

## El Immunepotent-CRP induce apoptosis en células leucémicas Molt-4

Helen Y Lorenzo-Anota<sup>1</sup>, Ana Carolina Martínez-Torres<sup>1\*</sup>, Daniel Scott-Algara<sup>2</sup>, Cristina Rodríguez-Padilla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México.

<sup>2</sup> Unité de Régulation des Infections Rétrovirales, Institute Pasteur, France..

\* ana.martinezto@uanl.edu.mx.

**Palabras clave:** Immunepotent-CRP, Inmunoterapia, Leucemia, Muerte Celular, Apoptosis

### Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la causa de mortalidad más común relacionada con cáncer en infantes, y el mecanismo para la progresión maligna se debe a la evasión del sistema inmunológico (SI).<sup>1</sup> Actualmente, la mayoría de los tratamientos antitumorales son inespecíficos, y por lo general causan daños importantes en el SI de los pacientes. Las inmunoterapias son tratamientos que hacen uso del SI del paciente para combatir múltiples enfermedades como infecciones bacterianas, como la tuberculosis; enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide; inmunodeficiencias como el VIH, y recientemente, se han utilizado como terapia adyuvante en distintos tipos de cáncer.<sup>2</sup> El IMMUNEPOTENT-CRP (I-CRP) es un tipo de inmunoterapia, desarrollada en el Laboratorio de Inmunología y Virología, con actividad antitumoral en distintos tipos de células cancerosas.<sup>3</sup> También, demostró tener efecto quimioprotector e inmunomodulador en distintas poblaciones de células del SI.<sup>4,5</sup> Por ello, se cree que el I-CRP puede tener efectos potenciadores sobre las diferentes poblaciones de linfocitos sanos y al mismo tiempo poseer efecto citotóxico importante en linfocitos tumorales. El objetivo de esta investigación fue analizar el efecto del I-CRP sobre la viabilidad de linfocitos sanos y tumorales.

### Metodología

La viabilidad de linfocitos sanos y tumorales se evaluó por citometría de flujo analizando actividad esterasa con el marcador Calceína-AM. Para ello, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos, y la línea celular Molt-4 como modelo de leucemia linfocítica aguda-T (T-ALL). La muerte celular en linfocitos tumorales se realizó mediante citometría de flujo analizando la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática. Para analizar el mecanismo de muerte celular regulada (MCR), se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), usando al NAC como inhibidor. El daño nuclear se determinó con el análisis de  $\gamma$ -H2AX, p53, ciclo celular y degradación del ADN; y el daño mitocondrial se determinó mediante la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Finalmente, se analizaron características bioquímicas de apoptosis; modulación del radio Bax y Bcl-2, activación de caspasa-3, y la implicación de las caspasas iniciadoras 8 y 9, y la principal caspasa efectora 3 en el mecanismo de MCR.

### Resultados y discusión

El I-CRP no afecta la viabilidad de PBMC y de linfocitos sanos; sin embargo, induce citotoxicidad selectiva de manera dependiente de tiempo y dosis en células Molt-4. Indicando, que

el I-CRP posee efecto antitumoral selectivo en líneas celulares leucémicas, independiente del linaje celular. El análisis del mecanismo de MCR en células leucémicas Molt-4 inducido por el I-CRP demostró que genera daño en el ADN ( $\gamma$ -H2Ax), incluyendo la sobreexpresión de la proteína p53 para reparación del daño, que conlleva arresto del ciclo celular en la fase G2, daño que finalmente conduce a la degradación del ADN. Además, el I-CRP genera la producción de ROS, moléculas que pueden ser inhibidas en presencia del antioxidante NAC. El aumento de ROS intracelular conduce a un daño mitocondrial (pérdida del potencial de membrana mitocondrial), generando la modulación de proteínas pro y anti-apoptóticas (Bax y Bcl-2); de igual forma, las ROS activan a la principal caspasa efectora (caspasa-3), induciendo apoptosis intrínseca y extrínseca, dependiente de ROS en células leucémicas Molt-4. Los resultados difieren con lo propuesto en células de cáncer cervical (HeLa), por Martínez-Torres y colaboradores en 2018, en donde se demostró que el I-CRP induce un mecanismo es independiente de caspasas; sin embargo, se comparten características bioquímicas como la degradación del ADN, el arresto del ciclo celular, la producción de ROS, y el daño mitocondrial.

### Conclusiones

Nuestros resultados muestran que la MCR inducida por el I-CRP es apoptosis en la línea celular de T-ALL (Molt-4), sin afectar PBMC y linfocitos sanos. Esta investigación abre la puerta para evaluar detalladamente su función en el mecanismo de muerte celular en células tumorales en conjunto con otras terapias; y entender el funcionamiento inmunoregulador en linfocitos sanos para potenciar su aplicación en distintas patologías asociadas al SI.

### Agradecimientos

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL por la infraestructura y el apoyo económico. ACMT y CRP agradecen a CONACYT, por el apoyo económico otorgado y HYL A agradece a CONACYT por la beca nacional 745665. A Keila Abigail Palacios Castro por los resultados preliminares y ayuda técnica.

### Referencias

1. Terwilliger, T., and M. Abdul-Hay. 2017. Blood cancer journal 7(6): e577.
2. M. A. Franco-Molina, E. et al. 2008. Cytotherapy 10(5): 490-96.
3. Franco-Molina, M. A. et al. 2006. Cytotherapy 8(4): 408-14.
4. Coronado-Cerda, Erika Evangelina et al. 2016. Journal of Immunology Research 2016.
5. Rodríguez-Salazar, Maria Del Carmen et al. 2017. Oncology Letters 14(1): 844-5.