

El IMMUNEPOTENT CRP disminuye la viabilidad en células A427 de cáncer pulmonar

Alan Martínez-Loria^a, Luis Gómez-Morales^a, Ana 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: cáncer, IMMUNEPOTENT CRP, viabilidad relativa, muerte celular, ciclo celular

Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una división descontrolada y deficiencias en la muerte celular¹, siendo éstas el motivo del 13% de muertes en México, del cual el 9% son ocasionadas por cáncer pulmonar². En la actualidad existen diversos tratamientos en contra de este conjunto de enfermedades; como la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia¹. Entre las inmunoterapias se encuentra el I-CRP (IMMUNEPOTENT CRP, moléculas menores de 12kDa obtenidas del extracto dializable de leucocitos bovinos), el cual es utilizado como adyuvante para mejorar la calidad de vida de pacientes que reciben quimioterapia y radioterapia³. Además, se ha comprobado que por sí mismo presenta actividad citotóxica en células de cáncer cervicouterino⁴, mama⁵, y melanoma⁶. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos para entender su mecanismo de acción, éste aún es desconocido. Por esta razón, en este trabajo se evaluó, a múltiples niveles, la citotoxicidad inducida por el I-CRP sobre la línea de cáncer pulmonar A427.

Parte experimental

En todos los experimentos se utilizó la línea celular A427, de adenocarcinoma pulmonar. Como control negativo se usaron células sin tratamiento, y como control positivo células tratadas con etopósido (150µM, 24h). Se comprobó por triplicado la viabilidad relativa mediante la técnica de MTT en células tratadas por 24h a diversas concentraciones (unidades, U) de I-CRP. La muerte celular se determinó por quintuplicado mediante el análisis en citometría de flujo utilizando el marcaje de Anexina-V (Ann) y yoduro de propidio (PI), para medir la exposición de fosfatidilserina y la integridad de la membrana plasmática respectivamente. Además, se realizó un análisis morfológico por microscopía óptica después del tratamiento con I-CRP, para determinar las características de las células moribundas. Finalmente, los efectos en la progresión del ciclo celular fueron observados por citometría de flujo, mediante el marcaje con PI en células control y tratadas con I-CRP.

Resultados y discusión

La administración de I-CRP sobre la línea celular A427 tiene un efecto dosis-dependiente, ya que induce una reducción de la actividad celular (ensayo MTT) del 20% al administrar 0.75U/mL, del 50% a 1.25U/mL, y cerca del 80% a 1.75U/mL. Teniendo en cuenta que el ensayo de MTT determina el porcentaje de células que conservan la capacidad de metabolizar el reactivo MTT, con este ensayo sólo se determina si existe una reducción en la actividad celular, mas no si se induce muerte celular. Esto debido a que las células pueden perder su capacidad metabólica no sólo al morir, sino también al provocar un arresto en el ciclo celular⁷. Para verdaderamente identificar una muerte celular se realizó un ensayo de Ann/PI, en el cual se observaron 35%, 50% y 85% de muerte celular a

las concentraciones de 1.25U, 1.5U y 1.75U/mL respectivamente, indicando que efectivamente el I-CRP induce muerte celular en células A427. Además, el análisis morfológico muestra una menor cantidad de células y una disminución en su tamaño. Es destacable que existe una diferencia entre los IC⁵⁰ obtenidos por MTT y por citometría de flujo, siendo necesaria una concentración mayor de I-CRP para inducir la muerte que para reducir la viabilidad. Debido a lo anterior, se realizó un análisis del ciclo celular a una concentración de 1.25U/mL para encontrar el motivo de esta diferencia. Estos análisis muestran que existe una mayor cantidad de células en fase G2/M del ciclo celular en las células tratadas con I-CRP, indicando un arresto en la división celular además de la muerte celular inducida.

Conclusiones

En este estudio se demuestra que el I-CRP no sólo es capaz de actuar como adyuvante de tratamientos contra el cáncer, también reduce la viabilidad de forma dosis dependiente en células de cáncer pulmonar, mediante la inducción del arresto en el ciclo celular y la muerte celular. Estos parámetros se reflejan directamente en cambios morfológicos de las células tratadas.

Agradecimientos

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

Referencias

1. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/> (accesado el 24 de marzo del 2015).
2. Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., & Torrecillas-Torres, L. Erazo-VA. **2012**, 11, 371-379.
3. Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Zapata-Benavides, P., Vera-García, M. E., Castillo-Tello, P., García de la Fuente, A., Mendozac R., Garzab R., Tamez-Guerra R., Rodríguez-Padilla, C. *Cytotherapy*. **2008**, 10(5), 490-496.
4. Martínez-Torres, A. C. *Estudios bioquímicos del IMMUNEPOTENT CRP y de su mecanismo de citotoxicidad en células HeLa*; Editorial Academia Española: México, 2011.
5. Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Miranda-Hernández, D., Zapata-Benavides, P., Castillo-León, L., Isaza-Brando, C., Tamez-Guerra R., Rodríguez-Padilla, C. *Cytotherapy*. **2006**, 8(4), 408-414.
6. Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., Isaza-Brando, C. E., Zamora-Avila, D., Rivera-Morales L. D., Miranda-Hernández D. F., Sierra-Rivera C. A., Vera-García M. E., Tamez-Guerra R. S., Rodríguez-Padilla, C. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. **2010**, 32(4), 637-646.
7. Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., & Leitman, D. C. *Cancer research*. **2004**, 64(1), 423-428.