

Análisis del mecanismo citotóxico inducido por el IMMUNEPOTENT CRP sobre células HELA

Alejandra Reyes-Ruiz^a, Milena Benítez-Londoño^a, Ana Carolina Martínez-Torres^{a*}, Cristina Rodríguez-Padilla^a

^aLaboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciudad Universitaria, Nuevo León, México. *ana.carolina.mtz@gmail.com

Palabras clave: IMMUNEPOTENT CRP, cáncer cervicouterino, muerte celular.

Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. El cáncer cervicouterino (CaCu) es el tercer tipo de cáncer más común en las mujeres a nivel mundial y el segundo lugar en México¹. La mayoría de las estrategias de tratamiento contra el cáncer buscan inducir la muerte celular de las células cancerosas. Sin embargo, se ha descrito que la muerte celular es un proceso complejo que involucra muy diversas vías de muerte². Por esta razón, para poder aplicar este tipo de terapias es de vital importancia entender el mecanismo llevado a cabo por el tratamiento y así, ayudar a predecir posibles efectos adversos o positivos.

El IMMUNEPOTENT CRP (I-CRP) es un tipo de inmunoterapia pasiva que ha demostrado ser capaz de inducir la muerte celular en líneas tumorales de melanoma, mama, pulmón y cervix^{3,4,5}, además de no ser tóxico para las células normales^{3,5}. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados para entender su mecanismo de acción^{3,4,5,6}, aún se desconoce cómo induce su citotoxicidad. Debido a esto, el presente estudio buscó elucidar el mecanismo de citotoxicidad inducido por el I-CRP la línea celular de CaCu, HeLa.

Parte experimental

Para medir la actividad metabólica de las células se utilizó la técnica de MTT, la cual se basa en la reducción metabólica de sales del MTT en cristales de formazán, permitiendo determinar la viabilidad relativa de las células tratadas a diferentes horas y a distintas concentraciones de I-CRP. Para poder observar las alteraciones morfológicas de las células tratadas con I-CRP se observaron las células tratadas a diferentes tiempos usando un microscopio invertido (40x). Para medir la muerte celular se marcaron las células con anexinaV (AnnV) y yoduro de propidio (PI). La AnnV tiene afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido que usualmente se mantiene en la monocapa lipídica interior, pero cuando una célula sufre apoptosis la fosfatidilserina queda expuesta a la superficie de la célula, funcionando como una señal cómeme para fagocitos y células vecinas, por otro lado la tinción con PI nos permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido (muerte celular). Para analizar la dependencia de caspasas (cisteín proteasas) se preincubaron las células con QVD, un químico que ha demostrado ser capaz de inhibir la actividad de las caspasas⁷ y posteriormente se analizó la muerte celular. Finalmente quisimos determinar si el I-CRP induce la degradación del ADN, por lo que se hizo una medición de la degradación de ADN dentro de las células tratadas con I-CRP durante diferentes tiempos. El etopósido fue usado como control positivo, debido a que induce la muerte y degradación de ADN en distintas líneas tumorales^{8,9}.

Resultados

En el ensayo de MTT, se observó una reducción en la actividad metabólica de las células HeLa, dependiente de tiempo y concentración de I-CRP. Al observar las células tratadas con el microscopio óptico se pudo notar una menor cantidad de células,

una disminución en su tamaño y una vacuolización dentro de ellas. Además las células que fueron tratadas con el I-CRP fueron después despegadas, lavadas y resembradas en medio sin tratamiento para determinar la capacidad de recuperación celular, y se encontró que éstas habían perdido su potencial de recuperación. Se hizo un análisis detallado de la muerte celular (observada con el marcaje AnnV/PI), donde se observó que las células moribundas efectivamente exponen la señal cómeme, fosfatidilserina. Para determinar si este tipo de muerte es dependiente de la actividad de caspasas, se inhibió su actividad con el QVD, observando que el mecanismo de acción del I-CRP no es dependiente de su actividad (contrariamente al etopósido). Finalmente, en la tinción del DNA con PI y se observa un claro aumento en la degradación de ADN a tiempos largos de tratamiento con I-CRP, indicando que este mecanismo de muerte culmina en la degradación de ADN.

Conclusiones

Se logró determinar que el IMMUNEPOTENT CRP reduce la viabilidad en las células HeLa induciendo alteraciones morfológicas, y muerte celular (permeabilidad en la membrana plasmática) regulada (exposición de fosfatidilserina). Además, se observó que, contrariamente a la muerte inducida por el etopósido, el mecanismo de acción del ICRP no es dependiente de caspasas, lo cual es indicativo de que puede inducir una muerte celular distinta a la apoptosis. Finalmente se determinó que esta vía de muerte atípica culmina en la degradación del ADN celular. Este estudio abre las puertas a un análisis más detallado de esta vía de muerte, para poder clasificar el tipo de muerte celular inducida por el I-CRP, y que nos permita determinar si su efecto puede ser potencializado o inhibido en determinadas situaciones celulares.

Agradecimientos

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. A PROMEP por el apoyo DSA/103.5/14/10812 otorgado a ACM-T. A William Velazco por su ayuda técnica.

Referencias

1. Globocan 2012 <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (accesado el 22 de Julio del 2015)
2. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M. et al. *Cell Death Differ* **2012**, *19*(1), 107-120.
3. Franco, M. A.; Mendoza, E.; Miranda, D. et al. *Cytotherap* **2006**, *8*(4), 408-414
4. Franco, M. A.; Mendoza, E.; Zapata, P. et al. *Immunopharm immunot* **2010**, *32*(4), 637-646
5. Martínez, A. C.; Isaza, C. E.; Rodríguez, C. *El IMMUNEPOTENT CRP es citotóxico en células HeLa: Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y su mecanismo de citotoxicidad sobre células HeLa*. 1ra ed.; Editorial académica española, 2011; pp 40-68
6. Franco, M. A.; Mendoza, E.; Miranda, D. F. et al. *Afr. J. Microbiol. Res* **2011**, *5*(22), 3726-3736.
7. Caserta, T. M.; Smith, A. N.; Gultice, A. D.; Reedy, M. A.; Brown, T. L. *Apoptosis* **2003**, *8*(4), 345-352.
8. Barry, M. A.; Reynolds, J. E.; Eastman, A. *Cancer Res* **1993**, *53*(10), 2349-2357.
9. Thomadaki, H.; Tsiapalis, C. M.; Scorilas, A. *Biol Chem* **2005**, *386*(5), 471-480.