

CAPÍTULO VI

Expresión de genes relacionados con apoptosis

1.- Introducción

2.- Protocolos para análisis genéticos

3.- Resultados en MCF-7

4.- Discusión

1.- Introducción

Como se ha descrito anteriormente, la apoptosis o muerte celular programada es un proceso crítico en la homeostasis de órganos y tejidos. Así, la restauración terapéutica de la respuesta apoptótica puede resultar muy ventajosa en enfermedades como el cáncer o la linfoproliferación. Por el contrario, en el caso de patologías que dan lugar a degeneración celular, la inducción de procesos inhibidores de apoptosis puede resultar beneficiosa.

La secuencia de procesos característica de la apoptosis está regulada por diferentes familias de genes. La familia de proteínas Bcl-2 juega un papel fundamental en el control apoptótico, conteniendo miembros con funciones opuestas [KOR92]. Estos miembros interactúan entre sí, con lo que un aspecto del control de la apoptosis tiene lugar por interacciones entre proteínas. En este sentido, uno de los factores determinantes para la viabilidad celular es la relación entre los niveles de productos inhibidores y los niveles de productos inductores de esta familia multigénica. Los principales productos inhibidores son bcl-2 y bcl-x_L, que es un producto del gen bcl-x. Las terapias anticancerosas basadas en fármacos tienden a inducir apoptosis en las células tumorales. Por esta razón, la inhibición de este mecanismo de muerte celular constituye una de las bases de los fenómenos de resistencia quimioterápica. La sobreexpresión de estos miembros inhibidores está relacionada con fenómenos de resistencia quimioterápica en diferentes tipos de tumor [MIN95]. Por otro lado, existen miembros de la citada familia que actúan frente a bcl-2, es decir, productos proapoptóticos tales como bcl-x_S y bax [OLT93].

La acción combinada de genes inductores e inhibidores de apoptosis puede ser influenciada por diferentes factores externos a la célula [ZHA96]. En este sentido, muchas drogas utilizadas en el tratamiento farmacológico del cáncer actúan por medio de inducción de apoptosis, incrementando la expresión de genes relacionados con este tipo de muerte celular como son p53 y miembros de la familia bcl-2. También agentes biológicos tales como adenovirus con carga genética controlada han sido empleados para incrementar la expresión de inductores de apoptosis como bcl-x_S [SUM95]. Desde esta perspectiva, cabe preguntarse si las bajas dosis de radiación ionizante podrían ser

capaces de modificar la expresión de este tipo de genes, cambiando así la sensibilidad celular a la apoptosis.

Hay una diversidad de estudios acerca de los efectos genéticos producidos por la radiación ionizante. Para radiaciones de baja LET (fotones X, γ y radiación β) se han encontrado cambios en los niveles de RNA mensajero correspondiente al gen *bcl-x* [ZHA96]. Otros estudios han mostrado inducción de apoptosis [WAN99], estímulo de mecanismos de reparación enzimática [DUC00], y en dosis elevadas, incremento mutagénico e inestabilidad genómica [LOR98]. También en dosis intermedias y altas se han observado alteraciones cromosómicas [POH00] y cambios en el tamaño y estructura del ADN [GEO00]. En el rango de dosis bajas, hay muy pocos estudios sobre los efectos genéticos de la radiación alfa. Por estas razones, hemos llevado a cabo la serie de experimentos que se describe a continuación encaminados a estudiar la influencia de las bajas dosis de este tipo de radiación.

2.- Protocolos para análisis genéticos

Después de las medidas de crecimiento celular realizadas en las células, se extrajo el ARN de las mismas [CHO87]. Las muestras de ARN total fueron tratadas con ARNsa-freeADNsa I con el fin de eliminar el ADN genómico, diluidas apropiadamente para igualarlas, y almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Las diferencias entre los niveles relativos de ARNm de *bcl-2*, *bcl-x* y *bax* entre células MCF-7 irradiadas y no irradiadas fueron analizadas usando la técnica de transcripción inversa por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se transcribió inversamente 1 μgr del ARN celular total durante una hora en una reacción con 10 nM de Tris HCl de pH 7.6, 12 nM de KCl, 2 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTPs, 0.5 μM de hexámeros, 40 unidades de RNAsin y 200 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis avian, en un volumen final de 40 μl .

Como control, se utilizó la expresión del gen GAPDH, cuyos niveles de RNAm no se modifican con las dosis de radiación empleadas en los estudios. La expresión de

este gen fue evaluada junto con la de los genes de apoptosis en cada muestra. El 10 % del producto de cDNA fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa conteniendo 10 mM de Tris HCl de pH 8.3, 50 mM de KCl, 0.001 % de gelatina, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, y una unidad de Taq polimerasa utilizando el par de primers apropiado (0.5 µM de cada) según el siguiente patrón de temperaturas en los ciclos: 5 minutos a 94 °C, 25 ciclos a 94 °C, 30 segundos, 60 °C, 30 segundos, y un minuto a 72°C. La PCR fue realizada en un volumen total de 50 µl usando un termociclador.

Los “primers” para la amplificación de los genes bcl-2, bcl-x y bax fueron los siguientes pares:

bcl-2: primer 5' AGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC
primer 3' AGATAGGCACCAGGGTGAGCAAGCT

bcl-x primer 5' CGGGCATTTCAGTGACCTGAC
primer 3' TCAGGAACCAGCGGTTGAAG

bax primer 5' ATGGACGGGTCCGGGGAGCAGC
primer 3' CATCCTGAGGCACCGGGTCC

GAPDH primer 5' GGTCTTACTCCTTGGAGGCCATGTG
primer 3' ACCTCACTACATGGTTTACATGTT

En nuestras condiciones experimentales las curvas de amplificación frente al número de ciclos mostraron para la amplificación deseada de los fragmentos correspondientes a bcl-2, bcl-x y bax, que el número óptimo de ciclos estaba entre 25 y 27. Posteriormente, los productos de la amplificación por PCR fueron visualizados tras electroforesis en 2% de gel de agarosa, ó en 4-20% de gel de poliacrilamida, a 300 voltios y 12°C de temperatura constante. En ambos casos se usó tinción con bromuro de etidio.

Se verificó la especificidad de los productos de PCR por secuenciación directa del ADN extraído de los geles con un secuenciador usando AmpliTaq Gold polimerasa y un kit de secuenciación de dye terminator. Las secuencias de oligonucleótidos usados para la secuenciación fueron las mismas que las usadas para la amplificación por PCR.

Como se muestra en la Figura 6.1, el esquema de irradiación de cultivos fue el mismo que el correspondiente a los análisis de crecimiento celular.

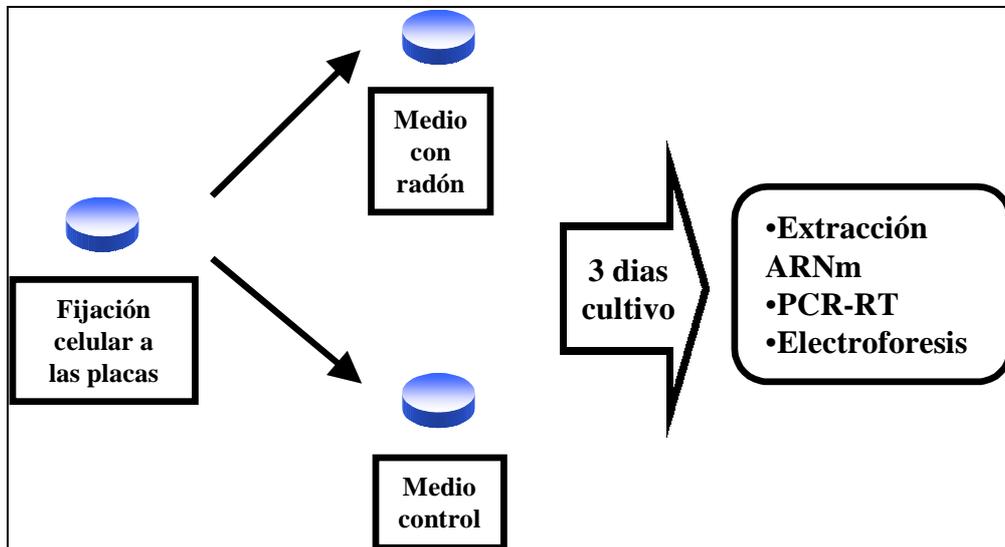


Fig. 6.1: Esquema de los experimentos sobre expresión de genes

3.- Resultados en MCF-7

Se realizaron seis experimentos para analizar la expresión de genes relacionados con apoptosis, en los cuales las dosis variaron entre 0.6 y 8.3 mGy. En un primer análisis se realizó una PCR por transcripción inversa con un número de ciclos suficiente para alcanzar la saturación. Tras esta reacción, por medio de electroforesis en gel de agarosa se observó que las MCF-7 mostraban una elevada expresión de la familia bcl-2 de genes vinculados al proceso de muerte celular por apoptosis. Los genes de esta familia analizados fueron bcl-2, bax y bcl-x.

Como se mostró en el apartado dedicado a la apoptosis, la sobreexpresión de *bcl-2* da como resultado la inhibición de muerte celular apoptótica en respuesta a diferentes estímulos inductores de dicho proceso. Por el contrario, el gen *bax* pertenece a los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. El *bcl-x* codifica información para al menos dos productos proteínicos que se diferencian en las regiones de corte del ARN mensajero correspondiente a este gen, y que tienen efectos opuestos sobre la inducción de apoptosis. El transcrito largo o *bcl-x_L* es homólogo al *bcl-2* y tiene una capacidad similar para inhibir la muerte celular apoptótica. En el lado opuesto, el transcrito corto ó *bcl-x_S* se traduce en un péptido capaz de inhibir la acción de *bcl-2* o *bcl-x_L*, aumentando la sensibilidad apoptótica de la célula.

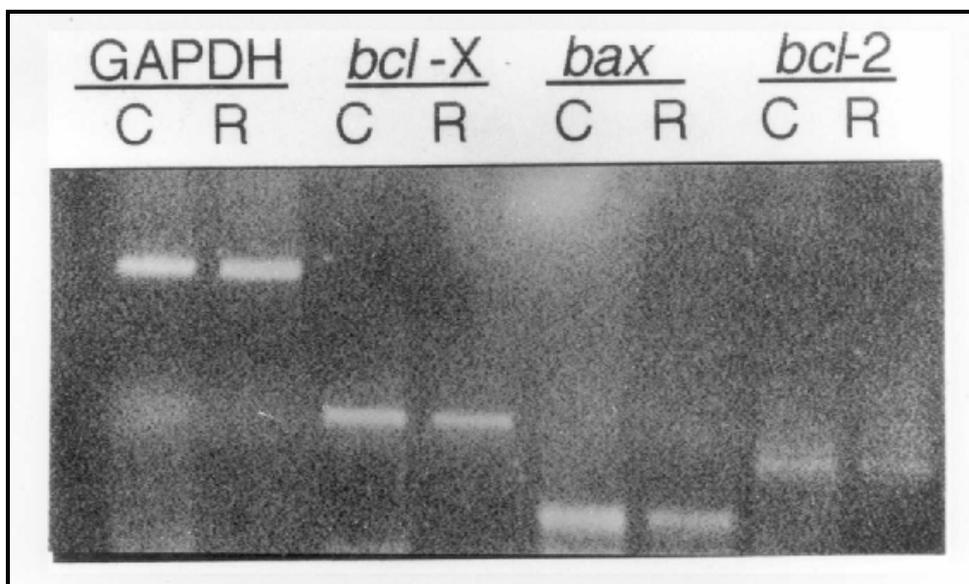


Fig. 6.2: Electroforesis de productos de PCR correspondientes a los genes analizados de la familia *bcl-2*

El más expresado de los tres genes analizados fue *bax* seguido de *bcl-2* y *bcl-x*, mostrando tener un papel importante en la regulación de apoptosis en esta línea celular (Fig. 6.2). Para comparar la expresión de estos genes en las células irradiadas y las de control, se realizó una PCR inversa sin llegar a la saturación con 27 ciclos. Para el análisis de los productos se utilizó la electroforesis en gel, tomando como referencia la expresión del gen *GADPH*, no modificada por la radiación. Tras un primer análisis se observaron diferencias en la expresión de los genes estudiados en los cultivos irradiados

con respecto a los de control. bax y bcl-2 mostraron una menor expresión en los cultivos irradiados que en los controles. En el caso del gen bcl-x no se apreciaron diferencias significativas en su expresión.

Para realizar un análisis más fino de este último gen, se realizó una PCR con menos ciclos y se corrieron los productos por electroforesis en gel de acrilamida, de mayor resolución que el gel de agarosa (Fig. 6.3). Para comprobar que las bandas aparecidas en la electroforesis se correspondían con los dos transcritos de bcl-x, se analizaron con un secuenciador. Como resultado, se obtuvo que los fragmentos mayores (360 pares de bases) correspondían como se esperaba al bcl-x_L, y los fragmentos menores (170 pares de bases), que no aparecían en los análisis de los controles, correspondían a la forma inductora de apoptosis bcl-x_S descrita en la literatura [BOI93].



Fig. 6.3: Comparación de la expresión de los transcritos bcl-x_S y bcl-x_L

De este análisis más detallado se obtuvo por comparación con la expresión del GAPDH, que el bcl-x_L mostraba ligeros aumentos, no significativos, con respecto al

control, en los casos de dosis mayores de 1 mGy. Si que se observaron diferencias en el caso del *bcl-x_S*, no expresado en las células no irradiadas, que mostró niveles intermedios de expresión en las células irradiadas. Esquemáticamente, estos resultados se muestran en la tabla 6.1:

GEN	Control (C)	Irradiadas (R)
GAPDH	++++	++++
bcl-x_L	+++	+++
bcl-x_S	-	+ / ++
bax	++++	++
bcl-2	++	+

Tabla 6.1: Expresión relativa de los genes estudiados

4.- Discusión

No se conocen con precisión los mecanismos por los que agentes externos, entre ellos la radiación ionizante, son capaces de modificar la expresión de ciertos genes. Esta expresión se cuantifica habitualmente por los niveles de ARNm o de las proteínas codificadas por cada gen en el citoplasma. Los cambios en la expresión de un gen pueden ser causados por interacciones en el núcleo celular o en el citoplasma. En el núcleo, estos cambios pueden ser causados por la alteración de las secuencias reguladoras de la expresión de cada gen o intrones. Mientras que en el citoplasma los cambios de expresión pueden estar relacionados con acciones sobre las moléculas de ARNm (ruptura), o sobre proteínas (desnaturalización).

Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos, especialmente en lo referido a la inducción de expresión de *bcl-x_S*, revelan dos aspectos interesantes referidos a la acción de las partículas alfa sobre las células. En primer lugar, indican la preponderancia de mecanismos de actuación sobre el medio de cultivo. Por otro lado, el aumento de la expresión de *bcl-x_S*, inductor de apoptosis, sugiere la posibilidad de

utilizar estas bajas dosis de partículas alfa para incrementar la eficacia de fármacos quimioterápicos que actúan provocando apoptosis en células tumorales.

Debido al corto alcance de las partículas alfa, las ionizaciones en el medio se producen en espacios muy reducidos. Cuando la concentración de emisores alfa en el medio de cultivo es bajas, la probabilidad de interacciones directas partícula alfa-células se reduce notablemente. Como se comprobó con la simulación Montecarlo presentada, tan sólo una pequeña proporción (menos del 1 %) de las células presentes en el cultivo son afectadas directamente por una partículas alfa. Por otro lado, las modificaciones observadas en la expresión de genes no puede explicarse por un efecto directo sobre la molécula de ADN.

La expresión de estos genes se cuantifica a partir de la cantidad de ARN mensajero con la secuencia correspondiente a cada uno de ellos. Así, los cambios observados en dicha expresión parecen estar más relacionados con interacciones sobre estas moléculas de ARNm que con interacciones con el ADN, ya que en tal caso se observarían más cambios en la secuencia genética que en la expresión del gen mismo. Parece por lo tanto razonable pensar que la causa de estos cambios de expresión está en la acción que especies químicas generadas en el medio por la radiación alfa ejercen sobre las moléculas de ARN mensajero transcritas de las regiones del genoma correspondientes a cada gen analizado.

Los efectos observados en este estudio pueden se comparados con otros obtenidos con diferentes fuentes de partículas alfa como el ^{239}Pu . Un ejemplo representativo de este tipo de estudios es el realizado por Kadhim [KAD92], en el que de nuevo se hace referencia al porcentaje de células afectadas por las partículas alfa, de forma similar a otro estudio llevado a cabo por Mays [MAY87]. Estos trabajos inciden en la idea de que a dosis bajas, el número de células irradiadas es muy bajo, y la causa principal de los efectos encontrados hay que buscarla en moléculas generadas en el medio capaces de reaccionar con las moléculas de ADN ó ARN.

Esta hipótesis parece verificarse con los cambios que hemos encontrado en los lugares de corte del ARN mensajero correspondiente al gen *bcl-x*. La formación del transcripto *bcl-x_S* tras la irradiación es el resultado de los cortes en dos lugares

específicos de la cadena de ARNm. Estos sitios son los únicos que poseen la secuencia GTTCA (Fig. 6.4). Teniendo en cuenta el carácter aleatorio de las deposiciones energéticas de la radiación, y por tanto su inespecificidad en cuanto a las lesiones producidas, parece que estos cortes pudieran ser consecuencia de una acción de los radicales libres sobre la molécula completa de ARNm, que se rompe por los lugares de enlace más débiles.

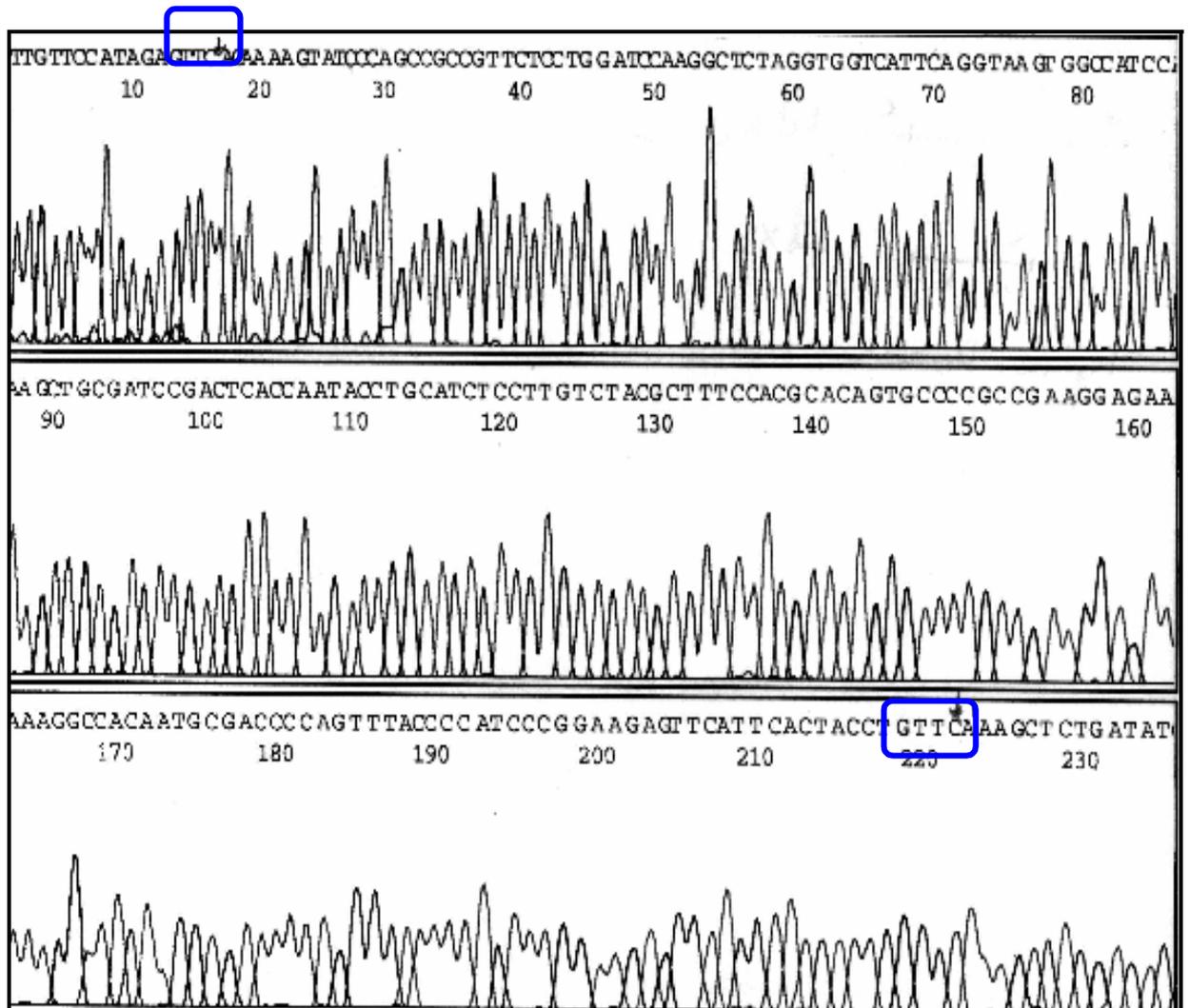


Fig. 6.4: Secuencia de ARNm de *bcl-x* entre los puntos de corte con GTTCA

En el trabajo de Kadhim, el efecto de la irradiación alfa es la inducción de inestabilidad cromosómica, que se transmite a la descendencia de las células hematopoyéticas irradiadas. Este hecho parece estar relacionado con el incremento en la expresión del gen *bcl-xL*, encontrado en nuestros experimentos. La inhibición de apoptosis inducida por los productos de este gen podría tener consecuencias mutagénicas, al no eliminarse aquellas células que presentan mutaciones relevantes.

Sin embargo, la proteína *bcl-xS* es capaz de inhibir la acción de *bcl-2* o *bcl-xL*, aumentando la sensibilidad apoptótica de la célula frente a agentes físicos o farmacológicos. Esta posibilidad resulta interesante en el caso de células tumorales. Si es posible aumentar la respuesta apoptótica de tales células, se puede mejorar sensiblemente la eficacia de los fármacos empleados en terapias anticancerosas, que actúan por este mecanismo principalmente. En un estudio realizado por Sumantran [SUM95]) se mostró que el agente quimioterápico taxol resultaba más efectivo sobre células MCF-7 cuando éstas habían sido previamente tratadas con adenovirus, con el fin de aumentar la expresión del gen *bcl-xS*.