

# LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA MELATONINA POTENCIA SU EFECTO APOPTÓTICO EN CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO

Ordóñez R<sup>1,3</sup>, Fernández A<sup>1,3</sup>, Martínez L<sup>2,3</sup>, Núñez S<sup>2,3</sup>, Carabajo-Pescador S<sup>1,3</sup>, Baulies A<sup>2,3</sup>, Prieto-Domínguez N<sup>1,3</sup>, García-Ruiz C<sup>2,3</sup>, Fernández-Checa JC<sup>2,3</sup>, Mauriz JL<sup>1,3</sup>, González-Gallego J<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Universidad de León. <sup>2</sup>Departamento de Muerte y Proliferación Celular, Instituto Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC (IIBB-CSIC) y Liver Unit-Hospital Clinic-IDIBAPS. <sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd).



## INTRODUCCIÓN



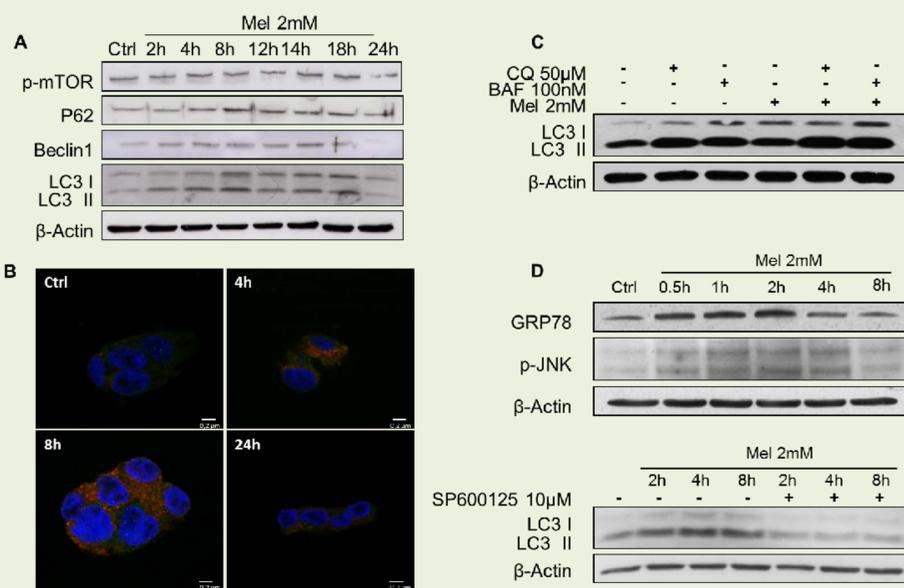
El hepatocarcinoma es la quinta neoplasia más frecuente, y la tercera causa de muerte por cáncer. La autofagia favorece la degradación lisosomal de orgánulos dañados y de proteínas alteradas, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular; sin embargo, este proceso también puede contribuir a la muerte de la célula en diferentes contextos. Las ceramidas son efectores importantes en la regulación de la vía autofágica, y podrían mediar en la relación entre apoptosis y autofagia. La hormona melatonina tiene propiedades pro-apoptóticas, anti-angiogénicas y anti-invasivas en células HepG2 de hepatocarcinoma humano. Sin embargo, los efectos de la modulación de la autofagia por parte de la melatonina y su conexión con la apoptosis son aún desconocidos en el hepatocarcinoma.

## OBJETIVO

Analizar la modulación de la autofagia tras la administración de melatonina y sus efectos en los mecanismos de muerte en células HepG2.

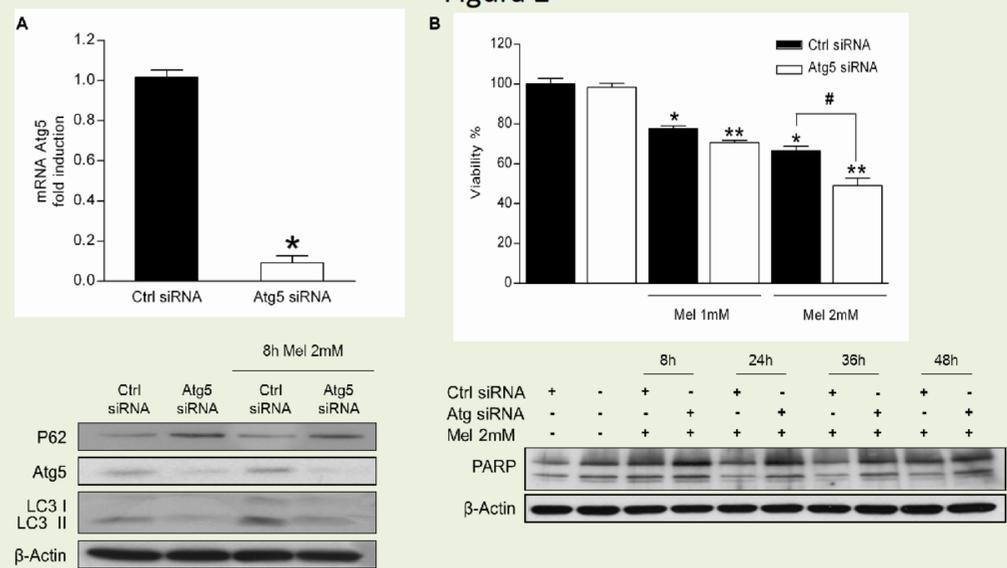
## RESULTADOS

Figura 1



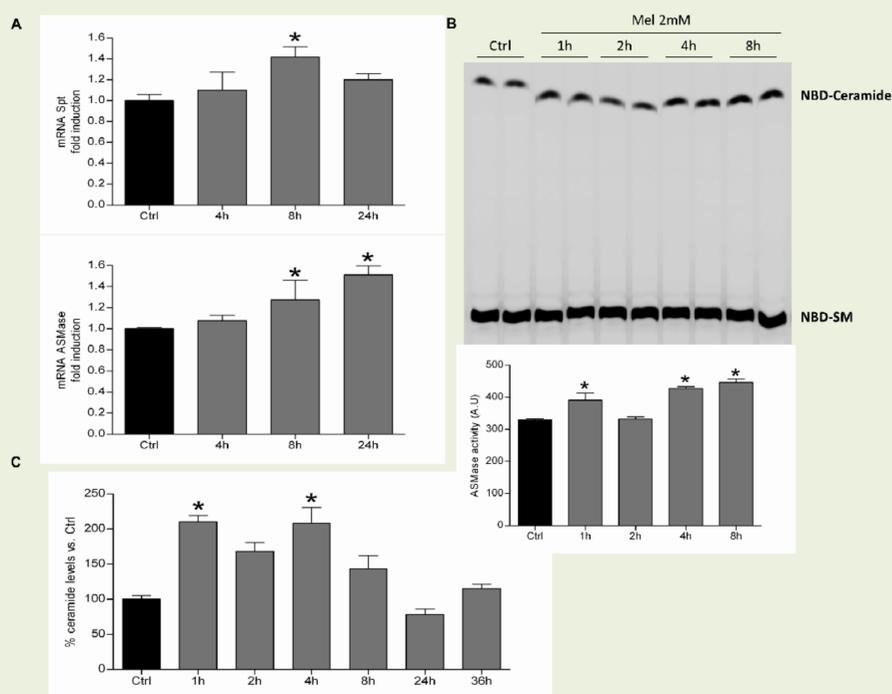
**Fig.1 (A)** La administración de melatonina (2 mM) en células HepG2 de hepatocarcinoma humano induce una autofagia transitoria caracterizada por un incremento de los niveles de LC3II y beclin-1 y una degradación de P62. No se observan cambios en los niveles de p-mTOR. **(B)** Mediante microscopia confocal se observa una co-localización de LAMP2 y LC3 que alcanza un máximo entre 8 y 12 horas y desaparece a las 24 horas. **(C)** El flujo autofágico indica una correcta funcionalidad del proceso inducido por la melatonina. **(D)** La administración de melatonina induce estrés de retículo (GRP78) y la fosforilación de JNK. La inhibición de p-JNK impide la estimulación de la autofagia.

Figura 2



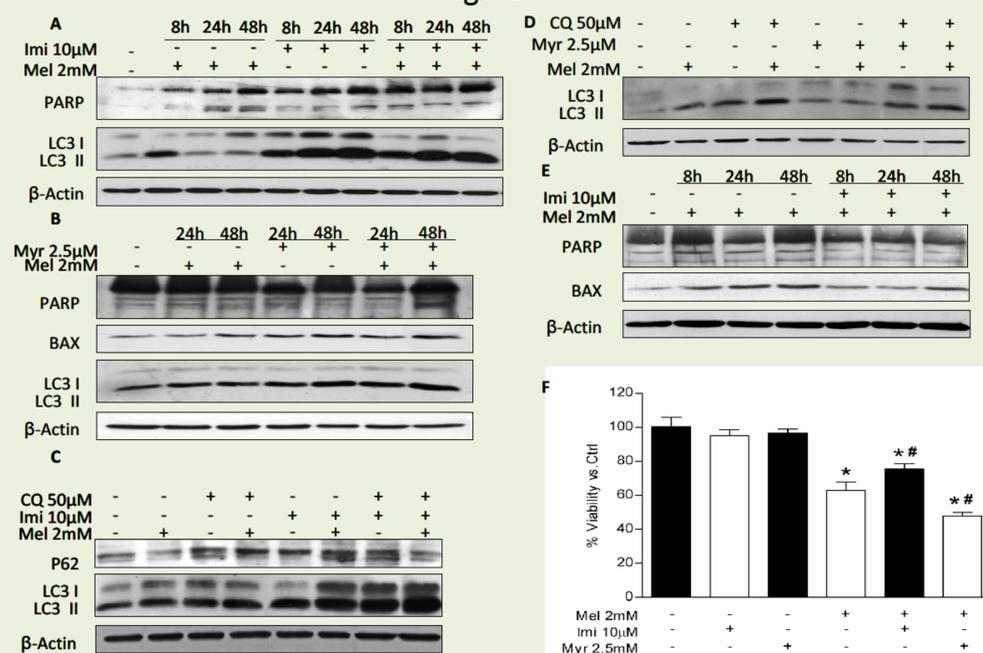
**Fig.2 (A)** El silenciamiento de Atg5 en células HepG2 reduce en un 90% los niveles de mRNA de Atg5 y la respuesta autofágica a la administración de melatonina no se produce. **(B)** Las células con el gen silenciado son más susceptibles a la muerte celular inducida por la melatonina que las células no silenciadas, con un incremento significativo en la rotura de PARP. \* Diferencias significativas  $p < 0.05$  versus control. # Diferencias significativas  $p < 0.05$  versus células no tratadas.

Figura 3



**Fig.3** La melatonina induce la expresión de la serin palmitoiltransferasa (SPT) y de la esfingomielinasa ácida (ASMase) **(A)**, incrementa la actividad de la ASMase **(B)** y estimula la formación de ceramidas **(C)** tras 4 horas de ser administrada. \* diferencias significativas  $p < 0.05$  versus control.

Figura 4



**Fig.4 (A)** La inhibición de la ASMase provoca un incremento de los niveles de LC3II y reduce los niveles de PARP. **(B)** La inhibición de la SPT produce un incremento de PARP y BAX aunque no modifica los niveles de LC3II. **(C y D)** La evaluación del flujo con los inhibidores muestra que la ausencia de actividad ASMase provoca un defecto en el flujo y que la inhibición de la SPT impide la respuesta autofágica por la melatonina. **(E)** En células silenciadas, la inhibición de la ASMase previene la apoptosis inducida por la melatonina. **(F)** La disminución en la viabilidad celular inducida por la melatonina es revertida, en parte, cuando se impide la actividad de la ASMase, mientras que la inhibición de la SPT potencia su efecto citotóxico.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la respuesta autofágica a la administración de melatonina tiene un efecto protector en células HepG2. El metabolismo de las ceramidas está implicado de diversas maneras en la autofagia y en la muerte celular, por lo que la modulación de la autofagia como posible diana para potenciar la citotoxicidad de la hormona debe realizarse con cautela.

