

El IMMUNEPOTENT-CRP induce arresto en el ciclo celular y muerte celular regulada independiente de caspasas, pero dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno en células HeLa.

Milena Benítez-Londoño^a, Alejandra Reyes-Ruiz^a, Ana Carolina 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, cáncer cervicouterino, muerte celular regulada.

Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las principales causas de muerte en las mujeres a nivel mundial¹. Las terapias convencionales utilizadas para tratarlo (quimioterapia y radioterapia) presentan numerosos efectos secundarios por su falta de especificidad². Debido a lo anterior, se ha vuelto de gran interés la búsqueda de nuevas terapias que mejoren los tratamientos existentes. El IMMUNEPOTENT CRP (I-CRP) es un dializado de una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular (<12kDa) liberadas por leucocitos de bazo bovino, el cual ha demostrado ser capaz de mejorar la calidad de vida en pacientes con cáncer de mama y pulmón^{3,4}, también se ha demostrado que puede inducir la muerte celular en diversas líneas celulares tumorales^{5,6}, además de no ser tóxico para las células normales^{7,8,9}. Sin embargo, a pesar de los estudios realizados para entender su mecanismo de acción^{5,6,7,9,10}, aún se desconoce cómo ejerce estos efectos y el tipo de muerte celular que activa. Por esto, el presente estudio buscó analizar el mecanismo molecular por el cual el I-CRP induce la muerte en la línea celular de CaCu, HeLa.

Parte experimental

Los experimentos realizados fueron: la comprobación de la actividad citotóxica del I-CRP mediante MTT, utilizando diferentes concentraciones de I-CRP a diferentes tiempos, tinción con azul tripán y marcaje con anexina (AnnV) y yoduro de propidio (PI), para medir la muerte celular y determinar la dosis letal media; el análisis de la morfología en el microscopio invertido (40x) y la medición de la condensación de la cromatina por microscopía de fluorescencia; el análisis del I-CRP sobre el ciclo celular y la presencia de ADN degradado mediante un marcaje con PI; la medición de la activación de las caspasas y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), utilizado el inhibidor de caspasas, QVD, y el antioxidante NAC, respectivamente. El Etopósido fue usado como control positivo, ya que induce apoptosis en distintas líneas celulares tumorales¹¹.

Resultados y discusión

Al tratar las células HeLa con diferentes concentraciones de I-CRP durante distintas horas y hacer los ensayos correspondientes se logró observar una disminución de la actividad metabólica y viabilidad en las células dependiente de la concentración de I-CRP y del tiempo de exposición; lo cual nos permitió determinar el IC₅₀ a 1.25 U/mL de I-CRP para esta línea celular.

Continuando con este estudio se determinó la presencia de cambios morfológicos como la disminución del tamaño celular, y la condensación parcial de la cromatina, características presentes en varios tipos de muerte celular regulada^{12,13}.

El arresto en el ciclo celular se ha observado comúnmente como un primer paso en varios tipos de muerte celular, y por esto se realizó un análisis de éste. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con I-CRP induce un arresto en la fase G2/M a las

16 y 24 horas, indicando que la célula no logró pasar el punto de control que se encuentra en esta fase¹⁶. Este arresto concuerda con los cambios morfológicos presentes en las células tratadas a partir de las 16 horas.

Posteriormente se observó que había una ligera activación de la caspasa-3, la principal caspasa efectora, pero que la muerte celular inducida por el I-CRP es independiente de la actividad de estas proteasas, indicándonos que la muerte celular en cuestión es distinta a la apoptosis¹².

Debido a que las ROS son mensajeros secundarios que juegan un papel activo en diversos tipos de muerte^{14,15}, se buscó determinar si estas moléculas jugaban un papel en la muerte inducida por el I-CRP. Se encontró que efectivamente, el I-CRP induce la producción de ROS y que la muerte celular es dependiente de su formación. La producción de ROS es hasta ahora el primer evento observado y el único efector descrito hasta el momento en la muerte celular inducida por el I-CRP.

Finalmente, se observó que la vía de muerte celular desencadenada por el I-CRP culmina con la degradación del ADN a las 48 y 72 horas, indicando que esta degradación es una consecuencia y no un inductor de la muerte¹².

Conclusiones

En conjunto, nuestros datos indican que el tratamiento con I-CRP en células HeLa induce arresto en el ciclo celular en la fase G2/M y muerte celular dependiente de ROS, pero independiente de caspasas. Estos resultados abren la puerta a más estudios sobre la elucidación del mecanismo molecular desencadenado por el I-CRP, el cual podría trabajar en conjunto con agentes inductores de una muerte celular dependiente de caspasas como la quimioterapia clásica y así atacar a la célula cancerosa mediante diferentes 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 PROMEP por el apoyo DSA/103.5/14/10812 otorgado a ACM-T.

Referencias

1. Globocan 2012 <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (accesado el 22 de Julio del 2015)
2. Follen, Michele, et al. *Cancer*. 98.S9, **2003**: 2044-2051.
3. Franco-Molina, et al. *Cytotherapy*. **2008**, 10(5), 490-496.
4. Lara, H.H.; et al. *Exp Ther Med*. **2010**, 1(3), 425-431.
5. Franco-Molina, et al. *Cytotherapy* 8.4, **2006**: 408-414.
6. Martínez-Torres, et al. 1° ed.; Ed. académica española, **2011**, 40-68
7. Franco-Molina, et al. *Immunopharm immunot*. **2010**, 32(4), 637-646.
8. Franco-Molina, et al. *Afr. J. Microbiol. Res*. 5(22), **2011**, 3726-3736.
9. Coronado-Cerda, et al. *Journal of immunology research* **2016**.
10. Mendoza-Gamboa, E., et al. *Cytotherapy* 10.2, **2008**: 212-219
11. Barry, et al. *Cancer Res*. **1993**, 53(10), 2349-2357.
12. Galluzzi, et al. *Cell Death Differ*. **2015**, 22(1), 58-73.
13. Chaabane, et al. *Arch Immunol Ther Exp*. **2013**, 61(1), 43-58.
14. Dubois, et al., *Oncotarget*. **2016**.
15. Maryanovich, Gross, *Trends Cell Biol*. **2013**, 23(3), 129-134.
16. Kastan, M.B.; Bartek, J. *Nature*. **2004**, 432(7015), 316-323.