

2016 Mayo, 6(2): 1-2

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DE MONOTERPENOS EN CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES

Crespo R^{1,2}; Hurtado C⁴; Castro MA^{1,3}; Rodenak Kladniew BE^{1,2}; Montero Villegas SM¹; Polo MP^{1,2}; García de Bravo MM^{1,2}

¹INIBIOLP (UNLP-CONICET-CCT La Plata) Fac. de Ciencias Médicas de La Plata. ²Cátedra de Biología. ³Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. ⁴Sanford-Burnham Institute for Medical Research, San Diego, USA. Dirección postal del lugar de trabajo: calle 60 y 120 (1900) La Plata e-mail de contacto: ro_crespo@yahoo.com

Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, precedida sólo por las enfermedades cardiovasculares. Los fármacos utilizados actualmente para su tratamiento tienen una limitada actividad y causan una variedad de efectos indeseables que incluyen toxicidad cardíaca, pulmonar, neurológica y renal. Por lo tanto, es imperioso descubrir nuevos agentes anticancerosos con mayor eficacia y elevada selectividad por células tumorales. Los monoterpenos (Mts) son fitoquímicos presentes en aceites esenciales de frutos y plantas aromáticas utilizados en medicina tradicional como antiespasmódicos, vasodilatadores, antioxidantes y antimicrobianos. La actividad antitumoral de muchos Mts está siendo activamente examinada y los resultados reportados proporcionan importantes perspectivas para el uso de dichos compuestos naturales para el tratamiento del cáncer.

El geraniol (G) y el limoneno (L) son Mts que se encuentran principalmente en aceites de rosas y citronelas (G) y en el aceite de las cáscaras de los cítricos (L). Estos compuestos inhiben la proliferación de diversas líneas celulares por arresto del ciclo celular y/o inducción de apoptosis aunque los mecanismos moleculares responsables de estos procesos aún no han sido dilucidados ni evaluados en células normales. Diferentes mecanismos pueden ser responsables de estos efectos citotóxicos y podrían atribuirse a la naturaleza lipofílica y a los bajos pesos moleculares de los Mts, que permiten aumentar la fluidez de las membranas produciendo alteración del gradiente de pH, pérdida de potencial y reducción de la síntesis de ATP mitocondrial. La disminución de la producción de ATP induce la fosforilación y la consecuente activación de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP), un sensor del estado energético celular y un regulador metabólico, quien según estudios recientes cumpliría además un rol importante en la regulación del ciclo celular.

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que el G disminuye la proliferación de células tumorales tanto in vitro como in vivo induciendo apoptosis e inhibe dos enzimas reguladas negativamente por pAMPK: la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (principal enzima reguladora de la síntesis de colesterol) y la acetil CoA carboxilasa (principal enzima reguladora de la síntesis de ácidos grasos).

Objetivos

- Examinar el efecto antiproliferativo y citotóxico de los monoterpenos G y L en células en cultivo y ponderar su potencial utilización en el tratamiento del cáncer analizando su selectividad por células tumorales.
- Dilucidar algunos de los mecanismos celulares y moleculares responsables del efecto antiproliferativo.

Materiales y Métodos

Para la realización de los ensayos se utilizaron células tumorales proveniente de un adenocarcinoma humano (A549), fibroblastos de ventrículo de rata neonatal Hsd:Sprague-Dawley de 1-2 días y células madres embrionarias humanas (hESC-H9) y pluripotentes inducidas (hiPSC). Las células fueron incubadas durante 24h con distintas concentraciones de G (0,05-4 mM) y de L (0.01-4 mM). La proliferación celular se evaluó por conteo de células y por medición de síntesis de ADN (Click-iT® EdU assay). La citotoxicidad se analizó mediante el test de MTT y la técnica de exclusión de azul tripán determinando para cada tipo celular, los valores de IC50 (concentración de Mts que inducen muerte celular en un 50%). El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular se determinó por citometría de flujo. La técnica de TUNEL se empleó para cuantificar apoptosis. La determinación de pAMPK por Western-blot se utilizó para evaluar la activación de AMPK.

Resultados

Se demostró que los Mts evaluados inhiben proliferación celular de ambos tipos celulares de manera dosis dependiente. Los valores de IC50 obtenidos por MTT para células tumorales fueron de 800 µM para G y 1 mM para L; mientras que los valores registrados para las células normales fueron ≥ 1450 µM para G y ≥4 mM para L. Las células tumorales incubadas con concentraciones correspondientes a sus IC50 de ambos Mts, mostraron que el efecto antiproliferativo está asociado a un arresto del ciclo celular principalmente en las fases G0/G1 para G y G2/M para L. En las células normales, estas concentraciones de G y L mostraron una disminución en la síntesis de ADN, pero que sólo representó un 20% de inhibición de la proliferación celular. Se determinó además que la inducción de apoptosis en

2016 Mayo, 6(2): 2-2

células tumorales fue de 8% G y 6% L, mientras que en las células normales se registraron valores muy inferiores. Finalmente, se observó que el tratamiento con estos Mts ocasiona un incremento de la fosforilación de AMPK.

Discusión y/o conclusiones

Los monoterpenos G y L ejercen un efecto antiproliferativo en todos los tipos celulares evaluados. Se observa una moderada selectividad por células tumorales siendo los índices de selectividad (IS: definido como IC_{50} células normales/ IC_{50} células tumorales) 1.81 y ≥ 4 para G y L respectivamente. Por lo tanto, estos Mts pueden ser considerados potencialmente útiles como agentes antitumorales efectivos y de baja toxicidad. En células tumorales el efecto citotóxico de ambos Mts está asociado a una detención del ciclo celular (con arresto en distintas fases según el monoterpeno considerado) y a un aumento de la muerte celular programada, mecanismos que podrían desencadenarse por la activación de AMPK. La fosforilación de AMPK inducida por los Mts interferiría con múltiples vías de señalización vinculadas al crecimiento y proliferación celular.

Palabras claves: monoterpenos, inhibición de proliferación, cultivos celulares