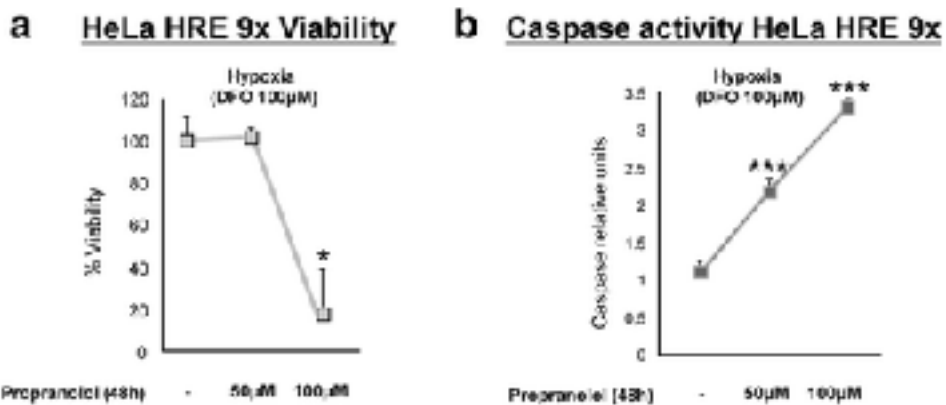


Figura 8

Conclusiones del primer modelo celular: HeLa 9xHRE

El propranolol actúa disminuyendo los niveles de HIF inducidos por hipoxia y por tanto disminuyendo la transcripción de dianas dependientes de HIF, en este caso los elementos artificiales en tándem HRE. Pero además, y de modo interesante, en condiciones de hipoxia el propranolol induce la muerte celular por apoptosis.

Animados por estos resultados en una línea celular ya establecida, al disponer de los cultivos primarios de hemangioblastomas obtenidos en la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, decidimos aplicar los tratamientos a las células objeto de interés terapéutico, en una primera fase, a los hemangioblastomas.

RESULTADOS EN CULTIVOS PRIMARIOS HEMANGIOBLASTOMAS

Viabilidad y Apoptosis tras tratamiento con propranolol

- La viabilidad de las células de hemangioblastoma tras tratamiento con 50 y 100 μM de propranolol, determinada mediante medida del ATP intracelular, disminuye frente a células no tratadas. Cuando durante los tratamientos se observa la evolución de los cultivos en las placas, a 24 h, y a 48 h, tratados a 50 y 100 μM de propranolol, se puede ver que hay menos células (se observan espacios vacíos) especialmente a 48 horas y a la dosis más alta 100 μM , por lo que la afectación en la viabilidad es visible ya a tiempos cortos (Figura 9a).

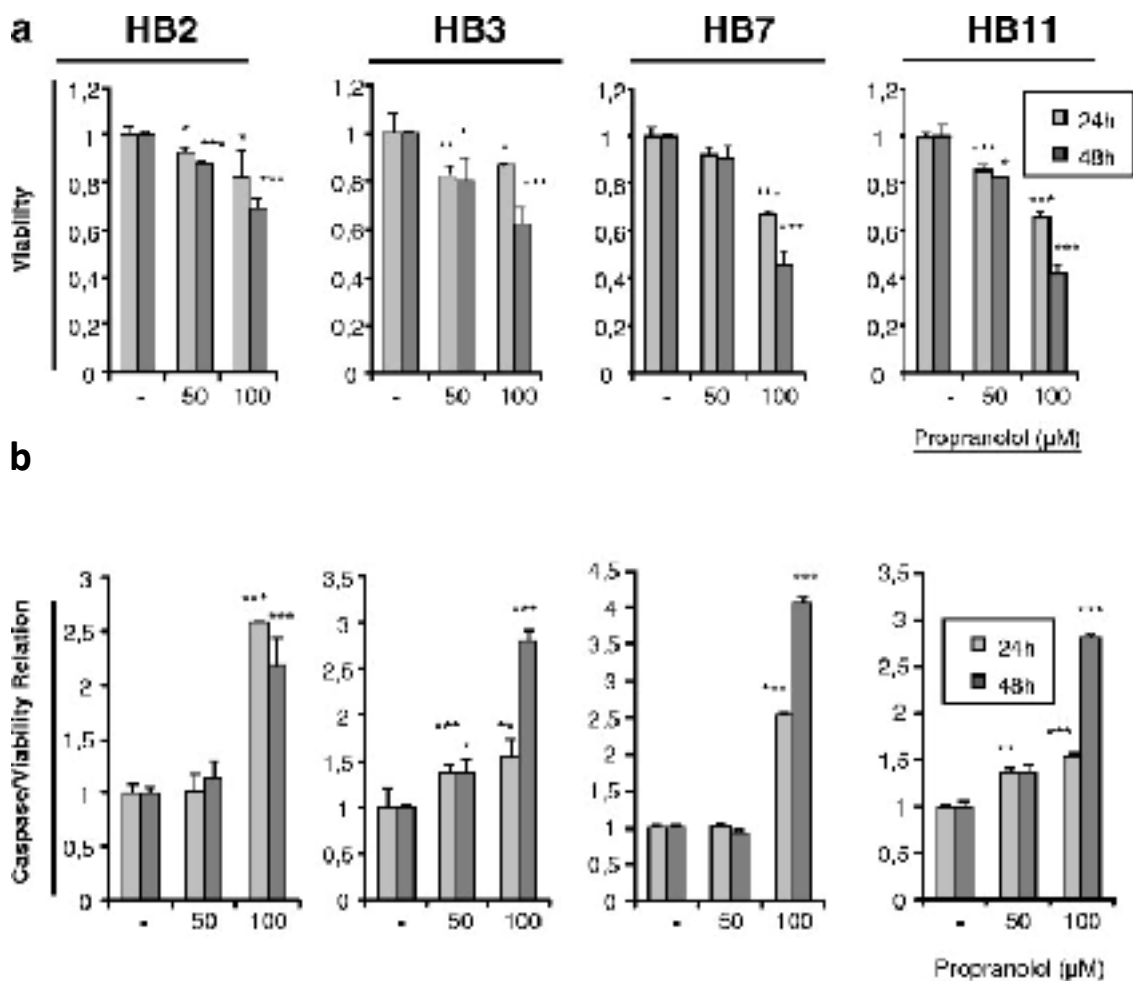


Figura 9

- La apoptosis o grado de muerte celular inducida por el propranolol, mediante medida de la actividad caspasa3/7 de las células de los hemangioblastomas, aumenta llegando hasta casi un 50% tras 48 horas de cultivo, en medio menos rico (RPMI) (Figura 9b).

El propranolol disminuye la cantidad de factor HIF expresado de manera constitutiva en hemangioblastomas de VHL

Las células de los hemangioblastomas de pacientes de VHL se caracterizan por una expresión constitutivamente alta del factor inducible de hipoxia, HIF, aún en condiciones de normoxia, debido a la mutación de la proteína VHL que es la encargada de marcar y llevar a HIF a su degradación en el proteasoma en condiciones de normoxia. El análisis de la cantidad de proteína HIF1- α y HIF2- α en lisados de células de Hemangioblastomas, lo presentamos en la siguiente figura en dos de éstos cultivos (HB2 y HB3), mediante ensayos de western blot dónde observamos que hay una expresión de las proteínas HIF1 y HIF2 en normoxia, cuyos niveles se ven disminuídos tras tratamiento con 50 y 100 μ M de Propranolol (Figura 10).

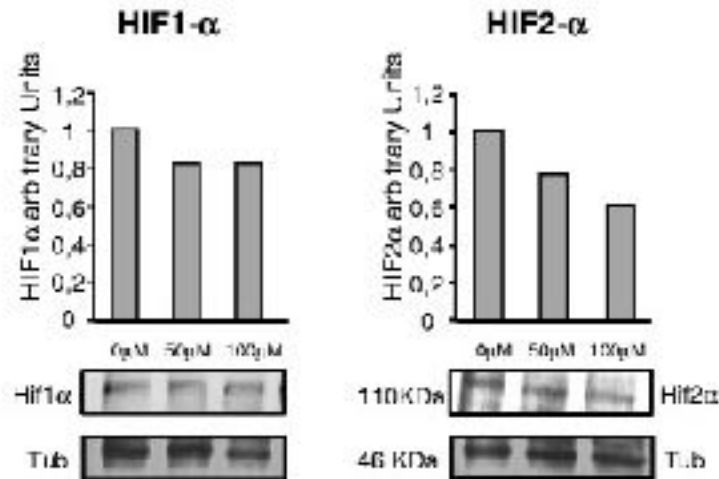


Figura 10.

El Propranolol al bajar HIF disminuye además la expresión de los genes diana de HIF en Hemangioblastomas

Si el tratamiento con propranolol bajaba la cantidad de proteína HIF, que a su vez controla una serie de genes de cuya expresión depende el desarrollo de los tumores, sería esperable que estos factores que están estimulando desarrollo y crecimiento de tumores, se vieran afectados, bajando también su expresión. Entre estos factores están VEGF (factor que controla el desarrollo de nuevos vasos y nutre a los tumores), Eritropoyetina, que favorece la producción de glóbulos rojos y células de la pared vascular, así como los factores de pluriptencia y desdiferenciación SOX-2. Tras la aplicación del tratamiento con propranolol, se pudo observar que la síntesis de RNA de estos factores bajaba entre un 40 y un 60% con respecto a las células no tratadas, siendo la disminución más aparente a la dosis más alta (Fig 11a).

Especialmente interesante es el caso de los factores de crecimiento de vasos, VEGF y de eritrocitos y pared vascular, EPO, que podían medirse también en el sobrenadante de los cultivos.

Hay que pensar que VEGF es un gen absolutamente dependiente de HIF y que participa en angiogénesis (formación de nuevos vasos a partir de otros existentes) y en vasculogénesis. Sin VEGF no hay vasos, y sin vasos sanguíneos no hay nutrientes para alimentar los tumores.

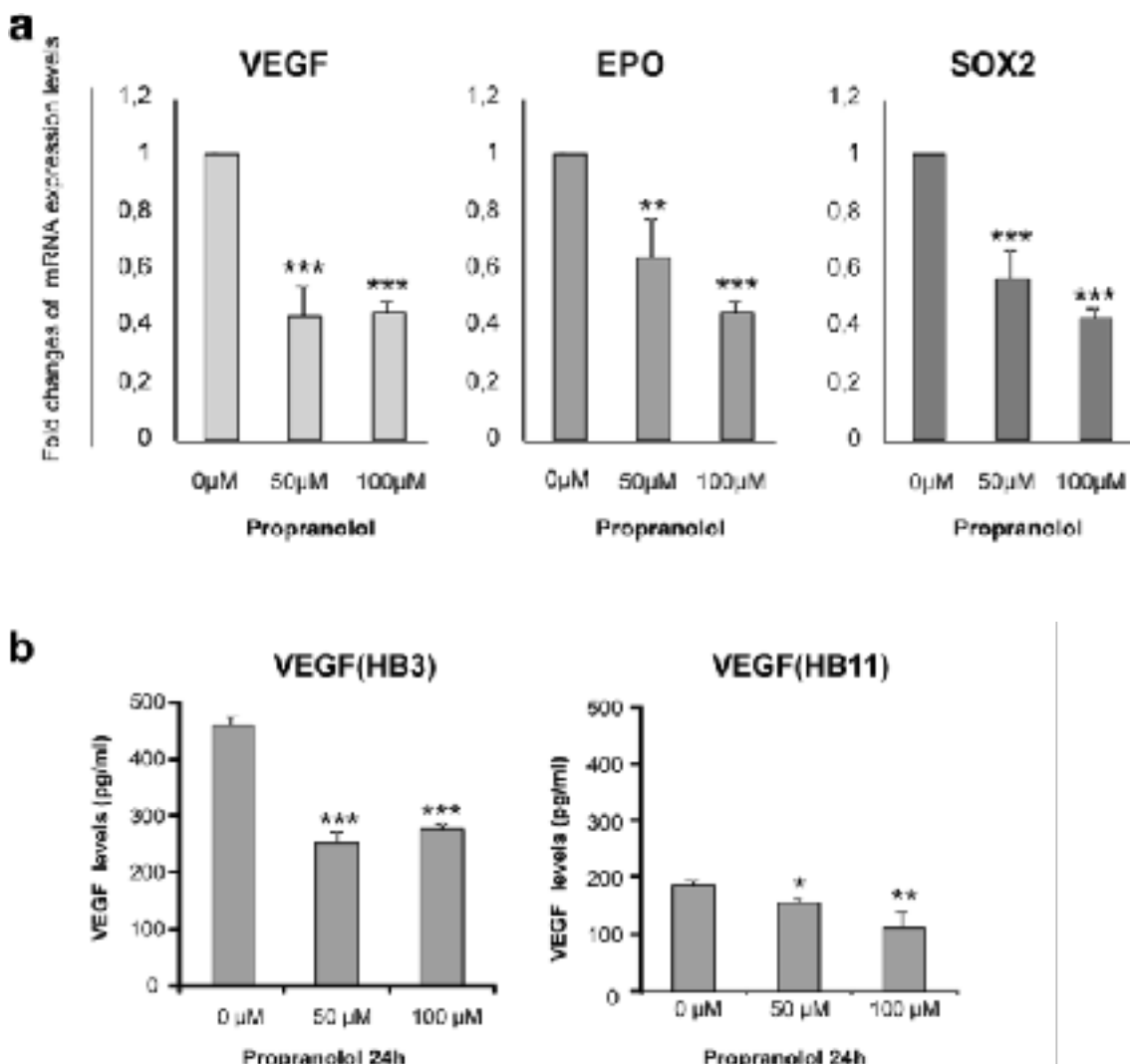


Figura 11

Presentamos en la parte b de la figura 11, cómo los niveles de VEGF soluble bajaban tras tratamiento de las células de los hemangioblastomas con propranolol.

Además hay genes implicados en apoptosis que se encuentran inhibidos por HIF: NIP3 y Bax, que también dependen de HIF, lo cual explicaría la muerte celular por apoptosis inducida tras tratamiento con propranolol, que explicaría los resultados de bajada de viabilidad e inducción de apoptosis vista en un apartado anterior, todo consecuencia de la bajada de HIF.

Dados los resultados de disminución de viabilidad y aumento de apoptosis tras tratamiento con propranolol durante tiempos cortos, quisimos saber si el efecto era acumulativo en el tiempo y sometimos a las células de hemangioblastomas a un tratamiento largo (5 días), empezando con una cantidad controlada de células, 50.000 células. Se hizo un tratamiento en el tiempo a ambas dosis 50 y 100 μM comparando con el control sin tratar. Tal y como se puede apreciar en la Figura 7, a lo largo del tiempo las células tratadas con propranolol parece que paran su proliferación y aumentan su muerte, tal y como se aprecia por los espacios vacíos intersticiales entre las células. La muerte, tal y como se ha descrito en la figura 4 se produce por apoptosis y es dependiente de la actividad de caspasas.

Tras 5 días de tratamiento (96 horas) las células han dejado de proliferar, han muerto la mayoría de las células y a la dosis máxima, 100 μM , apenas quedan 5.000 células mientras que en los controles sin tratar han proliferado hasta 300.000 células.

Por otra parte las pocas células que quedan presentan una morfología atípica, alargadas, estrechas y con vesículas apoptóticas rodeando al núcleo (Figura 12).

Este resultado sería compatible con la regresión que se observan en el hemangioma infantil y sugeriría que el propranolol podría retrasar la proliferación de los hemangioblastomas en los pacientes VHL y por tanto, retrasar las cirugías.

Los hemangioblastomas tienen una composición celular heterogénea, ya que no se trata de un único tipo celular. Constan de células endoteliales y de pericitos o células de la capa muscular lisa que rodea a las células endoteliales en la formación de vasos, pero además, tienen un componente estroma desdiferenciado de naturaleza mesenquimal. La muerte celular por apoptosis afecta a los tres tipos celulares

Propranolol treatment

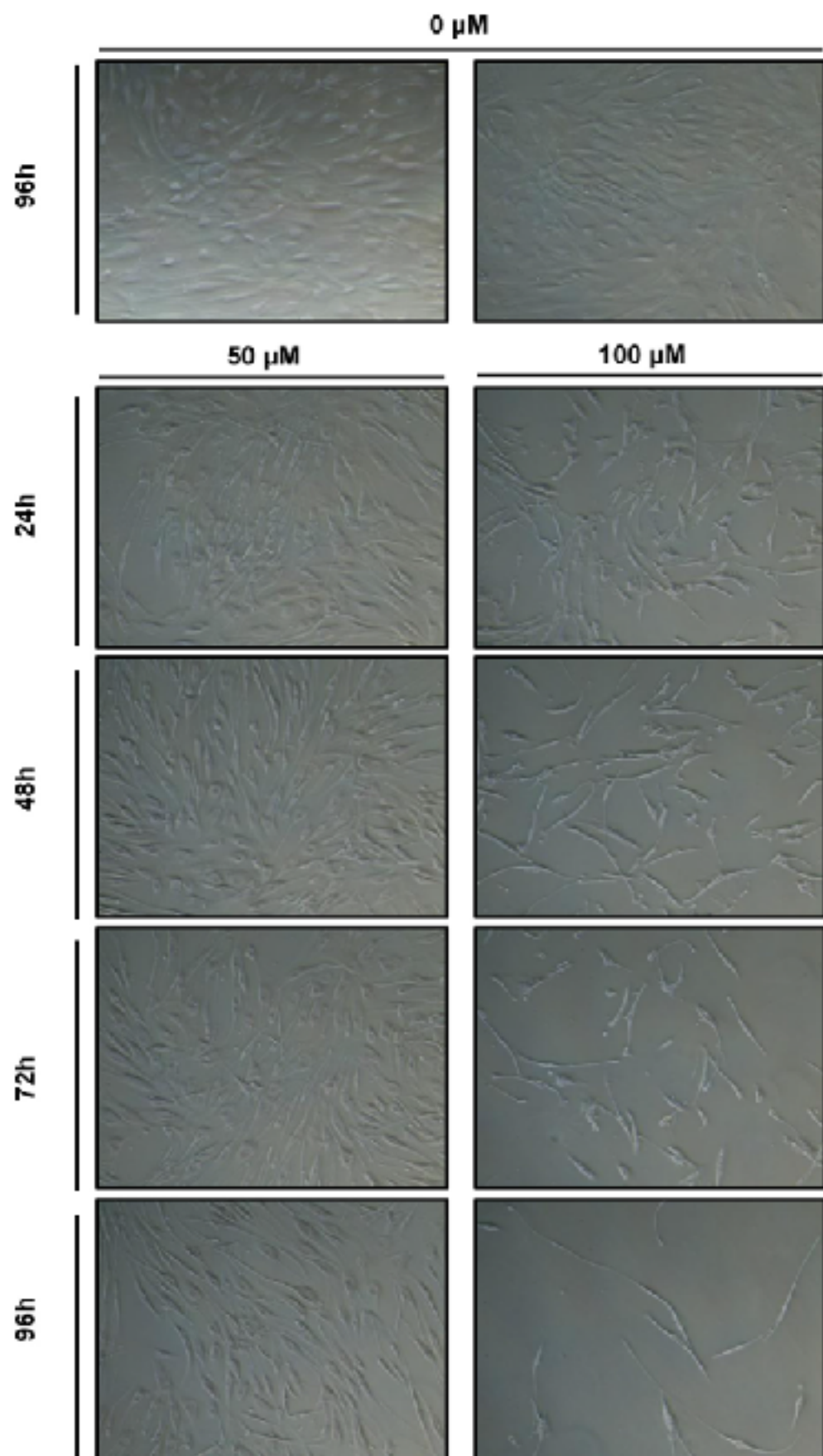


Figura 12

El propranolol previene la formación de tubos in vitro de células de hemangioblastomas.

Las células endoteliales y de musculatura lisa (pericitos) tienen la capacidad de alinearse espontáneamente formando tubos en un medio semisólido especial con factores de crecimiento (matrigel). Como se ve en la figura de más abajo (Figura 13), el tratamiento de las células de hemangioblastoma con propranolol, evita la formación de estructuras celulares similares a los tubos, la cual no es más que una manifestación *in vitro* del fenómeno de angiogénesis in vivo.

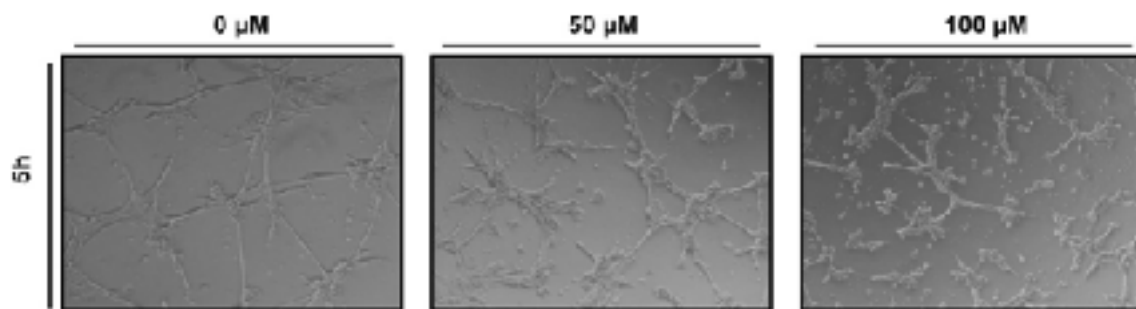


Figura 13

Conclusiones y Modelo

En conjunto, por los antecedentes y resultados experimentales de este artículo, llegamos a la conclusión de que el propranolol actúa primeramente disminuyendo los niveles del factor inducible por hipoxia, HIF, el cual, a su vez controla una pléiade de genes del programa de hipoxia/tumorogénesis. Estos genes dianas de HIF van a ser inhibidos al bajar el propranolol. Estos genes son esenciales para la supervivencia de las células tumorales, la cuales dejan de dividirse y mueren por apoptosis.

Un esquema hipotético del modelo de actuación del propranolol se presenta a continuación que engloba todos los resultados presentados en este trabajo (Figura 14).

Se propone el propranolol como posible terapia farmacológica para detener el crecimiento de los hemangioblastomas en VHL

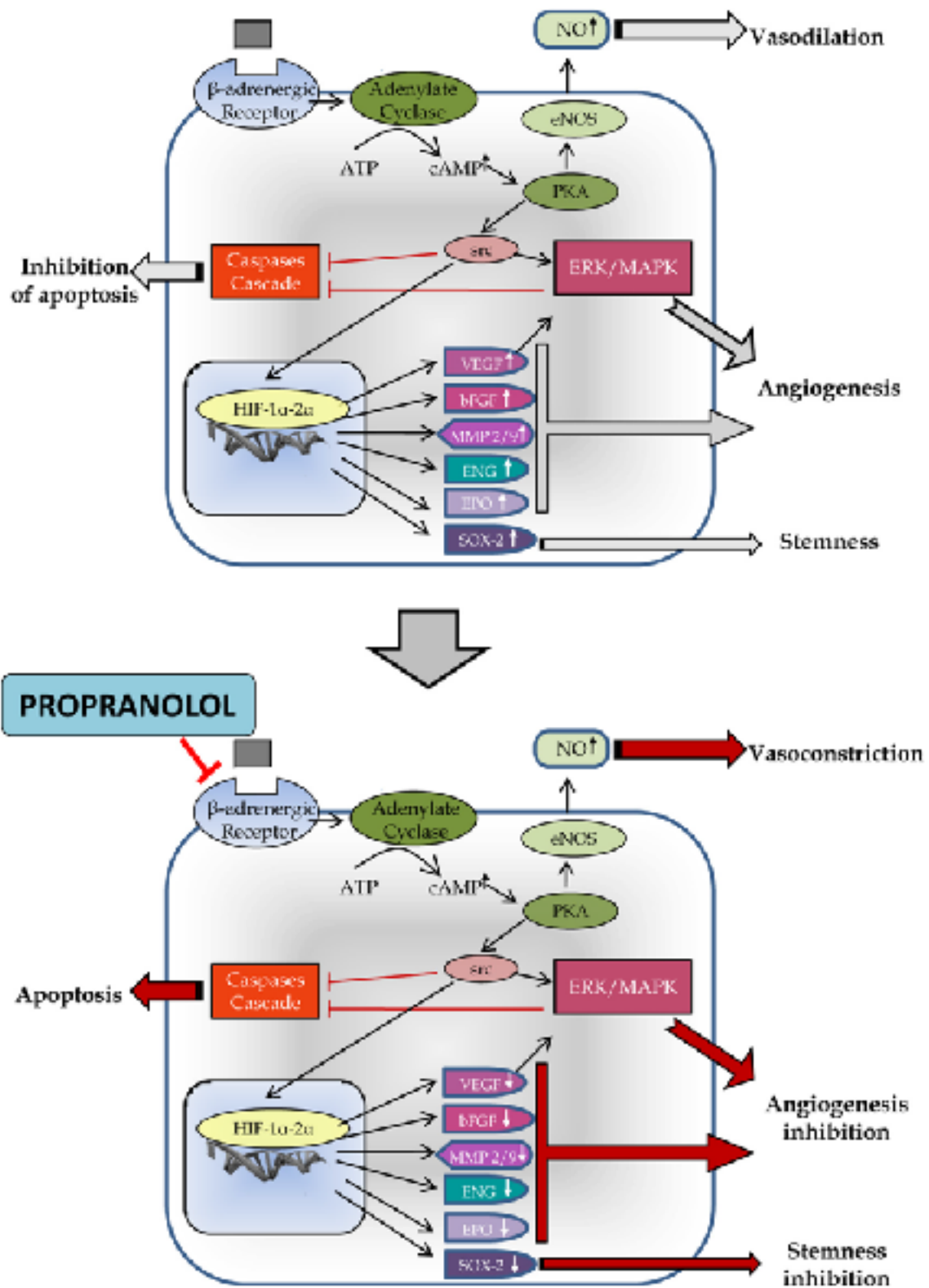


Figura 14

En la actualidad :

CONTINUACIÓN DEL ESTUDIO CON HEMANGIOBLASTOMASy Seguimos con los ensayos para estudiar los distintos hemangioblastomas en relación al tipo de tumor (bulbo, cerebelo, médula), tipo de mutación VHL, y ensayar formación de hemangioesferas, en definitiva más resultados que sigan apoyando los primeros resultados obtenidos con el propranolol, y que los relacionen con características tales como la tasa de mayor o menor crecimiento y la presencia de cistos o quistes todavía por estudiar, pudiendo completar en un futuro cercano la publicación del propranolol, con resultados sobre los genes que controlan los cistos o edemas que rodean algunos de estos tumores.

Además planificamos repetir los tratamientos de propranolol con un fármaco betabloqueante específico del receptor β -adrenérgico 2, que no tiene efectos sobre el ritmo cardíaco ni la tensión arterial, para ver si obtenemos los mismos resultados que con el propranolol, pero sin efectos cardiacos. Las propiedades de este fármaco muestran que tendría menos influencia sobre la conducción cardíaca y presión arterial.

EXTENSIÓN A OTROS TUMORES DE PACIENTES VHL

Recientemente hemos comenzado cultivos primarios a partir de excedentes quirúrgicos de carcinomas renales de células claras y de feocromocitomas, tumores también de pacientes de VHL, con el objetivo de estudiar si estas células también responden al propranolol.