

EFECTO DEL TAXOL SOBRE LA AUTOFAGIA EN CÉLULAS TUMORALES DE COLON

Taxol Effect in Autophagy of Colon Cancer Cells

Ana María MATEOS TEMPRANO; Rogelio GONZÁLEZ SARMIENTO

Centro de Investigación del Cáncer (CIC), laboratorio 14. Campus Miguel de Unamuno. Salamanca

Correo electrónico: anamariamateostemprano@gmail.com

RESUMEN: El paclitaxel es un fármaco antitumoral utilizado en el tratamiento de cáncer de ovario, mama, no microcítico de pulmón y sarcoma de Kaposi asociado al SIDA. Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la subunidad β -tubulina en el microtúbulo, disminuyendo su despolimerización y estabilizándolos; deteniendo el ciclo celular en la fase G2/M conduciendo a la apoptosis.

Por otro lado, la autofagia, donde tienen gran importancia los microtúbulos, es un conjunto de procesos catabólicos cruciales para el mantenimiento de la viabilidad celular; pero también supone una ruta de muerte celular programada. Con este trabajo se pretende estudiar la citotoxicidad de este fármaco, así como su efecto sobre 6 proteínas relacionadas con la autofagia: P62, PKC ζ , mTOR, TRAF6, LC3 y Beclin 1; sobre dos líneas celulares de cáncer de colon: HT29 y HCT-116. Las técnicas utilizadas fueron los ensayos MTT y Western Blot. Nuestros resultados indican que el paclitaxel inhibe el crecimiento de ambas líneas a 10nM; y aumenta la expresión de las proteínas Beclin 1, LC3-II y p62, que nos indica una inducción de la autofagia, y su posterior bloqueo en el paso de formación del autolisosoma. En conclusión, se puede afirmar que el paclitaxel bloquea la autofagia.

Palabras clave: paclitaxel; cáncer; colon; autofagia; p62; LC3-II; Beclin 1.

ABSTRACT: Paclitaxel is an anticancer drug used in the treatment of ovarian, breast, non small cell lung, and Kaposi's sarcoma associated with AIDS. Its mechanism of action is based on blocking β -tubulin subunit of microtubules, decreasing depolymerisation and stabilizing them; stopping the cell cycle at the G2 / M phase leading to apoptosis.

Furthermore, the autophagy, in which process microtubules are very important, is a set of catabolic processes crucial for the maintenance of cell viability; but also is a programmed cell death. The target of this article is to study the drug cytotoxicity and its effect on 6 autophagy related proteins: P62, PKC ζ , mTOR, TRAF6, LC3 and Beclin 1; on two colon cancer cell lines: HT29 and HCT-116. The techniques used were the MTT and Western Blot tests. Our results indicate that paclitaxel inhibits the growth of both lines at 10 nM; and increases the expression of Beclin 1, LC3-II and p62 proteins, which indicates an induction of autophagy, and a later block of autolysosoma. In conclusion, we can say that paclitaxel blocks autophagy.

Key words: paclitaxel; cáncer; colon; autophagy; p62; LC3-II; Beclin 1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Papel de la autofagia en el cáncer*

La autofagia es un conjunto de procesos catabólicos específicos, cruciales para el mantenimiento de la viabilidad celular y la homeostasis en respuesta a condiciones estresantes (Jiang *et al.*, 2015); pero también supone una ruta de muerte celular programada (Xi *et al.*, 2011).

El papel de la autofagia en la carcinogénesis es controvertido y depende del tipo de tumor y su fase: en fases iniciales puede evitar la formación del tumor y su progresión; en fases avanzadas actuará como un mecanismo de defensa que promueve la supervivencia de las células cancerosas y el desarrollo de resistencias frente a la quimioterapia (Peña-Sanoja, De Sanctis, 2013). Así, la modificación adecuada de la autofagia podría aumentar la citotoxicidad del tratamiento anti-tumoral (Galluzzi *et al.*, 2015).

1.2. *Paclitaxel*

Anticanceroso descubierto en 1968 en extractos del *Taxus brevifolia* (Nutt.) (Barbuti, Chen, 2015). Actualmente es utilizado en el tratamiento de cáncer de

ovario, mama, no microcítico de pulmón y sarcoma de Kaposi asociado al SIDA (Ficha técnica Paclitaxel).

Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la subunidad β -tubulina en el interior del microtúbulo, disminuyendo la despolimerización de la tubulina y estabilizando los microtúbulos; detiene el ciclo celular en la fase G2/M conduciendo a la apoptosis celular (Barbuti, Chen, 2015).

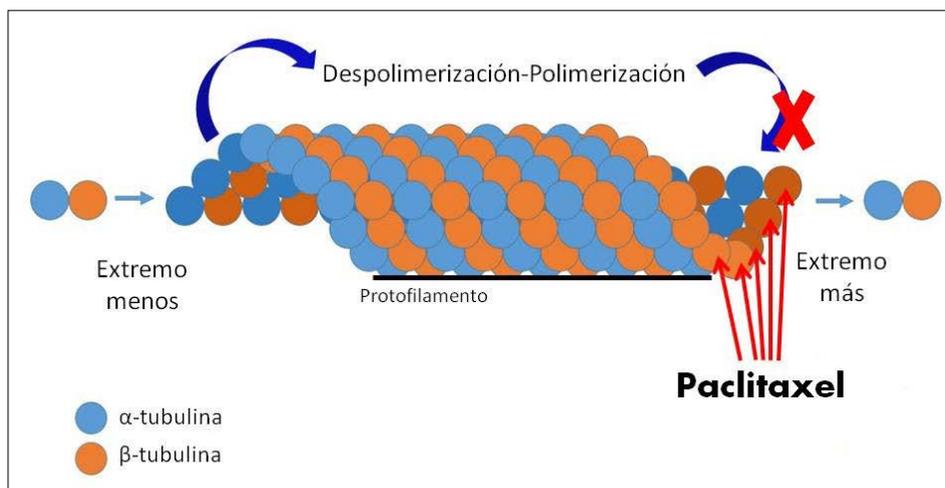


FIGURA 1: Mecanismo de acción de paclitaxel.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis es que el tratamiento de las líneas celulares de cáncer de colon HT29 y HCT116 con paclitaxel induciría un aumento de la autofagia celular.

Así, los objetivos planteados fueron:

- Estudiar la citotoxicidad del paclitaxel sobre ambas líneas, observando la concentración mínima a la que es capaz de inhibir el crecimiento celular.
- Evaluar la expresión de seis proteínas relacionadas con la autofagia: P62, PKC ζ , mTOR, TRAF6, LC3 y Beclin 1 tras el tratamiento con paclitaxel.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Cultivos celulares*

Realizamos los cultivos celulares a partir de dos líneas celulares: la línea HCT116, procedente de tejido epitelial de colon humano asociado a carcinoma colorrectal; y la línea HT29, procedente de tejido epitelial de colon humano asociado a adenocarcinoma colorrectal. Fueron cultivadas en medio DMEM, suplementado con antibióticos (penicilina, estreptomycin) y 10% FBS, y en condiciones de 37°C y 5% CO₂.

3.2. *Ensayo MTT*

- Fundamento teórico:

Ensayo de viabilidad celular colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT, una sal de tetrazolio amarilla, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en la célula metabólicamente activa (Mosmann, 1983).

Se origina un compuesto hidrofóbico denominado formazán, de color azul-violeta, que es soluble en DMSO. Su absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Mosmann, 1983).

- Procedimiento:

Se realizó un ensayo MTT por cada línea celular.

Cada ensayo se realizó en 4 placas de 24 pocillos, una por tiempo: 0h, 24h, 48h y 72h. Se estudiaron 6 concentraciones de paclitaxel: 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 35 nM y 50 nM a cada tiempo, y por triplicado (3 pocillos). En los 6 pocillos restantes, se situaron el blanco y el control negativo.

Se partió de una concentración de 10.000 células por pocillo (10.000 cel/mL de cultivo). Las placas se sembraron y se dejaron una noche en el incubador a 37 °C.

Posteriormente, se prepararon las diluciones de fármaco (en 10 mL de medio) y se añadieron en los correspondientes pocillos: excepto en los 6 primeros y en la placa de las 0 h.

Transcurrido el tiempo necesario, se añadió 110 µL de MTT diluido en PBS en cada pocillo, excepto en los 3 primeros (blanco). Se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C, se aspiró el sobrenadante, dejando en el fondo del pocillo los cristales de formazán, y se añadió 1 mL de DMSO por pocillo, diluyendo los cristales.

Se midió la absorbancia a 560 nm mediante un detector de microplacas UltraE-volution (Tecan®), que trasladó los datos al software Xflour 4®.

3.3. *Western Blot*

- Fundamento teórico:

Inmunoensayo que detecta proteínas específicas dentro de una muestra, pudiendo estimar su tamaño, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteínas entre muestras. Esta especificidad se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína en estudio (Towbin *et al.*, 1979).

- Procedimiento:

Se analizó la expresión de seis proteínas: p62, PKC ζ , mTOR, TRAF6, LC3 y Beclin1. Para ello, previamente se trataron ambas líneas celulares (HT29 y HCT 116) con paclitaxel 10 nM a tiempo 0h, 24h, 48h y 72h.

- Extracción, cuantificación y preparación de proteínas

Se extrajeron las proteínas incubando el precipitado celular (obtenido de la centrifugación de las muestras) en un buffer de lisis al que se añadieron inhibidores de proteasas durante 1h en frío y agitación. Los extractos celulares se centrifugaron 10 minutos en frío y se recogieron los sobrenadantes, que contenían la mezcla de proteínas.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el software Nanodrop®, calculándose los mL necesarios para utilizar siempre la misma cantidad de proteínas, en nuestro caso 200 μ g.

La preparación de las muestras se llevó a cabo mezclando el correspondiente volumen de proteínas con 2 μ L de tampón de lisis, dejándose 5 minutos en un baño seco a 100 °C. Con este proceso desnaturalizamos las proteínas hasta su estructura secundaria, posibilitando la posterior unión de los anticuerpos a sus epítipos.

- Electroforesis y transferencia

Las proteínas se separaron mediante una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida a 150V durante una hora aproximadamente, junto a un marcador para poder identificarlas.

Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF utilizando un sistema de transferencia semi-húmeda.

- Bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado

Tras la transferencia, se bloquearon las membranas con una solución de leche en polvo al 5% en TBST durante una hora, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primario y/o secundario.

Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico de la proteína de interés durante una noche en agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados con TBST para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se incubaron de nuevo con el anticuerpo secundario HRP-conjugado (peroxidasa) correspondiente.

A continuación, y tras tres lavados con TBST, se llevó a cabo el revelado mediante una reacción de quimioluminiscencia que queda reflejada en una película fotosensible. Se expone la membrana a una mezcla de luminol y peróxido de hidrógeno: allí donde el anticuerpo secundario haya hibridado, la peroxidasa oxidará el luminol y quedará reflejado como una banda oscura en la película.

- Proteína control

Es necesaria una proteína control para cerciorarnos de la correcta carga de las muestras y de que todas ellas tengan la misma cantidad de proteína: así el aumento o disminución de su expresión solo será debido al resultado del tratamiento.

En nuestro caso se utilizó la β -Actina. Se llevó a cabo el mismo procedimiento sobre las mismas membranas, pero con los anticuerpos correspondientes a β -actina, y se revelaron.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. *Ensayo MTT*

A partir de los datos de absorbancia obtenidos, se calculó el porcentaje de supervivencia celular.

Como se observa, en las células control existe un crecimiento exponencial con el tiempo; mientras que en las muestras tratadas, el crecimiento se detiene y llega a disminuir claramente (concentraciones 20nM, 35nM y 50nM) en ambas líneas.

La concentración mínima a la que el fármaco es capaz de inhibir el crecimiento en ambas líneas es 10nM, pues es la primera concentración con la que el crecimiento celular disminuye a las 72h respecto al control. Este resultado es más evidente en la línea HT29. En la línea HCT116 parece que a 5nM empieza a disminuir el crecimiento, pero en otros estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que la concentración mínima, también para esta línea, es 10nM.

Esta fue la concentración de paclitaxel utilizada para la detección de proteínas específicas de autofagia.

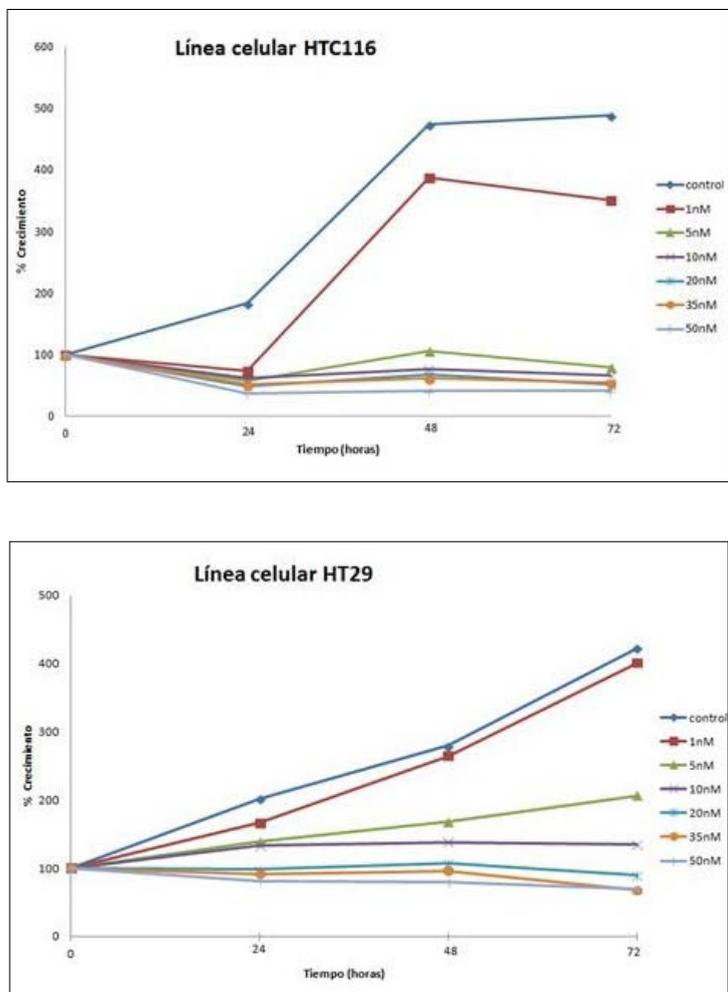


FIGURA 2: Evolución temporal del crecimiento celular de las líneas HTC116 y HT29 a distintas concentraciones de paclitaxel.

4.2. Western Blot

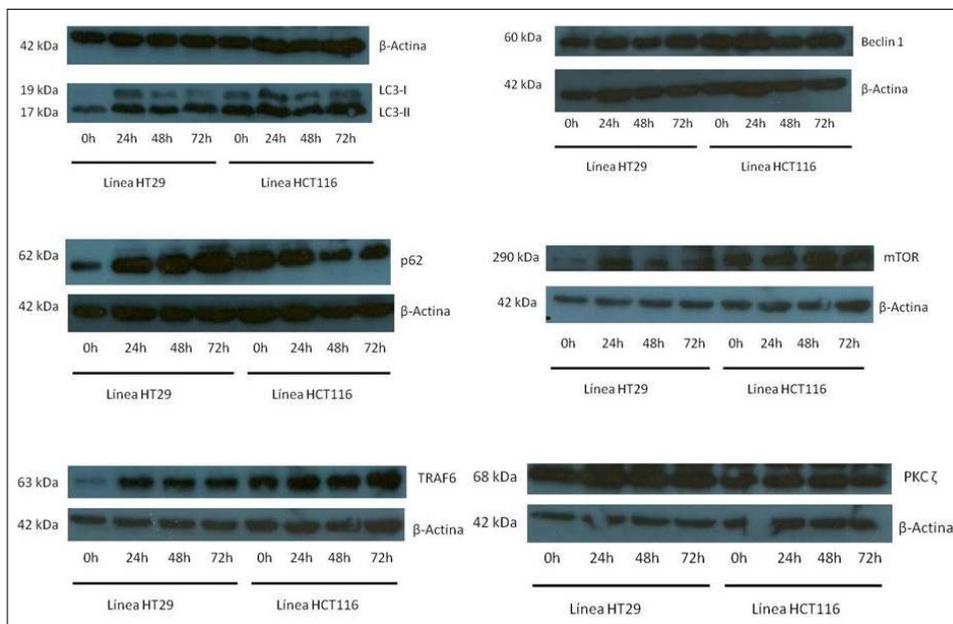


FIGURA 3: Revelado Western Blot de las proteínas p62, PKC ζ , mTOR, TRAF6, LC3 y Beclin1 de ambas líneas celulares tratadas con paclitaxel a diferentes tiempos.

• Proteína LC3

La proteína LC3 tiene dos isoformas: la forma citosólica (LC3-I), se conjuga con fosfatidiletanolamina, dando lugar a LC3-II, que se deposita en la membrana del autofagosoma y resulta esencial para su formación. Por ello, LC3 es considerada un marcador principal de autofagia (Xi *et al.*, 2011).

En nuestros resultados, se muestra un aumento de expresión de LC3-II a medida que aumenta el tiempo de exposición al fármaco, más evidente en la línea HT29. Esto indica la formación del autofagosoma, y por tanto, que se está produciendo la autofagia. A 24h, la expresión de LC3-I aumenta en ambas líneas, y luego disminuye: se está formando el autofagosoma; por lo que la expresión de LC3-II aumenta.

• Proteína Beclin 1

Beclin 1 tiene un papel central en la autofagia: interviene en la formación del autofagosoma, siendo fundamental en la formación del complejo responsable de

la nucleación de la vesícula autofágica. Un aumento en su expresión es indicativo de un aumento en la autofagia (Sinha, Levine, 2009).

Aunque mínimamente, se puede observar un aumento de expresión de Beclin 1 en ambas líneas, sobre todo a 72h de exposición, lo que indica un aumento de la autofagia.

- Proteína p62

Su importancia radica en sus múltiples dominios de interacción proteína-proteína: interviene en la regulación de múltiples procesos celulares. En concreto, se une tanto a proteínas dañadas y agregados de poliubiquitina, por oligomerización; como a LC3 en la membrana del autofagosoma, induciendo la formación del autolisosoma (Mathew *et al.*, 2009). Así, p62 se degrada cuando la autofagia se induce; y cuando p62 aumenta, la autofagia no se está produciendo.

En nuestros resultados, la proteína p62 se acumula en ambas líneas. En la línea HT29 se aprecia bien que a 0h prácticamente no existe proteína, y que esta se acumula a medida que aumenta el tiempo de exposición. Esto indica que no se está llevando a cabo la formación del autolisosoma, porque la proteína p62 no se está degradando.

- Proteína mTOR:

Este regulador del crecimiento celular es una proteína-quinasa que forma parte de una cascada de inhibición de la autofagia, impidiendo la formación del autofagosoma (Barbuti, Chen, 2015). Constitutivamente, mTOR activa una cadena de fosforilación que mantiene inhibida la autofagia; y cuando esta proteína es inactivada, la señal de inhibición desaparece y se forma el autofagosoma (Nguyen *et al.*, 2004).

A pesar de que nuestros resultados en la línea HT29 no son concluyentes; se observa que en la línea HCT116 no se producen cambios en la expresión de mTOR, lo que indicaría que la autofagia que se produce no está mediada por la inhibición de mTOR.

- Proteína TRAF6

TRAF6 interviene, entre otros procesos, en la cascada de inhibición de mTOR, junto con p62, por la cual se induce la autofagia (Linares *et al.*, 2013). Así, junto con p62, su expresión puede interpretarse como presencia de autofagia.

Observamos, en ambas líneas, una expresión sostenida de la proteína con la exposición al fármaco, lo que nos indica que está sucediendo la autofagia. Es relevante mencionar la diferencia a las 0h: en la línea HT29 no observamos expresión;

sin embargo en la línea HCT116 sí, por lo que podemos pensar que aquí también se está produciendo, aunque parece que en menor grado.

- Proteína PKC ζ :

Isoforma atípica de la proteína kinasa C que se une a un dominio específico de p62 y está presente en la cascada de activación del factor de transcripción NF- κ B, importante factor anti-apoptótico desregulado en células cancerosas. En la autofagia, se une a p62 para la formación del autolisosoma (Moscato, Diaz-Meco, 2009).

En nuestros resultados podemos observar que la expresión de PKC ζ no se modifica. La proteína no está siendo degradada porque no se está produciendo la formación del autolisosoma, lo que concuerda con los resultados obtenidos para la proteína p62.

Pensamos que, en presencia de paclitaxel, la autofagia se está produciendo, pero sufre un bloqueo a nivel de la formación del autolisosoma: el aumento de la proteína LC3-II indica la formación del autofagosoma; pero la acumulación de p62 indica que el autolisosoma no se está formando. Este resultado era esperable: el paclitaxel es un inhibidor de microtúbulos y, en la autofagia, los microtúbulos tienen mayor participación en la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Por tanto, con la polimerización de los microtúbulos inhibida, no se está llevando a cabo esta fusión y el autolisosoma no se está formando.

5. CONCLUSIONES

Se puede concluir que:

- El paclitaxel disminuye el crecimiento celular a concentraciones 10nM y superiores.
- Se aumenta la expresión de las proteínas Beclin 1, LC3-II y p62, que nos indica una inducción de la autofagia, y su posterior bloqueo en el paso de formación del autolisosoma.

Siguiendo esta línea, se podría fácilmente comprobar este resultado mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Así se podría dilucidar si este bloqueo que se produce en la autofagia contribuye al efecto citotóxico del paclitaxel.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ATCC®. LGC Standars [base de datos en Internet] 2014. [Actualizada en ¿?; acceso el 7 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.lgcstandards-atcc.org/>.
- Barbuti A, Chen Z. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy. *Cancers*. 2015; 7(4):2360-2371.
- Ficha técnica de Paclitaxel. Centro Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS – CIMA [base de datos en Internet] Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios [fecha de acceso: 13 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>.
- Galluzzi F *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*. 2015; 34(4):856-880.
- Jiang X, Overholtzer M, Thompson C. Autophagy in cellular metabolism and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2015; 125(1):47-54.
- Linares J, Duran A, Pasparakis M, Moscat J, Diaz-Meco M. K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. *Molecular cell*. 2013; 51(3):283-296.
- Mathew R, Karp C, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, DiPaola R, Karantza-Wadsworth V, Wuite E. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009; 137(6):1062-1075
- Moscat J, Diaz-Meco M. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis and cancer. *Cell*. 2009; 137(6):1001-1004.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.
- Nguyen D, Chen G, Reddy R, Tsai W, Schrupp W, Cole G, Schrupp D. Potentiation of paclitaxel cytotoxicity in lung and esophageal cancer cells by pharmacologic inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt)-mediated signaling pathway. *The journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2004; 127(2):365-375.
- Peña-Sanoja M, De Sanctis J. Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investigación clínica*. 2013; 54(3):1-13.
- Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*. 2009; 27(1):137-148.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1979; 76(9):4350-4354.
- Xi G, Hu X, Wub B, Jiang H, Young C, Pang Y, Yuan H. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters*. 2011; 307:141-148.

