

Proliferación y apoptosis de linfocitos humanos cultivados inducidas por anión superóxido

RESUMEN

Introducción: proponemos que un estado oxidativo moderado induce a las células a proliferar, sin embargo, un aumento descontrolado del nivel oxidativo puede causar la muerte o daños irreversibles de las células. Ejemplos de respuestas fisiológicas no balanceadas al anión superóxido son la proliferación no regulada en estados patológicos como cáncer y la destrucción de células β en diabetes. **Métodos:** se utilizaron mitógenos para inducir activación de linfocitos de sangre periférica tales como fitohemaglutinina, concanavalina A y ésteres de forbol. Se utilizó también paraquat como inductor de la generación del anión superóxido. Las respuestas fisiológicas fueron evaluadas en términos de proliferación celular utilizando MTT, así como también la muerte celular por apoptosis y necrosis. **Resultados:** el incremento en el estado oxidativo de linfocitos en reposo induce proliferación celular, pero altas concentraciones de superóxido son tóxicas e inducen apoptosis y necrosis. **Conclusiones:** nuestros resultados muestran la participación del anión superóxido en respuestas fisiológicas celulares como proliferación y apoptosis. Estas respuestas divergentes pueden explicarse en términos de nuestras observaciones de dosis-respuesta que ejemplifican la importancia del balance oxidativo.

SUMMARY

Background: Mild oxidative stress induces the cells to proliferate. On the other hand, too much oxidative stress may cause cells to die or suffer irreversible damage. Cancer and β -cells destruction on diabetes can illustrate the paradoxical roles of superoxide in the physiological cellular responses. **Methods:** the activation of resting human peripheral blood lymphocytes (HPBL) was done using different mitogens such as phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (ConA), and phorbol ester (PMA), as well the superoxide producing system, paraquat. The physiological responses were evaluated in terms of proliferation using MTT to assess activation of the resting cells, as well apoptosis and necrosis by fluorescent microscopy. **Results:** our results show that the increase in oxidative status by superoxide in resting human peripheral blood lymphocytes induces cells to proliferate; however, higher concentrations of superoxide are harmful, inducing apoptosis and necrosis. **Conclusions:** our results clearly show the involvement of superoxide (supplied by paraquat and/or induced with mitogens) in physiological responses such as proliferation and apoptosis. Such divergent responses should be explained in terms of our dose-response observations.

Comunicación con:
Daniel

Hernández-Saavedra
Tel: (55) 5627 6900,
extensiones 21477 y
21914.

Fax: (55) 5627 6914.

Correo electrónico:
dhernandezs@cis.gob.mx

Recibido: 30 de octubre de 2006

Aceptado: 19 de febrero de 2007

Introducción

El desbalance entre oxidantes y antioxidantes en células y tejidos comúnmente se refleja en procesos patológicos o en enfermedad. Las mitocondrias son las principales fuentes de producción de energía en células eucarióticas bajo condiciones aeróbicas. Sin embargo, la cadena respiratoria mitocondrial produce también el anión superóxido, un radical libre altamente reactivo y cito-

tóxico formado por la reducción parcial del O_2 en dos sitios de la cadena respiratoria. La eliminación de superóxido es efectuada por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa (SOD2), la cual contiene un átomo de manganeso como cofactor. La enzima SOD2 dismuta el anión superóxido formando H_2O_2 y O_2 . Sin embargo, la enzima glutatión peroxidasa (GSHPX) es la responsable de catalizar la eliminación de H_2O_2 a H_2O y O_2 . Por fortuna, la mitocondria puede

Palabras clave

- ✓ superóxido
- ✓ proliferación celular
- ✓ apoptosis
- ✓ linfocitos

Key words

- ✓ superoxides
- ✓ cell proliferation
- ✓ apoptosis
- ✓ lymphocytes

entonces producir energía eficientemente y proteger el sistema de posibles daños que pudieran ser causados por las especies reactivas de oxígeno formadas durante el proceso respiratorio.

El balance de oxidación y reducción (redox) en parte es realizado por enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa. El crecimiento celular irregular puede reflejar un desbalance del control redox en la maquinaria metabólica. Existen evidencias que señalan incremento del estado oxidativo en tumores y células transformadas. Los mecanismos involucrados en la activación y proliferación celular por estrés oxidativo son desconocidos. En la naturaleza, los organismos mantienen un balance entre la renovación y muerte celular en la mayoría de los órganos y tejidos. En circunstancias normales, la producción de nuevas células está regulada, si bien algunas células dejan de responder a los mecanismos que controlan el crecimiento normal y pueden proliferar y producir un tumor o neoplasma.

El balance del redox en la célula puede ser observado en respuestas fisiológicas tales como la proliferación y apoptosis, que si bien divergentes pudieran ser explicadas en términos de nuestros resultados en experimentos de dosis-respuesta.^{1,2} Es bien conocido que las especies reactivas del oxígeno pueden reaccionar con diferentes moléculas blanco tales como proteínas, lípidos y ADN. Cuando las células son sometidas a estrés oxidativo, las interacciones con macromoléculas disparan señales que pueden afectar la activación de factores de transcripción, la regulación de genes, modificando la expresión de proteínas antioxidantes (por ejemplo, la hemoxygenasa y SOD2), de proteasas y citosinas, además de proteínas que puedan relacionarse con la proliferación celular.³ Paradójicamente, alteraciones en el estado redox celular pueden reflejarse en daño oxidativo y otras veces incrementar la proliferación celular.⁴ Sin embargo, alteraciones en la proliferación celular y daño oxidativo han sido relacionadas con numerosos padecimientos crónicos incluyendo diabetes, inflamación, infarto después de un evento de isquemia-reperfusion y cáncer. De la misma manera, los antioxidantes desempeñan un papel importante en el control experimental de algunas de esas patologías.

Dada la importancia del balance redox y su papel en la regulación de actividades fisiológicas celulares, en este trabajo planteamos la hipótesis

de que el estado redox en linfocitos en reposo dirige la proliferación o la muerte celular por apoptosis debido a un incremento en el estado oxidativo ocasionado por cambios en la concentración del anión superóxido. Hasta la fecha no existen reportes que correlacionen la concentración del anión superóxido y el estrés oxidativo que ocasiona la proliferación y muerte celular.

Material y métodos

Medios y reactivos: bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), todos los mitógenos, fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (ConA), éster de forbol (PMA) y paraquat (PQ, metil viológeno) fueron obtenidos de Sigma, Co. El medio de cultivo Opti-Mem, suero fetal bovino y la solución Hank's libre de magnesio y calcio fueron compradas a Gibco-BRL.

Purificación y cultivos celulares: los linfocitos humanos de sangre periférica (HPBL) fueron purificados de sangre fresca de donadores o de leukopak (leucocitos residuales, Bonfils Blood Center, Denver, CO). Se utilizaron gradientes de Ficoll para purificar los HPBL (Accu-Prep, Accurate Chemical and Scientific Corp.). Las observaciones en microscopio mostraron que la población final de linfocitos tuvo una pureza de más de 95 %. Los HPBL fueron incubados cinco días a 37 °C bajo una atmósfera de 5 % de CO₂ (95 % aire) y 100 % de humedad, con control diario mediante observación microscópica para verificar viabilidad por exclusión del colorante azul de trypan. Estas células fueron utilizadas en los experimentos de proliferación. En los experimentos de reducción del citocromo C, las células fueron incubadas únicamente 18 horas. Se adicionaron 5×10^5 células HPBL/pozo en placas de cultivo de 24 pozos conteniendo medio Opti-Mem con 4 % de suero fetal bovino para completar un volumen final de 1 mL/pozo. La activación de las células HPBL en reposo se realizó con los diferentes mitógenos: 2 µg/mL de PHA, 2 µg/mL de ConA y 10 ng/mL de PMA. El sistema productor de superóxido (PQ) fue utilizado a concentraciones de 10, 30, 100 y 300 µM. Las células fueron incubadas durante 24 y 48 horas bajo las condiciones descritas. Se utilizaron gradientes de Percoll para purificar

neutrófilos de muestras de sangre y de leukopak. Estas suspensiones celulares fueron lavadas una vez con 10 mL de solución amortiguadora Hank's y centrifugadas a 800 rpm 10 minutos. Las células fueron entonces resuspendidas en Hank's y utilizadas para los experimentos de activación con PMA y producción/inhibición de superóxido.

La proliferación celular fue determinada adicionando una solución concentrada de MTT (10 mg/mL) para tener una concentración final de 5 % (50 μ L/mL) por pozo. Los cultivos fueron incubados tres horas más a 37 °C bajo una atmósfera de 5 % de CO₂ y 100 % de humedad. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos Eppendorff de 1.5 mL y fueron centrifugadas cinco minutos a 14 mil rpm. El paquete celular fue disuelto con 1 mL de DMSO y cada muestra se analizó espectrofotométricamente a 570 y 690 nm.

La determinación de apoptosis y necrosis se realizó en células cultivadas 24 y 48 horas bajo las distintas condiciones utilizando tinción con naranja de acridina-bromuro de etidio, y mediante observación y conteo en microscopio de fluorescencia. Así mismo, la viabilidad se evaluó con exclusión de azul de trypan.

La producción del anión superóxido en linfocitos y neutrófilos fue cuantificada mediante la reducción de citocromo C, que es inhibida por superóxido dismutasa. Se utilizaron 5×10^5 células HPBL cultivadas por 48 horas. Las células fueron lavadas y suspendidas en solución amortiguadora Hank's. Las muestras fueron adicionadas con 1 mM de citocromo C e incubadas a 37 °C. Cada 10 minutos fueron leídas en espectrofotómetro a 550 y 526 nm. Los valores de absorbancia de muestras control, las cuales contienen 2.8 μ M SOD2, fueron sustraídos de los valores obtenidos de sus respectivas muestras sin SOD2; el valor resultante sirvió para estimar la cantidad de superóxido utilizando el coeficiente de extinción del citocromo C (20 000 M⁻¹). Como control positivo fueron empleados neutrófilos estimulados con PMA.

Resultados

Para determinar el efecto del incremento en estado oxidativo en la proliferación celular, evaluamos el papel del anión superóxido (O₂^{•-}) en un modelo de células en reposo utilizando linfocitos hu-

manos de sangre periférica (HPBL). Nuestros resultados muestran que la adición de PQ, un generador de superóxido, induce activación celular en cultivos de HPBL (figura 1). Encontramos una respuesta dependiente de la dosis: bajas concentraciones de PQ (10-30 μ M) inducen activación de linfocitos; concentraciones moderadas (30-100 μ M) provocan apoptosis (muerte celular programada); altas concentraciones ocasionan muerte por necrosis (figura 1b).

El proceso de apoptosis ha sido considerado como una muerte normal fisiológica. Este proceso puede ser inducido por la activación de factores de transcripción sensibles a inducción por superóxido, sintetizándose de esta manera proteínas relacionadas con el proceso de apoptosis. Por otro lado, la muerte por necrosis o muerte accidental ha sido asociada comúnmente con trauma. Ambos tipos de muerte celular pueden detectarse en diferentes estados patológicos. Des-

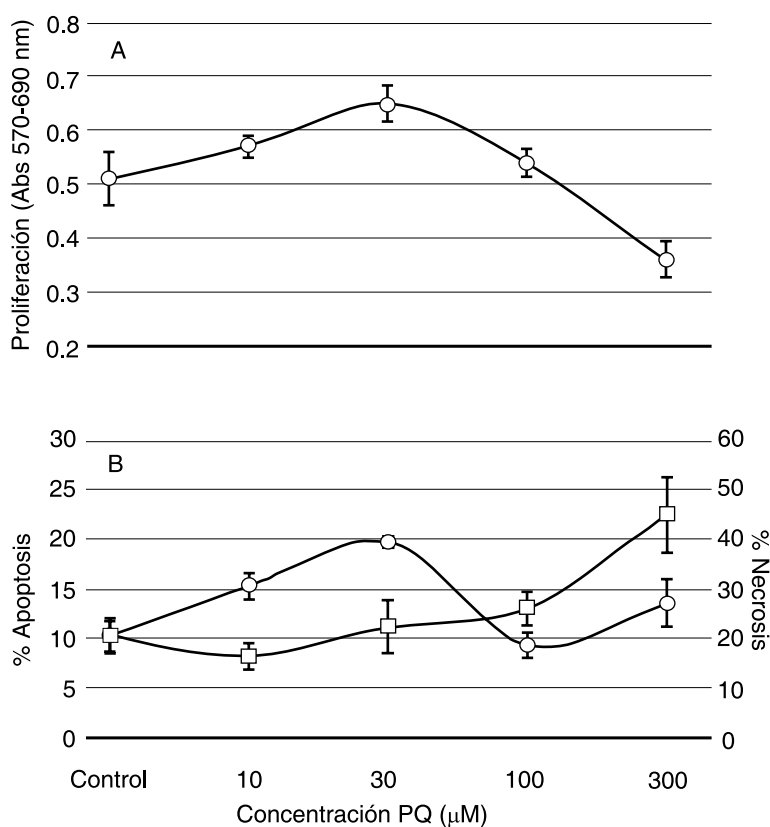


Figura 1. A) Efecto de superóxido en la proliferación de HPBL. Las células fueron incubadas en medio Opti-Mem adicionando PQ a las concentraciones que se muestran. La proliferación fue determinada por la reducción de MTT. B) Efecto de superóxido en apoptosis (○) y necrosis (□). El porcentaje de células en proceso de apoptosis y necrosis fueron determinadas por microscopio de fluorescencia.

afortunadamente, en nuestros experimentos se encontraron variaciones en las distintas preparaciones de linfocitos humanos. Quizás estas variaciones puedan correlacionarse con el estado de salud de cada donador.

En este trabajo se midió la proliferación celular como una función de la producción del radical superóxido. Para este fin se utilizaron neutrófilos como un control positivo en la producción de este radical y así evaluar la producción de superóxido en linfocitos estimulados con mitógenos. Todos los mitógenos utilizados mostraron inducción de la proliferación de linfocitos; la figura 2 muestra la proliferación celular medida por la capacidad de las células para reducir MTT. Este ensayo colorimétrico es ampliamente usado para detectar crecimiento celular, puesto que la cantidad de MTT reducido se relaciona directamente con la cantidad de células vivas en un cultivo.^{5,6} Así mismo, el PQ indujo activación celular en HPBL, lo cual indica que el anión superóxido por sí mismo tiene acción inductora. Bajo las condiciones experimentales de crecimiento, PHA fue el mitógeno que mostró la inducción más alta en la proliferación de linfocitos. ConA y PMA también provocaron proliferación, pero solo cerca de 50 % de lo inducido con PHA; interesantemente PQ y PMA mostraron un efecto aditivo. También se midió el radical superóxido como una función del mitógeno utilizado para activar los lin-

focitos. Los resultados de la figura 2 sugieren una fuerte correlación entre la producción de superóxido y proliferación. La producción del anión superóxido se incrementó de cinco a seis veces cuando los linfocitos fueron estimulados con PHA o ConA, los cuales mostraron la actividad de inducción de proliferación más alta; de la misma manera, PQ y PMA, indujeron la formación de superóxido, pero no al nivel de los otros mitógenos. El efecto aditivo de PMA y PQ en la cantidad de superóxido producido por linfocitos es detectable ligeramente, pero la diferencia no es significativa cuando se compara con la inducción únicamente con PMA.

Al graficar la producción del radical superóxido contra la proliferación de HPBL en respuesta a los mitógenos utilizados se encontró una correlación directa (figura 3). Interesantemente, el efecto del superóxido producido por la activación con mitógenos es aditivo con el efecto de PQ adicionado exógenamente. Ambos, PMA y PQ indujeron cierto nivel de activación y producción intracelular de superóxido, lo cual se incrementó cuando los linfocitos fueron estimulados con ambos compuestos. En esta forma se puede establecer que los mecanismos de activación e inducción de proliferación celular involucran al menos en parte la producción de superóxido. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis, en la cual proponemos que las concentraciones de superóxido determinan las respuestas fisiológicas de los linfocitos.

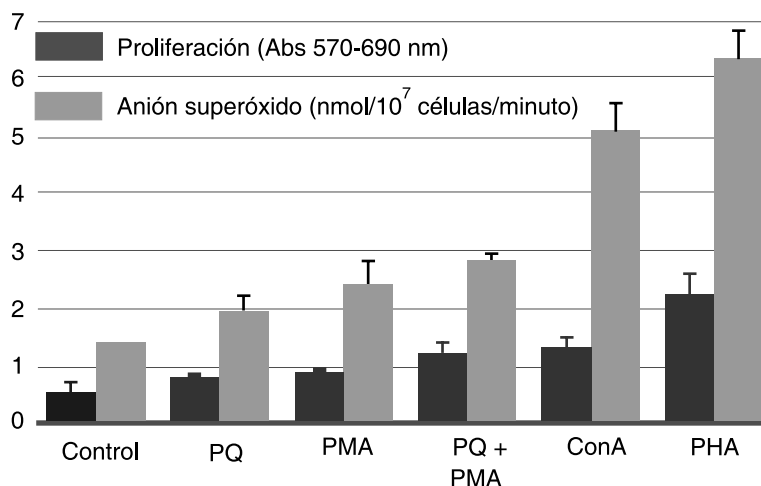


Figura 2. Efecto de diferentes mitógenos y PQ en la proliferación de HPBL. Las células fueron incubadas en Opti-Mem adicionado con cada mitógeno (2 µg/mL PHA, 2 µg/mL ConA, y 10 ng/mL PMA) y PQ (30 µM) por 48 horas. La proliferación fue medida por la reducción de MTT. La producción de superóxido se determinó por reducción de 1 mM citocromo C a 550 y 526 nm

Discusión

El balance entre oxidante y antioxidantes dentro de las células determina las condiciones redox bajo las cuales todos los componentes celulares interactúan. Cuando utilizamos HPBL para determinar el efecto de superóxido en células humanas en reposo, se encontró un comportamiento de dosis-respuesta en términos de inducción de la proliferación o muerte celular cuando las células fueron tratadas con PQ (figura 1), lo cual apoya la hipótesis propuesta. En este sentido, los datos presentados refuerzan el concepto del balance entre oxidantes y antioxidantes, discutido por McCord,⁴ en términos de la proliferación y muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis.¹ Notablemente, la proliferación dirigida por la induc-

ción con mitógenos comunes para linfocitos, también involucra la producción de superóxido (figura 3), estimulando la proliferación de las células en reposo, lo cual igualmente concuerda con nuestra hipótesis. La presencia de superóxido fue evaluada por la capacidad de la enzima superóxido dismutasa para inhibir la reducción del citocromo *C*. Estudios anteriores que intentaron determinar la producción de superóxido en linfocitos *T* estimulados, mostraron que la reducción de sales de tetrazolio no se debió a la producción de superóxido;⁷ como alternativa se atribuyó únicamente a la respuesta de la estimulación de los linfocitos por mitógenos en general, lo cual en términos del estado redox también refleja cambios en el estado oxidativo celular.

En este trabajo se muestra la participación del anión superóxido (producido por PQ e inducido con mitógenos) en respuestas fisiológicas tales como proliferación y apoptosis. Respuestas tan divergentes podrían ser explicadas en base al comportamiento de dosis-respuesta observado. En general, el papel de los radicales derivados del oxígeno es bien aceptado en la modificación de macromoléculas en las células. Las bajas concentraciones de superóxido inducen la proliferación de linfocitos humanos probablemente debido a la modificación de proteínas involucradas con el control del crecimiento, tales como cinasas y algunos factores de transcripción (AP-1, NF- κ B, c-jun, c-fos, etcétera). Se ha demostrado que estas proteínas son controladas por el estado redox celular y que su modificación por oxidantes puede ocasionar cambios positivos que permiten a las células proliferar. Sin embargo, concentraciones moderadas o altas de oxidantes pudieran inhibir o inducir cambios en estas u otras moléculas relacionadas con la muerte celular.

Se ha propuesto al anión superóxido como posible segundo mensajero en la transducción en el señalamiento metabólico.⁸ También ha sido demostrado el papel del anión $O_2^{\cdot -}$ en la activación de factores nucleares de transcripción durante la expresión y síntesis de proteínas celulares, y más recientemente fue puesto en evidencia el efecto de las especies reactivas derivadas del oxígeno en la iniciación de la proliferación de células *T*;⁹ sin embargo, no se determinó el efecto particular del anión superóxido. La estimulación de linfocitos *T* con PHA desencadena una vía de señalamiento a través de un sistema de estimula-

ción lípido ligando-inositol, la cual es inhibida por antioxidantes como hidroxitolueno butilato y hidroxianisol butilato. En contraste, células Jurkat no mostraron inhibición por estos antioxidantes luego de estimulación con PHA y CD3.¹⁰ Los autores sugieren que un proceso sensitivo a antioxidantes juega un papel en el acoplamiento de los receptores de la superficie celular con la transducción y señalamiento de linfocitos *T*, y que las diferencias con las células Jurkat dependen en la organización de la maquinaria de señalamiento en los distintos estadios de diferenciación de los linfocitos.

Sin embargo, el desbalance en el estado redox celular puede comprometer su estabilidad y provocar serios daños y muerte celular. Se ha sugerido que el estrés oxidativo es un mediador en la apoptosis.¹¹ Algunas observaciones apoyan esta propuesta: *a*) la adición de especies reactivas del oxígeno o una disminución de antioxidantes celulares pueden resultar en apoptosis; *b*) la apoptosis puede ser asociada con la inducción de especies reactivas del oxígeno; *c*) la apoptosis puede ser bloqueada por la adición de compuestos con propiedades antioxidantes.¹²

La apoptosis tiene un importante papel en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis durante el desarrollo embrionario, proliferación celular y eliminación de células dañadas. Se ha realizado una cantidad extraordinaria de esfuerzo para describir las vías y mecanismos moleculares involucrados en el proceso de apoptosis. Una de las vías mejor descritas es la cascada

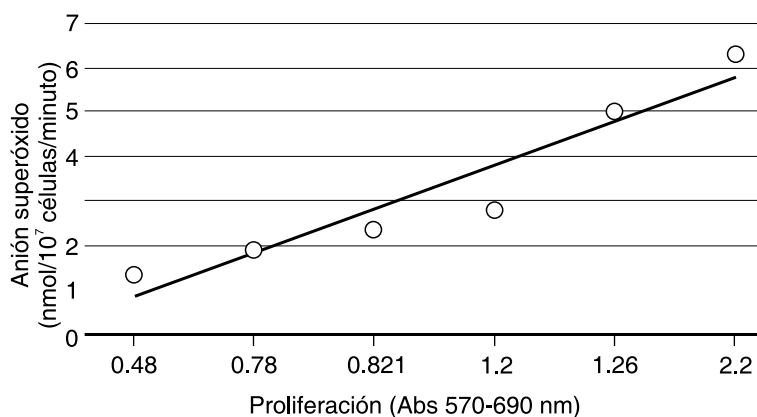


Figura 3. Correlación entre la producción de superóxido y la proliferación de HPBL estimulados con diferentes mitógenos y PQ. Los valores fueron tomados de la figura 2

proteolítica de las caspasas, la cual interactúa con la vía Bcl-2 localizada principalmente en la mitocondria, en donde los radicales libres tales como superóxido pueden tener efectos deletéreos.

Nuestros resultados muestran que una concentración moderada de superóxido puede inducir proliferación, así como también apoptosis en linfocitos humanos en reposo (figura 1); concentraciones mayores inducen muerte celular por necrosis. Este efecto paradójico del radical superóxido ha sido discutido por McCord⁴ y el efecto de respuesta a la dosis en la inducción de apoptosis por estrés oxidativo en células tumorales ha sido demostrado por Lennon y colaboradores.¹³ Como es conocido existen varios blancos para el daño oxidativo, el cual resultará en muerte celular. En HPBL tratados con concentraciones moderadas de superóxido, el daño oxidativo al ADN podría asociarse con la iniciación del proceso apoptótico. De la misma manera, la oxidación de proteínas intracelulares puede ser importante.

La modificación oxidativa de proteínas permite su eliminación por proteólisis; así algunas de las proteínas modificadas oxidativamente que son eliminadas pudieran estar involucradas en el bloqueo del proceso de apoptosis. Otra posibilidad es que algunas de estas proteínas modificadas pudieran activarse e iniciar la apoptosis celular. Las células Jurkat y los linfocitos activados sufren apoptosis cuando son expuestos a luz ultravioleta induciendo fragmentación del ADN. En contraste, linfocitos en reposo no mostraron respuesta a dicho inductor. La fragmentación del ADN se correlacionó con el estado de activación de las células y con la presencia de cationes bivalentes.¹⁴ En adición, concentraciones altas de superóxido inducen necrosis en HPBL posiblemente debido al daño oxidativo del ADN, proteínas y lípidos, los cuales están asociados con daño a las membranas y disrupción celular.

Referencias

1. Seve M, Favier A, Osman M, Hernández D, Vaitaitis G, Flores NC, McCord JM, Flores SC. The human immunodeficiency virus-1 Tat protein increases cell proliferation, alters sensitivity to zinc chelator-induced apoptosis, and changes Sp1 DNA binding in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys* 1999;361:165-172.

2. Hernández-Saavedra D, McCord JM. Paradoxical effects of thiol reagents on Jurkat cells and a new thiol-sensitive form of human mitochondrial superoxide dismutase. *Cancer Res* 2003;63: 159-163.
3. Janssen YMW, Vanhouten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993;69:261-274.
4. McCord JM. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209:112-117.
5. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.
6. Loveland BE, Johns TG, Mackay IR, Vaillant F, Wang ZX, Hertzog PJ. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem Int* 1992;27 (3):501-510.
7. Melinn M, McLaughlin H. Nitroblue tetrazolium reduction in lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1987;41: 325-329.
8. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa β transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258.
9. Tatla S, Woodhead V, Foreman JC, Chain BM. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic Biol Med* 1999;26:14-24.
10. Khan MA, Jeremy JY, Hallinan T, Tateson JE, Hoffbrand AV, Wickremasinghe RG. Antioxidants impair the coupling of cell-surface ligand receptors to the inositol lipid signalling pathway in human T lymphocytes but not in Jurkat T lymphoblastic leukemia cells. Evidence that leukotrienes are not involved in the coupling mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1993;1178:215-220.
11. Richter C. Pro-oxidants and mitochondrial Ca_2^{+} : their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett* 1993;325:104-107.
12. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 1994;15:7-10.
13. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991; 24:203-214.
14. Bazar LS, Deeg HJ. Ultraviolet B-induced DNA fragmentation (apoptosis) in activated T-lymphocytes and Jurkat cells is augmented by inhibition of RNA and protein synthesis. *Exp Hematol* 1992; 20:80-86. 