

EFECTO DEL INOSITOL HEXAFOSFATO (IP6) SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS

Sánchez Venegas Dulce Karina ¹, Flores Villavicencio Lérica Liss ², Castruita Domínguez José Pedro³, Sabanero López Myrna⁴, Carrillo Landell Felipe Guadalupe⁵, Sánchez Ramos Sanjuana⁶

¹ [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [dulceeo626@gmail.com]

² [Departamento de Biología, Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [leri_oo@hotmail.com]

³ [Departamento de Ecología, Universidad de Guadalajara] | Dirección de correo electrónico: [casdompe@hotmail.com]

⁴ [Departamento de Biología, Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [myrna.sabanero@gmail.com]

^{5, 6} [Departamento de Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: 5 [fecarrillo@itesi.edu.mx]; 6 [sansachez@itesi.edu.mx]

Resumen

El hexafofosfato de inositol (IP6) es un compuesto orgánico que se encuentra presente en casi todas las células de mamíferos, entre ellas las humanas, y es esencial para llevar a cabo las funciones vitales más importantes. Se considera altamente benéfico para la salud humana, puesto que se le atribuyen grandes cualidades, siendo la mayor de ellas su potente efecto antioxidante. El mecanismo de acción es evitar la formación de radicales libres, los cuales son causantes de enfermedades degenerativas como el cáncer; dado que el organismo no puede sintetizarlo, se obtiene mediante la alimentación. Actualmente se comercializa como suplemento alimenticio, sin embargo, no hay reportes que indiquen el efecto que presenta a nivel celular y estructural. 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%, bajo las condiciones de 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.

Abstract

Inositol hexaphosphate (IP6) is an organic compound which is present in almost all mammalian cells, including human, and is essential to carry out the most important vital functions. It is considered highly beneficial to human health, thanks to its great qualities as its powerful antioxidant effect. The mechanism of action is to prevent free radicals formation, which are causative of degenerative diseases such as cancer; because the body can not synthesize, it is obtained from food. Today it is marketed as a dietary supplement, however, there are no reports indicating the effect to cellular and structural level. In this work was evaluated the inhibition of growth presents a culture of cells HeLa (CCL-2, human cervical adenocarcinoma), cultured in DMEM with 10% FBS under conditions of 37 ° C and 5% CO₂. To carry out this study the cells were exposed to different concentrations of IP6 (0.048-25 mg/mL). Subsequently, the metabolic activity was determined with the XTT assay and trypan blue method to measure cell viability and evaluate membrane permeability. For the structural analysis of cells was used phalloidin-FITC and DAPI to analyze the core and actin microfilaments by epifluorescence microscopy.

Palabras Clave

Inositol hexafofosfato (IP6); citotoxicidad; cáncer; HeLa.

INTRODUCCIÓN

El término cáncer puede aplicarse a un amplio número de enfermedades que afectan cualquier parte del cuerpo, y 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 y 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 [4].

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 [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 [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 [7], sin embargo, no hay reportes que indican el efecto que éste presenta a nivel celular y estructural. En consecuencia, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico que produce el IP6 sobre células cancerosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

El inositol hexafosfato empleado en esta investigación fue proporcionado por la empresa Natural Health, S.A. de C.V., a partir de esta muestra se realizó una suspensión de 100 mg/mL de medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Cultivo celular

Para este estudio se utilizó un cultivo de células HeLa ATCC No. CCL-2 (Células de adenocarcinoma cervicouterino humano), las cuales fueron cultivadas en medio DMEM con SFB 10% bajo las condiciones de 5% de CO₂ a 37°C.

Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad celular se evaluó con dos técnicas diferentes, con XTT y con azul de tripano. El ensayo con XTT se realizó para determinar la DL₅₀, en el cual la sal de tetrazol [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2Htetrazolio-5-carboxianilida] es reducida por enzimas celulares hasta formar una sal de formazán soluble y coloreada que permite medir la actividad metabólica mediante espectrofotometría [8]; para llevar a cabo este ensayo se contó con una placa de 96 pozos con células HeLa expuestas a partir de 100 mg/mL de IP6 por dilución seriada a las cuales se les aplicó el ensayo con XTT [8]. El método de azul de tripano se empleó para medir la viabilidad celular por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas [9], para lo cual se expusieron pozos que contenían 1x10⁵ células/mL a diferentes concentraciones de IP6; alta, media y baja (250, 3.1 y 0.048 mg/mL respectivamente) [9].

Análisis estructural

Con la finalidad de analizar la estructura celular se empleó la microscopía de epifluorescencia, aplicando la Faloidina-FITC, la cual se une a la actina de los microfilamentos del Citoesqueleto [10]; y el DAPI, que tiene la capacidad de unirse

fuertemente a las bases nitrogenadas [11]. Para esto se sembraron 6 pozos con células expuestas a una concentración alta (25 mg/mL), una baja (0.048 mg/mL) de IP6 y para el control negativo se utilizó H₂O₂ al 3%.

Determinación de proteínas totales

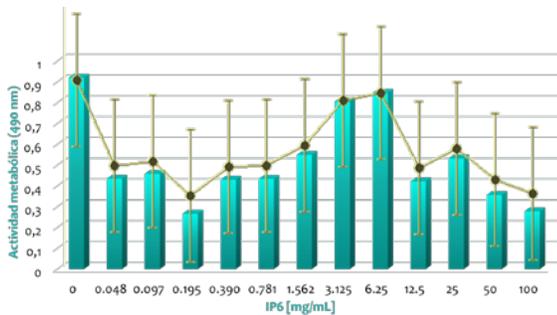
Para determinar las proteínas totales se utilizó el método de Lowry, en el que los reactivos forman complejos coloreados con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas presentes en una muestra [12]. Para esto se sembró una placa de 6 pozos con células HeLa, las cuales fueron expuestas a concentraciones de 0.048 y 25 mg/mL de IP6. [12]

Determinación de proteínas totales y expresión del gen HSP70

Para determinar el perfil de proteínas totales se empleó la técnica de SDS-PAGE [13] y para determinar la expresión del gen HSP70 se aplicó el ensayo de RT-PCR [14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Gráfica 1, el IP6 no muestra efecto significativo sobre la actividad metabólica celular, puesto que no hay diferencia significativa respecto al control, por lo que no es posible obtener una DL₅₀.



Gráfica 1: La gráfica representa la actividad metabólica mitocondrial (490 nm) a las diferentes concentraciones de IP6, y la desviación estándar obtenida a partir de una prueba de Tukey Kramer muestra que no existe diferencia significativa respecto al control.

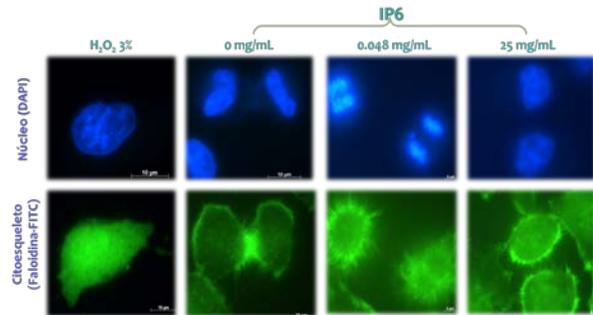
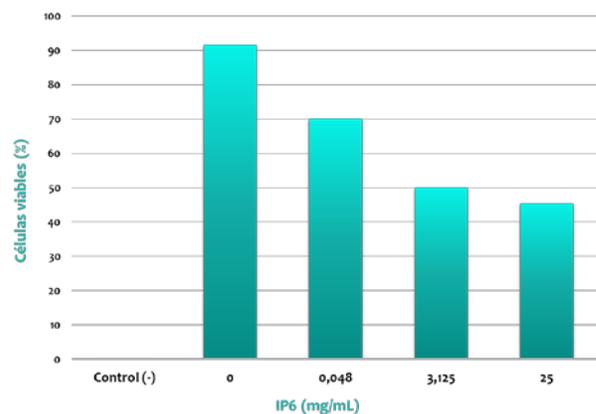


Figura 1: La imagen representa el análisis estructural empleando H₂O₂ al 3% como control negativo y tratamiento de IP6 a diferentes concentraciones. El peróxido de hidrógeno empleado es una sustancia que provoca daños en la morfología celular que altera la conexión entre célula y célula por lo que en la imagen el citoesqueleto pierde la forma celular característica y no se aprecian los microfilamentos. Para los tratamientos a las concentraciones de IP6 empleadas el núcleo permanece íntegro, incluso a bajas concentraciones se muestran células en división, a diferencia de altas concentraciones de IP6, en el que los microfilamentos tienden a desaparecer y las células comienzan a perder su forma celular característica.

Aplicando el método de azul de tripano se puede observar que el colorante penetra y tiñe las membranas lo que indica que la permeabilidad de la membrana se ve afectada, por lo que la viabilidad celular presenta una alteración dependiente de la concentración, tal como se muestra en la Gráfica 2.



Gráfica 2: La gráfica muestra el porcentaje de células viables después de aplicar el tratamiento con IP6 a diferentes concentraciones, donde se puede observar que la viabilidad celular es afectada

La Figura 1 representa el análisis estructural de organelos celulares empleando peróxido de hidrógeno al 3% como control negativo, en el que 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. Para las diferentes concentraciones utilizadas como tratamiento de IP6, se puede observar la integridad del núcleo, sin embargo, a altas concentraciones de IP6 el citoesqueleto comienza a presentar daños.

En la Figura 2 se puede observar el perfil total de proteínas a partir de células HeLa expuestas a diferentes concentraciones, en el que se muestra que no hay degradación de proteínas.

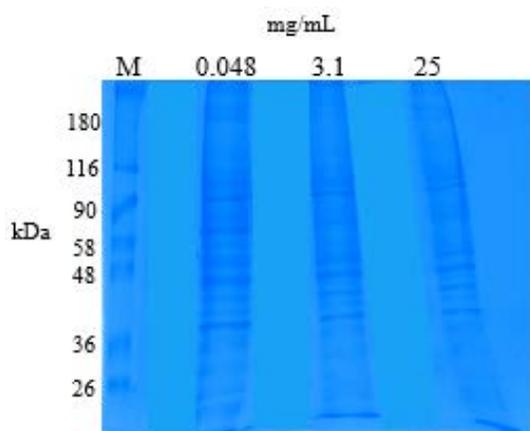


Figura 2. Perfil total de proteínas a partir de células HeLa

CONCLUSIONES

No fue posible obtener una DL_{50} puesto que el IP6 no presenta un efecto significativo sobre la actividad metabólica celular. Sin embargo, la viabilidad celular muestra una alteración dependiente de la concentración. Por otro lado, el perfil de proteínas totales no muestra alguna alteración.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo del presente trabajo fue posible gracias al Laboratorio de Biología Celular de la Universidad de Guanajuato, en especial a la Dra. Myrna Sabanero López y a la Dra. Lérica Liss

Flores Villavicencio. También se agradece la colaboración del Dr. José Pedro Castruita Domínguez de la Universidad de Guadalajara, a la empresa Natural Health, y a mis asesores la Maestra Sanjuana Sánchez Ramos y al Dr. Felipe Guadalupe Carrillo Landell, por su apoyo.

REFERENCIAS

- [1] Instituto Nacional del Cáncer. (2008). Manual de Enfermería y Oncología. (A. Goldman, Ed.) (pp 7).
- [2] Organización Mundial de la Salud. (2012). Datos y cifras sobre el cáncer. Recuperado el 02 de Agosto de 2012, de <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- [3] American Cancer Society. (2016). Cancer Facts & Figures. Recuperado el 2 de Agosto de 2016, de <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>
- [4] Murray, M., Birdsall, T., Pizzorno, J. E., & Reilly, P. (2002). La curación del cáncer. (pp 181)
- [5] Solórzano, H. E. (2015). El hexafosfato de inositol y el cáncer. Recuperado el 25 de Julio de 2016, de <http://hector.solorzano.com.mx/036.html>
- [6] Gómez, M. (2006). IP6 o ácido fítico. Recuperado el 22 de Julio de 2016, de <http://www.dietametabolica.es/ip6.htm>
- [7] Nootrimet. (2011). Inositol Hexaphosphate Benefits, Dosing & Safety Information. Recuperado el 02 de Agosto de 2016, de <http://nootrimet.com/inositol-hexaphosphate/>
- [8] American Type Culture Collection. (2008). XTT Cell Proliferation Assay Kit.
- [9] Laboratorio de Genómica Viral y Humana. (2008). Conteo y Evaluación de la Viabilidad de Células Mononucleares.
- [10] Piñeiro, A., Capeans, C., Domínguez, F., Buceta, M., Carneiro, C., Blanco, M., . . . Sánchez-Salorio, M. (2012). Efecto de los inhibidores de la vía mitogénica del proto-oncogén ras en la proliferación del epitelio pigmentario de la retina. Recuperado el 22 de Julio de 2016, de <http://www.oftalmo.com/seo/archivos/maquetas/B/3BA7DF85-7501-4089-0365-00004449BDAB/articulo.html>
- [11] Molecular Probes. (2001). DAPI Nucleic Acid Stain.
- [12] O.H. Lowry, N. R. (1951). Valoración de proteínas por el método de Lowry.
- [13] UAH. (2012). Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
- [14] Abello, K. A. (2011). Determinación de variantes del virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de papa (PYVV) por análisis molecular de tres genes aislados colombianos de Solanum spp.