

2011 Octubre, 2(3): 1-1

Análisis de la expresión de la mucina MUC1 en un modelo de hipoxia tumoral in vitro.

Rabassa ME^{1,3}, Pasquale MA², González PH³, Croce MV¹

1. CINIBA, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP 2. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas, UNLP 3. Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

E-mail: mrabassa@med.unlp.edu.ar

Introducción:

La expresión de antígenos asociados a tumores puede ser afectada por diversos estímulos presentes en las neoplasias. La hipoxia es un fenómeno presente en la mayoría de los tumores y es capaz de estimular la expresión de MUC1. Esta mucina ha sido propuesta como moduladora del daño celular inducido por hipoxia. La colocación de un cubreobjeto sobre un cultivo en monocapa simula las condiciones de isquemia tumoral y podría constituir un modelo adecuado para la evaluación de la expresión de este marcador.

Objetivos

Explorar un modelo de hipoxia in Vitro, para el estudio de la expresión de antígenos asociados a tumores.

Materiales y Métodos

5 x10⁴ células HeLa se cultivaron sobre cubreobjetos de 24x24 mm (inferior) durante 24 horas. Luego se colocaron cubreobjetos de 8x24 mm (superior) sobre la monocapa en cultivo, en cápsulas nuevas y sujetos a la misma con parafina estéril. Para el análisis inmunohistoquímico los cultivos se prolongaron durante 6, 24, 48 y 72 horas para posteriormente ser fijados en formol 4% en PBS pH 7,4 luego de remover el cubreobjeto superior. Se emplearon anticuerpos monoclonales (AcMo) anti MUC1. La presencia de Hsp70 y de malondialdehído se analizó por medio de sus respectivos anticuerpos y se utilizó como evidencia de estrés celular. Las determinaciones de muerte celular se realizaron con y sin remoción de los cubreobjetos superiores, sin fijación de las células. La tinción se realizó empleando Hoestch 33342 y Ioduro de Propidio para luego calcular el índice apoptótico. La proporción de células no viables de aspecto normal se empleó como indicador de muerte por necrosis.

Resultados

La aplicación de un cubreobjeto sobre el cultivo celular indujo la muerte de las células HeLa, la cual fue evidente a las 6, 24 y 72 horas. Se observó el establecimiento de tres zonas bien diferenciadas: a) la exterior, no sometida a estrés, b) un margen comprendido desde el borde del cubre objeto superior y aproximadamente 1-2 mm hacia la zona interna y c) la región interna debajo del cubreobjeto.

En todos los tiempos estudiados se observaron células viables en la región del margen (b) siendo a las 72 horas un tercio del total inicial de células viables. A las 24 horas las células viables en la región interna (c) representaron menos del 0,1% del total original. El índice apoptótico de las regiones a, b y c fue de 0,009 0,016 y 0,020 a las 6 horas; 0,010 0,048 y 0,203 a las 24 horas y 0,015 0,050 y 0,060 a las 72 horas, respectivamente. La expresión de MUC1 fue del 20% a las 0 horas y aumentó al 70%, 50% y 80% de las células del margen a las 6, 24 y 72 horas respectivamente, con una intensidad de +3 a las 72h, respecto de +1 a las 0 horas. La detección de Hsp70 fue de mayor intensidad a las 6 horas con el 45% de las células de la región interna (c) positivas respecto del 5% observado a las 0 horas. La presencia de malondialdehído fue mayor a las 24 horas con el 30% de las células del margen (b) e internas (c) positivas.

2011 Octubre, 2(3): 2-2

Conclusiones

La aplicación de un cubreobjetos sobre un cultivo celular en monocapa genera un área que muestra presencia citoplasmática de Hsp70 a las 6 horas, y de muerte celular vías apoptosis y necrosis. La detección de malondialdehído indica daño mediado por radicales derivados del oxígeno. A pesar de ello, una población de células permanece viable en la interfase (b) entre el exterior y la región cubierta. El análisis de la expresión de MUC1 demostró que la mayoría de las células HeLa que sobreviven en esta región poseen la mucina. Los datos presentados permiten inferir que la inducción de MUC1 podría contribuir a la mitigación del daño por hipoxia y/o radicales libre del oxígeno.