

El IMMUNEPOTENT-CRP induce la fosforilación de eIF2 α , la liberación de DAMPs y la formación de autofagosomas en células HeLa y MCF-7

Alejandra Reyes-Ruiz^a, Karla M. Álvarez-Valadez^a, Kenny M. Calvillo-Rodríguez^a, Alan B. Martínez-Loria^a, Ashanti C. Uscanga-Palomeque^a, Ana C. Martínez-Torres^{a*}, y Cristina Rodríguez-Padilla^a

^aLaboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Ciudad Universitaria, Nuevo León, México.

*ana.carolina.mtz@gmail.com

Palabras clave: IMMUNEPOTENT-CRP, DAMPs, eIF2 α , autofagosomas.

Introducción

El IMMUNEPOTENT-CRP (I-CRP) es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino, el cual, es capaz de modular la respuesta inmune en inflamación, enfermedades infecciosas y cáncer¹. Adicionalmente, el I-CRP induce una muerte celular regulada (MCR) en distintas líneas celulares de cáncer². En cuanto a su mecanismo de citotoxicidad, se sabe que en células de cáncer cervicouterino (HeLa), el I-CRP induce una vía de muerte independiente de caspasas a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)³. Además, en células de melanoma murino (B16F10), el I-CRP es capaz de inducir una liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)⁴. Sin embargo, aún no existen datos concluyentes sobre su mecanismo de acción, lo cual ha limitado su uso como agente antitumoral.

Metodología

Se utilizaron las líneas celulares HeLa (cáncer cervicouterino) y MCF-7 (cáncer de mama). Para medir la muerte celular se marcaron las células con AnexinaV (AnnV, mide la exposición de fosfatidilserina) y yoduro de propidio (PI, evalúa la permeabilidad de la membrana plasmática). El arresto en el ciclo celular fue evaluado con PI. Para determinar el daño en la mitocondria se utilizó el TMRE (el cual es atrapado por la mitocondria cuando ésta conserva su potencial de membrana). La formación de ROS fue medida utilizando DCFDA-AM. Para analizar el papel de las caspasas, ROS y autofagosomas en la muerte, se preincubaron las células con QVD (un inhibidor de caspasas), NAC (un antioxidante) y Spautina-1 (un inhibidor de autofagia) para posteriormente analizar la muerte celular. Para evaluar la exposición de calreticulina (CRT) se utilizó un anticuerpo marcado con fluorocromo (PE) dirigido a CRT. La liberación de ATP y HMBG1 fue evaluada por bioluminiscencia y un kit de ELISA respectivamente. La fosforilación de eIF2 α se evaluó utilizando el anticuerpo primario ANTI-EIF2S1 (PHOSPHO S51) y como anticuerpo secundario Anti-IgG-Alexa-Fluor-488. Por último se evaluó la formación de autofagosomas utilizando cyto-ID.

Resultados y discusión

El I-CRP desencadenó una MCR dosis-dependiente, con una concentración citotóxica hacia el 50% por ciento de las células (CC50) de 1.25 U/mL de I-CRP en HeLa y 1.5 U/mL en MCF-7 después de 24h de tratamiento. Bajo estas mismas condiciones, el I-CRP indujo arresto en la fase G2/M del ciclo celular, daño en la mitocondria y aumento de ROS. Al profundizar en el mecanismo de muerte, demostramos que este no requiere de la activación de

caspasas (indicando ser distinto a la apoptosis⁵), pero dependiente del aumento de los niveles de ROS, conservándose este mecanismo en las dos líneas celulares analizadas.

Adicionalmente, nuestros resultados indican que el I-CRP induce una liberación y/o exposición de DAMPs (CRT, ATP y HMBG1), en células HeLa y MCF-7. Sugiriendo que el I-CRP podría inducir una muerte celular inmunogénica (MCI) en estos modelos, como se observó previamente en melanoma murino⁴. Debido a que todos los inductores de MCI descritos hasta ahora causan estrés en el retículo endoplásmico (RE)⁶, quisimos evaluar si el I-CRP inducía la fosforilación de eIF2 α (principal marcador de estrés en RE⁶). Nuestros resultados muestran que el I-CRP es capaz de desencadenar la fosforilación en eIF2 α en las dos líneas celulares evaluadas.

Finalmente, observamos la formación de vacuolas en las células que habían sido tratadas con I-CRP. Debido a que la formación de autofagosomas se encuentra ligada al estrés en el RE, daño a la mitocondria y formación de ROS⁷, quisimos ahondar en las estructuras observadas, evaluando si estas eran autofagosomas. Encontrando que el I-CRP induce la formación de autofagosomas, los cuales tienen un efecto pro-supervivencia en ambas líneas celulares.

Conclusiones

El I-CRP induce MCR distinta a la apoptosis, la cual requiere de estrés oxidativo para llevarse a cabo, dicha vía involucra un daño en la mitocondria, la fosforilación de eIF2 α y la liberación y/o exposición de DAMPs en células HeLa y MCF-7. Estos resultados nos permiten proponer al I-CRP como un agente que podría trabajar en conjunto con fármacos inductores de una muerte celular dependiente de caspasas (quimioterapia clásica) para atacar a la célula cancerosa con distintas estrategias a la vez.

Agradecimientos

Al LIV de la FCB de la UANL por el apoyo económico y de infraestructura otorgado para este proyecto. A Luis Gómez Morales por sus resultados preliminares. Y a Conacyt por la beca de manutención otorgada a ARR, KMCR, ABML y ACUP.

Referencias

1. Franco-Molina, M. A., et al. *Cytotherapy*. **2008**, 10(5), 490–496.
2. Franco-Molina, M. A., et al. *J Exp Clin Cancer Res*. **2006**, 29(1), 1.
3. Martínez-Torres, A. C., et al. *BMC Cancer*. **2018**, 18(1), 13.
4. Rodríguez-Salazar, M. D. C., et al. *Oncol Lett*. **2017**, 14(1), 844–852.
5. Galluzzi, L., et al. *Cell Death Differ*. **2018**, 1, 690.
6. Krysko, D. V., et al. *Nat Rev Cancer*. **2012**, 12(12), 860.
7. Rashid, H. O., et al. *Autophagy*. **2015**, 11(11), 1956–1977.