

Propranololul reduce viabilitatea și induce apoptoza celulelor hemangioblastomului la pacienții cu modificarea genetică Von Hippel-Lindau

- Virginia Albiñana,
- Karina Villar Gómez de las Heras,
- Gemma Serrano-Heras,
- Tomás Segura,
- Ana Belén Perona-Moratalla,
- Mercedes Mota-Pérez,
- José María de Campos și
- Luisa María Botella [Email autor cibluisa@cib.csic.es](mailto:cibluisa@cib.csic.es)

Orphanet Journal of Rare Diseases 2015**10**:118

DOI: 10.1186/s13023-015-0343-5

© Albiñana et al. 2015

Primit la: 22 Mai 2015

Acceptat: 16 septembrie 2015

Publicat: 22 septembrie 2015

Rezumat

Context

Sindromul Von Hippel-Lindau (VHL) este o boală oncologică rară cu o incidență de 1:36,000, care se caracterizează prin dezvoltarea a diferite tipuri de tumori: hemangioblastoame la nivelul sistemului nervos central (SNC) și retinei, carcinomului renal, feocromocitoamelor, chistadenoamelor pancreatice seroase, și tumorilor sacului endolimfatic. Aceste tumori nu exprimă proteina VHL (pVHL). pVHL determină apariția proteinei numită factor indus de hipoxie (HIF) pentru degradare la nivelul proteazomului; în absența VHL, HIF se translochează în nucleu spre a activa exprimarea genelor sale țintă. Abordarea tumorilor derivate din VHL cu medicamente care prezintă efecte secundare reduse este urgentă pentru a se evita repetarea operațiilor chirurgicale la nivelul SNC. Articole recente au arătat că propranololul, un beta-blocant folosit în tratamentul hipertensiunii și al altor boli cardiace și neurologice, este cea mai bună opțiune în cazul hemangiomului infantil (IH). Propranololul ar putea fi un tratament eficient în controlul dezvoltării hemangioblastomului în sindromul VHL date fiind efectele sale antiangiogenice demonstrate în IH și impactul ipotetic asupra nivelurilor de HIF.

Metode

Linia de celule HeLa 9X (HRE) a elementului de răspuns la hipoxie și celulele derivate din hemangioblastomul primar au fost supuse tratamentului cu propranolol și au fost evaluate viabilitatea celulelor și apoptoza. Exprimarea HIF1- α și Hif-2 α după tratamentul cu propranolol a fost analizată prin reacția western blot (imunoblotting). Reacția cantitativă PCR a fost efectuată spre a se studia exprimarea mRNA a genelor țintă HIF. Factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF) a fost măsurat în lichidele supernatante din culturi prin imunodozare (immunoassay).

Rezultate

Propranololul a încetinit transcrierea dependentă de HIF la celulele HeLa 9XHRE. În condiții hipoxice, propranololul a redus exprimarea genelor țintă HIF la nivelul celulelor din hemangioblastoame, a căror înmulțire s-a oprit, acestea murind după un tratament pe termen lung. Aceste rezultate sugerează că tratamentul cu propranolol a promovat exprimarea redusă a proteinei HIF și reducerea corespunzătoare a genelor țintă HIF, și a inhibat proliferarea celulelor în paralel cu inducerea morții celulelor prin apoptoză.

Concluzii

Rezultatele noastre sugerează că propranololul ar putea reduce creșterea tumorilor dependente de HIF și deci ar putea fi un tratament promițător în întârzierea operațiilor chirurgicale la pacienții cu modificări ale VHL.

Cuvinte cheie

Sindromul von Hippel-Lindau (VHL) pVHL Hipoxie inductiv factor hemangioblastom CNS tumori Propranolol

José María de Campos a decedat.

Context

Sindromul Von Hippel-Lindau (VHL) este un tip rar de facomatoză cu o incidență de 1 la 36,000 de persoane din populație generală [1, 2]. Manifestările clinice includ tumori multiple benigne și

maligne care apar de-a lungul întregii durate de viață a pacientului. Cele mai frecvente tumori sunt hemangioblastoamele (HB) sistemului nervos central (CNS) și carcinomul de retină și cel renal (carcinomul celulelor renale) [3–6]. În plus boala este asociată cu feocromocitoamele, chistadenoamele seroase pancreatice, tumorile sacului endolimfatic și chistadenoamele papilare.

Sindromul VHL este o entitate moștenită, cu transmitere dominantă autosomală. Pacienții sunt heterozigoți pentru mutațiile *VHL*, o genă supresoare a tumorilor localizată pe brațul scurt al cromozomului 3 (3p25–p26). Tumorile se dezvoltă la pacienții care au o copie mutată a *VHL* la naștere prin pierderea alelei sălbatice (pierderea caracterului heterozigot) [7]. Astfel, tumorile acestor pacienți fie nu exprimă proteina VHL (pVHL) sau forma mutată nu este funcțională. pVHL se leagă de și ubiquitinează HIF-1 α și HIF-2 α spre a le ținti la nivelul proteazomului în vederea degradării. Ca urmare, în absența pVHL funcționale, HIF se acumulează în interiorul citoplasmei și se translochează în nucleu spre a declanșa programul de hipoxie prin țintirea genelor de răspuns la hipoxie [8]. HIF-1 α și HIF-2 α sunt implicate în proliferarea celulelor, în angiogeneză, degradarea matricei extracelulare, tonusul vascular și eritropoieza, printre alte procese. Toate genele țintă HIF sunt în mod normal reduse la tăcere în normoxie. pVHL nu poate lega HIF în condiții hipoxice, deoarece prolin-hidroxilazele nu pot hidroxila reziduurile HIF specifice prolinei. În aceste circumstanțe, HIF se acumulează și se translochează în nucleu. Ca urmare, celulele tumorale în VHL au un program HIF constitutiv activ prin absența pVHL funcționale.

Până în prezent, opțiunile terapeutice pentru pacienții suferinzi de VHL sunt cele chirurgicale [9, 10]. Terapia sistemică folosită în cazul cancerelor metastazate a dat rezultate limitate în cazul tumorilor VHL pancreatice și renale, iar tumorile SNC nu reacționează deloc. Ca urmare, lipsa terapiilor pentru boala difuză sau recurentă înseamnă că există o cerere urgentă de medicamente efective cu efecte secundare reduse pentru pacienții VHL, în special acelea care opresc dezvoltarea tumorilor și ulterior întârzie tratamentul chirurgical. Unele studii anterioare au arătat că propranololul, un beta-blocant folosit în tratamentul aritmiei, hipertensiunii arteriale, migrenelor și al altor boli cardiace și neurologice, este și cea mai bună opțiune de tratament pentru hemangioamele infantile (IH) [11–15]. IH sunt cele mai frecvente tumori vasculare benigne la nou-născuți. În ultimii câțiva ani, propranololul a devenit tratamentul preferat pentru IH în locul chirurgiei, existând o lungă listă de publicații care îi susțin succesele. Legat de acest lucru, grupul nostru a demonstrat că celulele endoteliale tratate cu propranolol au prezentat o exprimare scăzută a proteinelor pro-angiogenice endoglină și ALK1, care sunt țintele HIF-1 α

[16]. Deși mecanismul precis de acțiune al propranololului nu este clar, prin blocarea receptorilor beta-adrenergici, propranololul duce la vasoconstricție (reducerea fluxului sanguin), inducerea apoptozei, și inhibarea genelor țintă HIF angiogenice cum sunt factorul de creștere al endoteliului vascular (*VEGF*), factorul de creștere fibroblastic (*FGF*) sau metaloproteazele (*MMP*).

Așadar, aceste rezultate ne determină să luăm în considerare ipoteza că propranololul ar putea fi un tratament eficient pentru hemangioblastoame prin inhibiția HIF în tumorile puternic vascularizate în care HIF este exprimat constitutiv.

Metode

Cultura de celule

Celulele HeLa 9XHRE au fost transfectate în mod stabil cu un reporter HRE-luc purtând nouă copii în tandem ale elementului de răspuns la hipoxie (HRE) urmate de gena luciferazei, și au fost cultivate în DMEM (Mediul Dulbecco Eagle Modificat, Gibco, Grand Island, NY, SUA) suplimentat cu 10 % ser fetal bovin (FBS; Gibco), 2 mM L-glutamină și 100 U/ml penicilină/streptomycină (Gibco). Pentru a induce condiții hipoxice, celulele HeLa au fost cultivate fie cu soluție 100 μ M de desferioxamină (DFO) (hipoxia chimică) fie incubate într-o cameră hipoxică (Billups-Rothemberg, Inc, Del Mar, CA) în 1 % oxigen, 5 % CO₂ și 94 % N₂, timp de 24 h.

Culturile primare de hemangioblastom SNC au fost obținute conform protocolului nou precedent conceput de Serrano-Heras și colaboratorii științifici de la Spitalul Universitar General din Albacete, Spania (Manuscrisul este în pregătire). Între martie 2013 și martie 2014 o serie de eșantioane clinice de la 4 pacienți (3 bărbați și 1 femeie, cu media de vârstă între 31.5 ± 15.6 ani, și intervalul: 13–45), diagnosticați cu sindromul Von Hippel-Lindau, a fost prelevată de la secția de neurochirurgie de la Spitalul Universitar “Fundación Jiménez Díaz”, Spania. În prealabil au fost obținute formulare de consimțăminte informate de la toți pacienții. Toate procedurile au fost aprobate în prealabil de Comisia de Etică conform directivelor general acceptate privitoare la eșantioanele prelevate de la om. Țesuturile proaspete colectate din excesul de hemangioblastom rezecat au fost introduse în eprubete sterilizate care conțineau soluție salină echilibrată Earle (*Earle's Balanced Salt Solution*, (EBSS, Gibco)) rece de la gheață. Eșantioanele de tumori au fost spălate de mai multe ori cu PBS, și tăiate în bucăți de 1 mm³. Bucățile de țesuturi au fost

transferate cu pense sterile în vase de cultură curate (Sarstedt, Germania) și supuse unei digestii enzimatică cu o cantitate egală de colagenază I și dispază II cu o concentrație finală de 1 mg/ml EBSS, timp de 45 min la 37 °C. După aceasta, bucățile au fost complet dezagregate prin picurare delicată cu pipeta și digerate timp de 15 min cu tripsină la 37 °C. Apoi eșantioane triturate au fost centrifugate, peletele celulare au fost suspendate în mediu de creștere (RPMI 1640 (Gibco) ameliorat cu 20 % ser fetal bovin, 1 % Pen/Strep și 4 mM glutamină), și incubate la 37 °C. Mediul a fost înlocuit la fiecare 72 h până ce culturile au devenit aderente.

În continuare a fost efectuată o citometrie de flux pentru caracterizarea celulelor. Analiza a arătat că culturile erau compuse din celule stromale (30–50 % celule CD99 +), celule endoteliale (15–25 % celule CD34+), și pericite (30–40 % celule NG2+). Experimentele au fost efectuate pe toate tipurile de celule care formau hemangioblastomul. Un total de patru hemangioblastoame de la pacienți diferiți au fost testate în cultură, cu următoarea localizare: HB2, bulbul rahidian; HB3, lobul temporal; HB7, măduva spinării; HB11, lobul temporal.

RT-PCR în timp real

ARN total celular a fost extras din celulele de hemangioblastom folosind un kit Nucleo Spin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Un microgram de ARN total a fost transcris invers într-un volum final de 20 μl cu kitul *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Mannheim, Germania) folosind stimulare aleatorie. A fost folosit sistemul SYBR Green PCR (BioRad, Hercules, CA, SUA) pentru a se efectua PCR în timp real cu un sistem iQ5. Secvențele oligonucleotidelor folosite au corespuns cu genele țintă HIF-1α și -2α, după cum urmează: *VEGF* înainte: 5'-ATCTGAGCAGGGCGACAGC-3' și înapoi 5'-ACTCCCTGTGGTGCAGTCA-3'; *EPO* înainte 5'-TGTTTTTCGCACCTACCATCA-3' și înapoi 5'-AAGTCACAGCTTGCCACCT-3'; și *SOX2* înainte 5'-GGGGGAATGGACCTTGTATAG-3' și înapoi 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'. Pentru controlul intern, nivelurile de mRNA de *18S* au fost măsurate folosind următoarele stimulări: înainte 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' și înapoi 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'. Ampliconii au fost detectați folosind un sistem iQ5 (BioRad). Eșantioanele au fost folosite în triplicat și experimentul a fost repetat de două ori.

Analiza Western Blot

Celulele au fost lizate pe gheață timp de 30 min în tampon TNE (Tris 50 mM NaCl 150 mM-EDTA 1 mM 0.5 % Triton X100) suplimentat cu inhibitori de protează (Complete Roche

Diagnostics) și lactacystin ca inhibitor specific de proteazom pentru a conserva HIF. Lizatul a fost centrifugat la $14.000 \times g$ timp de 5 min. Cantități similare de proteine din alicotele de lizat celular purificat au fost fierte în tampon SDS eșantion și analizate cu 10 % SDS-PAGE în condiții de nereducere. Proteinele din geluri au fost electro-transferate în membranele de nitroceluloză urmate de imunodetecția cu anti-HIF1 α (BD, Bedford, MA, SUA), anti-HIF-2 α (NOVUS, Oxon, UK) și anti- γ -tubulină (Sigma, St.Louis, MO, SUA) anticorpilor în diluția recomandată de producător. Anticorpilor secundari au fost conjugați de peroxidază de hrean de la Dako (Glostrup, Danemarca). Membranele au fost dezvoltate prin chemoluminescență (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, SUA).

Testul luminescent al viabilității celulare

Viabilitatea celulelor de hemangioblastom și HeLa 9X HRE a fost măsurată cu un test CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, SUA). Aceasta este o metodă omogenă de a determina numărul de celule viabile din cultură pe baza cuantificării ATP prezent, care semnalizează prezența celulelor active metabolic. Un total de 10.000 celule au fost plasate pe plăci cu 96 de godeuri și cultivate timp de 24 h și 48 h cu propranolol (50 μ M și 100 μ M) în 100 μ l de mediu. După tratament, plăcile au fost echilibrate la temperatura camerei timp de 30 min înainte de adăugarea a 100 μ l de reactiv Cell Titer-Glo (tampon Lysis, Ultra-Glo Recombinant Luciferase, Luciferine și Mg²⁺). Liza celulelor a fost indusă de un agitator orbital timp de 2 min, și apoi plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 10 min spre a se stabiliza semnalul luminescent. Luminescența a fost măsurată folosind un sistem Glomax Multidetecție (Promega).

Testul Activării Caspazei

Testul Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) este un test luminescent care măsoară activitatea caspazei 3 și caspazei 7 folosind un substrat luminogen de caspază 3/7 care conține secvența de tetrapeptide DEVD într-un reactiv optimizat pentru activitatea caspazei, a luciferazei și liză celulară. Luminescența este proporțională cu nivelul prezent de activitate a caspazei. Un total de 10.000 celule de hemangioblastom au fost plantate pe plăci cu 96 de godeuri și cultivate timp de 24 h și 48 h cu propranolol (50 μ M și 100 μ M) în 100 μ l de mediu. După tratament, plăcile au fost echilibrate la temperatura camerei timp de 30 min înainte de a adăuga 100 μ l de reactiv Caspase Glo 3/7 Reagent (tampon de liză, luciferază recombinată Ultra-Glo Recombinant Luciferase, amino-luciferină DEVD și Mg²⁺). Liza celulară a fost indusă

prin agitare timp de 30 s (300 rpm), și apoi plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 2 h. Luminescența a fost măsurată folosind un sistem Glomax Multidetection System (Promega).

Determinarea VEGF în plasmă

Un kit Quantikine Human VEGF ELISA de la R&D Systems (Abingdon, Marea Britanie) a fost folosit pentru a determina cantitativ concentrația de VEGF-A umană în supernatanți de celule de cultură de hemangioblastom tratate cu propranolol în diferite doze.

Statistică

Datele reprezintă media \pm SD. Diferențele valorilor medii au fost analizate folosind *testul t* al lui Student. Valorile *P* de <0.05 au fost considerate a fi statistic semnificative; valorile statistic semnificative sunt marcate cu asteriscuri (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$).

Rezultate

Propranololul reduce transcrierea funcție de HIF la celulele 9XHRE HeLa

Celulele HeLa transfectate stabil cu reporterul HRE-luc au fost folosite spre a măsura transcrierea dependentă de HIF (Fig. [1a](#)). Activarea hipoxiei a fost măsurată cantitativ printr-un test de luminometrie în condiții hipoxice. Când celulele HeLa au fost supuse hipoxiei chimice (100 μ M DFO), a fost detectată o creștere marcată a unităților de luciferază, față de condițiile normoxice, de până la 3,5 ori. Totuși, tratamentul celulelor în condiții hipoxice cu 50 și 100 μ M propranolol a contracarat stimularea hipoxică a celulelor HeLa 9XHRE, așa cum se vede din descreșterea activității luciferazei (Fig. [1b](#)). Rezultatele au fost statistic semnificative în toate cazurile, cu excepția acelor obținute în condiții de normoxie și tratament cu 50 μ M propranolol ($P < 0.005$). Cultura de celule în camera hipoxică (1% O₂) cu sau fără propranolol a prezentat în esență aceleași rezultate ca și la DFO (datele nu sunt prezentate).

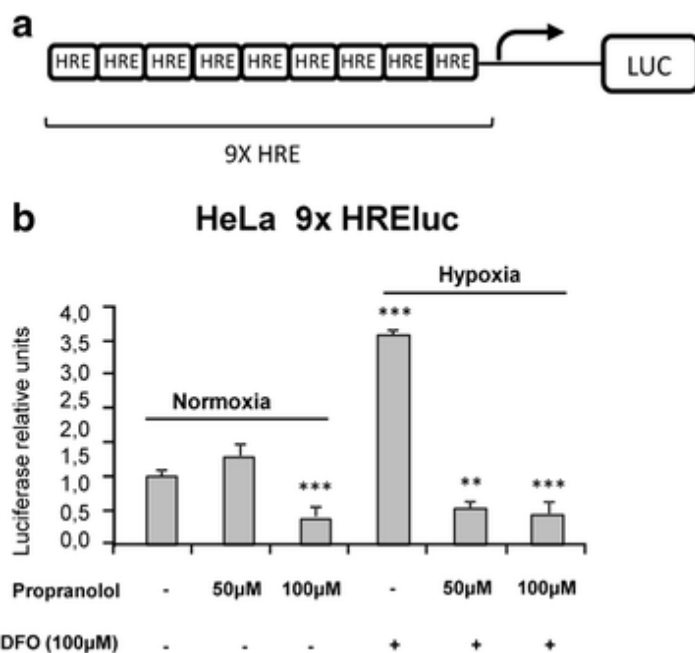


Fig. 1

Propranololul reduce transcrierea dependentă de HIF la celulele HeLa.

a Structura schematică a reporterului 9XHRE-luc.

b Transcrierea dependentă de HIF în linia de celule a reporterului HeLa. Testele cu luciferază au fost executate pe celule HeLa transfectate stabil pe HRE-luc în condiții hipoxice și tratament cu propranolol. Propranololul (50–100 µM) a împiedicat stimularea hipoxică a celulelor HeLa, așa cum se vede prin descreșterea activității luciferazei, prin inhibarea activării elementelor hipoxice (HRE) de către HIF. *** $P < 0.005$

Propranolol reduce exprimarea genelor țintă HIF la celulele de hemangioblastom

Apoi am explorat efectele tratamentului cu propranolol față de celulele hemangioblastomului față de țintele HIF. Astfel, exprimarea genelor reglate din punct de vedere al transcrierii de către HIF-1 α , cum sunt *VEGF* și *EPO* (eritropoietină), și HIF-2 α , cum este *SOX2* (HMG BOX legată de SRY) a fost studiată de RT-PCR cantitativă. După cum se arată în Fig. 2a, nivelurile de transcriere ale tuturor acestor gene au fost semnificativ reduse cu 40–60 % dintr-o doză de 50 µM. Nivelurile de *EPO* și *SOX2* au fost reduse într-un mod dependent de doză; la 100 µM propranolol, nivelul diferitelor mRNA a fost de 40% față de martori. Aceste rezultate au fost observate pe toate cele patru eșantioane de hemangioblastom. Rezultatele sunt în concordanță cu un nivel mai redus de transcriere a genelor țintă HIF. Remarcabil, *VEGF* și *EPO* sunt ținte HIF-

1 α implicate în angieneză și alimentarea cu oxigen a celulelor, iar *SOX2* este o țintă de transcriere a HIF-2 α și este o țintă a caracterului de sușă implicată în natura nediferențiată a componentei mezenchimale, predominantă în hemangioblastoame [17-19].

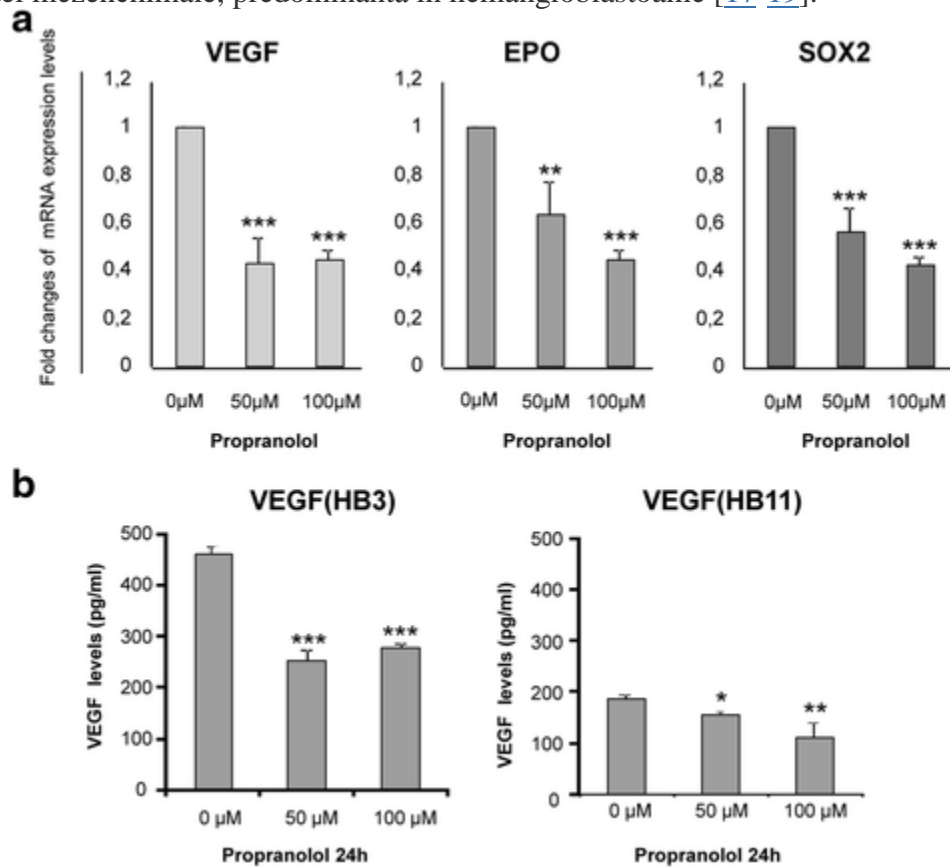


Fig. 2

Propranolol reduce expresia genelor HIF în celulele de hemangioblastom.

a Nivelurile de transcriere ale genelor țintă HIF, *VEGF*, *EPO* și *SOX2*, au fost comparate cu matorul endogen al ARN 18S ribozomic RNA. Tratatamentul cu propranolol a dus la reducerea dependentă de doză a exprimării mRNA ca o consecință a exprimării reduse a țintelor HIF. Diferențele au fost statistic semnificative conform *testului t* al lui Student. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

b Nivelurile solubile ale VEGF au fost măsurate prin testul ELISA în supernatanții culturilor de hemangioblastom tratate cu propranolol. Nivelurile solubile ale VEGF au fost reduse în celulele tratate cu propranolol comparativ cu cele netratate

VEGF, una dintre principalele ținte ale HIF-1 α , și un puternic mediator atât al angiogenezei cât și a vasculogenezei, a fost măsurat de asemenea în supernatanții a două eșantioane de

hemangioblastom diferite cultivate cu și fără propranolol. Așa cum se observă în Fig. [2b](#), nivelele de *VEGF* au fost reduse de tratamentul cu propranolol 50 μ M, în conformitate cu rezultatele mRNA (Fig. [2a](#)).

Propranolol afectează viabilitatea celulelor tumorale și induce moartea celulelor prin apoptoză

Albiñana et al. (2012) au raportat că propranololul induce apoptoza și reduce viabilitatea celulelor endoteliale și EOMA umane (celule endoteliale de hemangioendoteliom murin) [[16](#), [20](#)]. Viabilitatea celulelor HeLa după tratamentul cu DFO (hipoxie chimică), cu și fără propranolol, a fost cantitativ măsurată folosind testul de viabilitate a celulelor luminescente CellTiter-Glo. Așa cum se arată în Fig. [3a](#), tratamentul cu propranolol a afectat viabilitatea celulelor HeLa. Pe de altă parte, când apoptoza a fost măsurată cantitativ cu testul luminiscent Caspase-Glo 3/7, s-a constatat că propranololul reduce viabilitatea celulelor HeLa printr-o creștere a apoptozei provocată de activarea caspazei 3/7. După 48 h de tratament cu propranolol, celulele au încetat să se mai înmulțească, și creșterea activității caspazei a favorizat moartea celulelor (Fig. [3b](#)).

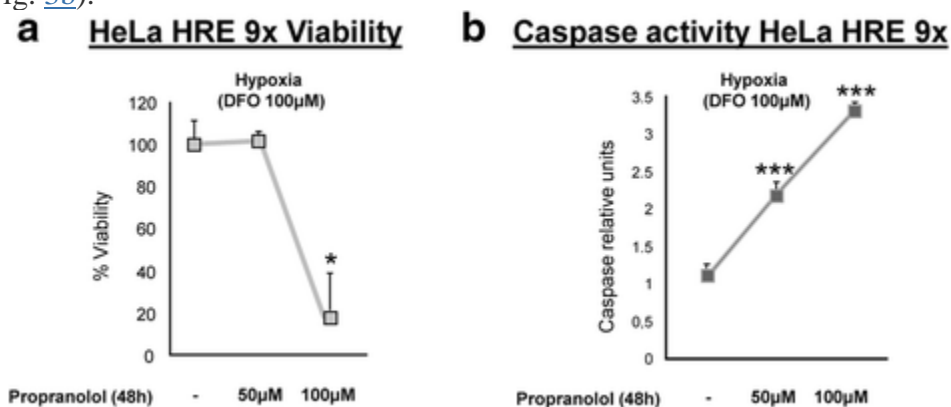


Fig. 3

Propranololul afectează viabilitatea și activarea caspazei în celulele HeLa. Celulele HeLa 9XHRE au fost cultivate în absența sau prezența propranololului (50 μ M sau 100 μ M). Viabilitatea a fost măsurată folosind un tester CellTiter-Glo (**a**), și apoptoza a fost măsurată folosind un tester Caspase-Glo 3/7 (**b**). Histogramele arată o creștere a activării caspazei 3/7 și o reducere a viabilității celulelor.

Apoi am folosit aceleași testere spre a verifica supraviețuirea și apoptoza celulelor de hemangioblastom după tratamentul cu propranolol timp de 24 și 48 h. Figura [4](#) arată viabilitatea, activarea caspazei 3/7, și raportul de activare/viabilitate al caspazei în cele patru culturi de

hemangioblastom de la patru pacienți diferiți suferinzi de VHL; viabilitatea a scăzut cu propranolol într-un mod dependent de concentrație și timp în aproape toate cazurile. Aici, fiecare hemangioblastom reprezintă o cultură diferită de la un pacient diferit și o tumoră diferită, așadar există o amplă variabilitate, dar arătăm în toate cazurile că reacția este similară calitativ. Cele mai reduse viabilități au fost descoperite după tratamentul cu 100 μ M propranolol timp de 48 h. Această scădere a viabilității poate fi explicată printr-o creștere a apoptozei datorată activării caspazei 3/7, în special la 100 μ M și după 48 h de tratament.

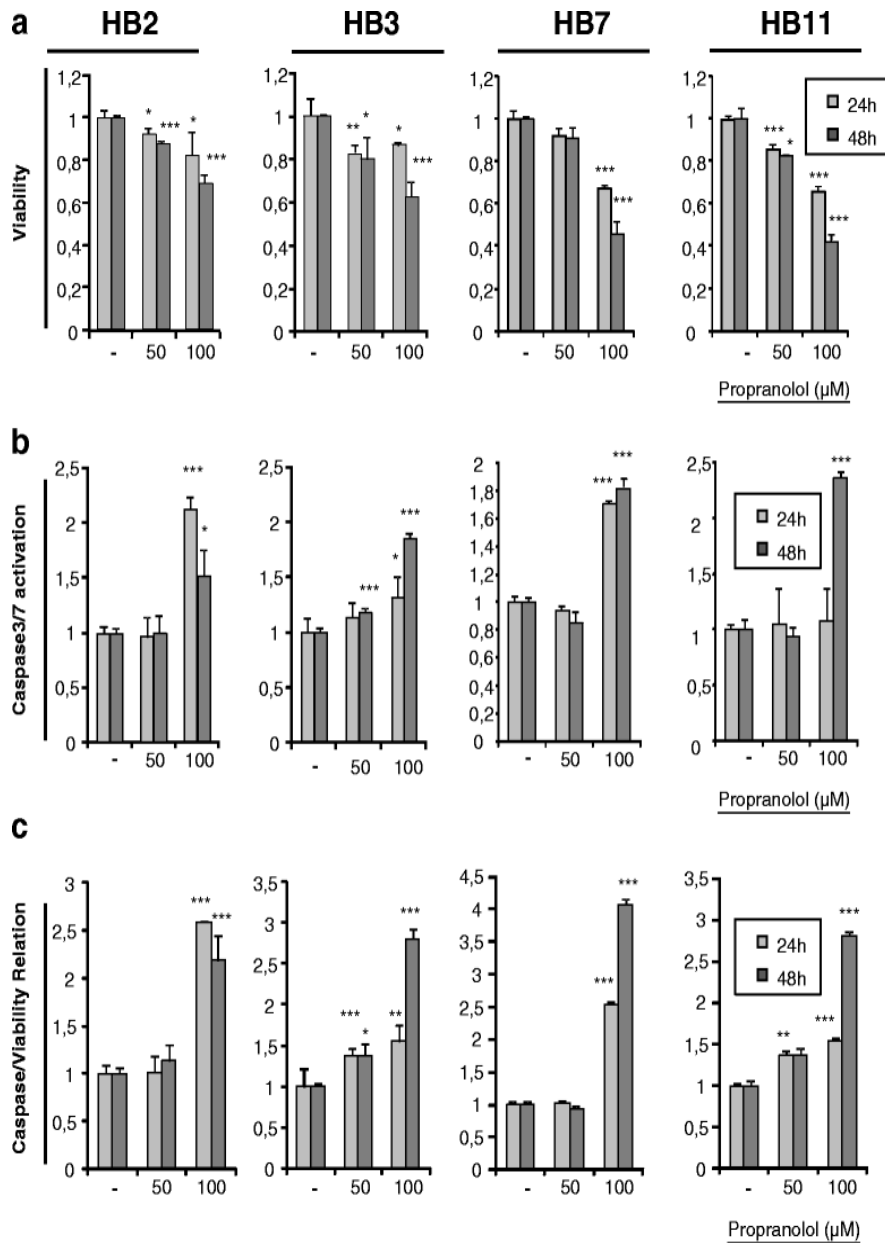


Fig. 4

Propranololul afectează viabilitatea și activarea caspazei la celulele hemangioblastomului. Diferite linii de celule de hemangioblastom au fost cultivate în absența sau prezența propranololului (50 μ M sau 100 μ M) spre a se măsura viabilitatea și apoptoza. Histogramele arată o reducere a viabilității (a), cu o creștere în paralel a activării caspazei 3/7 (b). În final, legat de viabilitatea redusă a celulelor, este prezentat raportul apoptozei vs. viabilitate (c). Propranololul a promovat o reducere a viabilității prin creșterea apoptozei la aceste celule tumorale.

Date fiind rezultatele reducerii viabilității și inducerii apoptozei după tratamentul cu propranolol, am decis să supunem celulele de hemangioblastom unui tratament cu propranolol de lungă durată, începând cu 50.000 celule per godeu, înregistrând imagini printr-o monitorizare în timp. După cum se arată în Fig. 5, celulele hemangioblastomului au părut să se oprească din proliferare, și apoi a fost detectată o creștere a morții celulelor deoarece apăreau locuri goale pe plăci. Așa cum am explicat prin rezultatele precedente (Fig. 4), moartea trebuie atribuită apoptozei. După 5 zile (96 h) de tratament continuu cu propranolol, au mai rămas puține celule în culturile tratate cu 100 μ M propranolol, mai puțin de 5.000 celule cu morfologie firavă, comparativ cu 300.000 celulele sănătoase din culturile netratate. Celelalte celule tratate cu propranolol, pe de altă parte, prezentau un aspect atipic și apoptotic.

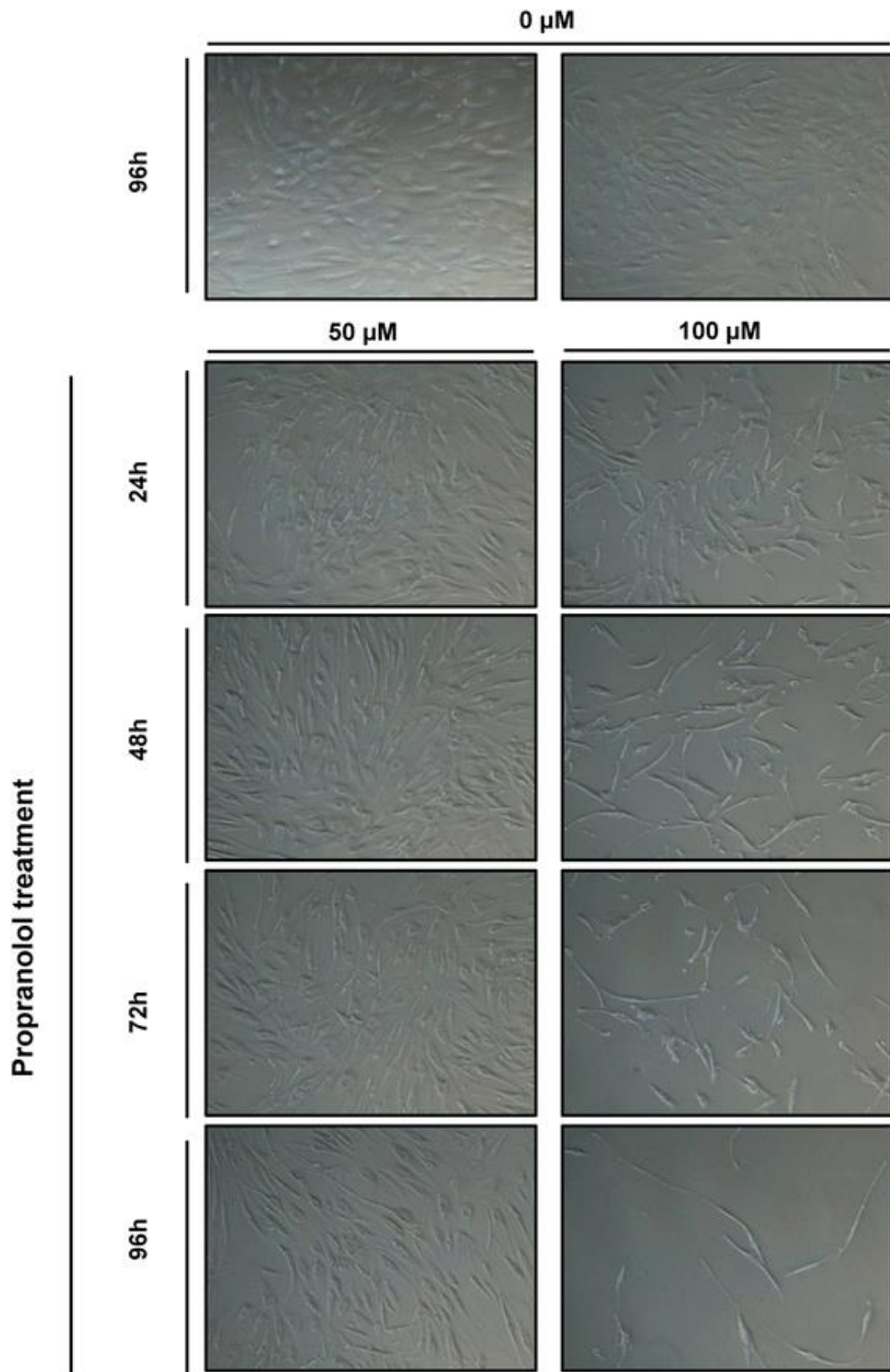


Fig. 5

Tratamentul cu propranolol pe termen lung inhibă proliferarea și promovează moartea celulelor de hemangioblastom. Derularea în timp a tratamentului cu propranolol. Celulele de hemangioblastom au fost tratate cu diferite doze (50 μ M și 100 μ M) de propranolol, pe durate variabile de timp (între 24 h și 96 h). Au fost observate schimbări semnificative ale morfologiei la celulele tratate la 100 μ M, însă celulele tratate la 50 μ M prezentau aceeași morfologie cu celulele martor dar cu nucleole caracteristice. După 96 h de tratament cu 100 μ M, majoritatea celulelor dispăruseră de pe placă din cauza morții celulelor prin apoptoză (Mărire 40 X)

Per total, putem conchide că propranololul reduce viabilitatea celulelor tumorale (celulele de hemangioblastom derivate din HeLa și VHL) prin oprirea proliferării și inducând moartea celulelor prin apoptoză. Acest rezultat ar fi compatibil cu regresa observată la IH, și ar sugera că propranololul ar putea întârzia proliferarea hemangioblastoamelor la pacienții cu modificări ale VHL.

Hemangioblastoamele au o compoziție celulară eterogenă constând din pericite, celule stromale și endoteliale. Propranololul afectează toate tipurile de celule. Ca rezultat complementar, Fig. 6 susține și pierderea activității migratorii și angiogenice a celulelor de hemangioblastom după tratamentul cu propranolol. De fapt, tratamentul cu propranolol împiedică tubulogeneza prezentată de celulele de hemangioblastom în Matrigel. Celulele endoteliale/pericite de la nivelul hemangioblastomului prezintă un aranjament de rețea tipic în condiții de cultură specială cum ar Matrigel. Așadar, celulele de hemangioblastom fără tratament cu propranolol tind să formeze “structuri celulare tubulare”, în timp ce propranololul blochează această manifestare a angiogenezei *in vitro*.

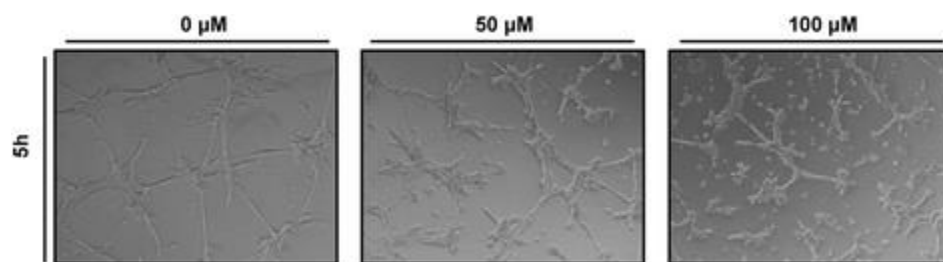


Fig. 6

Propranololul inhibă angiogeneza. Tratamentul cu propranolol inhibă tubulogeneza celulelor de hemangioblastom parțial (50 μ M) sau complet (100 μ M). (Mărire, 40X)

Discuție

Sindromul Von Hippel-Lindau (VHL) este o boală autosomală dominantă care generează multe tumori puternic vascularizate în diferite zone ale corpului. VHL este o boală dependentă de vârstă și foarte penetrantă, și manifestările cele mai frecvente includ hemangioblastoamele retinei și ale SNC, carcinoame renale cu celule clare, feocromocitoame și tumorile sacului endolimfatic ale urechii mijlocii [21, 22]. Mecanismul pentru patogeneza sindromului VHL este explicat de ”ipoteza celor două lovituri” [23]. O alelă a *VHL* este de obicei o copie mutantă moștenită însă a doua lovitură este dobândită prin mutație somatică sau hipermetilare. Microdisecția țesuturilor a arătat că ștergerea genei *VHL* la celulele stromale ale hemangioblastoamelor [24], indică faptul că celulele stromale sunt adevăratele celule tumorale derivate din hemangioblastele oprite embriologic care se pot dezvolta în progenituri hematopoietice și endoteliale în condiții adecvate [2]. VHL este o boală sistemică complexă cu implicații serioase în întregul organism. Actualmente nu există nici o metodă de vindecare, nici opțiuni terapeutice de succes, cu excepția chirurgiei prin care se îndepărtează tumorile VHL. Așadar este nevoie de medicamente care să țintească dezvoltarea tumorii spre a întârzia sau elimina nevoia de operație chirurgicală. Tumorile VHL exprimă HIF1 α și HIF2 α în mod constitutiv [17, 18] deoarece sunt lipsite de pVHL funcțională. HIF este un factor de transcriere care poate activa sute de gene țintă implicate în angiogeneză, formarea, supraviețuirea, invazia și metabolismul tumorilor [25–27]. Dat fiind că tumorile pacienților suferind de VHL sunt lipsite de pVHL funcțional, HIF este exprimat constitutiv în condiții normoxice, așa cum se coroborează prin nivelurile ridicate de HIF detectate în aceste tumori prin Western blotting (Fig. 7). Acest lucru se află în contrast cu celulele HeLa în condiții normoxice acolo unde nu există proteina HIF, dacă nu sunt supuse condițiilor hipoxice, așa cum am raportat mai sus [28]. Așadar, un medicament care ar ținti HIF, și deci genele pe care le reglează acesta, ar fi strategia ideală de a întârzia înaintarea tumorii VHL.

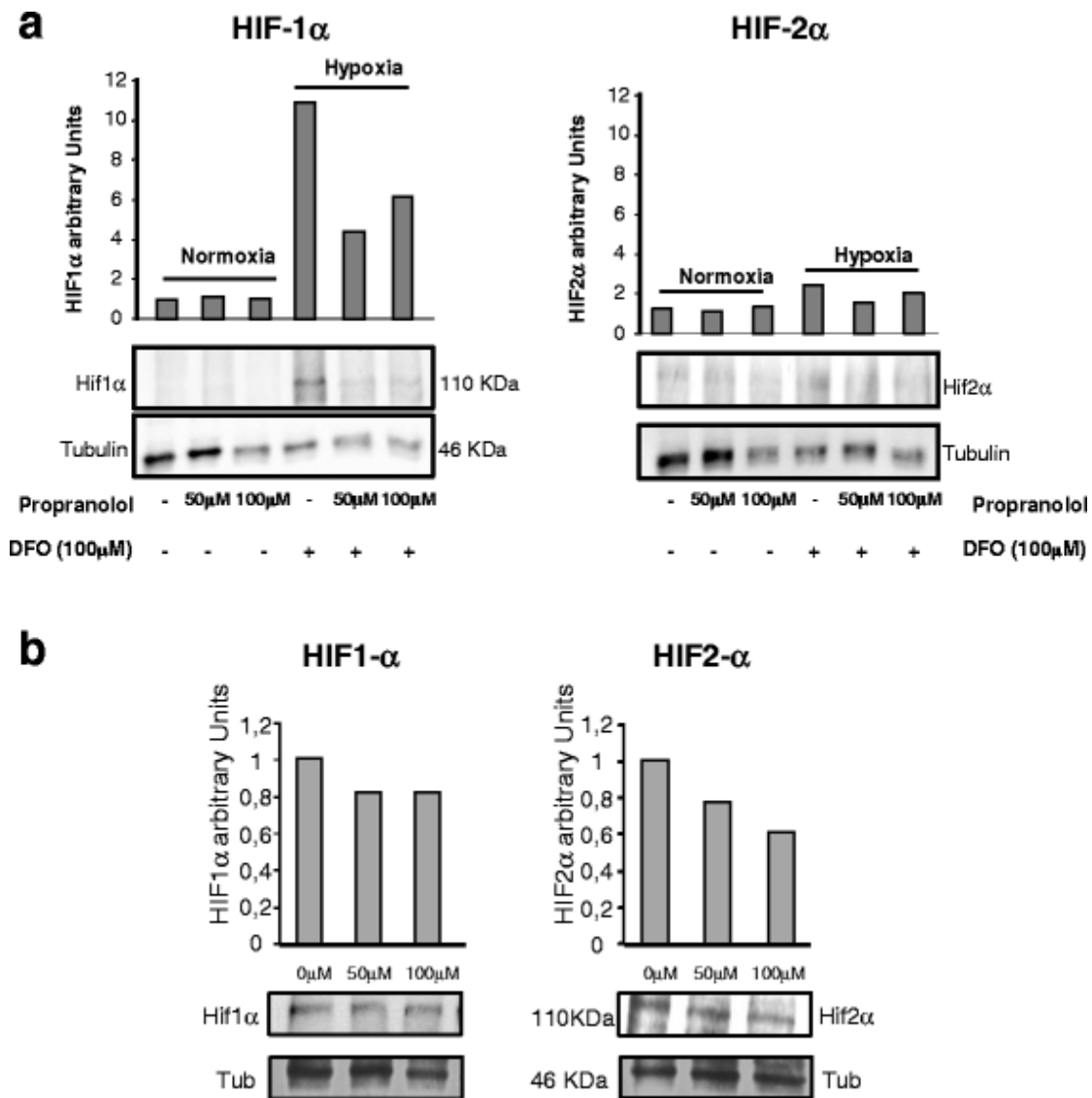


Fig. 7

Exprimarea proteinelor HIF-1 α și HIF-2 α este redusă ca urmare a tratamentului cu propranolol. **a** Testele Western Blot au fost efectuate pe lizatul celulelor 9XHRE HeLa. Ca și la testele cu luciferază, nu au existat diferențe ale nivelurilor de proteină HIF-1 α și HIF-2 α între diferitele tratamente cu propranolol în condiții de normoxie. După tratamentul DFO (simularea hipoxiei), au crescut nivelurile ambelor proteine. Când s-a adăugat propranolol la celule, nivelurile de HIF-1 α și HIF-2 α au scăzut. **b** Analiza Western blot a fost efectuată pe lizatul celulelor de hemangioblastom tratate cu 50 și 100 μ M propranolol timp de 24 h; nivelele de HIF-1 α și HIF-2 α s-au redus. γ -Tubulina a fost folosită ca martor de încărcare.

S-a sugerat că propranololul poate acționa pe diferite căi, inclusiv vasoconstricția, ca anti-angiogenic inhibând producția de VEGF, și ca medicament pro-apoptotic ducând la apoptoza

celulelor [11, 20, 29, 30]. Totuși, beneficiile sale terapeutice potențiale în diferitele anomalii vasculare încă nu au fost explorate.

În baza rezultatelor precedente ale eficienței propranololului în tratamentul IH [12–15], și a propriilor noastre rezultate care arată că propranololul acționează ca anti-angiogenic în celulele endoteliale reducând nivelele de transcriere a factorilor pro-angiogenici cum sunt endoglină și ALK1 [16], am emis ipoteza că propranololul ar putea acționa reducând nivelele de HIF și ca urmare reducând programul țintă al HIF. Ca efect colateral putativ al tratamentului cu propranolol, recent au apărut preocupări legate de efectele propranololului asupra dezvoltării neurologice sau cognitive pe termen lung după un studiu realizat de Langley și Pope [31]. Acești autori susțin că propranololul poate trece de bariera hematoencefalică și cauza tulburări de somn și memorie, după cum s-a demonstrat prin funcțiile specifice scăzute ale memoriei la adulți. Această lucrare a fost comentată de Tozzi [32] într-o Scrisoare către Editor, și Léauté-Labrèze et al. au răspuns [33] în aceeași ediție a jurnalului. Răspunsul se bazează, înainte de toate, pe absența efectelor adverse la copiii tratați cu propranolol. De fapt, rata afectării în dezvoltarea neurologică sau întârzierile observate la 272 copii tratați cu propranolol între 2008 și 2013 pare să se situeze în intervalul observat la populația normală. Pe de altă parte, articolul lui Langley și Pope este mai ales teoretic și nu bazat pe dovezi, și include date din studii la scară mică realizate pe adulți sănătoși.

E destul de interesant că toate genele țintă ale HIF, inclusiv, printre altele, *VEGF*, *MMPs*, *EPO* sau *FGF*, sunt absolut necesare pentru supraviețuirea și progresia tumorilor în general, și pentru hemangioblastoame în special. Hemangioblastoamele sunt tumori complexe care constau din diferite tipuri de celule, principalele componente fiind celulele stromale (celule mezenchimale nediferențiate) și endoteliale. Așa stând lucrurile, propranololul ar putea opri creșterea dependent vasculară a hemangioblastoamelor [2, 34].

În prezentul studiu, am arătat că propranololul reduce țintele HIF-1. De fapt, propranololul a inhibat transcrierea dependentă de HIF la o linie de celule reporter 9xHRE HeLa (Fig. 1) și la genele țintă cruciale pentru supraviețuirea hemangioblastoamelor, cum ar fi *VEGF*, *EPO* și *SOX2* (Fig. 2). *EPO* a fost raportată ca fiind activă la tumorele din hemangioblastom ale pacienților suferind de VHL [35–37], și conform Fig. 2a exprimarea sa a fost redusă cu aproape jumătate în prezența propranololului. Pe de altă parte, s-a demonstrat că *VEGF* este redusă la nivel de transcriere (Fig. 2a), dar și ca proteină secretată în supernatanții din culturi ai diferitelor

hemangioblastoame cultivate *in vitro* (Fig. 2b). Mai mult, în Fig. 6 este arătată angiogeneza afectată negativ a hemangioblastoamelor în Matrigel unde rețeaua tubulară a celulelor netratate a rămas cu celulele neînchise în fața unei doze intermediare de propranolol, și formarea sa a fost împiedicată de doza cea mai ridicată de propranolol. Acestea sunt în concordanță cu rezultatele obținute de Albiñana et al. (2012) unde propranololul a împiedicat formarea tuburilor la tratarea EOMA și a celulelor endoteliale umane cu doza maximă.

Țesutul de hemangioblastom este compus din celule stromale neoplazice și numeroase celule vasculare reactive [19, 24, 38]. Celulele tumorale VHL deficiente au capacitate de diferențiere hemangioblastică [39, 40]. Celulele stromale sunt celule nediferențiate de natură mezenchimală, unde markerul de caracter de sușă master SOX-2 este exprimat ca țintă a HIF-2 α . Astfel, am explorat exprimarea SOX-2 în hemangioblastom înainte și după tratamentul cu propranolol, și nivelurile SOX-2 au fost și ele semnificativ reduse de propranolol (Fig. 2).

Am constatat că propranololul a redus transcrierea dependentă de HIF în celulele 9XHRE HeLa în condiții de hipoxie și în celulele de hemangioblastom cu exprimare constitutivă a HIF, după cum se arată în Fig. 7a, cantitățile de proteină HIF1 α și HIF2 α în condiții de hipoxie în celulele HeLa au fost reduse de tratamentul cu propranolol. Acest fapt a fost de asemenea testat la celulele de hemangioblastom care erau funcțional hipoxice, așa cum se arată în exprimarea HIF1 α și HIF2 α în condiții normale de cultură. Western blotting a demonstrat că atât HIF-1 α cât și 2 α au fost reduse de tratamentul cu propranolol la nivel proteic (Fig. B).

Ulterior am investigat dacă propranololul putea interfera cu proliferarea și supraviețuirea celulelor de hemangioblastom. Deoarece HIF declanșează programul genei hipoxiei spre a menține supraviețuirea celulei, rezultatele precedente au sugerat că propranololul a afectat și viabilitatea celulelor. De fapt, Fig. 3 demonstrează că propranololul a redus viabilitatea celulelor HeLa în condiții hipoxice. Cauza morții a fost constatată a fi apoptoza, conform măsurătorilor activității caspazei 3/7, care la doza cea mai ridicată de propranolol crescuse de trei ori față de celulele netratate. Interesant este că acest lucru este valabil și când viabilitatea și apoptoza celulelor de hemangioblastom de la diferiți pacienți suferinzi de VHL au fost evaluate după tratamentul cu propranolol. Figura 4 arată că viabilitatea celulei de hemangioblastom poate scădea cu până la 50 % după 48 h, și că apoptoza crește de între 2.5- și 5 ori după 48 h de tratament cu 100 μ M propranolol.

Date fiind aceste rezultate, ipoteza noastră a fost că, dacă tratamentul cu propranolol este menținut în timp, celulele ar dispărea așa cum se arată în Fig. 5 la celulele de hemangioblastom. În mod remarcabil, după 96 h de tratament cu 100 μ M propranolol, foarte puține celule au mai rămas atașate de godeuri, iar cele care mai erau vii aveau o formă extrem de subțire și elongată, cu aspectul unor celule apoptotice.

Per total, rezultatele sugerează că mai întâi propranololul reduce nivelele de HIF din celulele de hemangioblastom, și astfel țintele HIF sunt parțial reduse la tăcere/micșorate numeric. Ca urmare, în absența factorilor esențiali pentru supraviețuire, celulele tumorale încetează să se mai dividă și mor prin apoptoză. În Fig. 8 este prezentată o schemă care arată mecanismul ipotetic de acțiune al propranololului investigat în prezentul studiu.

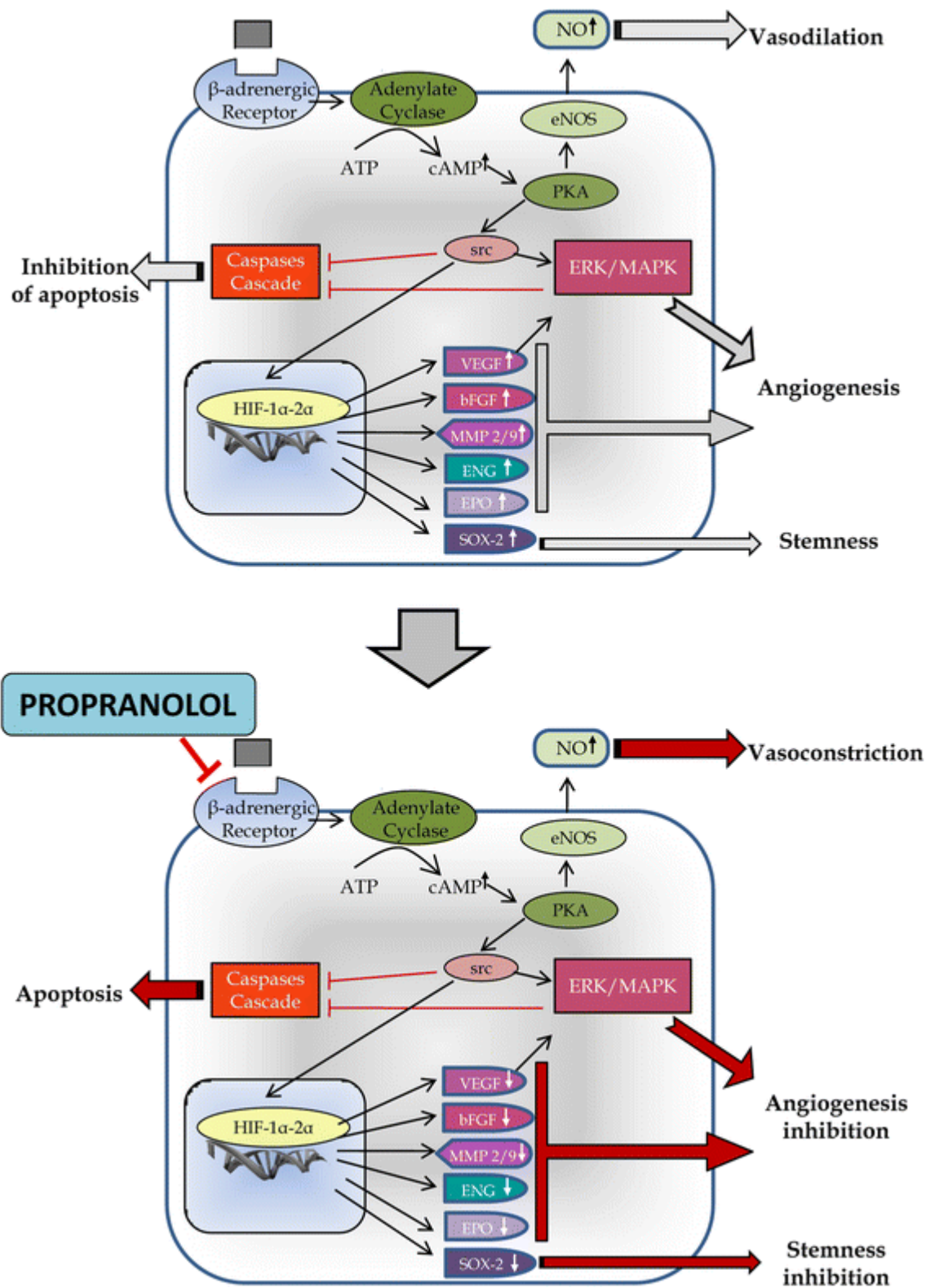


Fig. 8
Modelul ipotetic al mecanismului de acțiune al propranololului

Concluzii

În concluzie, rezultatele noastre ne sugerează că propranololul reduce creșterea tumorilor dependente de HIF, și ar putea fi un medicament promițător terapeutic în întârzierea intervenției chirurgicale la pacienții suferind de VHL.

Note

José María de Campos a decedat.

Abrevieri

ALK1:

Receptor de activină cum este kinaza 1

SNC:

Sistemul Nervos Central

DFO:

Deferoxamină

DMEM:

Mediul Dulbecco Eagle modificat

EOMA:

Celule endoteliale de hemangioendoteliom de șoarece

EPO:

Eritropoietină

FBS:

Ser Fetal de bovine

FGF:

factor de creștere a Fibroblastelor

HIF:

Factor Inductibil prin Hipoxie

HRE:

Element de Răspuns la Hipoxie

IH:

Hemangiom Infantil

MMP:

Metaloproteinaza Matricială

pVHL:

Proteina Von Hippel Lindau

RPMI:

Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR:

Reacția de polimerizare în lanț a transcriptazei inverse

SDS-PAGE:

Electroforeza în gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu

SOX-2 or SRY-box 2:

Regiunea determinantă a sexului de pe cromozomul X sau Y

VEGF:

Factor de Creștere Endotelială Vasculară

VHL:

Von Hippel-Lindau

Declarații

Mulțumiri

Această lucrare a fost sprijinită de finanțări de la Ministerul Economiei și Competitivității SAF2011-23475 și de Alianza VHL Spain & Fundația Iberdrola de pe lângă LMB. Virginia Albiñana a fost susținută de Alianza VHL Spania, Fundația Iberdrola și de Fundația Divina Pastora. Le suntem recunoscători pacienților care au participat la cercetarea noastră și mulțumim medicilor Pablo de Andrés și Delia Viñas (Fundația Jiménez Díaz, Madrid, Spania) care au participat la colectarea probelor și a datelor de la pacienți și Dr Blanca Carrión în calitate de colaborator științific la obținerea culturilor primare de hemangioblastom pe SNC.

Acces Liber

Acest articol este distribuit în baza condițiilor Licenței Creative Commons Attribution 4.0 International (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), care permite utilizarea fără restricții, distribuția și reproducerea pe orice mediu, cu condiția de a se menționa în mod adecvat autorii originali și sursa, de a se include un link către licența Creative Commons, și de a se menționa efectuarea unor modificări. Renunțarea la Transferul în Domeniul Public a Creative Commons (*Public Domain Dedication waiver*) (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) se aplică datelor publicate în acest articol, dacă nu se prevede altfel.

Interese contradictorii

Autorii declară că nu au interese contradictorii.

Contribuțiile Autorilor

VA a efectuat majoritatea lucrărilor experimentale și redactarea manuscrisului. KVGH a asigurat consiliere, co-dirijarea principalelor strategii și a finanțării. TS și ABPM au gestionat cultura experimentală de hemangioblastoame VHL. GSH a proiectat și efectuat cultivarea și caracterizarea culturilor de țesuturi primare de hemangioblastom. JMC a efectuat operațiile chirurgicale (neurochirurg pentru pacienții cu VHL). LMB a dirijat și coordonat experimentele *in vitro* și conceperea și strategiile de abordare experimentală, a asigurat finanțarea pentru proiect și redactarea manuscrisului. Toți autorii au citit și aprobat manuscrisul final.