

GenT

The EuroEspes Journal

FARMACOGENÉTICA y estrategias terapéuticas

Pharmacogenetics and therapeutic strategies



**FARMACOGENÉTICA
DE LOS AINEs**

Personalizar el
Tratamiento



**PERSONALIZED
MEDICINE OF
DEMENTIA**

Pharmacogenomics of
Alzheimer's Disease



**EFFECTS OF FR-91
ON HUMAN TUMOR
CELL LINES**

Efectos de FR-91 sobre líneas celulares tumorales humanas

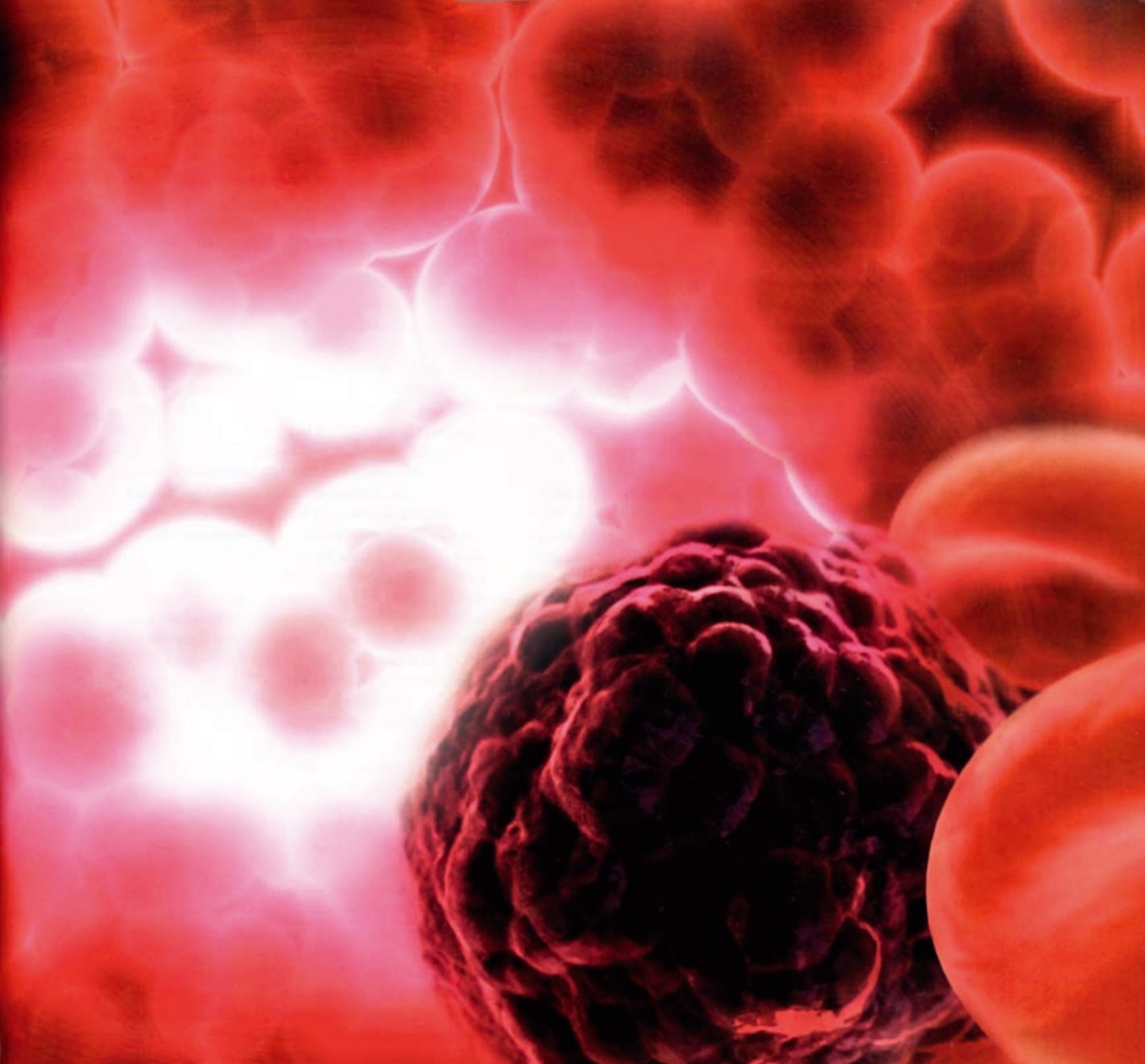
VRM Lombardi¹, E. Martínez², R. Chacon², I. Etcheverría¹, R. Cacabelos¹

1. EBIOTEC, Department of Cellular Immunology, La Coruña, Spain

2. Georgian Alternative Medicine, Madrid, Spain

LA APOPTOSIS ha sido un área de investigación intensa, que incluye el estudio de los componentes que inhiben o desencadenan este mecanismo de muerte celular. Siendo un importante proceso implicado en muchas enfermedades patológicas, incluyendo el cáncer, se ha investigado nuevos componentes naturales en un intento de inhibir o desencadenar este proceso celular fundamental haciendo la apoptosis susceptible a nuevas intervenciones biofarmacéuticas. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto antitumoral de FR-91, un lisado estandarizado de células microbianas pertenecientes al género *Bacillus*, contra las líneas celulares tumorales SW872 (células

adiposas humanas), SW982 (sarcoma sinovial humano), HL-60 (células promielocíticas), HS 274.T (adenocarcinoma de mama), HS 313.T (linfoma), H2126 (adenocarcinoma pulmonar). Usamos el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1) 2,5 bromuro de difeniltetrazolium) para estudiar la actividad de inhibición de crecimiento y apoptosis del FR-91. Informamos de la actividad potencial apoptogénica de FR-91 después de 24 horas de incubación a 10, 25 y 50 µl/ml. Se observó apoptosis, determinada por la fragmentación del DNA celular, en las líneas HL-60, HS 313T, SW872, SW982 y TOV-21G tratadas con 25 y 50 µl/ml de FR-91. El nivel más alto de inhibición



del crecimiento en el ensayo de citotoxicidad, se observó en las líneas SW872 (55, 78 y 87%), SW982 (50, 70, 87%) y TOV-21G (42, 66, 85%), con respecto a las células no tratadas, mientras que los resultados de la expresión de genes asociada a la apoptosis indicó regulación a la baja de Bcl-2 en todas las líneas celulares. Todos estos resultados juntos sugieren que el FR-91 contiene pequeños péptidos los cuales pueden contribuir a la inducción de la apoptosis. Se requerirán futuras investigaciones para clarificar la naturaleza de estos constituyentes bioactivos y los efectos del FR-91 in vivo sobre modelos animales experimentales tumor-inducidos.

Introducción

La proliferación no regulada parece ser un sello del incremento de la susceptibilidad a la neoplasia. La prevención del cáncer está generalmente asociada con la inhibición, reversión o retardo en la hiperproliferación celular. Estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que una variedad de alimentos y componentes alimenticios, debido a varias propiedades biológicas, pueden modular el sistema inmune de los mamíferos y pueden ser utilizados en la prevención de muchas enfermedades degenerativas siendo más económicos y menos penosos representando así una nueva forma racional de aproximación al cáncer. >>

Efectos de FR-91 sobre líneas celulares tumorales humanas

Es bien conocido que ciertas isoflavonas y flavonas de la dieta se comportan como inhibidores del crecimiento celular. Una de sus propiedades biológicas, es el hecho de proporcionar resistencia al crecimiento fúngico y bacteriano. Y aunque la mayoría de ellas parecen ser no tóxicas para humanos y animales han demostrado inhibir la proliferación de muchas células cancerígenas humanas cultivadas.

Se han presentado informes de los efectos anti-proliferativos de quercetina, taxifolin, nobiletin y tangretin a 2-8 µg/ml durante 3-7 días sobre las siguientes líneas células tumorales: meningioma, carcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de colon y leucemia.

Estudios sobre ratones, ratas y pollos han demostrado que muchos animales son portadores de virus oncogénicos latentes que se mantienen inactivos pero que ocasionalmente se activan para causar el desarrollo de tumores o leucemia. El proceso de activación puede desencadenarse por varios factores externos o internos, tales como la radiación, ciertas hormonas o productos químicos. Sin embargo, la activación de estos virus inductores de tumores latentes puede ser sustancialmente retardada o incluso prevenida evitando o reduciendo, la exposición a ciertos factores inductores así como por el uso de productos naturales.

Las bacterias que residen en el tracto intestinal generalmente tienen una relación simbiótica con el huésped. Las bacterias beneficiosas producen antibióticos naturales que mantienen los microbios patógenos bajo control (previniendo diarreas e infecciones) y produciendo algunas vitaminas B en el intestino delgado donde pueden ser utilizadas. Las bacterias beneficiosas ayudan a) en la digestión proporcionando exo-enzimas tales como la lactasa en el intestino delgado, b) fortalecimiento del sistema inmune en el intestino donde tienen lugar muchas de las interacciones entre el mundo exterior y el organismo y

c) previniendo reacciones alérgicas alimentarias. Además pueden ayudar a prevenir el cáncer en diferentes estados de desarrollo. Estas bacterias beneficiosas pueden mejorar la absorción de minerales, maximizando la utilización de los alimentos. Sin embargo, el balance entre bacterias beneficiosas y potencialmente patógenas en el intestino es dieta-dependiente.

Estudios llevados a cabo en ratas han mostrado que los probióticos pueden inhibir la formación de focos de criptas aberrantes identificados como lesiones precancerosas en el colon. Los mejores resultados se obtuvieron con una cepa de probióticos consumida junto a inulina, un tipo de fructooligosacárido. El total de focos de criptas aberrantes químicamente inducidas se redujo un 74% tratando a las ratas con inulina y *B. longum*, pero sólo un 29% y 21% cuando se trataron con *B. longum* e inulina respectivamente, por separado. Hubo un efecto sinérgico usando ambos productos juntos. Se vio el mismo efecto sinérgico en ratas con azoxymethane con cáncer de colon inducido en otro estudio. Ratas alimentadas con Raftilosa, una mezcla de inulina y oligofructosa, o Raftilosa con *Lactobacillus rhaminosus* (LGG) y *bifidobacterium lactis* (Bb12) que tuvo un significativo número menor de tumores en comparación con el grupo control. Una mezcla probiótica, sin ningún prebiótico, dado a ratas a las que se había administrado azoxymethane, redujo los tumores de colon comparado con el grupo control (50% vs 90%) y también redujo el n° de tumores a las ratas tumor-inducidas.

En el presente estudio, se han empleado diferentes concentraciones de FR-91, un lisado estandarizado de células microbianas pertenecientes al género *Bacillus*, para investigar la actividad potencial antitumoral frente a las líneas tumorales SW872, SW982, HL-60, HS274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM115 y HS281T.



Materiales y métodos

Cultivos y líneas celulares

Las células adiposas humanas (SW872) y la línea del sarcoma sinovial humana (SW982) se obtuvieron de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Las células se mantuvieron en el medio L-15 (medio Leibovitz-15 con L-glutamina [PAA, The Cell Culture Company, Oasching, Austria]), suplementado con 10% de suero de feto bovino inactivado al calor (FBS,PAA) y bicarbonato sódico [1,5 g/l, Gibco], incubados a 37°C y 5% CO₂. La línea celular HL-60 (células promielocíticas) fueron obtenidas de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Las células crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB inactivado al calor, 100 IU de Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina, y 2 mM L-glutamina. La línea celular HS 274.T (adenocarcinoma de mama) se obtuvo de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Crecieron en medio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con 10% de SFB inactivado al calor, 100 UI Penicilin, 100 µg/ml Estreptomina y 2 mM L-glutamina. La línea celular hipotriploide H2126 procedente de metástasis del derrame pleural de adenocarcinoma se obtuvo de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Crecieron en medio DMEM/ F12 suplementado con 5% de SFB inactivado al calor, 100 UI Penicilin, 100 µg/ml Estreptomina y 2 mM L-glutamina y suplemento G-5. La línea celular TOV 21G de cáncer epitelial ovárico, se obtuvo de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Las células crecieron en medio DMEM suplementado con 1% de SFB inactivado al calor, Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). La línea celular WM 115 (melanoma) se obtuvo de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Las células crecieron en Medio Eagle (MEM), 100 UI Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina y 2 mM L-glutamina. La líneas 281T (Adenocarcinoma de mama) se obtuvo de Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC Rockville, MD, USA). Crecieron en medio DMEM suplementado con 10% se SFB inactivado al calor, 100 UI Penicilina, 100 µg/ml Estreptomina y 2 mM L-glutamina. El stock de células se mantuvo en nitrógeno líquido.

Antes de ser usadas en ensayos experimentales, las células crecieron en monocapa dónde se liberaron del falcon con 0,25% de tripsina (PAA), lavadas dos veces con medio fresco y posteriormente sembradas en microplaca de 96 pocillos. El recuento de células viables se confirmó antes de cada experimento usando tripán.

Reactivos químicos

El medio RPMI 1640 Buffer Hepes, DMEM, DMEM/F-12, L-15, MEM, Tripsina, suplemento G-5 y el CrioMaxx se obtuvieron de PAA. La Glutamina y los antibióticos (Penicilina y Estreptomina) se compraron en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Ensayo de reducción MTT

El ensayo de proliferación celular se determinó usando el ensayo MTT. Las líneas celulares (1x10⁵ cel/ml) se incubaron en placa de 96 pocillos con diferentes dosis de FR-91 (10, 25 y 50 µl/w) durante 24 horas. Se añadió 10 µl de MTT (10 mg/ml) a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Tras la incubación, el precipitado MTT-formazan se disolvió en 100 µl de DMSO y la absorbancia fue registrada a 570nm en un lector automático (BioRAD). Los datos se presentaron como el % de citotoxicidad frente a las células no tratadas.

Determinación de DNA en escalera

La determinación de DNA en escalera fue realizada por el método estándar. Este método previene la contaminación del DNA genómico completo con DNA fragmentado. En resumen, después del tratamiento con FR-91, las células fueron recogidas, lavadas 2 veces con PBS frío y lisadas durante 30 minutos a 4°C en buffer de lisis (50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0,2% TRiton X-100) usando cuentas de zirconium y lisador automático de cels.

**Esto es un texto simulado
que será sustituido**

Después se centrifugó a 15.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se trató con un cóctel inhibidor de la proteasa y 0,5% SDS durante 1 hora a 37°C. Se extrajo el DNA dos veces con fenol y se precipitó con 150 mM de CLNa y dos volúmenes de etanol a -20°C. El DNA precipitado se lavó dos veces con etanol frío 70%, disuelto en TE buffer y tratado durante 1 hora con RNAasa a 37°C. Finalmente, los precipitados de DNA fueron teñidos con yoduro de propicio, realizada la electroforesis sobre gel de agarosa al 2% y visualizado en un sistema automático de documentación de gel (BioRAD system).

Estimación cuantitativa de fragmentación de DNA usando un ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA)

Tras el tratamiento con tripsina, las células se recogieron con una breve centrifugación y se>>

Efectos de FR-91 sobre líneas celulares tumorales humanas

Table 1

Oligonucleotides used in the RT-PCR

p53	sense:	5'-AAACTTACCAAGGCAACTA-3'
	antisense:	5'-TGAATATTCTCCATCGAGT-3'
p21	sense:	5'-CATGTCCGATCCTGGTGATG-3'
	antisense:	5'-AGTGCAAGACAGCGACAAGG-3'
Bcl-2	sense:	5'-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3'
	antisense:	5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'
Bax	sense:	5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGC-3'
	antisense:	5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3'

transfirieron a una microplaca de 96 pocillos a una densidad de 110^4 megl/pocillo (Costar) e incubadas toda la noche en medio completo a 37°C y 5% de atmósfera de CO_2 . Al día siguiente el medio se cambió por 100 μl de medio completo con o sin la concentración indicada de 10, 25 y 50 μl de FR-91 incubadas de nuevo durante 24 horas más. En algunos experimentos, las células se preincubaron con Z-vad-FMK (Promega) o inhibidor de la adenosin kinasa 5'-iodotubercidin (IT; Sigma) antes de la incubación con FR-91. Después de esto, los fragmentos de DNA fueron cuantitativamente estimados en las restantes células fijadas usando la técnica de ELISA (Cell Detection ELISA^{plus}, Behringer Mannheim, Mannheim Germany), de acuerdo al protocolo del fabricante.

Se midió la absorbancia a 405 nm (referencia a 492 nm) en cada pocillo y la media \pm fue trazada como una función de la concentración del agente indicado. Todas las incubaciones control contenían la max concentración de DMSO el cual tenía una concentración típica $<0,1\%$. La concentración de DMSO hasta 1,25% no indujo una fragmentación significativa de DNA (datos no mostrados). Cada experimento independiente se llevó a cabo por triplicado usando todas las diferentes líneas celulares tumorales.

Aislamiento de RNA y RT-PCR

El RNA celular total fue aislado mediante lisis en un buffer de tiocianato guanidina por un simple proceso de extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamilo. En resumen, las células fueron recolectadas y lisadas en una solución que contenía 4M isocianato de guanidina, 25mM de sodio citrato, (pH 7.0), 0,5% sodio sarcosina y 0,1 M β mercaptoetanol. Secuencialmente, se añadió para homogeneizar 1/10 volumen de 2M acetato sódico (pH 4,9) un volumen de fenol y 1/5 volumen de cloroformo alcohol isoamilo (49:1,v/v).

Después de agitar vigorosamente durante 30 segundos, la solución fue centrifugada a $10.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . El RNA de la fase acuosa se precipitó por la adición de 0,5 ml de isopropanol. Un μg del RNA total sufrió un proceso de transcripción inversa en cDNA por incubación con 200 unidades de transcriptasa inversa en 20 μl de buffer de reacción que contenía 0,25 μg random primers (cebador aleatorio) y 0,8 mM dNTPs a 42°C durante 1 hora. Dos μl de cada primer (cebador) y 5 unidades Taq DNA polimerasa durante 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto a la temperatura de hibridación de $55^\circ\text{C}/1$ min y extensión a $72^\circ\text{C}/2$ min. Los productos resultantes de la PCR se analizaron en electroforesis de 1,5% gel de agarosa. Las secuencias para los cebadores específicos usados en la PCR aparecen resumidas en *Tabla 1*.

Análisis estadísticos

Todos los test estadísticos fueron llevados a cabo usando SPSS (versión 11.0; SPSS Inc, Chicago) y a valor $P < 0,005$ significado estadístico indicado.

Los datos se analizaron usando factor doble de análisis de medidas repetidas de varianza (ANOVA) seguido por análisis post hoc, donde el 1-factor medida repetidas ANOVA, seguido por el test de Turkey's para un efecto significativo de dosis y emparejado t test para un significativo efecto del tratamiento FR-91.

Resultados

Inhibición del crecimiento en líneas celulares tumorales de FR-91

Para examinar el posible efecto antineoplásico del FR-91 en células tumorales, se determinó primero su efecto sobre el crecimiento celular mediante el ensayo MTT, el cual mide el metabolismo de las células vivas basado en su actividad mitocondrial dehidrogenasa. Como muestra la *Fig 1*, FR-91 origina inhibición del crecimiento dosis dependiente. La citotoxicidad no fue limitada a una línea celular específica sino que otras 5 líneas celulares fueron sensibles a los efectos del FR-91.

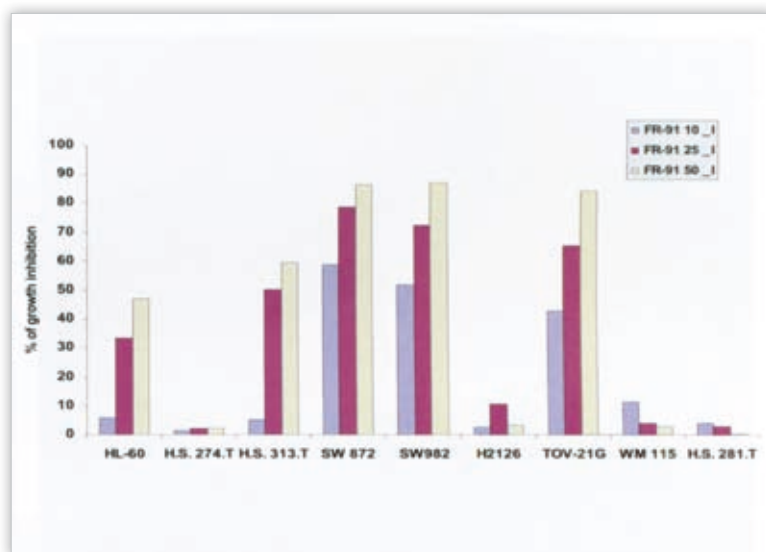
El mayor nivel de inhibición del crecimiento se observó en la línea SW872 (55%, 78%, 87%), SW982 (50%, 70%, 87%) y TOV-21G (42%, 66%, 85%) mientras que en la línea HL-60 (6%, 33%, 48%) y en HS 313.T (5%, 50%, 60%) mostraron un ligero, pero significativo efecto citotóxico en comparación con las células no tratadas.

A concentraciones más bajas de FR-91 (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$) se observó una diferencia significativa

entre las células control y las líneas tumorales SW872, SW982, y TOV-21G. No se observó efecto citotóxico en HS 274.T, H2126, WM 115, y HS281.T. Para determinar si es reversible el efecto antiproliferativo, las líneas SW872, SW982, y TOV-21G fueron tratadas con 25 $\mu\text{l/ml}$ de FR-91 o con medio de cultivo durante 48 horas. Las células tratadas con FR-91 y las que sólo lo hicieron con medio, se incubaron en medio completo durante 0, 6, 24, y 72 horas seguidamente se tripsinaron y se realizó el recuento. Tras 48 h de tratamiento con FR-91, el número de células había decrecido un 50% en todas las líneas celulares. Una vez eliminado el FR-91 el n° de células no incrementó pero bastantes mostraron una pequeña disminución adicional, mientras que el número de células, en ausencia de tratamiento, se incrementó con el tiempo (Fig 2). Estos datos indican que el FR-91 no tiene efecto reversible.

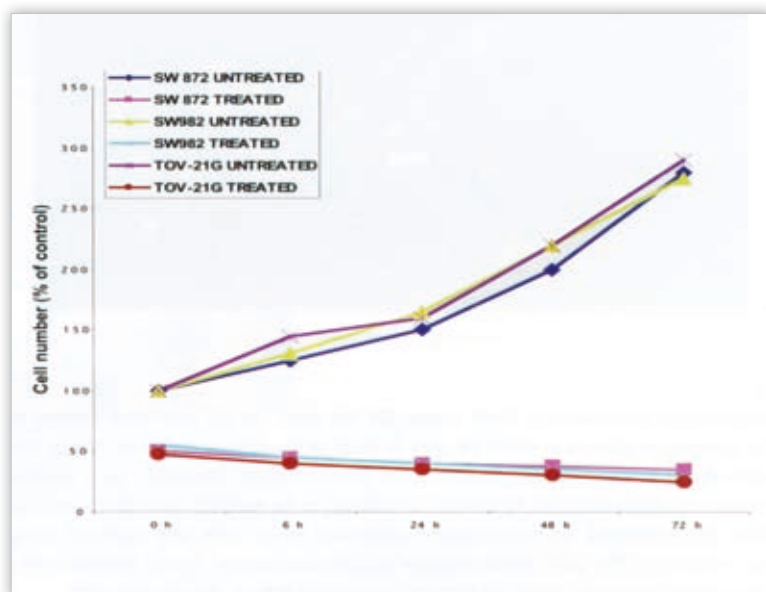
Inducción de la apoptosis en líneas celulares tumorales con FR-91

Lo siguiente fue testar si la administración de FR-91 indujo efectos citotóxicos en las líneas tumorales humanas SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H 2126, TOV 21G, WM115, HS 281.T. Cuando las células fueron tratadas con 10, 25, y 50 $\mu\text{l/ml}$ de FR-91 durante 24 horas y se las examinó morfológicamente al microscopio, se observó que una porción de las células mostraba condensación (punta de flecha) y escisión (flecha) del núcleo, ambos típicos de la apoptosis (Fig 3). Ninguna de estas imágenes se observó en las células control no tratadas. Los resultados siguientes, medidos en absorbancia, (570 nm), claramente muestran que el tratamiento con FR-91 induce a la apoptosis en las líneas celulares HL-60 (FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,96, $p < 0,001$ vs negativo, 0,12, y positivo, 1,47, de los controles). FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 1,1 $p < 0,001$ vs negativo 0,18 y positivo 1,72 del control); HS 313T (FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,77, $p < 0,001$ vs negativo 0,18 y positivo 1,72 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 0,68, $p < 0,001$ vs negativo, 0,18 y positivo, 1,72 del control); SW872 (FR-91 10 $\mu\text{l/ml}$: 0,58, $p < 0,001$ vs negativo, 0,17, y positivo; FR-91 25o 1,64 del control; FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,76, $p < 0,001$ vs negativo, 0,17, y positivo, 1,64 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$ $p < 0,001$: 1,55 $\mu\text{l/ml}$ vs negativo 0,17 y positivo, 1,64 del control); SW982 (FR-91 10 $\mu\text{l/ml}$ 0,77, $p < 0,002$ vs negativo, 0,24 y positivo 1,8 del control; FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,99, $p < 0,001$ vs negativo, 0,17 y positivo 1,64 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 1,48, $p < 0,001$ vs negativo 0,17 y positivo 1,64 del control); y TOV-21G 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,58, $p < 0,001$ vs negativo 0,17 y positivo 1,8 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 1,6, $p < 0,001$ vs negativo, 0,17 y positivo 1,8 del control (Fig 4). El DNA procedente de las líneas



▲ *Figura 1*

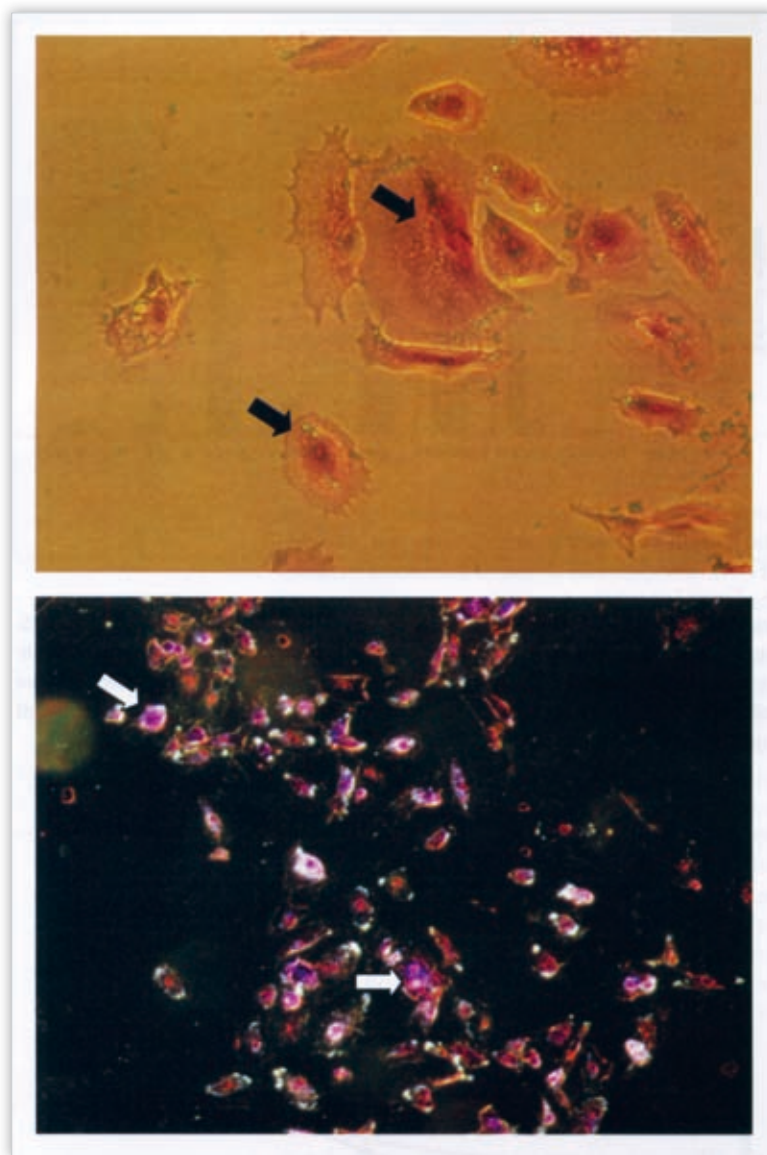
Inhibición del crecimiento de SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM 115 y HS 281T en líneas celulares tumorales humanas.



▲ *Figura 2*

Inhibición del crecimiento de SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM 115 y HS 281T en líneas celulares tumorales humanas.

celulares tratadas HL-60, HS 313.T, SW872, SW982, y TOV-21G con FR_91 durante 24 horas mostró fragmentación nucleosomal en escalera sobre electroforesis de gel de agarosa (datos no mostrados). No se observaron signos de apoptosis en las líneas HS 274.T (FR-91 10 $\mu\text{l/ml}$: 0,22, $p = 0,28$ vs negativo 0,2 y positivo 1,65 del control; FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,24, $p =$



▲ **Figura 3**
Inhibición del crecimiento de SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM 115 y HS 281T en líneas celulares tumorales humanas.

0,08 vs negativo 0,22 y positivo 1,65 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 0,2, $p=0,33$ vs negativo 0,22 y positivo, 1,65 del control); HS2126 (FR-91 10 $\mu\text{l/ml}$: 0,18, $p=0,32$ vs negativo, 0,2 y positivo 1,75 del control, FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,23, $p=0,78$ vs negativo, 0,2 y positivo 1,75 del control), WM 115 (FR-91 10 $\mu\text{l/ml}$: 0,23, $p=0,25$ vs negativo, 0,14 y positivo, 1,69 del control; FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,22, $p=0,27$ vs negativo, 0,14 y positivo, 1,69 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 0,24, $p=0,07$ vs negativo, 0,14 y positivo, 1,69 del control) y HS 281T (FR-91 10 $\mu\text{l/ml}$: 0,2, $p=0,25$ vs negativo 0,24 y positivo 1,81 del control; FR-91 25 $\mu\text{l/ml}$: 0,22, $p=0,27$ vs negativo, 0,24 y

positivo 1,81 del control; FR-91 50 $\mu\text{l/ml}$: 0,24 $p=0,07$ vs negativo, 0,24 y positivo 1,81 del control (*Fig 5*).

Expresión del gen regulador Bcl-2 en líneas tumorales tratadas con FR-91

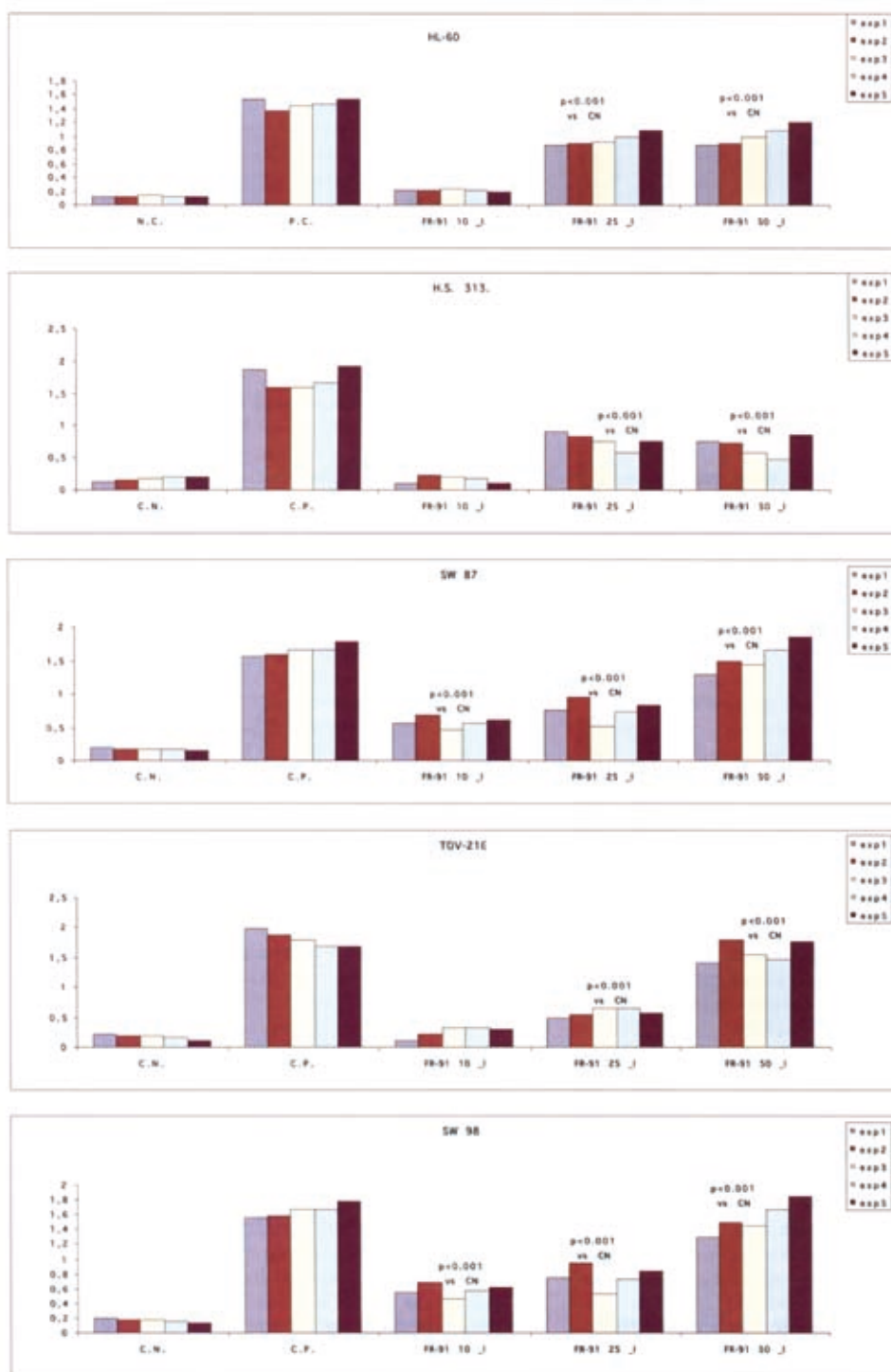
En una investigación siguiente, los mecanismos moleculares responsable del FR-91, indujeron apoptosis en las líneas HL-60, HS 313T, SW872, SW982 y TOV-21G. Se analizó la expresión genética de algunos genes apoptosis relacionados tales como p53, p21, Bax y Bcl-2 por Rt-PCR (*Fig 6*). El tratamiento con FR-91 originó la regulación de la expresión del gen Bcl-2, mientras que no fueron afectados otros genes los cuales, por tanto mostraron un relativo crecimiento de Bax/Bcl-2 ratio.

Discusión

En un intento de comprender y tratar las enfermedades, se han descubierto, por ensayo y error, varios componentes naturales que han sido usados durante miles de años por una fracción importante de la población en muchos países y regiones alrededor del mundo. Se estima, que alrededor de un 25% de los fármacos mundialmente prescritos actualmente, derivan de plantas y que un 60% de los medicamentos anticancerígenos/antiinfecciosos, en el mercado o bajo experimentación clínica son de origen natural y que extractos procedentes de plantas como Taxol, curcumilla, ácidos fenólicos, y flavonoides se han descritos como inhibidores del crecimiento tumoral en muchos tipos de cánceres. El crecimiento tumoral está generalmente asociado con cambios marcados en la hematopoyesis, inmunorespuesta, mielosupresión y anemia.

El sistema inmune tiene varios recursos potenciales para limitar, e incluso prevenir, el crecimiento tumoral. Entre estos se incluyen: **a)** inmunidad específica contra tumores mediada por células T asociada a transplante antígeno (TATAs); **b)** producción de anticuerpos contra TATAs y/o otras estructuras antigénicas asociadas con células tumorales; **c)** inmunidad natural cel-mediada contra tumores la cual consiste, principalmente de células natural-killer (NK) y macrófagos activados y **d)** anticuerpos antitumorales naturales.

Aunque hay alguna evidencia de efecto antitumoral de anticuerpos específica o naturalmente inducidos, particularmente si son citotóxicos, en presencia de complemento o en combinación con linfocitos o macrófagos que expresan receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas, y por lo tanto puede mediar entre anticuerpo cel-dependiente de la citotoxicidad cel-mediada ADCC), la



◀ **Figura 4**
Inhibición del crecimiento de SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM 115 y HS 281T en líneas celulares tumorales humanas.

mayoría de la atención y de los datos experimentales han estado focalizados sobre la inmunidad cel-mediada como la base para una posible resistencia del huésped contra el crecimiento progresivo del tumor. Ha habido mucho interés y controversia durante muchos años sobre el posible papel de cada uno de estos mecanismos inmunológicos en prevenir el desarrollo inicial de tumores detectables.

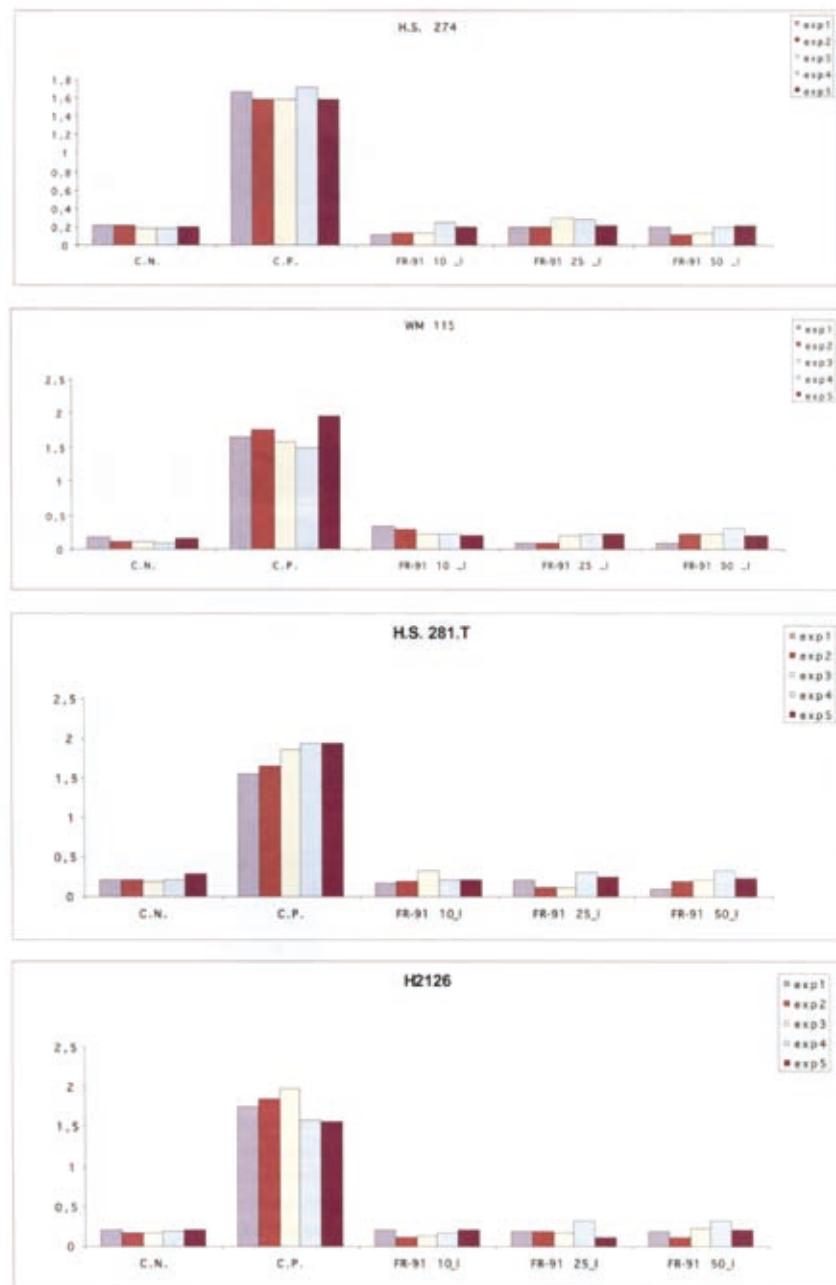
Las consideraciones entre estas líneas se abarcan en la vigilancia inmunológica contra los tumo-

res. Se ha realizado un informe de una versión actualizada de esta hipótesis, la cual incluye la potencial participación de células NK y otros aspectos de inmunidad natural así como la inmunidad específica mediada por células T. El más convincente apoyo a esta hipótesis ha venido de observaciones, en situaciones clínicas así como en modelo experimental animal, de los tumores más sustancialmente frecuentes desarrollados en individuos inmunodeficientes en comparación con individuos con un funcionamiento normal >>

Efectos de FR-91 sobre líneas celulares tumorales humanas

Figura 5 ▶

Inhibición del crecimiento de SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM 115 y HS 281T en líneas celulares tumorales humanas.



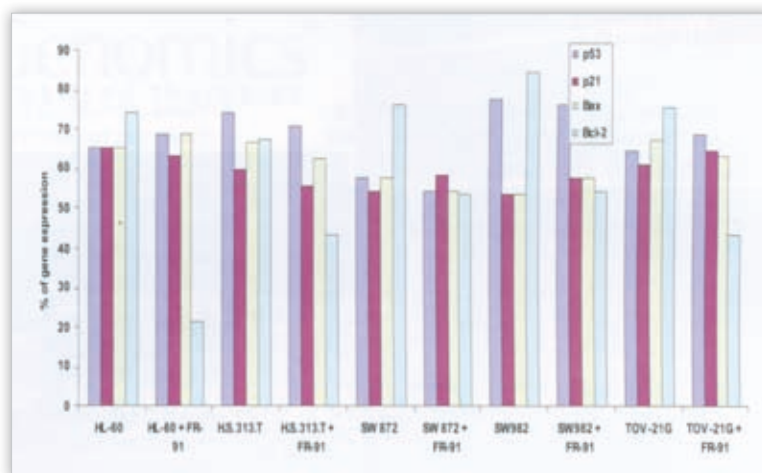
del sistema inmune. Por ejemplo, el desarrollo frecuente de la enfermedad linfoproliferativa en pacientes inmunosuprimidos con trasplante de algún órgano, pacientes infectados con el virus del SIDA, o en niños con inmunodeficiencia congénita, donde el sistema inmune tiene un papel en la prevención de este tipo de cáncer. Sin embargo ha sido muy efectivo en la vigilancia del sistema inmune. Es un hecho bastante posible que diferentes secciones del sistema inmune contribuyan a la resistencia contra el desarrollo del tumor primario con la aparición de una enfermedad maligna manifiesta posiblemente representando el fallo en más de una de defensa. Aunque hay al menos 120 sustancias químicas útiles como medicamentos antineoplásicos, y

entre ellas Paclitaxel (Taxol), aislada de tres especies del género *Taxus*, procedentes de plantas a través del mundo, existe todavía controversia sobre el papel de componentes naturales en el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Estudios epidemiológicos-valorando la ingestión diaria de componentes naturales aunque basados firmemente en hipótesis biológicamente plausibles han proporcionado ayuda para la asociación entre la reducción del riesgo y la ingesta bioactiva en la mayoría, aunque no en la totalidad de los datos de los estudios publicados. Aunque el extracto FR-91 ha demostrado *in vitro* e *in vivo* actividad antineoplásica contra diferentes líneas celulares tumorales, no ha sido completamente examinado el mecanismo de

este efecto. En este estudio, el FR-91 demostró citotoxicidad selectiva *in vitro* en células tumorales humanas testadas (liposarcoma, sarcoma, líneas celulares tumorales mielocíticas, de ovario y linfoma) cuando se las compara con células no tratadas. Más aún, FR-91 mostró el mayor efecto citotóxico en cel. HS.313.T que son resistentes a la quimioterapia. La habilidad de este compuesto para matar efectivamente varios tipos de tumores sin efecto aparente en células normales indica que este compuesto puede ser un potencial agente quimioterapéutico. La inducción a la apoptosis del FR-91 ocurrió de una manera dosis dependiente y se acompañó de la disrupción del potencial mitocondrial transmembrana (datos no mostrados) y la activación de caspasa-3 y quizás la caspasa-8.

El resultado del estudio sugiere que el FR-91 inhabilita la proliferación de las células tumorales por un mecanismo que implica citotoxicidad. La forma predominante de la muerte celular es la apoptosis puesto que se vio inicialmente la apoptosis en la muerte celular. Sin embargo, a periodos de incubación mayor, se observó la muerte celular por necrosis. Es probable que la muerte celular por necrosis ocurriera como un efecto secundario, y es un fenómeno visto *in vitro* debido a la falta de fagocitosis de cels blancas. Sin embargo, la posibilidad de que FR-91 cause ambas formas de muerte celular no puede ser excluida y la incidencia de estas formas de muerte depende de la concentración empleada y del periodo de incubación.

La apoptosis es regulada y ejecutada por la interacción de diferentes genes frente a varios estímulos. Hay dos caminos centrales que conducen a la apoptosis. 1) inducción positiva a la unión a los receptores de la membrana plasmática. y 2) inducción negativa por pérdida de una actividad supresora. La inducción positiva implica ligandos relacionados con TNF, mientras que la inducción negativa de la apoptosis por pérdida de la actividad supresora implica al mitocondrias. El estudio de la apoptosis en la terapia del cáncer es muy importante. Ha sido probado que la aparición del cáncer es debida a la pérdida de control de la apoptosis normal y a la alteración del balance entre la apoptosis y la proliferación celular. Los genes relacionados con la apoptosis (familia de bcl-2) están divididos en 2 categorías: apoptosis represor y apoptosis promotor. El bcl-2 es un importante apoptosis represor mientras que el Bax es un importante apoptosis promotor. La proteína que codifica puede combinarse con Bcl-2 para formar compuestos que resisten la acción de la apoptosis represiva. Pero tiene una acción reguladora positiva. Estudios recientes indican que la regulación de la apoptosis por Bcl-2 y Bax no está solamente



▲ **Figura 6**

Inhibición del crecimiento de SW872, SW982, HL-60, HS 274.T, HS 313.T, H2126, TOV 21G, WM 115 y HS 281T en líneas celulares tumorales humanas.

basada en el nivel de cualquiera de las dos proteínas reguladoras sino que también está basada en la proporción de las mismas. Si el ratio es alto, las células se dirigen a la apoptosis. Todas las líneas celulares utilizadas en el presente estudio, han sido producidas por una variedad de reactivos químicos para experimentar apoptosis a través de diferentes vías como por ejemplo p53-dependiente o familia relacionada con Bcl-2.

Para aclarar el mecanismo de apoptosis mediada por diferentes concentraciones de FR-91 examinamos por PCR-RT, la expresión de los genes incluyendo p53, p21, Bax y la familia de Bcl-2. Los resultados indicaron que la apoptosis ocurrió en las líneas HL-60, HS 313T, SW872, SW982 y en TOV-21G tratadas con 25 µl/ml de FR-91 acompañado por la expresión de la regulación a la baja del gen Bcl-2, dosis dependiente mientras que en otras no hubo cambios significativos (*Fig 6*). En el estudio presente demostramos que el incremento relativo del ratio apoptótico Bax/Bcl-2 tuvo buena correlación con la apoptosis inducida por FR-91 en diferentes líneas celulares humanas. Es posible que el FR-91, por una señal apropiada, induzca a un cambio conformacional en el gen Bax el cual se mueve a la membrana mitocondrial donde origina la liberación del citocromo mitocondrial c dentro del citosol.

En conclusión, el uso del extracto FR-91 demuestra un efecto de inducción a la apoptosis en varias líneas celulares humanas. Aunque se puedan llevar a cabo estudios futuros para aclarar los mecanismos por los cuales el FR-91 induce a la apoptosis en líneas celulares humanas, los datos actuales indican que el FR-91 podría ser un compuesto quimioterapéutico útil en pacientes con diferentes tipos de tumores. ■



Dr. Valter R.M. Lombardi
biotecnologia@ebotec.com

Referencias

- Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:1265-71.
- Biesalski HK. Diabetes preventive components in the Mediterranean diet. *Eur J Nutr*. 2004; 43 Suppl 1:V26-30.
- Slattery ML, Curtin KP, Edwards SL, Schaffer DM. Plant foods, fiber, and rectal cancer. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:274-81.
- Pan MH, Ho CT. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem Soc Rev* 2008; 37:2558-74.
- Fan E, Jiang S, Zhang L, Bai Y. Molecular mechanism of apoptosis induction by resveratrol, a natural cancer chemopreventive agent. *Int J Vitam Nutr Res* 2008; 78(1):3-8.
- Yang H, Landis-Piwowar KR, Chen D, Milacic V, Dou QP. Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment. *Curr Protein Pept Sci* 2008; 9:227-39.
- Yu W, Jia L, Wang P, Lawson KA, Simmons-Menchaca M, Park SK, Sun L, Sanders BG, Kline K. In vitro and in vivo evaluation of anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:447-56.
- Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res* 2008; 31:1281-5.
- Bruselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 5636-45.
- Luo G, Guan X, Zhou L. Apoptotic effect of citrus fruit extract nobletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7:966-73.
- Kong D, Aoki S, Sowa Y, Sakai T, Kobayashi M. Smeenospongine, a sesquiterpene aminoquinone from a marine sponge, induces G1 arrest or apoptosis in different leukemia cells. *Mar Drugs* 2008; 6: 480-8.
- Rezacova M, Zaskodova D, Vavrova J, Vokurkova D, Tichy A. Antileukemic activity of the combination of ionizing radiation with valproic acid in promyelocytic leukemia cells HL-60. *Neoplasma* 2008; 55:519-25.
- Lollini PL, Nicoletti G, Landuzzi L, De Giovanni C, Nanni P. New target antigens for cancer immunoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5:221-8.
- Salvini F, Granieri L, Gemmellaro L, Giovannini M. Probiotics, prebiotics and child health: where are we going? *J Int Med Res* 2004; 32: 97-108.
- Chouraqui JP, Grathwohl D, Labaune JM, Hascoet JM, de Montpouflier I, Leclaire M, Giarre M, Steenhout P. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:1365-73.
- Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol* 2008; 104:305-44.
- Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 2007; 137:751S-5S.
- Isolauri E, Salminen S; Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42:S91-S96.
- Klein K, Stevens R. The clinical use of probiotics for young children. *J Fam Health Care* 2008; 18:66-8.
- Ouwehand AC. Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 2007; 137:794S-797S.
- del Giudice MM, Rocco A, Capristo C. Probiotics in the atopic march: highlights and new insights. *Dig Liver Dis* 2006; 38:S288-S290.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 2006; 100:1171-85.
- Milner JA. Nutrition and cancer: essential elements for a roadmap. *Cancer Lett* 2008; 269:189-98.
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998; 19:281-5.
- Femia AP, Luceri C, Dolara P, Giannini A, Biggeri A, Salvadori M, Clune Y, Collins KJ, Paglierani M, Caderni G. Antitumorogenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 2002; 23:1953-60.
- Marotta F, Naito Y, Minelli E, Tajiri H, Bertuccelli J, Wu CC, Min CH, Hotten P, Fesce E. Chemopreventive effect of a probiotic preparation on the development of preneoplastic and neoplastic colonic lesions: an experimental study. *Hepatogastroenterology* 2003; 50:1914-8.
- Wang JW, Cheng JQ. A simple method for profiling miRNA expression. *Methods Mol Biol* 2008; 414:183-90.
- Drago-Ferrante R, Santulli A, Di Fiore R, Giuliano M, Calvaruso G, Tesoriere G, Vento R. Low doses of paclitaxel potentially induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by up-regulating E2F1. *Int J Oncol* 2008; 33:677-87.
- Hussain AR, Ahmed M, Al-Jomah NA, Khan AS, Manogaran P, Sultana M, Abubaker J, Plataniias LC, Al-Kuraya KS, Uddin S. Curcumin suppresses constitutive activation of nuclear factor-kappa B and requires functional Bax to induce apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2008; 7:3318-29.
- Seeram NB. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J Agric Food Chem* 2008; 56:630-5.
- Raza H, John A. In vitro effects of tea polyphenols on redox metabolism, oxidative stress, and apoptosis in PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1138:358-65.
- Varela JC, Imai M, Atkinson C, Ohta R, Rapisardo M, Tomlinson S. Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. *Cancer Res* 2008; 68:6734-42.
- Bergmann C, Strauss L, Wang Y, Szczepanski MJ, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL. T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3706-15.
- Rethi B, Vivar N, Sammiceli S, Fluor C, Ruffin N, Atlas A, Rajnavolgyi E, Chiodi F. Priming of T cells to Fas-mediated proliferative signals by interleukin-7. *Blood* 2008; 112:1195-1204.
- Sullivan RJ, Pantanowitz L, Casper C, Stebbing J, Dezube BJ. HIV/AIDS: epidemiology, pathophysiology, and treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus disease: Kaposi sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castlemans disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47:1209-15.
- Chua I, Quinti I, Grimbacher B. Lymphoma in common variable immunodeficiency: interplay between immune dysregulation, infection and genetics. *Curr Opin Hematol* 2008; 15:368-74.
- Johansson M, Persson JL. Cancer therapy: targeting cell cycle regulators. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8:723-31.
- Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, Choi YH, Palmer CA, Harrison K, Roarty K, Berveniste EN. Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4694-704.
- Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene* 2008; 27:6419-33.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahsan H, Mukhtar H, Ahmad N. Combination of vitamin E and selenium causes an induction of apoptosis of human prostate cancer cells by enhancing Bax/Bcl-2 ratio. *Prostate* 2008; 68:1624-34.