

Estudio Citotóxico del Inositol Hexafosfato en la línea celular HeLa

SANCHEZ-RAMOS, Sanjuana*†, FLORES-VILLAVICENCIO, Lerida Liss, CASTRUITA-DOMINGUEZ, José Pedro, y CARRILLO-LANDELL, Felipe Guadalupe.

Instituto Tecnológico Superior de Irapuato

Recibido Enero 15, 2017; Aceptado Marzo 10, 2017

Resumen

El hexafosfato de inositol (IP6) es un compuesto orgánico que se encuentra presente en casi todas las células de mamíferos. En este trabajo se evaluó la inhibición de crecimiento que presenta un cultivo de células HeLa (CCL-2, adenocarcinoma cervicouterino humano), cultivadas en medio DMEM con SFB 10%, a 37°C y 5% de CO₂. Para llevar a cabo este estudio, se expusieron las células a diferentes concentraciones de IP6 (0.048-25mg/mL). Posteriormente, se determinó la actividad metabólica por el ensayo de XTT y el método de azul de tripano para medir la viabilidad celular y evaluar la permeabilidad de la membrana. Para realizar el análisis estructural de las células se empleó DAPI y Faloidina-FITC para analizar el núcleo y los microfilamentos de actina por microscopía de epifluorescencia. Para la obtención del patrón de proteínas totales se utilizó SDS-PAGE 10%. Los resultados indican que el núcleo permanece íntegro independiente de la concentración de IP6, en contraste a altas concentraciones el citoesqueleto presenta daño celular. En base al estudio realizado el IP6 muestra un efecto citotóxico. Es necesario realizar estudios para evaluar el efecto antioxidante del IP6.

Inositol hexafosfato (IP6); citotoxicidad; cáncer; HeLa

Abstract

Inositol hexaphosphate (IP6) is an organic compound found in almost all mammalian cells. In this work the growth inhibition of a culture of HeLa cells (CCL-2, human cervical adenocarcinoma) cultured in DMEM medium with 10% FBS to 37 ° C and 5% of CO₂ was evaluated. To carry out this study the cells were exposed to different concentrations of IP6 (0.048-25mg / mL). Subsequently, the metabolic activity was determined by the XTT assay and the trypan blue method to measure cell viability and to evaluate membrane permeability. To perform the structural analysis of the cells, DAPI and Phalloidin-FITC were used to analyze the nucleus and actin microfilaments by epifluorescence microscopy. SDS-PAGE 10% to obtain the total protein pattern. The results indicate that the nucleus remained intact independent of the concentration of IP6, in contrast to high concentrations the cytoskeleton presented cellular damage. Based on the study, the IP6 shows a cytotoxic effect. Studies are needed to evaluate the antioxidant effect of IP6.

Inositol hexaphosphate (IP6); Cytotoxicity; Cancer; HeLa

Citación: SANCHEZ-RAMOS, Sanjuana , FLORES-VILLAVICENCIO, Lerida Liss, CASTRUITA-DOMINGUEZ, José Pedro, y CARRILLO-LANDELL, Felipe Guadalupe. Estudio Citotóxico del Inositol Hexafosfato en la línea celular HeLa. Revista de Operaciones Tecnológicas. 2017. 1-1:22-29.

† Investigador contribuyendo como primer autor.

*Correspondencia al Autor Correo Electrónico: sansanchez@itesi.edu.mx

Introducción

El cáncer es definido como el crecimiento tisular producido por la proliferación de células anormales [1], y dado que puede invadir y dañar otros tejidos, existen al menos 200 tipos de cáncer que pueden presentarse en cientos de formas, dentro de las cuales se encuentran los sarcomas, los carcinomas, las leucemias y los linfomas; y de acuerdo a la OMS, el cáncer representa en la actualidad una de las primeras causas de muerte a nivel mundial [2][3]. Desde hace varios años, ha sido objeto de estudio la prevención de enfermedades como el cáncer, para lo cual los expertos sugieren seguir una dieta rica en fibra, y se ha encontrado que el IP6 presente principalmente en la fibra, podría ser el responsable de dichos efectos protectores [Shamsuddim y col., 1997].

El inositol hexafosfato (IP6) es un carbohidrato natural que se encuentra presente en la mayoría de las células de los mamíferos, incluyendo las células humanas, y es requerido tanto para llevar a cabo como para regular las funciones corporales más importantes [Fox y col, 2002 5]. El IP6 se encuentra naturalmente en aquellos alimentos ricos en fibra, como los cereales integrales y las legumbres, sin embargo, en la actualidad también es posible obtenerlo mediante suplementos alimenticios [Fox y col, 2002 4], y se le atribuyen grandes cualidades, siendo el efecto antioxidante el más reconocido, puesto que impide la formación de radicales libres, los cuales son causantes de producir enfermedades degenerativas, como el cáncer [6]. Además, hay estudios que indican que el inositol hexafosfato impide el crecimiento celular anormal, como en el caso de los tumores [Liu y col., 2015; Fu y col., 2016; Singh y col., 2005; Verghese y col., 2006 7], sin embargo, no hay reportes que indican el efecto que éste presenta a nivel celular y estructural. Por lo que. en este estudio, se evaluó el efecto del IP6 sobre células cancerosas.

Justificación

En la actualidad se comercializa como suplemento alimenticio, de acuerdo a los reportes que indican que el inositol hexafosfato posee un potencial efecto antioxidante, pero existen pocos reportes que indiquen el efecto que presenta a nivel celular y estructural.

Problema

El cáncer en la actualidad, específicamente el cervicouterino, representa una de las principales causas de muerte en mujeres mayores a 25 años, por ello, se han buscado tratamientos alternativos, tal es el caso de sustancias activas cuya actividad citotóxica o antitumoral es aprovechada en lugar de los tratamientos neoplásicos convencionales, ya que en muchas de las ocasiones, éstos representan un riesgo mayor para el paciente. Existen diversos estudios que demuestran que el inositol hexafosfato, también conocido como IP6, presenta un alto efecto antioxidante por lo que juega un papel importante en la prevención y disminución del daño oxidativo, es posible que represente una alternativa viable para evaluar el efecto citotóxico que presenta en células cancerosas

Hipótesis

Se espera que el Inositol hexafosfato presente un efecto citotóxico en células cancerosas dependiente de la concentración.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto del Inositol hexafosfato (IP6) sobre células cancerosas

Objetivos específicos

- Estudio citotóxico del IP6 sobre células cancerosas
- Evaluación del efecto del IP6 en organelos celulares

Marco Teórico

El término cáncer hace referencia a un amplio grupo de enfermedades que pueden llegar a afectar cualquier parte del cuerpo, puesto que es un crecimiento tisular descontrolado, producido por la proliferación constante de células anormales con capacidad de invadir y destruir cualquier tejido. (Silvia Aibar; et al, 2008).

El cáncer se origina cuando las células comienzan a crecer de forma descontrolada, y se les llama de acuerdo a su localización primaria, sin importar qué otras partes del cuerpo se hayan visto afectadas, ya que en ocasiones, el cáncer se propaga de su localización primaria, es decir, la parte del cuerpo en la que se desarrolla inicialmente, a una o más localizaciones metastásicas (American Cancer Society, 2014).

Una de las causas de cáncer en seres humanos se encuentra la contaminación de aire, agua y comida, factores de dieta, obesidad, inactividad física, tabaquismo, alcohol, radiación solar, factores hormonales, incluso factores hereditarios, tal como se muestra en la figura 1.

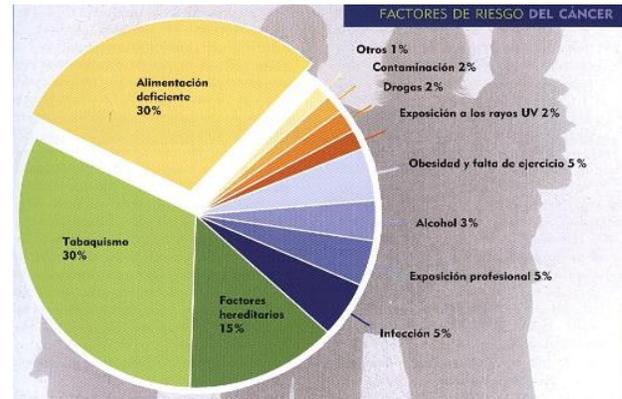


Figura 1 Factores de riesgo del cáncer (Timo Partanen, 2009)

Para algunos trastornos hereditarios, los cromosomas tienen una fragilidad intrínseca, lo que conlleva un riesgo elevado de presentar cáncer (Silvia Aibar; et al, 2008). En la actualidad existe un sinnúmero de sustancias químicas consideradas altamente cancerígenas, como el alquitrán de hulla y sus derivados, ya que sus vapores provenientes de algunas industrias, el cigarrillo. El alcohol es también un importante promotor, ya que el abuso crónico del mismo incrementa el riesgo de padecer cáncer inducido por otros agentes (Silvia Aibar; et al, 2008).

Las radiaciones ionizantes son uno de los factores causales de cáncer más reconocidos ya que produce cambios en el ADN como roturas o trasposiciones cromosómicas y actúa como iniciador de la carcinogénesis, pues induce alteraciones que progresan hasta convertirse en cáncer. Los rayos ultravioleta y los rayos X aumentan la propensión de adquirir cáncer de piel y leucemia (Silvia Aibar; et al, 2008).

En la Tabla 1 se muestran algunos de los agentes como bacterias y parásitos asociados a tumores humanos de los cuales se tiene evidencia de que infecciones provocadas por éstos pueden llegar a provocar cáncer, en especial en pacientes que presentan inmunodepresión. (Silvia Aibar; et al, 2008).

Agente	Sitio de cáncer
Helicobacter pylori	Estómago
Schistosoma haematobium	Vejiga
Opisthorchis viverrini	Hígado

Tabla 1 Tumores relacionados a bacterias y parásitos

A continuación, en la Tabla 2 se presentan los virus más comunes asociados a tumores humanos. (Silvia Aibar; et al, 2008).

Agente	Sitio de cáncer
Hepatitis B	Hígado
Hepatitis C	Hígado
HIV-1	Sarcoma de Kaposi
HTLV-1	Linfoma T del adulto
HPV	Cuello uterino y orofaringe
Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt, nasofarínge, Enfermedad de Hodgkin.

Tabla 2 Tumores relacionados a virus

Metodología

Cultivo celular

La línea celular humana HeLa de cáncer cérvico uterino (ATCC® CCL-2™), se cultivó a 37 ° C en botellas de 25 cm² con DMEM (medio Eagle Modificado de Dulbecco, GIBCO, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (GIBCO, USA), en una atmosfera de 5% de CO₂ humidificada. Las células se tripsinizaron y la suspensión celular se cuantificó en cámara de Neubauer para obtener una densidad de 1x10⁴ células/mL, para realizar los experimentos. Exposición de células HeLa a el Inositol hexafosfato

Para determinar los efectos del IP6 en las células, se expuso a diferentes concentraciones. Para ello, se sembraron 1x10⁴ células HeLa/mL en una placa de 96 pozos (Corning-costar) y se incubaron por 24h. Después del tiempo de incubación, se expusieron al IP6 realizando una dilución seriada, iniciando con la concentración de 100 hasta 0.048 mg/mL de IP6.

A continuación, la placa se incubó a 37°C / 24h / 5% de CO₂. Después de la incubación se determinaron las pruebas celulares y bioquímicas como a continuación se describe.

Ensayo de la actividad metabólica

La actividad metabólica se determinó cuantificando la capacidad de las células para reducir la sal de tetrazolio XTT amarilla (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2-h-tetrazolio-5-carboxanilida) a formazan, por enzimas deshidrogenasas (mitocondrias) en células metabólicamente activas. Brevemente, después durante 90 minutos con una solución de incubaciones experimentales, después de la exposición las células se incubaron de XTT 0.25 mg/mL a 37°C. Después, se determinó la absorción del formazan a una longitud de onda de 450 nm (Espectrofotometro, Epoch Biotek).

Determinación de la viabilidad celular

El azul de tripano puede usarse para discriminar entre células viables (no teñidas) y no viables (teñidas de azul). Las células fueron HeLa expuestas al IP6 como se ha descrito anteriormente. Después de la exposición, se añadió una solución de azul de tripano al 0,4% y se incubó 3 minutos. Las células viables se contaron en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio invertido (Primo Vert, Carl Zeiss).

Análisis del núcleo y citoesqueleto

Las células control y las expuestas a IP6 (0.048-100 mg/mL) durante 24 h, se fijaron con p-formaldehído al 4% durante 20 min, se permeabilizaron con Triton al 0,05%, posteriormente se expusieron a Faloidina-FITC (Sigma Aldrich). Las preparaciones se montaron utilizando VECTOR-DAPI, el DAPI se une fuertemente a las regiones ricas en AT en ADN (Vector Laboratories, USA).

Y se observó bajo un microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) utilizando un filtro B de 450-490 nm. La adquisición de imágenes fue con la cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss).

Análisis del perfil de proteínas totales

Las células expuestas a IP6 fueron homogenizadas con SDS 2% en PBS (solución amortiguadora de fosfatos) más un cocktail de inhibidores de proteasas (ROCHE). El perfil de proteínas totales se obtuvo mediante SDS-PAGE 10%, las proteínas fueron teñidas con Azul de Coomassie al 0.25% para la visualización de las proteínas, la adquisición de la imagen se realizó en un equipo ChemiDoc MP System-BIORAD utilizando el software Image Lab™ software (BIORAD).

Resultados

Efecto del IP6 sobre la actividad metabólica de células HeLa

El IP6 no reduce significativamente la actividad metabólica de las células HeLa (Gráfico 1). Indicando que no existe un efecto del IP6 sobre la actividad metabólica.

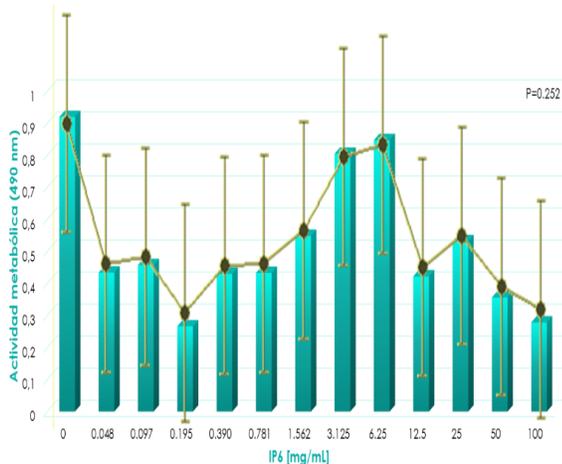
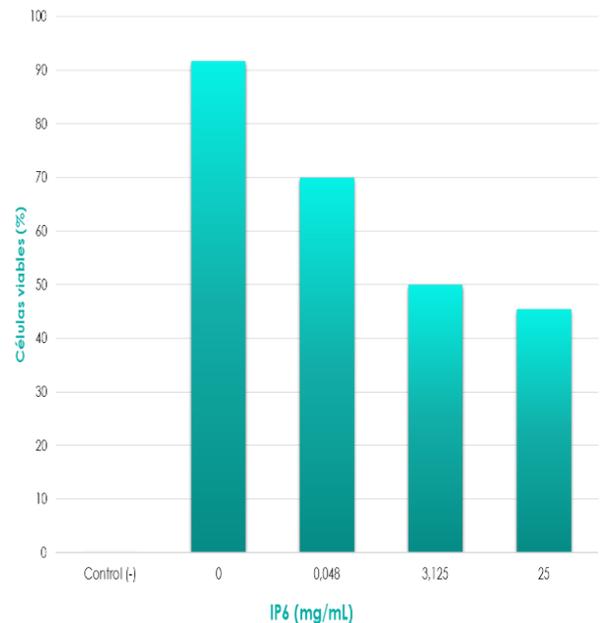


Gráfico 1 Efecto del IP6 sobre la actividad metabólica de células HeLa. Los resultados de tres experimentos independientes, se analizaron mediante una prueba estadística Tukey Kramer, n=9, *p≤0.05.

Viabilidad celular

Al analizar la viabilidad celular, se observó una significativa reducción en la viabilidad celular dependiente de la concentración (Gráfica 2). A partir de la concentración de 3.125mg/mL IP6, existe un 50% de reducción de la viabilidad celular. Estos resultados, indican una alteración en la permeabilidad de la membrana plásmatica por efecto del IP6.



Gráfica 1 Efecto del IP6 en la viabilidad de las células HeLa. El control positivo de daño celular fueron células expuestas a H₂O₂ 3%

En la figura 2, se muestran las células expuestas al IP6 y teñidas con azul de tripano. Se puede apreciar que a medida que la concentración aumenta, es mayor el número de células teñidas, a diferencia del control (células sin exposición al IP6), donde las células HeLa son viables.

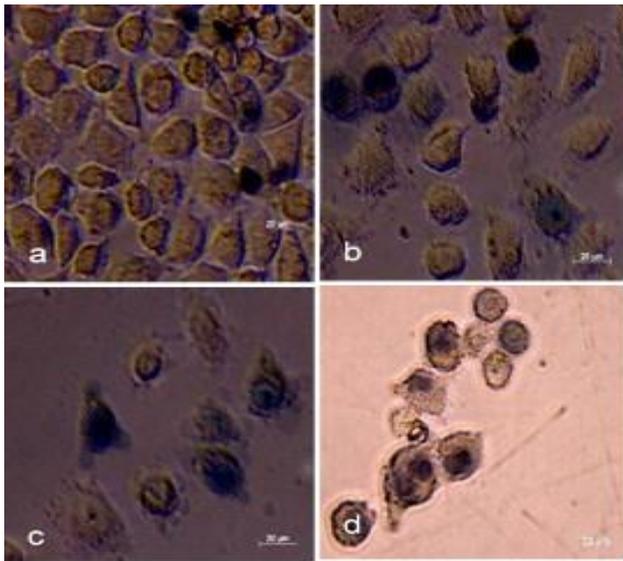


Figura 2 Analisis de la permeabilidad de la membrana plásmatica, a) Control, células no expuestas a IP6; b), c) y d) Células HeLa expuestas a 0.048, 3.125 y 25 mg/mL IP6 respectivamente.

Análisis estructural de núcleo y citoesqueleto

El efecto del IP6 en las células HeLa, muestra la despolimerización de los microfilamentos (citoesqueleto) y como consecuencia la pérdida de la formación de la monocapa y el redondeamiento de las células sin pérdida de la adhesión celular en las células expuestas. Sin embargo, la exposición a la concentración de 25mg/mL de IP6 la célula comienza no solo a perder la comunicación extracelular sino que también pierde su morfología característica. En el núcleo no se observan evidentes alteraciones.

En el control positivo de daño celular (H_2O_2 3%), se puede apreciar que el núcleo permanece íntegro a diferencia del citoesqueleto, el cual pierde su forma característica y no es posible apreciar los microfilamentos de actina, ya que el peróxido de hidrógeno tiene la capacidad de inducir la desorganización de la actina de los microfilamentos, afectando directamente la morfología.

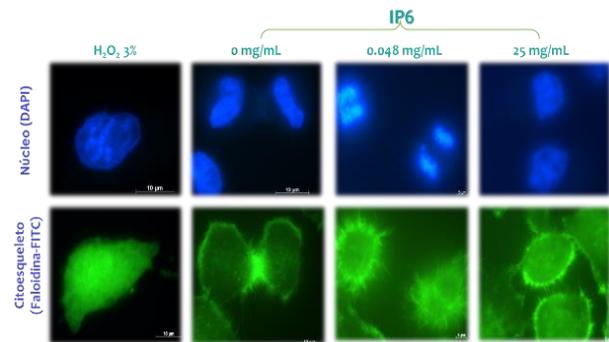


Figura 3 Análisis estructural de los organelos de las células HeLa expuestas a IP6

Perfil de proteínas totales

En la figura 5 se puede observar el perfil total de proteínas de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de IP6, en el que se muestra que existe una alteración en el perfil de proteínas totales ($Mr \geq 180-26$).

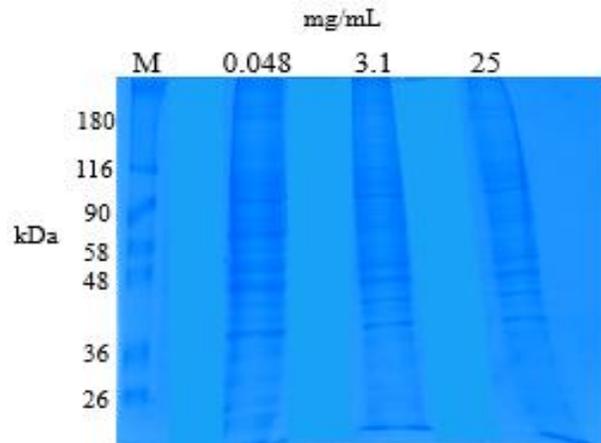


Figura 4 Perfil de proteínas totales de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de IP6

Conclusiones

El IP6 presenta un efecto citotóxico dependiente de la concentración mediante la alteración del citoesqueleto y la membrana celular.

Agradecimiento

Agradezco todo el apoyo al Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

Referencias

Abulkalam M. Shamsuddin, I. V. (1997). IP6: A NOVEL ANTI-CANCER AGENT. Elsevier, 343-354.

American Cancer Society, I. (2014). Cáncer de origen primario desconocido. Atlanta, Estados Unidos.

American Cancer Society, I. (2015). Métodos complementarios y alternativos para la atención del cáncer.

American Cancer Society, I. (2016). Cancer Facts & Figures . Obtenido de <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>

Borghi, A. (2011). Vitaminas y Suplementos Útiles para Personas con Cáncer. Obtenido de <http://www.sanasana.com/latinohealthmagazine/vitaminas-y-suplementos-utiles-personas-con-cancer/>

Cole, P., & Rodu, B. (2001). Cancer: Principles & Practice of Oncology. 6a, pp: 241-252.

Fox C. H., Eberl M. Phytic acid (IP6), (2002), Novel broad spectrum anti-neoplastic agent: asystematic review. Complimentary therapies in Medicine, 10, pp: 229-234.

Fu Min, Song Yang, Wen Zhaoxia Lu Xingyi, Cui Lianhua. (2016). Inositol Inhibit Colorectal Cancer Metastasis to the liver in Balb/c Mice. Nitrientes, 8, pp: 286-302.

Gómez, M. (2006). IP6 o ácido fítico. . Obtenido de <http://www.dietametabolica.es/ip6.htm>

Hidalgo Martínez, A. C. (2006). El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el por qué no funciona el programa nacional de detección oportuna. Biomed, pp: 81-84.

Instituto Nacional del Cáncer, I. (2008). Manual de Enfermería y Oncología. A. Goldman, pp: 7.

Instituto Nacional del Cáncer, I. (2014). Antioxidantes y prevención del cáncer. Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/dieta/hoja-informativa-antioxidantes>.

Lazcano Poce Eduardo Cesar, D. S.-V.-Q.-L.-A. (1999). Factores que determinan la participación en el tamizaje de cáncer cervical en el estado de Morelos. Salud pública de México, pp: 278-285.

Liu Guiyuan, Song Yang, Cui Lianhua, Wen Zhaoxia, Lu Xiaoquin. (2015). Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells in culture: PI3K/Akt pathway as a potential target. Int J Clin Exp Pathol; 8 (2), pp:1402-1410

Loewus, F. (2002). Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. Food Chemistry, pp: 53-61.

López Gonzalez A.A., F. G. (2009). Fitato y su utilidad en la práctica clínica. Medicina Balear, pp: 39-46

Murray, M. B. (2002). La curación del cáncer, pp: 181.

Nootriment. (2011). Inositol Hexaphosphate Benefits, Dosing & Safety Information. Obtenido de <http://nootriment.com/inositol-hexaphosphate/>

Mundial de la Salud, I. (2012). Datos y cifras sobre el cáncer. Obtenido de <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

Organización Mundial de la Salud, I. (2015). Cáncer. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Reddy, N. R. (2002). Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. Food phytates, 25-51.

Shamsuddin Abulkalam M., Vucenik Ivana, Cole E. (1997). Ip6: A novel anticancer agente. Life Xcienses, Vo. 61, No. 4, pp: 343-354

Silvia Aibar; et al. (2008). Manual de enfermería oncológica.

Sing Rana, Agarwal Rajesh. (2005). Prostate Cancer and Inositol Hexaphosphate: Efficacy and Mechanisms. Anticancer Research, 25, pp: 2891-2904.

Solórzano del Río, H. E. (2015). El hexafosfato de inositol y el cáncer. Obtenido de <http://hector.solorzano.com.mx/036.html>

Timo Partanen, P. M. (2009). Causas y prevención del cáncer ocupacional. Acta médica constitutiva, 51 (4), pp:195-205.

Vikas Kumar, A. K. (2009). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Elsevier, pp: 945-959.