

# Rol de TGF- $\beta$ 1 en la fibrosis de la piel inducida por radioterapia en cáncer de cabeza y cuello

Michelle Arroyo D.<sup>(1)</sup>, Rodolfo Nazar S.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital San Juan de Dios.

<sup>(2)</sup>Servicio de Otorrinolaringología, HCUCH.

## SUMMARY

*Introduction: radiotherapy (RT) is a major part of the treatment of head and neck cancer, but it can produce skin fibrosis and other complications. Fibrosis is produced by an increase of the fibroblasts (FB) and extra-cellular matrix proteins. TGF- $\beta$  is one of the several factors implied in FB proliferation, and it is the most important element in the development of radiation fibrosis. Temporality of radiation fibrosis: there are two successive stages in the fibrosis development. An actively inflammatory with high TGF- $\beta$ 1 secretion one, and a second stage characterized by hypo-cellularity and low TGF- $\beta$ 1 secretion. TGF- $\beta$ : an induction of TGF- $\beta$ 1 and its mRNA in animals skin during the first hours post irradiation have been demonstrated. By studying surgical skin biopsies post RT and fibrotic tissues post exposure to radiation, it was observed over-expression of TGF- $\beta$ 1. Discussion: there is a lot of new knowledge of the molecular process implied in radiation skin fibrosis. A future goal is to potentiate this information to improve our tools in prevention and treatment of fibrosis in patients that undergone RT because of cancer.*

## INTRODUCCIÓN: FIBROSIS CUTÁNEA INDUCIDA POR RADIOTERAPIA

La radioterapia (RT) es un pilar fundamental en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, pero su empleo no está exento de complicaciones. La toxicidad cutánea de la RT se manifiesta a través de múltiples entidades clínicas, tanto agudas como tardías. Las lesiones precoces que resultan de la exposición de la piel a la RT son el eritema, la descamación seca o exudativa y las úlceras. Las

alteraciones tardías incluyen atrofia dérmica, telangiectasias, úlceras crónicas y tumores cutáneos. También puede producir fibrosis cutánea<sup>(1,2,3)</sup>.

La fibrosis es la acumulación de fibroblastos (FB) y proteínas de la matriz extracelular (MEC). Si bien la fibrosis es un componente normal del proceso de cicatrización, cuando esta acumulación de proteínas de la MEC es excesiva, conduce a la destrucción de la arquitectura normal del tejido, lo que conlleva a la pérdida de su función<sup>(2,4)</sup>.

La fibrosis inducida por RT es un proceso multicelular que comienza con la inducción e interacción entre múltiples factores de crecimiento y citoquinas. Mediante la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de FB, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), entre otros, la RT induce una proliferación y disfunción de los FB, lo que aumenta su producción de colágeno y otras proteínas de la MEC<sup>(2,5)</sup>. De todos estos mediadores, el TGF- $\beta$  ha mostrado ser el modulador central de la respuesta *in vivo* de las citoquinas inducida por RT, participando tanto en la síntesis acelerada y reorganización de la MEC, como en la elevada destrucción de células epiteliales y hematopoyéticas en el campo irradiado<sup>(5-9)</sup>.

En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se buscó reunir y simplificar parte del conocimiento actual respecto al rol de TGF- $\beta$ 1 en la fibrosis cutánea inducida por RT. Se revisaron trabajos de investigación en animales, estudios retrospectivos en humanos, casos clínicos y revisiones bibliográficas previas.

### TEMPORALIDAD DE LA FIBROSIS POST RT

Los productos génicos inducidos por la RT son evidentes de manera inmediata, dentro de horas a días, por medio de la síntesis y liberación de numerosos factores de crecimiento y factores inhibidores. Existen también cambios fisiopatológicos secundarios que pueden ocurrir en semanas, meses e incluso años después de la exposición inicial<sup>(5,6)</sup>. Ambos procesos moleculares, precoces y tardíos, se manifiestan histológica y clínicamente con ciertas diferencias.

Histológicamente se distinguen dos tipos de fibrosis en la piel, que corresponden a etapas sucesivas del desarrollo de la lesión. Las muestras de piel del primer tipo de fibrosis presentan cambios inflamatorios activos, observándose además numerosos FB morfológicamente normales y sin alteraciones

cromosómicas, pero con una tasa de proliferación elevada y una alta secreción de TGF- $\beta$ 1. El segundo tipo de fibrosis corresponde a un tejido no inflamatorio, escasamente celularizado y que posee FB fenotípicamente senescentes con una reducida proliferación y secreción de TGF- $\beta$ 1<sup>(5,10,11)</sup>.

### FACTOR DE CRECIMIENTO TGF- $\beta$ 1 Y SU ROL EN LA FIBROGÉNESIS

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  es un mediador celular proteico con efecto profibrótico y es la citoquina que juega el papel más importante en la promoción de los cambios tisulares postradiación, especialmente en la generación de fibrosis inducida por RT en tejidos previamente sanos<sup>(5,12)</sup>.

Existen 3 isoformas conocidas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, y TGF- $\beta$ 3<sup>(5)</sup>, y todas estas isoformas parecen alterar su actividad fibrogénica en relación a la radiación, ya sea favoreciendo o reduciendo la generación de fibrosis. Estudios *in vivo* muestran una expresión elevada de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y, consecutivamente, de los componentes de la MEC en tejidos sometidos a RT, demostrándose su rol en la generación de fibrosis cutánea radioinducida<sup>(13)</sup>. Por el contrario, se ha descrito que el TGF- $\beta$ 3 tiene un efecto radioprotector en células epiteliales y FB, mostrando además inducir neovascularización<sup>(13-15)</sup>.

El TGF- $\beta$ 1 es la isoforma mayormente implicada en las enfermedades fibroproliferativas<sup>(5,16)</sup>. En pieles irradiadas se ubica preferentemente contenido en células inflamatorias de la región papilar<sup>(17)</sup>.

Estudios demuestran que la aplicación de 50 a 200 Gy de radiación  $\beta$  sobre el precursor recombinante humano del TGF- $\beta$  bastarían para generar la activación de la molécula<sup>(12)</sup>. Además, se ha demostrado que su molécula precursora es ubicuamente producida por las células; sin embargo, el factor activo presenta una concentración francamente mayor en tejidos fibróticos y en cicatrices<sup>(5,13)</sup>.

El TGF- $\beta$ 1 tiene un efecto quimiotáctico y autointuctivo sobre monocitos y macrófagos, aumentando de esta forma sus propios niveles en el sitio de daño. Sobre los FB también tiene un efecto quimiotáctico, induce su diferenciación y maduración y además estimula la expresión de los genes de la síntesis de colágeno<sup>(12,13)</sup>. También contribuye a la acumulación de MEC al inhibir la expresión de las metaloproteinasas de la matriz (MPM) y de las colagenasas y al estimular la expresión de la enzima inhibidora de las MPM<sup>(9,13,14,17,18)</sup>. Por otro lado, estudios en animales muestran que el TGF- $\beta$  disminuye la vascularización capilar en la piel sometida a radiación, lo que también contribuye a una alteración de la estructura y función tisular<sup>(13,14)</sup>.

Martin M. y cols. investigaron la iniciación de estos procesos durante las primeras 24 horas post RT, estudiando la activación por radiación  $\beta$  del TGF- $\beta$ 1 *in vivo* en piel de cerdos. La inducción del TGF- $\beta$ 1 en la piel se detectó en las primeras horas post RT, lo que se evidenció a través de la elevación de la proteína y de su ARN mensajero (ARNm). La proteína fue secretada por FB, células endoteliales y células epidérmicas, lo que se evidenció desde las 6 horas postirradiación. La inducción del ARNm del TGF- $\beta$ 1 se logró con una dosis umbral de radiación  $\beta$  de 16 Gy y fue detectada desde las 2 horas, con un *peak* a las 6 y disminución de sus niveles a las 24 horas. La inducción del TGF- $\beta$ 1 fue concomitante a la activación de otros genes implicados en el desarrollo del daño tardío de la piel, lo que sugiere la rápida estimulación de la remodelación tisular de la RT<sup>(19)</sup>.

Randall y cols. mostraron que la inducción del TGF- $\beta$ 1 también ocurre después de la radiación  $\beta$  en la piel. En ratones expuestos a 50 Gy de radiación  $\beta$ , se demostró una elevación del ARNm de TGF- $\beta$ 1 a las 6 horas postirradiación, regresando a sus valores basales a las 48 horas con un nuevo aumento a los 14 días<sup>(20)</sup>.

Estas observaciones sobre la inducción de TGF- $\beta$ 1 postirradiación  $\beta$  en ratones y postirradiación  $\beta$  en cerdos, apoyan que ésta parece ser la respuesta inicial general de las células de la piel a la RT.

Por otro lado, estudios *in vivo* muestran una sobreexpresión tardía y duradera de los niveles de TGF- $\beta$ 1 en tejidos irradiados<sup>(14,17,21-23)</sup>.

Delanian S. y cols. estudiaron la piel fibrótica de pacientes sometidos a RT. Se analizaron muestras de piel tomadas 6 a 20 meses post RT, observándose que los niveles de ARNm específicos de los genes del colágeno tipo I y III y de TGF- $\beta$ 1 estaban significativamente elevados<sup>(22)</sup>.

Mueller y cols. compararon la expresión génica en muestras de piel irradiada 1 a 3 años antes del estudio y piel no irradiada de 19 pacientes. De los 1303 genes estudiados, 79 mostraron un patrón de expresión distinto entre ambos grupos. En las muestras irradiadas se observó una expresión mayor del gen que codifica para el TGF- $\beta$  y de las moléculas implicadas en su vía de señalización, de los genes de varios tipos de colágeno y de la enzima inhibidora de la MPM. Por otro lado, se evidenció una expresión menor de genes que codifican para varios tipos de MPM<sup>(21)</sup>.

Vozenin-Brotons y cols. estudiaron tejidos fibróticos postexposición accidental a radiación. Analizaron una muestra de tejido removido quirúrgicamente de un paciente expuesto a radiación, 18 meses después de terminada la exposición. Se observó que el TGF- $\beta$ 1 se encontraba sobreexpresado en la piel fibronecrosada, tanto en la cicatriz epidérmica como en la dermis. Las células aisladas de la cicatriz conservaron su secreción disregulada de TGF- $\beta$ 1 en cultivos, especialmente los queratinocitos<sup>(23)</sup>.

## DISCUSIÓN

El TGF- $\beta$ 1 es un factor de crecimiento implicado en la estimulación de la proliferación fibroblástica. Numerosos estudios en piel de cerdo, cuya estructura ha demostrado una similitud con la piel humana importante<sup>(10)</sup>, y en otros animales, han mostrado cómo los niveles de este factor aumentan en forma paralela a la reproducción de los FB y, por ende, a la formación de la fibrosis. Estudios en humanos revelan datos similares, evidenciándose sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en piel expuesta a radiación terapéutica o accidental. Se ha observado que los queratinocitos serían los mayores produc-

tores de esta molécula, los que a través de una serie de mediadores extra e intracelulares, que actualmente se investigan, actúa sobre el FB. Mucho se ha avanzado en la investigación de estos procesos moleculares, habiéndose descrito incluso la forma de acción de algunos mediadores entre el TGF- $\beta$ 1 y la consiguiente fibrosis, como el Smad-3<sup>(24)</sup>. Lo importante de estas investigaciones es la posible repercusión clínica que pueda obtenerse. Idealmente estos conocimientos debieran asentar las bases para iniciar tácticas profilácticas y terapéuticas de la fibrosis cutánea en el paciente con cáncer que necesita RT para el manejo de su enfermedad<sup>(9,25)</sup>.

## REFERENCIAS

1. Cox J, Stetz J, Pajak T. Toxicity Criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1995;31:1341-6.
2. Dormand E, Banwell P, Goodacre T. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J* 2005;2:112-27.
3. Ho K, Farnell D, Routledge J, Burns M, Sykes A, Slevin N *et al.* Developing a CTCAEs patient questionnaire for late toxicity after head and neck radiotherapy. *Eur J Cancer* 2009;45:1992-8.
4. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995;35:83-90.
5. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:277-90.
6. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
7. Haydont V, Riser B, Aigueperse J, Vozenin-Brotans M. Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF- $\beta$ 1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1332-C1341.
8. Niemantsverdriet M, de Jong E, Langendijk J, Kampinga H, Coppes R. Synergistic induction of profibrotic PAI-1 by TGF- $\beta$  and radiation depends on p53. *Radiother Oncol* 2010;97:33-5.
9. Anscher M. Targeting the TGF- $\beta$ 1 pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. *Oncologist* 2010;15:350-9.
10. Martin M, Remy J, Daburon F. Abnormal proliferation and aging of cultured fibroblasts from pigs with subcutaneous fibrosis induced by  $\beta$ -irradiation. *J Invest Dermatol* 1989;93:497-500.
11. Delanian S, Martin M, Bravard A, Luccion C, Lefaix J. Abnormal phenotype of human cultured fibroblasts from cutaneous fibrosis induced by therapeutic irradiation. *Radiother Oncol* 1998;47:255-61.
12. Staroslawska E, Czarnocki K, Koziol-Montewka M, Donica H, Magrys A. Effect of infliximab on the levels of TNF- $\beta$  and TGF- $\beta$  in the whole blood cultures of irradiated patients. *Folia Histochem Cyto* 2008;46:291-7.
13. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Amann K, Radespiel-Tröger M, Rödel F, Grabenbauer G. In vivo TGF- $\beta$ 3 expression during wound healing in irradiated tissue. An experimental study. *Strahlenther Onkol* 2003;179:410-6.
14. Wehrhan F, Grabenbauer G, Rödel F, Amann K, Schultze-Mosgau S. Exogenous modulation of TGF- $\beta$ 1 influences TGF- $\beta$  R-III-associated vascularization during wound healing in irradiated tissue. *Strahlenther Onkol* 2004;180:526-33.
15. Kinbara T, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, de Crombrughe B, Takehara K. Transforming growth factor-beta isoforms differently stimulate proalpha2 (I) collagen gene expression during wound healing process in transgenic mice. *J Cell Physiol* 2002;190:375-81.
16. Kuo Y, Wu W, Wang F. Flashlamp pulsed-dye laser suppressed TGF- $\beta$ 1 expression and proliferation in cultured keloid fibroblasts is mediated by MAPK pathway. *Laser Surg Med* 2007;39:358-64.

17. Lee S, Thiele C, Dipl-Ing C. Factors associated with free flap complications after head and neck reconstruction and the molecular basis of fibrotic tissue rearrangement in preirradiated soft tissue. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68:2169-78.
18. Hageman J, Eggen B, Rozema T, Damman K, Kampinga H, Coppes R. Radiation and Transforming Growth Factor- $\beta$  cooperate in transcriptional activation of the profibrotic Plasminogen Activator Inhibitor-1 gene. *Clin Cancer Res* 2005;11:5956-64.
19. Martin M, Vozenin M, Gault N, Crechet F, Pfarr C, Lefaix J. Coactivation of AP-1 activity and TGF- $\beta$ 1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation. *Oncogene* 1997;15:981-9.
20. Randall K, Coggle JL. Long-term expression of transforming growth factor TGF beta 1 in mouse skin after localized beta-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1996;70:351- 60.
21. Mueller C, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Late changes in cutaneous gene expression patterns after adjuvant treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:694-9.
22. Delanian S, Martin M, Lefaix J. TGF $\beta$ 1, collagen I and III gene expression in human skin fibrosis induced by therapeutic irradiation. *Br J Radiol* 1992;65:82- 3.
23. Vozenin-Brotons M, Gault N, Sivan V, Tricaud Y, Dubray B, Clough K *et al.* Histopathological and cellular studies of a case of accidental cutaneous radiation syndrome after chronic exposure to cesium sources. *Radiat Res* 1999;152:332-7.
24. Lee J, Zoumalan R, Valenzuela, Nguyen P, Tutela J, Roman B *et al.* Regulators and mediators of radiation-induced fibrosis: Gene expression profiles and a rationale for Smad3 inhibition. *Otolaryng Head Neck* 2010;143:525-30.
25. Anscher M, Thrasher B, Zgonjanin L, Rabbani L, Corbley M, Fu K *et al.* Small molecular inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  protects against development of radiation-induced lung injury. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2008;71:829-37.

#### **CORRESPONDENCIA**



Dra. Michelle Arroyo Dávila  
 Servicio de Otorrinolaringología  
 Hospital San Juan de Dios  
 Huérfanos 3255, Santiago  
 Fono: 7 668 3204  
 E-mail: michellearroyod@gmail.com