

Estudio de los Efectos Apoptóticos de Anticuerpos Sobre Líneas Tumores

¹College of Arts and Sciences, MCPHS University
²Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Dinámica celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa 62209, Cuernavaca, Mor. duncker@uaem.mx

Abstract

Las células cancerosas a menudo sobreexpresan ciertos gangliósidos ricos en ácido siálico, contribuyendo a su naturaleza agresiva y a la capacidad de hacer metástasis en todo el cuerpo. Sin embargo, esta característica particular puede ser aprovechada con el fin de identificar blancos terapéuticos y tratar el cáncer potencialmente con inmunoterapias específicas para el tipo de antígenos gangliósidos presentes. Nuestro estudio se centra en el estudio del perfil de expresión de los gangliósidos GD3, GD2, GD1b y GT1b en la línea celular MOLT-4, una leucemia linfoblástica aguda. Se determinó que los AI observar la expresión de estos diversos gangliósidos en el transcurso de varios días, esperamos identificar determinados días de cultivo cuando las altas cantidades de cualquiera de estos cuatro gangliósidos aparecen con el fin de inducir la apoptosis a través de tratamiento con anticuerpos.

Metodología

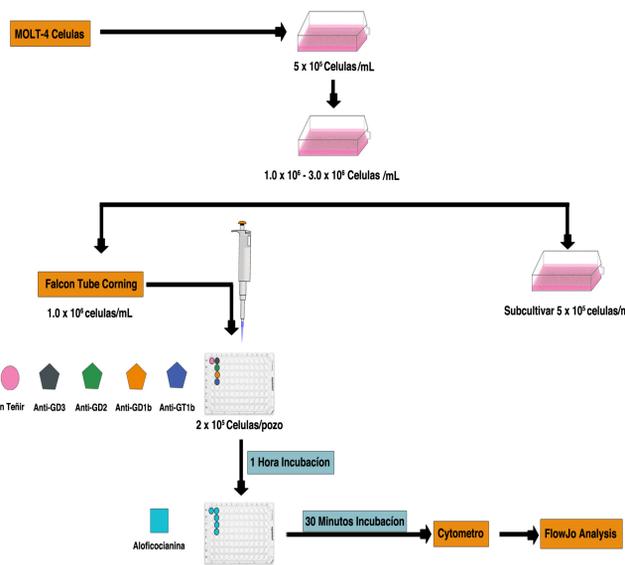


Figura 2: Proceso de mantenimiento y pruebas de células MOLT-4 usando inmunocitoquímica.

Resultados

MOLT-4 Células Día 5

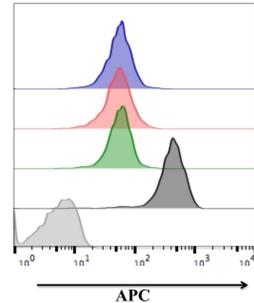


Figura 5: Histogramas de la expresión gangliósidos en MOLT-4 células en el día 5.

Sample Name	Subset Name	Count	Geometric Mean : FL4-H
MOLT DIA 5 GT18.001	Lymphocytes	2619	53.4
MOLT DIA 5 GD2.001	Lymphocytes	2674	51.6
MOLT DIA 5 GD3.001	Lymphocytes	2389	54.4
MOLT DIA 5 ST.001	Lymphocytes	2838	36.1
MOLT DIA 5 ST.001	Lymphocytes	3122	5.18

MOLT-4 Células Día 6

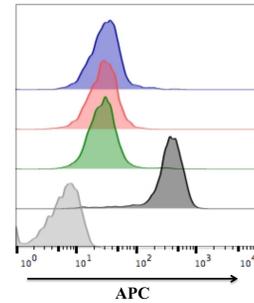


Figura 6: Histogramas de la expresión gangliósidos en MOLT-4 células en el día 6.

Sample Name	Subset Name	Count	Geometric Mean : FL4-H
MOLT DIA 6 GT18.001	Lymphocytes	4485	30.1
MOLT DIA 6 GD2.001	Lymphocytes	4298	27.9
MOLT DIA 6 GD3.001	Lymphocytes	3860	30.9
MOLT DIA 6 ST.001	Lymphocytes	4510	6.00

Metodología

- Las células MOLT-4 fueron cultivadas en medio RPMI advanced 3 % de SFB, 1 % de Penicilina, estreptomocina en una densidad celular de 5×10^5 células/mL.
- Se utilizaron aproximadamente 2.0×10^5 células/pozo para el análisis por citofluorometría de flujo.
- Previo a la inmunotinción, las células fueron fijadas con p-formaldehído al 4 %.
- Las células se incubaron en anticuerpos primarios durante una hora a 4 °C con 50 µL de buffer PBSx1 con 2% del Suero humano, 0.5% de BSA. Las células fueron lavadas dos veces con el mismo buffer. Los anticuerpos primarios fueron utilizados a las siguientes concentraciones:

anti-GD3 (R-24) a 5 µg /mL,
 anti-GD2 (14G2a) a 2,5 µg/mL,
 anti-GD1b (A2508) a 2,5 µg/mL,
 anti-GT1b (mab5608) a 2,5 µg/mL.

- Las células se incubaron con anticuerpo secundario durante una 30 min. a 4 °C como se describe en el punto 3. Para los anticuerpos secundarios se utilizó un anti IgG (ratón) acoplado a APC (Allofococianina) en una dilución 1: 4000. Las células se resuspendieron en 100 µL de p-formaldehído al 4 % y fueron analizadas por citofluorometría de flujo en un Facs scalibur, BD.

Para el ensayo de apoptosis:

- Las células fueron sembradas en una caja de 96 pozos a una densidad celular de 1×10^5 células/100 µL de medio de cultivo.
- Se adicionaron los respectivos anticuerpos a una concentración final de 2.5 µg/mL y se incubaron 24 h. Como control de muerte se utilizó dexametazona (300 µg/mL).
- Las células fueron analizadas con un kit de anexina-APC (e-Bioscience). El medio fue removido y cada pozo de células se lavó con 100 µL de buffer 1X.
- Se adicionaron 2.5 µL de Anexina-APC por pozo de células y se incubaron 15 min. a TA.
- Las células fueron lavadas dos veces con buffer 1X y previo al análisis por citofluorometría de flujo se adicionó 1 µL de yoduro de propidio (1mg/mL, SIGMA) por pozo.

Referencias

Cheresh, D. A., Honsik, C. J., Staffileno, L. K., Jung, G., & Reisfeld, R. A. (1985). Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(15), 5155-5159. doi:10.1073/pnas.82.15.5155

Cummings, V. A. (Ed.). (2009). Chapter 6 Biological Roles of Glycans. In J. Esko (Ed.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Immunotherapy - American Cancer Society. (n.d.). Retrieved July 10, 2016, from <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy-toe>

HEADER: <http://www.artofthecell.com/tag/nucleus-accumbens>

* <http://physrev.physiology.org/content/94/2/461>

Resultados

Nuestros resultados indican que los gangliósidos GD3, GD2, GD1b, y GT1b oscilan en cantidades en las células Molt-4 sobre intervalos de dos días. GD2 expresa el cambio más drástico en la cantidad en comparación con los otros gangliósidos, y GD1b y GT1b parece relativamente más consistentemente.

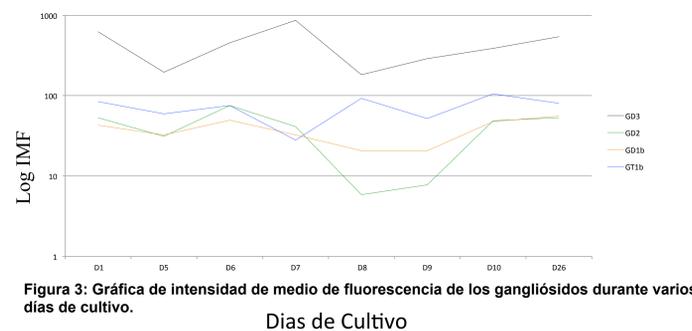


Figura 3: Gráfica de intensidad de medio de fluorescencia de los gangliósidos durante varios días de cultivo.

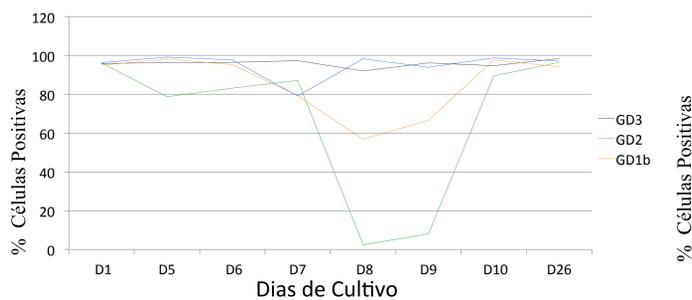


Figura 4: Gráfica de porcentaje de células MOLT-4 con presencia de gangliósidos durante varios días de cultivo.

Nuestros resultados finales indicaron que GT1b y GD1b eran gangliósidos relativamente persistentes (Figuras 3 y 4) y se seleccionaron para el tratamiento de anticuerpos con el objetivo de inducir apoptosis. Las células con 5 y 6 días de cultivo fueron seleccionadas debido a su alta cantidad de estos dos gangliósidos.

Las pruebas para la muerte después de la adición de los anticuerpos y la incubación durante 24 horas indican que no hubo ningún cambio significativo en la tasa de muerte de las células MOLT 4 después de la exposición. La Figura 5 y la Figura 6 demuestran que GT1b y GD1b estaban presentes en estas células al día 5 y 6, respectivamente; pero no causaron la muerte celular. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos de viabilidad celular para determinar si el tratamiento fue totalmente ineficaz.



La apoptosis es la muerte celular programada, la información genética y los componentes internos se disipan en ampollas de material celular. Esta es una vía de muerte para las células si presentan mutaciones en su ADN.

La necrosis es la muerte celular causada por factores externos, tales como calor, trauma físico, radiación, etc. Esto se traduce en la lisis de las células y la liberación del contenido interno causando inflamación.

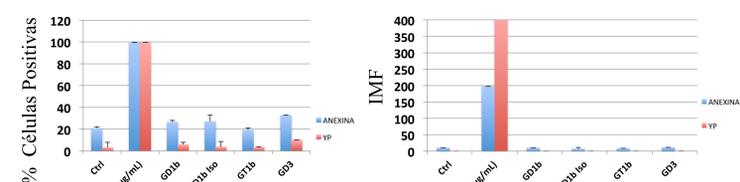
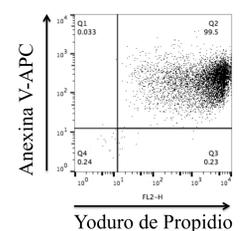


Figura 7: Gráficas de ensayo de muerte celular

Conclusion

A pesar de que estos gangliósidos (GD3, GD2, GD1b y GT1b) no inducen muerte celular cuando se exponen al tratamiento con anticuerpos, se sabe que GD3 induce inhibición tumoral significativa en la línea M21 de melanoma lo que demuestra que los glicanos pueden tener expresión similar pero no siempre realizan la misma función en el mismo organismo. Es importante seguir investigando cuáles son los antígenos glicanos que pueden servir como dianas útiles para inmunoterapia y generar terapias complementarias, innovadoras y específicas contra el cáncer.