

INFLUENCIA DE LOS NEUROPÉPTIDOS, BOMBESINA Y CALCITONINA, SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES PROSTÁTICAS, PC-3, DU 145 Y LNCaP

J. LARRÁN LÓPEZ, J. APARICIO PATINO, A. LÓPEZ MUÑOZ,
J. VILCHES TROYA

Departamento de Anatomía Patológica, Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. Cádiz.

PALABRAS CLAVES:

Próstata. Cultivo celular. Neuropeptidos. Proliferación.

KEY WORDS:

Prostate. Cell culture. Neuropeptides. Proliferation.

Actas Urol Esp. 24 (10): 779-784, 2000

RESUMEN

Las células neuroendocrinas están presentes en el tejido prostático normal y tumoral. Los neuropeptidos secretados por estas células tienen funciones biológicas que todavía no han sido totalmente esclarecidas. La presencia de células neuroendocrinas en el carcinoma prostático se relaciona con la progresión del tumor y un peor pronóstico.

Estudiamos la influencia de bombesina y calcitonina sobre la proliferación de líneas tumorales prostáticas humanas andrógeno-insensibles, PC-3 y DU-145, y andrógeno-sensible, LNCaP, para ello utilizamos el análisis colorimétrico XTT y recuentos celulares con un hematocitómetro.

El crecimiento de la línea celular PC-3 y DU-145 es estimulado por la bombesina y calcitonina pero estos peptidos no ejercen efecto estimulador sobre la línea celular LNCaP. Esto indica que la bombesina y calcitonina pueden modular la proliferación sobre las líneas andrógeno-insensibles "in vitro" y podrían actuar, por tanto, como factores paracrinos estimuladores del crecimiento sobre las células cancerosas prostáticas que se vuelven resistentes al tratamiento hormonal.

ABSTRACT

Neuroendocrine cells are present in normal and tumoral prostate tissue, the neuropeptides secreted by these cells have a biological functions that have not been fully elucidated. The presence of neuroendocrine cells in prostatic carcinoma have been shown to increase tumor progression.

We characterized the in vitro proliferative influence of bombesin and calcitonin in androgen-insensitive, PC-3 and DU-145, and androgen-sensitive, LNCaP, cell lines of human prostate cancers. The influence of these neuropeptides on proliferation were assessed using the colorimetric XTT assay and by cells counts with a hemocytometer.

The growth of PC-3 and DU-145 cell lines is stimulated by bombesin and calcitonin but exerted any stimulatory effect on the proliferation of the LNCaP cell line. This indicate that bombesin and calcitonin can modulate proliferation of androgen-insensitive human prostate cell lines "in vitro" and may be potential paracrine growth promoters in established androgen irresponsive human prostatic carcinoma cells.

El cáncer prostático es uno de los tumores malignos más frecuentes en el hombre. El desarrollo, crecimiento y fisiología de la próstata están modulados por una gran variedad de hormonas y factores de crecimiento. Aproximadamente un 50% de todos los tumores malignos prostáticos contienen células neuroendocrinas¹. Diversos estudios indican que la diferenciación neuroendocrina es un marcador de mal pronóstico en el cáncer prostático y que se correlaciona con el desarrollo de un estado andrógeno-resistente². Las células neuroendocrinas, en el cáncer prostático, tienden a localizarse próximas a las células que están en proliferación y esto sugiere que los productos de secreción de estas células pueden influenciar el comportamiento de estos tumores³. Estas células neuroendocrinas secretan diversos neuropéptidos como bombesina y calcitonina^{4,5}. La bombesina es un tetradecapéptido anfibio cuyo homólogo en los humanos es la GRP (Gastrin Releasing Peptide). La bombesina y la GRP estimulan el crecimiento de numerosos tipos celulares que incluyen las células epiteliales bronquiales⁶, las células humanas de cáncer de mama⁷ y las células de carcinoma pulmonar⁸. La calcitonina es un péptido de 32 aminoácidos secretado por las células "C" del tiroides. Diferentes estudios muestran que la calcitonina y CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide, péptidos relacionados genéticamente con la calcitonina) presentan efectos estimuladores sobre el crecimiento de distintos tipos celulares como las células epiteliales traqueales del cobaya⁹ y células endoteliales humanas¹⁰. Las funciones biológicas que estos péptidos puedan ejercer sobre las células prostáticas no han sido completamente esclarecidas, por lo que es necesario investigar si estos neuropéptidos inducen la proliferación de las células epiteliales prostáticas como cabría deducir de las observaciones microscópicas descritas en el carcinoma prostático humano lo que facilitaría el diseño de nuevas estrategias tanto preventivas, diagnósticas como terapéuticas.

En el presente trabajo utilizamos la línea andrógeno-sensible LNCaP, aislada de una biopsia de un ganglio linfático de un paciente con diagnóstico confirmado de metástasis de cáncer prostático y líneas celulares andrógeno-insensibles, DU-145 aislada de un paciente con metástasis

cerebral de un carcinoma de próstata y PC-3 aislada de un grado IV de carcinoma prostático. Sobre dichas líneas se estudia la acción de dos péptidos presentes en el tejido prostático, bombesina y calcitonina, para determinar si estos péptidos estimulan realmente la proliferación celular.

MATERIAL Y MÉTODO

Las líneas celulares prostáticas fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) (LNCaP y DU-145) y de Nuclear Ibérica (PC-3) y mantenidas en nuestro laboratorio en una estufa de cultivos celulares a 37 grados centígrados en una atmósfera de 5% de CO₂. Estas líneas crecieron formando monocapas en medio de cultivo RPMI-1640 (ICN Flow) para la LNCaP y DMEM (ICN Flow) en el caso de las líneas DU-145 y PC-3. Los medios de cultivo se suplementaron con 4% de penicilina-estreptomicina (Biochrom), 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (ICN Flow) y 0,4% de Gentamicina (GIBCO). Todos los cultivos celulares usados en los experimentos se encontraban en fase de confluencia o próximos a ella.

Para los experimentos se sembraron 10.000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos (tissue culture grades, 96 wells, flat bottom, Labsystem) a las que se añadían medio de cultivo con bajas concentraciones de suero bovino fetal (2,5%).

Después de 24 horas se cambia el medio de cultivo por otro que contiene bombesina o calcitonina. Las concentraciones empleadas para la bombesina en las tres líneas celulares fueron de 1 nM/ml y 5 nM/ml, mientras que las de calcitonina fueron de 50 pgr/ml y 500 pgr/ml. Se estableció en la línea celular LNCaP, andrógeno sensible, un grupo sometido a una concentración de 1,35 nM de dihidrotestosterona por pocillo.

Como grupo control se mantuvo un pocillo por línea celular con medio de cultivo bajo en suero bovino fetal (2,5%) sin neuropéptidos.

La proliferación celular fue estudiada con el análisis colorimétrico XTT basado en la reducción de la sal amarilla de tetrazolio, XTT, a formazan de color naranja soluble en agua por la actividad de la dehidrogenasa mitocondrial. La coloración del formazan se cuantifica usando un espectofotómetro, y así la intensidad del color naranja es proporcional al número de células vivas en el momento del análisis.

Después de la incubación con diferentes tratamientos, se añade la solución de XTT (Boehringer Manheim) a cada pocillo a una concentración de 0,3 mg/ml y se incuba durante cuatro horas para a continuación medir la absorbancia espectofotométrica usando un lector ELISA (Labsystems iEMS Reader MF). Las mediciones se efectuaron a las 24, 48 y 72 horas. Cada estudio se llevó a cabo por cuadriplicado reflejándose los valores medios significativos de cada uno de los grupos.

La proliferación celular también se analizó mediante recuentos celulares con un hematocitómetro.

RESULTADOS

En la línea celular PC-3, después de 24 horas de incubación, la proliferación celular en los pocillos sometidos a la acción de las distintas concentraciones de bombesina fue similar al grupo control, pero después de 48 y 72 horas el neuropéptido causó un incremento significativo sobre el crecimiento celular. En esta línea celular la calcitonina indujo una proliferación celular dosis-dependiente que alcanza el máximo a las 72 horas de incubación (Fig. 1).

En la línea celular DU-145 observamos una estimulación significativa de la proliferación celular causada por la bombesina en todos los períodos de incubación, dosis-independiente en las primeras etapas siendo al final mayor la estimulación con la mayor concentración de neuropéptido, mientras que la calcitonina indujo un incremento de la proliferación celular dosis-dependiente durante todos los períodos (Fig. 2).

El crecimiento de la línea celular LNCaP no fue estimulado por la bombesina e incluso observamos un descenso en el número de células por debajo del grupo control. El pocillo sometido a la acción de la dihidrotestosterona mostraba los más altos niveles de absorbancia. Igualmente el grupo con calcitonina mostró siempre valores de densidad óptica por debajo del grupo control y del grupo con dihidrotestosterona (Fig. 3).

Los recuentos celulares revelaron una respuesta positiva a la bombesina y calcitonina en la PC-3 y DU-145 pero en la línea celular LNCaP el número de células en los pocillos sometidos a la acción de estas sustancias estuvo siempre por debajo del grupo control.

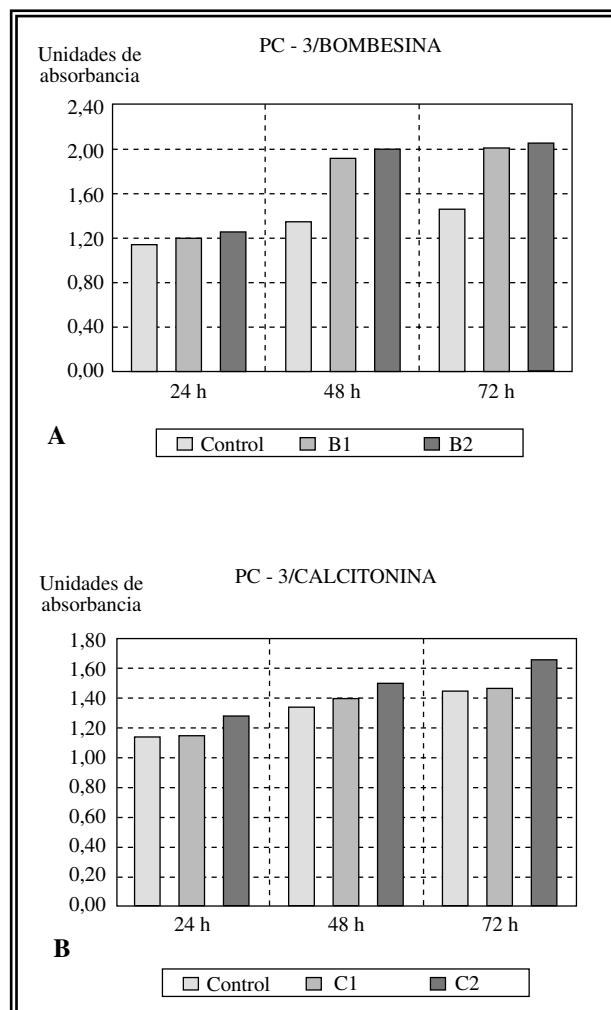


FIGURA 1. Efecto sobre la proliferación celular en la línea PC-3 de la bombesina (A) B1-1nM/ml, B2-5nM/ml y la calcitonina (B) C1-50 pgr/ml y C2-500 pgr/ml. La proliferación fue evaluada mediante análisis colorimétrico-XTT. Los datos representan la media de cuatro experimentos, y se expresan en unidades de absorbancia. El grupo control se mantiene sin neuropéptido sólo con medio de cultivo con baja suplementación de suero.

DISCUSION

Las células neuroendocrinas están presentes en el tejido prostático normal y patológico. En la próstata normal estas células se localizan en el epitelio prostático y extienden sus prolongaciones entre las células vecinas y hacia la luz glandular, lo que sugiere la posibilidad de que los productos peptídicos de estas células neuroendocrinas actúen como factores paracrinos en la regulación del crecimiento o función de las células prostáticas¹. En el tejido tumoral prostático las células neuroendocrinas están localizadas en la proximidad de las células que están en proliferación³.

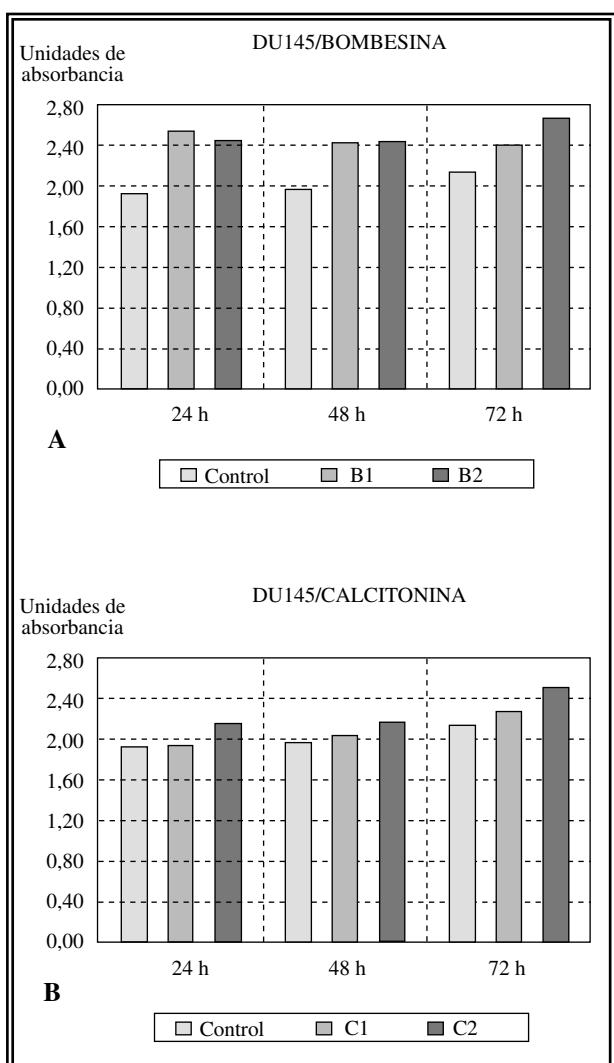


FIGURA 2. Efecto de la bombesina (A) y calcitonina (B) sobre la proliferación en la línea celular DU-145. Se establecieron los mismos grupos que en la línea PC-3

La presencia de células neuroendocrinas en el carcinoma prostático ha sido ampliamente documentada y correlacionada, por algunos autores, con la progresión tumoral y mal pronóstico debido a la pobre respuesta a la terapia endocrina. La causa de esto sea probablemente debido a que algunos neuropéptidos secretados por estas células neuroendocrinas afectan el crecimiento de las células tumorales prostáticas¹¹. Entre los péptidos descritos en la próstata están la bombesina y calcitonina con efectos demostrados sobre la proliferación de distintos tipos celulares⁶⁻⁹. Aunque la presencia de estos péptidos en la próstata ha sido ampliamente documentada sus funciones son menos claras^{4,5}. Se ha demostrado en la próstata que las células próximas a las células neuroendocrinas presentan un aumento de la actividad mitótica sugiriendo una regulación del crecimiento de forma paracrína por los productos neuroendocrinos³.

Los resultados de nuestro trabajo muestran que la bombesina y calcitonina incrementan la proliferación celular en las líneas PC-3 y DU-145. Ambas líneas celulares son andrógeno insensibles. El efecto estimulador de la bombesina sobre la proliferación de estas líneas celulares se produce de manera dosis-dependiente sobre la línea celular PC-3. Esto está en concordancia con los efectos estimuladores descritos por Bologna et al.¹² sobre la línea PC-3 y PMU. Para nuestro cono-

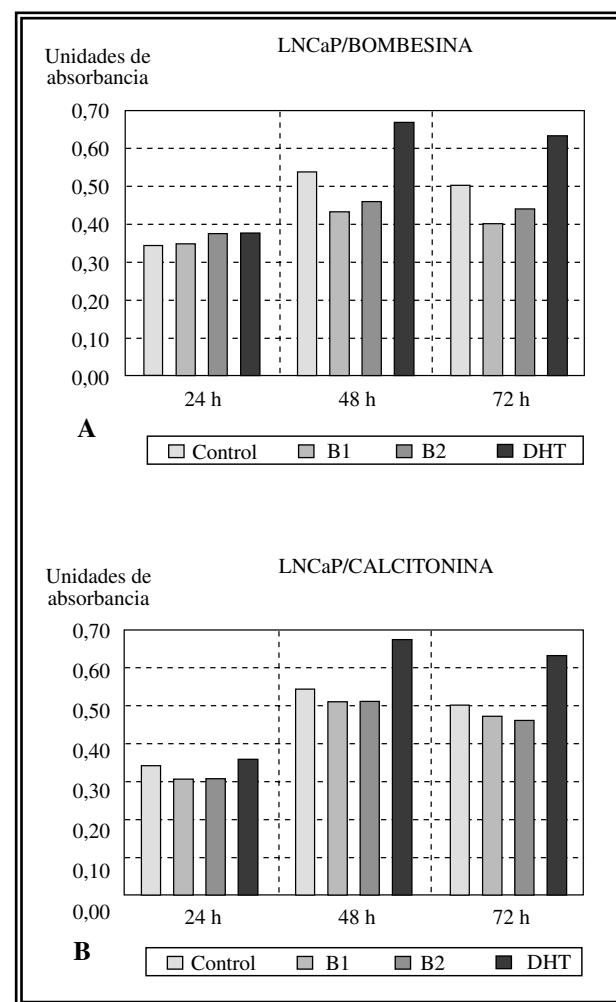


FIGURA 3. Efecto de la bombesina (A) y calcitonina (B) sobre la proliferación en la línea celular LNCaP comparando con los valores del grupo DHT -dihidrotestosterona 1,35 nM/pocillo-. Las concentraciones de neuropéptidos es la misma que para las líneas anteriores.

cimiento este es el primer trabajo que recoge el efecto estimulador de la bombesina sobre la línea Du-145. Los valores de densidad óptica de los pocillos sometidos a la acción de calcitonina reflejan un efecto estimulador de la proliferación celular dosis dependiente. Se ha descrito un aumento significativo del AMPc en respuesta a la calcitonina sobre las células de la línea Du-145¹³.

En contraposición la bombesina y calcitonina no muestran efectos estimuladores de la proliferación celular sobre la línea LNCaP, y así los valores de densidad óptica estaban siempre por debajo de los del grupo control. En este sentido otros autores reflejan en sus investigaciones una respuesta positiva de la movilización de Ca²⁺ tras la administración de bombesina en las líneas celulares PC-3 y DU-145 pero no en la línea LNCaP¹⁵. En oposición, Shah⁵ describe un incremento dosis dependiente en la incorporación de 3H timidina en estas células cuando están sometidas a la acción de calcitonina, aunque en otro estudio las células de esta línea no demuestran una respuesta en las concentraciones de AMPc¹³. En los pocillos sometidos a la acción de dihidrotestosterona se produce un incremento significativo de la proliferación celular, lo que confirma la andrógeno-sensibilidad de este modelo.

Ritchie¹⁶ describe una disminución en la proliferación de las líneas DU-145 y PC-3 sometidas a la acción de la calcitonina y un incremento en la línea LNCaP, pero nuestros resultados son más acordes con Gkonos¹³ quien describe que las células de las líneas LNCaP, ALVA-3 y PPC-1 no demuestran respuestas significativas a la calcitonina ya que carecen de ARNm para el receptor de la calcitonina, mientras que aumenta el AMPc intracelular en las células de la línea DU-145, siendo ésta la única que presenta ARNm para el receptor de calcitonina.

Probablemente ambos neuropeptidos, bombesina y calcitonina, en la línea LNCaP, jueguen más un papel regulador de la actividad secretora más que de estimulador de la proliferación como ocurre con el VIP en las células epiteliales prostáticas normales¹⁷. En este sentido, las células de la línea LNCaP comparten características con las células normales, no tumorales, de la próstata que incluye la presencia de receptores androgénicos y síntesis de antígeno específico prostático¹⁸.

Estos resultados sugieren que la bombesina y calcitonina juegan un papel independiente de los andrógenos. Si ésto se confirma a mayor escala podría llevar a una aplicación clínica directa. La mayoría de los cánceres prostáticos inicialmente responden a la deprivación androgénica pero la duración de esta remisión es limitada y en poco tiempo se produce la progresión del tumor. La evolución hacia la insensibilidad androgénica es atribuida a la heterogeneidad de los requerimientos para el crecimiento celular dentro del mismo tumor, probablemente debido a la proliferación de células hormono-independientes¹⁹. El desarrollo de antagonistas de bombesina/GRP y calcitonina/CGRP es de gran interés y en este sentido algunos estudios muestran el efecto inhibidor de un antagonista de bombesina/GRP RC-1095 sobre el crecimiento de líneas tumorales prostáticas humanas injertadas en ratones²⁰.

En conclusión, estos resultados indican que la bombesina y calcitonina estimulan la proliferación de las líneas celulares prostáticas humanas andrógeno-insensibles "in vitro" y serían potenciales factores paracrinos promotores del crecimiento sobre las células hormono-independientes que aparecen en el carcinoma prostático humano.

REFERENCIAS

1. CUSSENOT O, VILLETTÉ JM, COCHAND-PRIOLLET B, BERTHON P: Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate* 1998; **Suppl. 8**: 43-51.
2. COHEN RJ, GLEZERSON G, HAFFEJEE Z: Neuroendocrine cells-a new prognostic parameter in prostate cancer. *Br J Urol* 1991; **68**: 258.
3. BONKHOFF H, WERNET N, DHOM G, REMBERGER K: Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate* 1991; **19**: 91.
4. DI SANTAGNESE PA: Calcitoninlike immunoreactive and bombesinlike immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate. *Arch Pathol Lab Med* 1986; **110 (5)**: 412.
5. SHAH G, NOBLE M, AUSTENFELD M, WEIGEL J, DEFTOS L, MEBUST W: Presence of calcitonin-like immunoreactivity (iCT) in human prostate gland: Evidence for iCT secretion by cultures prostate cells. *Prostate* 1992; **21**: 87.
6. WILLEY JC, LECHNER, JF, HARRIS CC: Bombesin and C-terminal tetradecapeptide of Gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 1984; **153**: 245.
7. NELSON J, DONNELLY M, WALKER B, GRAY J, SHAW C, MURPHY RF: Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. *Br J Cancer* 1991; **63**: 933.

8. WEBER S, ZUCKERMAN JE, BOSTWICK DG, BENSCH KG, SIKIC BI, RAFFIN TA: Gastrin releasing peptide is a selective mitogen for small cell lung carcinoma in vitro. *J Clin Invest* 1985; **75**: 306.
9. WHITE SR, HERSHENSON MB, SIGRIST KS, ZIMMERMANN A, SOLWAY J: Proliferation of guinea pig tracheal epithelial cells induced by calcitonin gene-related peptide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **8 (6)**: 592.
10. HAEGERSTRAND A, DALSGAARD CJ, JONZON B, LARSSON O, NILSSON J: Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3.299.
11. ABRAHAMSSON PA, COCKETT A, DI SANT'AGNESE PA: Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Supplement* 1998; **8**: 37-42.
12. BOLGNA M, FESTUCCIA L, MUZI P, BIORDI L, CIO-MEI M: Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 1989; **63**: 1.714.
13. GKONOS PJ, BALAKRISHNA LL, BALKAN W, ROOS BA: Neuroendocrine peptides stimulate adenylyl cyclase in normal and malignant prostate cells. *Regulatory Peptides* 1995; **59**: 43.
14. SHAH G, et al.: Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3,5-monophosphates and cytoplasmic Ca^{2+} transients. *Endocrinology* 1994; **134**: 596.
15. APRIKIAN AG, HAN K, GUY L, LANDRY F, BEGIN LR, CHEVALIER, S: Neuroendocrine differentiation and the Bombesin/Gastrin-Releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *Prostate* 1998; **Suppl. 8**: 52-61.
16. RITCHIE CK, THOMAS KG, ANDREWS LR, TINDALL DJ, FITZPATRICK LA: Effects of the calcitrophic peptides calcitonin and parathyroid hormone on prostate cancer growth and chemotaxis. *Prostate* 1997; **30**: 183.
17. GKONOS PJ, KRONGRAD A, ROOS BA: Neuroendocrine peptides in the prostate. *Urol Res* 1995; **23**: 81.
18. HENTTU P, VIJKO P: Growth factor regulation of gene expression in the human prostate carcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res* 1993; **53**: 1.051.
19. DAVIES P, EATON CL: Regulation of prostate growth. *J Endocrinol* 1991; **131**: 5.
20. PINSKI J, SCHALLY AV, HALMOS G, SZEPESHAZI K: Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin/Gastrin releasing peptide antagonist RC-3095 on growth of PC-3 human prostate cancer xenografts in nude mice. *Int J Cancer* 1993; **55**: 963.

Dra. J. Larrán López
Facultad de Medicina. Dpto. Biología Celular.
Plaza Fragela, s/n
11003 Cádiz

(Trabajo recibido el 12 Mayo de 2000)