

EL CASNa MODULA DIFERENCIALMENTE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD DE LA LÍNEA LEUCÉMICA WEHI-3, CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS NORMALES Y EL CO-CULTIVO DE AMBAS

Edgar Ledesma-Marlín, Claudia Leticia Pérez-Cordero,
Guadalupe Sánchez-Tellez, Itzen Aguiñiga-Sánchez,
Yolanda Córdova-Galaviz, Benny Weiss-Steider,
Edelmiro Santiago-Osorio*.

RESUMEN

Las terapias existentes contra leucemia eliminan tanto las células tumorales como las normales, por lo que se compromete la sobrevivencia del paciente. Una sal de la caseína, el caseinato de sodio (CasNa), inhibe la proliferación de líneas leucémicas de ratón, pero estimula la granulopoyesis in vivo. No se conoce si al co-cultivar (CC) una línea leucémica, con células normales, se mantiene el efecto tóxico selectivo. Para responder a este vacío de conocimiento, se cultivaron células leucémicas WEHI-3 provenientes de ratones BALB/c y células mononucleadas (CMN) de médula ósea de ratones sanos de la misma cepa, con o sin 2 mg/mL de CasNa. Se encontró que el CasNa bloquea la proliferación y reduce la viabilidad de las células WEHI-3, mientras que incrementa la proliferación de CMN y el CC. Este último se acompaña, sin embargo, de reducción en la viabilidad e inducción a la fragmentación de DNA. Por lo anterior, el CasNa parece eliminar células leucémicas pero no las normales en un cocultivo.

Palabras Claves: BALB/c, leucemia, apoptosis.

The role of CasNa in the selective elimination of leukemic cells

ABSTRACT

Current antileukemic therapies eliminate both tumoral and normal cells compromising thus the survival of the patient. Sodium caseinate (CasNa) inhibits the proliferation of mouse leukemic cell lines, but it enhances the production of normal hematopoietic cells in independent cultures. However, it is unknown whether cocultures (CC) keep their selective toxic effect. In this work we found that cell proliferation is induced in WEHI-3 leukemic cells cocultured with normal bone marrow mononuclear cells (MNC) in the presence of CasNa whereas viability and apoptosis induction are reduced. We also found that WEHI-3 reduced cell proliferation with apoptosis induction, but it increased cell proliferation in absence of apoptosis in MNC. These data suggest that CasNa promote the elimination of leukemic cells but not that of normal ones.

Key Words: BALB/c, leukemia, apoptosis.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 19 DE ABRIL DEL 2013 Y ACEPTADO EL 22 DE MAYO DEL 2013.

*Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia (L8, PB), UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM.
Batalla 5 de Mayo s/n, E. Oriente, Iztapalapa, D.F., México. CP 09230. México.
E-mail: edelmiro@unam.mx

ANTECEDENTES

Las células leucémicas tienen alteraciones en la fisiología celular como autosuficiencia en las señales de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, evasión de la apoptosis¹, incapacidad para diferenciarse de manera terminal² y que en conjunto determinan el crecimiento maligno. La citarabina y las antraciclinas como daunorubicina o idarubicina, siguen siendo los antineoplásicos por elección para el tratamiento de la mayoría de los pacientes con leucemia mieloide aguda (AML), con el inconveniente de que éstas moléculas eliminan células malignas y normales sin distinción, comprometiendo aún más la vida del paciente; además, los adultos mayores por lo general no pueden tolerar la quimioterapia intensiva y sus células leucémicas son inherentemente más resistentes³. Así, las tasas de supervivencia a cinco años siguen siendo bajas, 60 % en pacientes jóvenes y solo del 10% en ancianos⁴.

Desde hace algunos años, diversos estudios han mostrado que las proteínas de la leche, además de su importante función nutricional⁵, ejercen efectos biológicos más específicos. Por ejemplo, la beta-caseína activa la producción de radicales libres en granulocitos e induce la proliferación de linfocitos de carnero⁶ y de linfocitos T de pacientes con diabetes tipo 1 y 2⁷. El CasNa, una sal de caseína, inhibe la proliferación de las células mieloides normales 32D⁸ y de diferentes líneas leucémicas⁹, pero incrementa la granulopoyesis en ratones normales¹⁰. Un agente terapéutico ideal es aquel que elimina las células cancerosas con una toxicidad mínima para los tejidos normales¹¹. Así, el CasNa parece exceder este requerimiento al potenciar la proliferación hematopoyética normal; no obstante, se desconoce si al cocultivar células normales y malignas se mantiene el efecto tóxico selectivo del CasNa sobre estas últimas.

OBJETIVO

Determinar la proliferación y viabilidad de células leucémicas cocultivadas con mononucleadas normales de ratón BALB/c en presencia de CasNa

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo, la línea celular leucémica de ratón WEHI-3 fue adquirida del ATCC (Rockville, MD, USA), se cultivó en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco-BRL, CA, USA), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (Gibco-BRL, CA, USA). Las células mononucleadas (MNC) de médula ósea normal de ratones hembra BALB/c, se cultivaron en IMDM suplementado con 15% (v/v) de FBS, 5% (v/v) de suero equino (Gibco-BRL, CA, USA) y 5 ng/mL de interleucina 3 recombinante de ratón (rmIL-3) (R&D System, MN, USA). En todos los casos, los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera con humedad a punto de rocío y 5% CO₂ a 37°C.

Para evaluar la proliferación celular, se cultivaron durante 72 h 3.0x10⁴ células WEHI-3, con o sin 0.5, 1 o 2 mg/mL de CasNa (Spectrum, USA), solubilizado en Solución Buffer

de Fosfatos (PBS) y esterilizado por autoclave. En todos los casos, las células se tiñeron con cristal violeta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la densidad óptica se determinó con un lector de placas TECAN a 570 nm.

Por otro lado, se cultivaron de manera independiente y en cocultivo (CC): 1.0x10⁵ MNC y/o 750 WEHI-3/mL, por 120 h con IL-3 (5 ng/mL) en presencia o ausencia de 2 mg/mL de CasNa. La proliferación se cuantificó como se indica en el párrafo anterior, la actividad metabólica como parámetro de viabilidad fue revelado con un ensayo de MTS (Promega, Madison, USA) y la apoptosis por la integridad del DNA revelado en electroforesis en gel de agarosa.

RESULTADOS

Se encontró que el CasNa, en forma dosis dependiente, bloquea de manera significativa la proliferación de WEHI-3 a 120 h de cultivo (Figura 1). Al comparar el efecto de CasNa en células WEHI-3 y CMN, ambas dependientes de IL-3 e inducibles a diferenciarse a granulocitos y macrófagos^{12,13}; se encontró que las mismas concentraciones de CasNa bloquearon la proliferación de las células leucémicas, pero la estimularon en células normales (Figura 1). Por otro lado, el CasNa demostró incrementar la proliferación en el cocultivo de ambos tipos celulares con respecto al vehículo, de manera similar al cultivo individual de MNC; mientras que en el cultivo individual de WEHI-3 se observó un efecto inverso; aumentó con el vehículo e inhibición con CasNa (Figura 2). En relación con la viabilidad, el CasNa la redujo en WEHI-3, pero no en células normales, mientras que en el CC se encontró que el CasNa incrementa la viabilidad con respecto al vehículo, sin

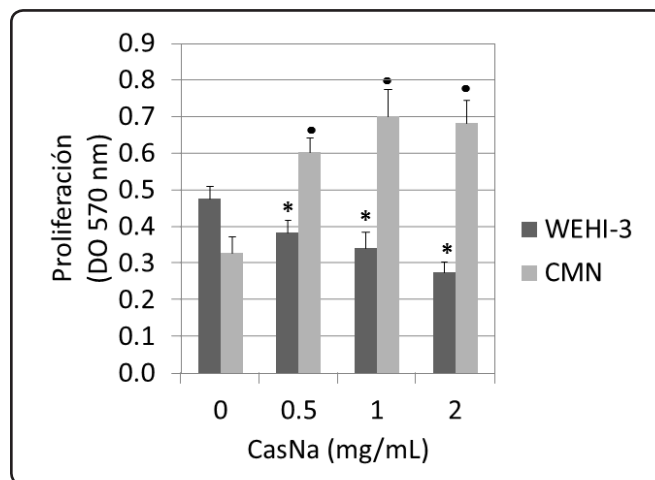


Figura 1. Proliferación de células leucémicas WEHI-3 y mononucleadas (CMN) normales de médula ósea de ratón BALB/c en presencia de 5 ng/mL de rmIL-3 más 0.5, 1 o 2 mg/mL de CasNa. Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. * • P<0.05 en el ANOVA Dunnet respecto a WEHI-3 0 mg/mL de CasNa o CMN 0 mg/mL de CasNa respectivamente.

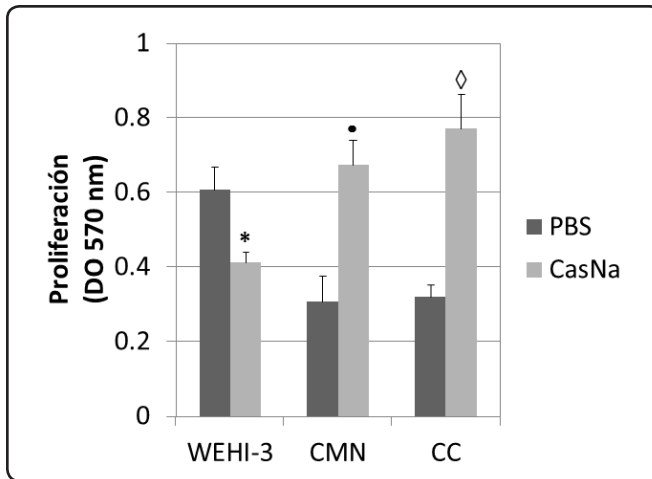


Figura 2. Proliferación de células leucémicas WEHI-3, mononucleadas (CMN) normales de médula ósea y cocultivo de ambas (CC) en presencia de 5 ng/mL de rml-3 sin (PBS) o con 2 mg/mL de CasNa (CasNa). Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. * • ◇ $P < 0.05$ en el ANOVA Tuckey respecto a WEHI-3 PBS, CMN PBS o CC PBS respectivamente.

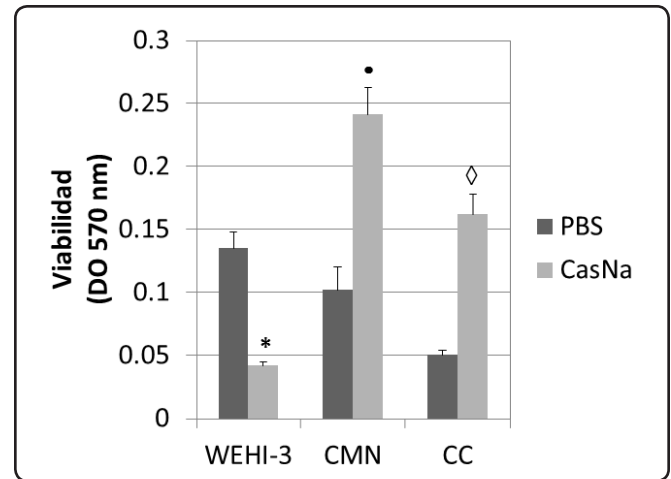


Figura 3. Viabilidad (actividad metabólica) de células leucémicas WEHI-3, mononucleadas (CMN) normales de médula ósea y cocultivo de ambas (CC) en presencia de 5 ng/mL de rml-3 sin (PBS) o con 2 mg/mL de CasNa (CasNa). Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. * • ◇ $P < 0.05$ en el ANOVA Tuckey respecto a WEHI-3 PBS, CMN PBS o CC PBS respectivamente.

embargo es menor a lo observado en el cultivo de solo células normales (Figura 3). Así, aunque el CC con CasNa muestra incremento en proliferación, esta se acompaña de reducción en la viabilidad celular, misma que podría ser explicada por inducción de apoptosis. Para verificar lo anterior, se analizó la fragmentación del DNA en un patrón de bandeo compatible con muerte por apoptosis¹⁴. Como muestra un corrimiento electroforético representativo, el CasNa indujo fragmentación de DNA en células WEHI-3 y en CC, pero no en células MN normales (Figura 4).

DISCUSIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, a partir de 2010, el cáncer es ya la primera causa de muerte en el mundo, a pesar de las novedosas estrategias terapéuticas basadas en los avances del conocimiento en bioquímica, biología molecular y celular del cáncer¹⁵. La utilidad de un compuesto potencial contra el cáncer, no solo se califica con base en su citotoxicidad hacia las células malignas, sino también en la relativa ausencia de toxicidad para los tejidos normales¹¹, por mala fortuna, de los más de 100 compuestos quimioterapéuticos empleados contra esta patología; todos tienen efectos secundarios, que en muchos casos comprometen la vida del paciente¹⁶.

Se ha reportado que nuevas moléculas con potencial antileucémico como el ácido betulínico y la curcumina, son tóxicas para las células malignas, pero no para las normales^{17,18}. De manera similar, este trabajo muestra que el CasNa desempeña un papel similar, induce apoptosis en células leucémicas cultivadas solas o en cocultivo con células mononucleadas normales, pero no lo hace en cultivo con solo

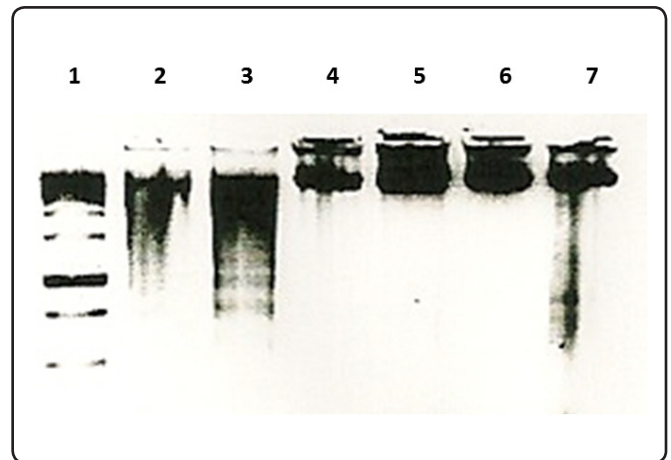


Figura 4. Fragmentación de DNA de cultivos de células WEHI-3, mononucleadas (CMN) normales de médula ósea y cocultivo de ambas (CC) en presencia de 5 ng/mL de rml-3, usando electroforesis en gel de agarosa. Línea 1, marcador (bp); línea 2, WEHI-3 más PBS; línea 3, WEHI-3 más 2 mg/mL de CasNa; línea 4, CMN más PBS; línea 5, CMN más 2 mg/mL de CasNa; línea 6, CC más PBS; línea 7, CC más 2 mg/mL de CasNa.

células mononucleadas normales. Así, estos datos sugieren que solo las células leucémicas son blanco del CasNa para ser inducidas a la apoptosis. Por otro lado, el CasNa no solo no daña las células normales, sino que, por el contrario, promueve su proliferación, una característica no reportada previamente para cualquier antineoplásico, quienes por lo

general son tóxicos para las células de médula ósea y por tanto mielosupresoras¹⁹. De esta manera, el CasNa parece exceder las expectativas de cualquier molécula antileucémica actualmente en investigación. De ser así, se tendría, por lo menos, una alternativa para purgar células normales de células leucémicas, una técnica de invaluable valor biomédico, ya que, recuperadas las células normales hematopoyéticas y limpias de leucémicas, pueden ser autotrasplantadas al paciente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado en parte por el Fondo SEP-CONACYT 104025 y PAPIIT IN225610. Agradecemos a CONACYT por la beca de licenciatura: ²15750 de la cual se desprende este trabajo. Becarios de CONACYT para estudios de posgrado: ¹48959; ³247169 y ⁴169059.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 7: 57-70.
2. Montesinos JJ, Mayani H. New concepts in the biology of acute myeloid leukemia. *Gac Med Mex* 2002; 138: 67-76.
3. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 1154-1163.
4. Robak T, Wierzbowska A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *ClinTher* 2009; 31: 2349-2370.
5. Koletzko B, Agget P, Bindels J, Bong P, Ferre P, Gil A, Lentze M, Robertfroid M, Strobel S. Growth development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* 1998; 80: S45.
6. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: 323-329.
7. Cavallo M, Fava D, Monettini L, Barone F, Pozzilli P. Cell mediated immune response to b-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 1996; 348: 926-928.
8. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. Sodium caseinate induces differentiation of 32D pluripotential hematopoietic cells. *Rev Invest Clin* 2000; 52: 638-644.
9. Ramos-Mandujano, G; Weiss-Steider B, Melo B, Cordova Y, Ledesma-Martinez E, Bustos S, Silvestre O, Aguiniga I, Sosa N, Martinez I, Sanchez L, Garcia A, Santiago-Osorio E. Alpha-, beta- and kappa caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology* 2008; 213: 133-141.
10. Domínguez-Meléndez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiñiga-Sánchez I, Ledesma-Martínez E, Marroquín-Segura R, García-Hernández A, Weiss-Steider B, Marché-Cova A, Monroy-García A, Mora-García L, Santiago-Osorio E. Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflamm Res* 2012; [Epub ahead of print].
11. Lickliter JD, Wood NJ, Johnson L, McHugh G, Tan J, Wood F, Cox J, Wickham NW. HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia* 2003; 17: 2074-2080.
12. Tweardy DJ, Morel PA, Herberman RB, Sakurai M. Inhibition of growth of mouse leukemic cell lines in vitro and in vivo by a monoclonal antibody that recognizes an interleukin 3 receptor-associated protein. *Cancer Res* 1991; 51: 4355-4359.
13. Ascaso R, Marvel J, Collins MK, López-Rivas A. Interleukin-3 and Bcl-2 cooperatively inhibit etoposide-induced apoptosis in a murine pre-B cell line. *Eur J Immunol* 1994; 24: 537-541.
14. Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)* 1993; 28: 35-43.
15. Arber D, Cousar B. Hematopoietic tumors: principles of pathologic diagnosis. En John P. Greer, John Foerster, John N. Lukens. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Twelfth Ed. Philadelphia USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2009: 1663.
16. Hande K. Principles and pharmacology of chemotherapy. En John P. Greer, John Foerster, John N. Lukens. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Twelfth Ed. Philadelphia USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2009: 1694.
17. Faujan NB, Alitheen SK, Yeap AM, Ali AH, Muhajir FB, Ahmad H. Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. *Afr J Biotechnol* 2010; 9: 6387-6396.
18. Rao J, Xu DR, Zheng FM, Long ZJ, Huang SS, Wu X, Zhou WH, Huang RW, Liu Q. Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *J Trans Med* 2011; 9: 71-86.
19. Kondo S, Yin D, Takeuchi J, Morimura T, Oda Y, Kikuchi H. bcl-2 gene enables rescue from in vitro myelosuppression (bone marrow cell death) induced by chemotherapy. *Br J Cancer* 1994; 70:421-426.