

EFFECTO APOPTOTICO IN VIVO DEL INTERFERON ALFA-2B (IFN) SOBRE HIGADOS PRENEOPLASICOS DE RATA

ALVAREZ, MARIA DE LUJAN*; CERLIANI, JUAN PABLO*; MONTI, JUAN A.*; CARNOVALE, CRISTINA E.*; RONCO, TERESA*; PELLEGRINO, JOSE M.*; PISANI, GERARDO**; LUGANO, CRISTINA**;
CARRILLO, MARIA C.*.#

*Instituto de Fisiología Experimental (CONICET), **Area Morfología; Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 570, 2000-Rosario, Argentina

Resumen Para conocer si el IFN α previene la oncogenesis *in vivo*, en estadios tempranos del desarrollo tumoral, evaluamos la acción del IFN α -2b sobre focos preneoplásicos en hígado de rata. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: sujetos a un modelo de iniciación-promoción (G1), tratados con IFN α -2b durante: a) iniciación-promoción (G2), b) iniciación (G3), c) promoción (G4); sujetos solo al estadio de iniciación (G5) y tratados con IFN α -2b en este período (G6). El área y el número de los focos preneoplásicos rGST P-positivos se mostraron significativamente disminuidos y el Índice Apoptótico aumentado en los G2, 3 y 6. Los niveles de Bcl-2 y Bcl-x_L están disminuidos en los grupos tratados con IFN α -2b y los de Bax mitocondrial aumentados en los G2, 3 y 6. En conclusión, los hepatocitos preneoplásicos de ratas que recibieron IFN α -2b sufren muerte celular programada como resultado de un aumento sustancial de Bax y de su translocación a la mitocondria.

Palabras clave: interferón, apoptosis, focos preneoplásicos, proteína Bax

Abstract *In vivo apoptotic effect of Interferon alfa-2b (IFN) on rat preneoplastic liver.* In order to know whether IFN α prevents *in vivo* oncogenesis in the very-early-stage cancer cells, we evaluated the action of IFN α -2b on preneoplastic foci in rats. Animals were divided into six groups: subjected to an initiation-promotion model of cancer development (G1), treated with IFN α -2b during: a) initiation-promotion (G2), b) initiation (G3), promotion (G4); subjected only to an initiation stage (G5) and treated with IFN α -2b during this period (G6). The number and area of rGST P-positive foci were reduced and the Apoptotic Index was increased in G2, 3 and 6. Bcl-2 and Bcl-x_L protein levels were decreased in IFN α -2b-treated rats. Increased levels of mitochondrial Bax protein were observed in G2, 3 and 6. In conclusion, preneoplastic hepatocytes in the IFN α -2b-treated rats undergo programmed cell death as a result of a significant increase of Bax and its translocation to the mitochondria.

Key words: interferon, programmed cell death, altered hepatic foci, Bcl-2 family proteins

La utilización del IFN α en el tratamiento de pacientes con hepatitis B o C ha generado considerables expectativas sobre su posible efecto preventivo en la aparición de hepatocarcinoma (HCC). Algunos estudios han confirmado una menor incidencia de HCC en pacientes con hepatitis B o C crónicas tratados con IFN α ^{1,2}. Por otra parte, el beneficio derivado de tratar con IFN α a pacientes con HCCs ya establecidos sigue siendo controversial^{3,4}. La importancia de comprender la acción del IFN α sobre células de HCCs reside en que algunos pacientes con enfermedades hepáticas por virus B o C tratados con IFN α poseen focos preneoplásicos (FP) pequeños, clínicamente indetectables. Estudios experi-

mentales demostraron que el IFN α ejerce sus acciones antiproliferativas sobre líneas celulares de HCC *in vitro*, inhibiendo la progresión del ciclo celular e induciendo apoptosis^{5,6}. No obstante, la sensibilidad al IFN α de los FP no puede estimarse a través de la sensibilidad de líneas celulares que poseen un gran número de anomalías genéticas y alta capacidad proliferativa, donde el IFN tendría actividad mínima⁷. Sin embargo, aún no se conoce si el IFN α previene la oncogénesis *in vivo*, expresando sus efectos en los estadios muy tempranos del desarrollo de cáncer, cuando hay FP clínicamente indetectables.

En el presente estudio evaluamos la acción del IFN α -2b, *in vivo*, sobre FP en un modelo de iniciación-promoción de desarrollo de cáncer en hígado de rata. Estudiamos el efecto del IFN α -2b sobre el área y el número de los FP y además evaluamos los niveles de proteínas

involucradas en el proceso de muerte celular programada: Bax, Bcl-2 y Bcl-x_L.

Animales y tratamientos

Ratas Wistar macho adultas se dividieron en 6 grupos (n= 6-7 c/grupo). Los animales del Grupo 1 (G1) fueron sometidos a un modelo de iniciación-promoción para el desarrollo de FP hepáticos. Se utilizó dietilnitrosamina (DEN) como agente iniciador, administrándolo i. p. en 2 dosis de 150 mg/kg PC, separadas entre sí por dos semanas. Una semana después de la última inyección de DEN se comenzó el estadio de promoción utilizando 2-acetilaminofluoreno (2AAF, dosis: 20 mg/kg PC), administrado por sonda gástrica 4 días consecutivos por semana, durante 3 semanas. Los grupos 2, 3 y 4 fueron sometidos al mismo protocolo de iniciación-promoción, recibiendo además 3 veces por semana IFN α -2b 6.5 10⁵ U/kg PC, dosis comparable a las usadas con propósitos terapéuticos⁸. El Grupo 2 (G2) recibió IFN α -2b durante todo el tratamiento, el Grupo 3 (G3) solo durante el estadio de iniciación (primeras 3 semanas) y el Grupo 4 (G4) solo durante el estadio de promoción (últimas 3 semanas). Al final de las seis semanas se sacrificaron todos los animales. Los Grupos 5 y 6 solo fueron sometidos al estadio de iniciación. El Grupo 6 (G6) además recibió IFN α -2b i. p. 3 veces por semana. Los animales de estos dos grupos fueron sacrificados al final de la tercer semana.

Observaciones inmunohistoquímicas

Tejidos de distintos lóbulos hepáticos fueron procesados acorde a las técnicas inmunohistoquímicas. Se realizó la tinción para la forma placentaria de la Glutathion S-Transferasa (rGST P), por el método peroxidasa-antiperoxidasa⁹. Esta isoenzima es el marcador más efectivo de preneoplasia hepática en rata, en consecuencia, la detección inmunohistoquímica de rGST P es la técnica más ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de los FP en hígado de rata¹⁰. Los cortes se analizaron a través de un microscopio AxioLab de

Zeiss que posee adosada una CCD video cámara color (Sony ssc-c370). Un número suficientemente representativo de campos de las secciones (usualmente se evaluaron 1 a 1,5 cm² de tejido por animal) de todos los grupos se procesaron con el programa analizador de imágenes de NIH, cuantificándose el total de áreas preneoplásicas (mm²) y el número de focos por cm² de sección hepática.

El análisis cuantitativo de apoptosis se realizó en cortes en serie a los teñidos para rGST P, por marcado específico del DNA fragmentado, *in situ*, usando el método de TUNEL con modificaciones¹¹. Las células apoptóticas se cuantificaron dentro de los FP y el Índice Apoptótico (IA) se expresó como células apoptóticas por cada 100 hepatocitos.

Análisis por western blot

Se midieron los niveles de las proteínas Bax, Bcl-2 y Bcl-x_L en los distintos grupos, por western blot, utilizando fracciones subcelulares hepáticas enriquecidas en mitocondrias. Además, Bax se determinó en lisado total. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron a 4 °C con anticuerpos contra Bax, Bcl-2 o Bcl-x_L. Las proteínas inmunorreactivas se detectaron utilizando quimioluminiscencia, y las bandas se cuantificaron por densitometría (Shimadzu CS 9000).

Los resultados obtenidos se expresaron como media \pm SEM. Las diferencias se analizaron por análisis de variancia (ANOVA) y en caso de significancia, se aplicó el test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

La tabla 1 muestra los cambios en el área y el número de FP rGST P-positivos.

Las ratas que recibieron IFN α -2b durante iniciación-promoción (G2) y durante la iniciación (G3) presentaron

Tabla 1. Áreas (mm²) y números de focos preneoplásicos rGST P-positivos por cm² de sección hepática. Los resultados representan el valor de la media \pm SEM.

Grupo	1	2	3	4	5	6
Área (mm ² /cm ²)	4.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2*	2.6 \pm 0.5*	3.3 \pm 0.7	0.3 \pm 0.1	0.10 \pm 0.05†
Nº/cm ²	375 \pm 14	110 \pm 24* #	158 \pm 14* #	448 \pm 40	242 \pm 62	78 \pm 10†

* $p < 0,05$ (vs. Grupo control 1); # $p < 0,05$ (vs. Grupo 4); † $p < 0,05$ (vs. Grupo control 5)

una reducción significativa tanto del área como del número de FP/cm² sección hepática con respecto al G1 control. La reducción del número de FP en los G2 y 3 también resultó significativa al ser comparado con el G4. Los animales que recibieron IFN α -2b durante la promoción (G4) no mostraron diferencias en área ni en número de FP con respecto al G1. En los animales sometidos solamente al estadio de iniciación, el tratamiento con IFN α -2b disminuyó área y número de FP (G6 vs. G5). Por lo tanto, esto sugiere que la utilidad del IFN α -2b como agente antitumoral se perdió cuando se administró solo durante la promoción, por lo que parece ser esencial su administración al menos durante la iniciación (G2, 3 y 6) para que ejerza sus efectos inhibitorios sobre FP en hígado de rata.

En cuanto al IA dentro de los FP, éste mostró un incremento significativo en los animales de los G2 y 3 comparados con el G1, mientras que el G4 mostró una tendencia a aumentar no significativa: G1= 0,26 \pm 0,03; G2= 0,42 \pm 0,02; G3= 0,40 \pm 0,02; G4= 0,40 \pm 0,04 (p <0,05 vs. G1). Como los G5 y 6 presentaron focos relativamente pequeños y hepatocitos iniciados aislados, el IA no pudo determinarse dentro de los FP, sino en el tejido hepático total. Los animales iniciados que recibieron IFN α -2b (G6) mostraron IA aumentado al ser comparados con el G5 (G5= 0,15 \pm 0,02; G6= 0,23 \pm 0,007; p <0,05). Por lo tanto, la reducción del número y área de los FP en los G2, 3 y 6 podría explicarse por una mayor muerte celular programada en los focos.

Bax, Bcl-2 y Bcl-x_L son miembros de la familia de las proteínas Bcl-2. Mientras Bax promueve apoptosis, Bcl-2 y Bcl-x_L protegen a las células de la muerte celular programada¹². Observamos un aumento en la expresión de Bax en los lisados hepáticos de las ratas tratadas con IFN α -2b. El nivel de Bax aumentó un 150% en los G2 y 3 y un 50% en el G4 (p <0,05) al ser comparados con el G1 control. Además, el incremento del nivel de Bax en los G2 y 3 resultó significativo con respecto al G4 (100%, p <0,05). La expresión de Bax también aumentó en el G6 (235%, p <0,05 vs. G5).

Evaluamos si esta expresión aumentada de Bax en los grupos tratados con IFN α -2b se asociaba a una translocación aumentada de la proteína hacia la mitocondria. Los resultados (expresados en porcentaje), junto con los niveles mitocondriales de Bcl-2 y Bcl-x_L, se muestran en la figura 1.

Los G2, 3 y 6 mostraron aumentos significativos de Bax en la fracción mitocondrial, no así el G4. Si la expresión aumentada de Bax es la responsable directa de la apoptosis en los focos, debe haber una regulación contraria de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L. Como puede observarse en la figura, los niveles de dichas proteínas en la fracción mitocondrial disminuyeron en los grupos tratados con IFN α -2b. En consecuencia, miembros de la familia Bcl-2 están involucrados en la

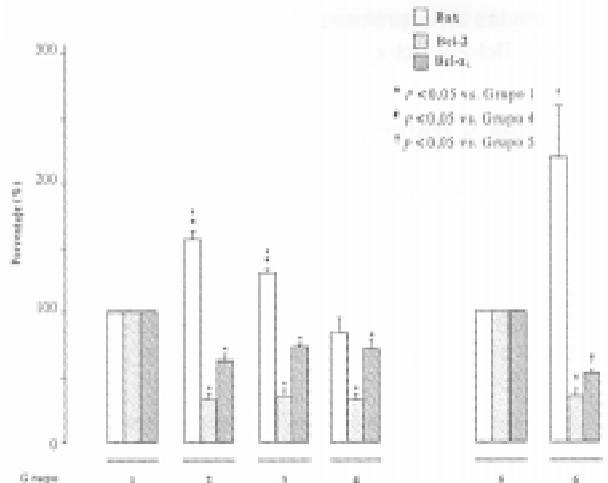


Fig. 1.- Niveles mitocondriales de las proteínas Bax, Bcl-2 y Bcl-x_L determinados por western blot y cuantificados por densitometría. Los resultados (media \pm SEM) se expresan como valores porcentuales.

eliminación apoptótica de hepatocitos preneoplásicos tratados con IFN α -2b al menos durante el estadio de iniciación. La prevalencia relativa de Bax y Bcl-x_L/Bcl-2 es un factor crítico para promover la supervivencia o la muerte celular¹³. Así, las vías apoptóticas pueden activarse en condiciones donde la expresión de Bax es elevada y la de Bcl-x_L/Bcl-2 está disminuida.

Se ha establecido que la localización subcelular de Bax es un regulador importante de la apoptosis¹⁴. Bax se encuentra en el citoplasma y se transloca a la mitocondria para mediar sus efectos a través de la formación de canales en la membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y apoptosis¹⁵. Aunque Bax se encontró aumentada en los lisados hepáticos de los animales del G4 (tratados con IFN α -2b solo en la promoción), su nivel no fue tan elevado como en los G2 y 3. Por otra parte, la expresión mitocondrial de Bax no aumentó en el G4 (ver figura). Esta discrepancia entre la expresión de Bax y su translocación a la mitocondria podría explicar la falta de reducción del área y número de FP en el G4.

En conclusión, los hepatocitos preneoplásicos en las ratas tratadas con IFN α -2b al menos en la iniciación sufren muerte celular programada como resultado primario de un aumento sustancial de Bax y de su translocación a la mitocondria.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con un subsidio de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). Agradecemos al Laboratorio BioSidus por la generosa donación del IFN α -2b recombinante (BIOFERON).

Bibliografía

1. Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, et al. Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus. *Cancer* 1998; 82: 827-35.
2. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: National Surveillance Program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 1999; 131: 174-81.
3. Lai CL, Lau JY, Wu PC, Ngan H, Chung HT, Mitchell S, Corbett T, et al. Recombinant interferon-a in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Hepatology* 1993;17: 389-94.
4. Llovet J, Sala M, Castells L, et al. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 54-8.
5. Yano H, Iemura A, Haramaki M, et al. Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human cancer cell lines. *Hepatology* 1999; 29: 1708-17.
6. Murphy D, Detjen KM, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Interferon-a delays S-phase progression in human hepatocellular carcinoma cells via inhibition of specific cyclin-dependent kinases. *Hepatology* 2001; 33: 346-56.
7. Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1198-205.
8. Gauthier T, Kalta K, Minuk G. The differential effects of three forms of interferon alfa on hepatic regeneration after parcial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 1995; 22: 883-6.
9. Kaku T, Ekem K, Lindayen C, Bailey DJ, van Nostrand AWP, Farber E. Comparison of formalin- and acetone-fixation for immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen (CEA) and keratin. *Am J Clin Pathol* 1983; 80: 806-15.
10. Pitot H. Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 465-500.
11. Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994; 71: 219-25.
12. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerization with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7834-8.
13. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
14. Nechushstan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999; 18: 2330-41.
15. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 3878-85.

Ganador del Premio "Ruben Cherny"