

## MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR TUMORAL RESISTENTE A VINCRISTINA

ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO<sup>1\*</sup>, MA. ELENA CANTÚ CÁRDENAS<sup>1</sup>, EDUARDO I. DE LA ROSA MORENO<sup>1</sup>, MARGARITA ORTIZ MARTÍNEZ, ARTURO S. VÁZQUEZ, ELENA MERCADÉ GIL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, Av. Pedro de Alba s/n, Ciudad Universitaria, Monterrey, Nuevo León, México

<sup>2</sup>Facultat de Farmàcia, Universtat de Barcelona, España.

\*E-mail: jegomez@fcq.uanl.mx

### Resumen

Los mecanismos de resistencia a fármacos a nivel de membrana más comunes desarrollados por las células neoplásicas involucran la sobre-expresión de la glicoproteína P (gp-P), también llamada MDRP (del inglés Multi-Drug Resistance Protein). Su participación en el proceso de resistencia se manifiesta al disminuir la concentración terapéutica de un fármaco en el citoplasma al transportarlo al exterior apenas ingrese en la célula, impidiendo así que el fármaco sea efectivo. En base a lo anterior se implementó un método para la obtención de células de origen neoplásico resistentes a Vincristina, mediante exposición a dosis graduales, con el propósito de proveer un modelo celular útil para estudios moleculares, farmacéuticos o de citología.

## 1. Introducción

### 1.1 Glicoproteína P

Cuando las características fisicoquímicas de una sustancia le impiden atravesar por sí misma la membrana citoplasmática, se requiere la participación de diversos mecanismos de transporte, generalmente proteínas trans-membrana; entre las que predominan las pertenecientes a la familia ABC, del inglés *ATP-binding cassette*. Considerada una superfamilia, se pueden encontrar representantes de la misma tanto en organismos unicelulares como en organismos superiores; además es una de las más antiguas encontradas en la naturaleza. El término ABC pone de manifiesto que estas glicoproteínas dependen del ATP como fuente de energía, son capaces de llevar a cabo el transporte de sustancias en ambos sentidos con respecto a la membrana citoplasmática, tanto productos endógenos derivados del metabolismo como lípidos y esteroides, así como sustancias exógenas como los fármacos [1, 2].

A pesar de los múltiples desempeños y beneficios que prestan estas glicoproteínas para el correcto funcionamiento celular, son a su vez responsables de uno de los mecanismos de resistencia más comunes desarrollados por las células neoplásicas. La sobre-expresión de la glicoproteína P (gp-P), también llamada MDRP (del inglés *Multi-Drug Resistance Protein*), tiene el efecto de disminuir la concentración terapéutica del fármaco en el citoplasma al transportarlo al exterior apenas ingrese en la célula. Se impide entonces que el fármaco ejerza su acción con la efectividad deseada. Esto redundaría en la necesidad de incrementar la dosis administrada al paciente para lograr el mismo efecto terapéutico. Además del fenómeno de resistencia a fármacos, esta familia proteica también se ve involucrada en diversos procesos, como la fibrosis quística y la resistencia a drogas por parte de muchos microorganismos, así como en diversas afecciones hereditarias [3-6].

### 1.2 Vincristina

*Vinca rosae* Linn es una planta originaria de Madagascar, perteneciente a la familia Apocináceas, conocida como "Teresitas" en la República Mexicana. Es un pequeño arbusto de hoja perenne y denso follaje. Contiene alcaloides de gran interés en la quimioterapia anti-neoplásica, entre los que destacan: *vincristina* (VC) y *vinblastina* (VB). Estos fármacos están indicados en el tratamiento de diversas enfermedades como son: leucemias, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, neuroblastoma, tumor de Wilms, cáncer testicular, sarcoma de Kaposi relacionado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y micosis fungoides entre otras, principalmente enfermedades provocadas por células con alta tasa de reproducción. Las similitudes entre VC y VB son muchas y son debidas principalmente a su semejanza estructural, sin embargo,

su toxicidad y espectro de acción difieren considerablemente. La VC presenta mayor tasa de acumulación intracelular, lo que podría explicar su potencia cuando se administra en bolo, mientras que ambos fármacos muestran la misma citotoxicidad cuando las células son expuestas durante periodos prolongados. El mecanismo de acción de los alcaloides de la vinca, consiste en la unión a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina, impidiendo su polimerización para la formación de los microtúbulos que intervienen en varias funciones celulares de suma importancia, entre las que destacan la formación del huso mitótico, y el desplazamiento y liberación de neurotransmisores a nivel de los axones. El punto de máxima sensibilidad celular es durante la metafase, teniendo como principales efectos la dispersión y desorganización del material cromosómico, que desencadenará finalmente la muerte celular. La resistencia a estos fármacos puede deberse tanto a su baja capacidad para ingresar a la célula debido a la sobre-expresión de la gp-P, como a la disminución en su capacidad de fijación a tubulina debido a alteraciones en sus subunidades sin embargo, este último mecanismo de resistencia puede contrarrestarse empleando taxanos, que inhiben la desagregación de los microtúbulos, ya que los sitios de acción de los alcaloides de la vinca son distintos a los de los taxanos y la colchicina [7-16].

En el desarrollo de nuevas terapias anti-neoplásicas, tanto en el descubrimiento de moléculas activas como en la implementación de estrategias eficaces, debe considerarse conveniente contar con modelos celulares de estudio representativos, y el modelo de una línea celular resistente a fármacos resulta ideal. Debido a que las células de neoplasias desarrollan mecanismos de resistencia a diversos fármacos, se requiere desarrollar líneas celulares con esta característica de manera previa a la evaluación de la efectividad de la terapia experimental propuesta.

### 1. Material y métodos

Para el desarrollo de una línea celular resistente a VC se utilizaron células HeLa provenientes de la colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC No. CCL-2). Las condiciones de cultivo de la línea celular fueron las indicadas por el proveedor: incubación a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad, además se cumplió con todas las condiciones y recomendaciones para su óptimo mantenimiento. Para ello se empleó una incubadora con inyector de CO<sub>2</sub> (Shel Lab) y Campana de bio-seguridad (LABCONCO) Tipo II [17]. Se empleó medio de cultivo MEM (GIBCO) adicionado con 10% v/v de suero bovino fetal (GIBCO) y la amplificación de la línea celular se llevó a cabo con tripsina (GIBCO 0.25%). Los lavados requeridos durante los pases de mantenimiento de la línea celular y la preparación de las placas de cultivo para los ensayos se llevaron a cabo con solución tampón de fosfatos (PBS) estéril a pH = 7.4.

Se prepararon placas de cultivo de 24 pozos (CORNING) con una densidad celular de  $2 \times 10^4$  células/pozo. Transcurridas 24 horas y permitiendo que el cultivo estuviera cerca de la monocapa se administró la primera dosis de VC como *Sulfato de Vincristina* (MP Biomedicals) a una concentración final de 5 nM. Se permitió el contacto células/fármaco durante 24 horas.

Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas dos veces con PBS. El medio de cultivo fue sustituido por medio fresco. Este procedimiento se repitió a las 72 horas aplicando sucesivamente las siguientes dosis de manera gradual: 5, 10, 20 nM para cada una de las preparaciones. El esquema del programa de aplicación de VC se presenta en resumen en la tabla 1. Cada determinación se realizó por triplicado en dos eventos sucesivos, y se llevaron a cabo los controles de crecimiento celular correspondientes. A fin de comprobar la resistencia adquirida, los cultivos se expusieron nuevamente a los fármacos a concentraciones dentro del rango que abarca el tratamiento previamente descrito. La viabilidad celular se determinó mediante el método de exclusión con azul de tripano.

Para analizar los cambios en la morfología celular provocados en el desarrollo de resistencia a VC se prepararon cámaras de cultivo sobre cubreobjetos de 16 pozos (Nunc) con  $5 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  células/pozo. Cada una de las preparaciones fue sometida al mismo programa de tratamientos con VC antes descrito y se llevaron a cabo los controles de crecimiento celular correspondientes. Al término del tiempo de incubación para cada una de las dosis del programa de tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS por 30 minutos y fueron lavadas 2 veces con PBS, finalmente se lavaron una vez con agua destilada para evitar la presencia de sales cristalizadas y se cubrieron para su posterior análisis. Los cambios en la morfología celular se registraron mediante captación de imágenes con un microscopio Olympus BX 60.



Tabla 1. Esquema del programa de aplicación de las dosis de Vincristina.

Dosis	Día	Dosis VC* (nM)**	Horas Recuperación
1	1	5	72
2	5	10	72
3	9	20	72

\* Vincristina

\*\* Concentración Nano-molar

### 3. Resultados y discusión

La susceptibilidad de la línea celular HeLa después de la primera dosis de VC provocó la disminución de la población viable del cultivo hasta un 52 %. Se observaron abundantes células redondeadas y refringentes, no adheridas al fondo de la placa de cultivo y que responden de manera positiva a la captación del azul de tripano. Tras la administración de las siguientes dosis se observó el mismo efecto sobre la viabilidad celular pero a diferencia de lo observado en la primera aplicación. Los porcentajes de células muertas disminuyeron de manera considerable conforme al avance del programa de exposición a las dosis progresivas de VC, obteniéndose un 58 % de viabilidad con la segunda dosis (10 nM) y 62 % con la tercera (20 nM). La figura 1 muestra de manera gráfica los resultados obtenidos. Al administrar dosis inferiores una vez alcanzada la concentración máxima, se comprobó la disminución del efecto citotóxico de los fármacos sobre la población celular al comparar con los resultados obtenidos después de la primera exposición.

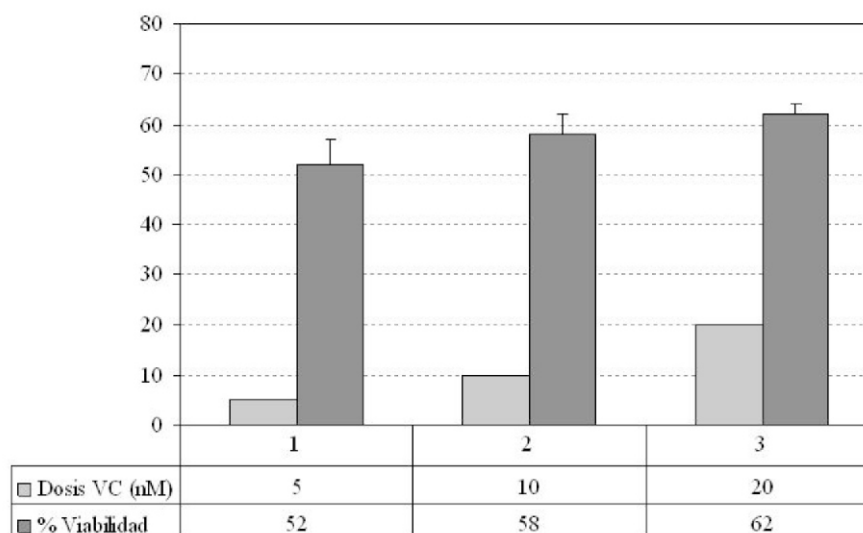
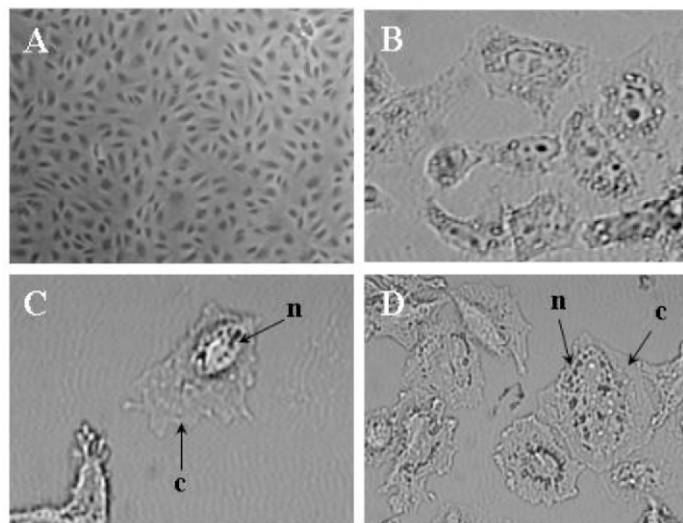


Figura 1. Representación gráfica de los porcentajes de viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a dosis graduales de Vincristina.

Existen reportes de experimentos *in vitro* que, administrando concentraciones de VC a 100 nM durante 3 horas, o bien, 10 nM durante 6-12 horas se logra la muerte del 50 % de las células. Además, en una gran parte de los tratamientos *in vivo* en los que se administra VC o VB en bolo se alcanzan concentraciones plasmáticas entre 200 y 400 nM, estas concentraciones se mantienen por un tiempo inferior a 2 horas, y se recomienda incluir un periodo de receso de tres a cuatro semanas, en algunos casos se incrementa la frecuencia de administración a más de una vez por semana por periodos cortos [12]. A diferencia de esto, nuestros resultados muestran claramente que empleando dosis menores y mayores tiempos de exposición, e incluyendo periodos de recuperación después de cada exposición a VC; se logra mantener una población de células mayor al 50 %.

El análisis microscópico de las células tratadas con VC reveló claramente cambios en la morfología celular. Es evidente el efecto citotóxico del fármaco sobre la población de células que sucumbe a su acción, mismas que adquieren progresivamente una forma redondeada, se tornan refringentes y paulatinamente pierden viabilidad y se van desprendiendo del fondo de la placa. En contraste, las células que toleran la presencia de VC y que sobreviven, presentan claros cambios en su forma de distribución en monocapa sobre la superficie de cultivo. Los cambios morfológicos observados son múltiples y se detectan como afecciones celulares.



**Figura 2.** Imágenes de microscopía de los cambios morfológicos de células HeLa resistentes a VC. A) Células control en monocapa (10x). B-D) Células HeLa expuestas a 5, 10 y 20 nM de VC, respectivamente (40x). La posición del núcleo celular (n) y el citoplasma (c) se indican con flechas.

#### 4. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se concluye que la línea celular de origen tumoral empleada en este estudio desarrolla resistencia mediante exposición a dosis graduales del alcaloide *vincristina* de *Vinca rosae* Linn. Las células resistentes presentan alteraciones morfológicas con respecto de las células no tratadas. La población de células resistentes obtenida por este método provee de un modelo celular útil para estudios moleculares, farmacéuticos o de citología.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo a Eduardo I. De la Rosa M. como becario del proyecto: “Incremento en la eficacia de farmacoterapias anti-neoplásicas mediante expresión de glicoproteínas fusogénicas recombinantes” (47362). Agradecemos también la valiosa cooperación de LQI. Alejandro Vázquez Dimas en la captación de imágenes de microscopía.

#### 6. Referencias

- [1] Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. 2001. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research* 11(7):1156-1166.
- [2] Sankatsing S., Beijnen J.H., Schinkel A.H., Lange J., Prins J.M. 2004. P Glycoprotein in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(4):1073-1081.
- [3] Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E. 2003. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Cancer Biology*. 8(5):411-424.
- [4] Borowski E., Bontemps-Gracz M.M., Piwkowska A. 2005. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochimica Polonica*. 52(3):609-627.
- [5] Miller J. 2000. Cancer Multidrug Resistance. *Nature Biotechnology*. Supplement. 18:18-20.
- [6] Bontemps-Gracz M.M., Kupiec A., Antonini I., Borowski E. 2002. The ability to overcome multidrug resistance of tumor cell lines by novel acridine cytostatics with condensed heterocyclic rings. *Acta Biochimica Polonica*. 49(1):87-92.
- [7] Beck W.T., Cass C.E., Houghton P.J. 2000. Microtubule-targeting anticancer drugs derived from plants and microbes: Vinca alkaloids, taxanes and epothilones. En: Holland J.F., Frei E. III., Bast R.C. Jr., Kufe D.W., Morton D.L., Weichselbaum R.R. (eds.) *Cancer Medicine*, 5a ed. Atlanta: American Cancer Society, p. 680-698.



- [8] Rivera-Fillat M.P., Pallarés-Trujillo J., Domènech C., Grau-Oliete M.R. 1988. Comparative uptake, retention and action of vincristine, vinblastine and vindesine on murine leukaemic lymphoblasts sensitive and resistant to vincristine. *Br J Pharmacol.* 93(4): 902–908.
- [9] Noble R.L. 1990. The discovery of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cellular Biology.* 68(12):1344-1351.
- [10] Bennouna J., Delord J.P. 2008. Campone M., Nguyen L. Vinflunine: a new microtubule inhibitor agent. *Clinical Cancer Research.* 14(6):1625-1632.
- [11] Leveque D., Jehl F. 2007. Molecular pharmacokinetics of catharanthus (vinca) alkaloids. *Journal of Clinical Pharmacology.* 47(5):579-588.
- [12] Simoens C., Vermorken J.B., Korst A.E., Pauwels B., De Pooter C.M., Pattyn G.G., Lambrechts H.A., Breillout F., Lardon F. 2006. Cell cycle effects of vinflunine, the most recent promising Vinca alkaloid, and its interaction with radiation, in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58:210–218.
- [13] Lobert S., Fahy J., Hill B.T., Duflos A., Etievant C., Correia J.J. 2000. Vinca Alkaloid-Induced Tubulin Spiral Formation Correlates with Cytotoxicity in the Leukemic L1210 Cell Line. *Biochemistry.* 39(39):12053-12062.
- [14] Ngan V.K., Bellman K., Hill B.T., Wilson L., Jordan M.A. 2001. Mechanism of Mitotic Block and Inhibition of Cell Proliferation by the Semisynthetic Vinca alkaloids Vinorelbine and its Newer Derivative Vinflunine. *Molecular Pharmacology.* 60(1):225-232.
- [15] Jordan M.A., Thrower D., Wilson L. 1991. Mechanism of inhibition by Vinca alkaloids. *Cancer Res.* 51:2212–2222.
- [16] Lee W.P., Lee C.L. 1994. Characterization of vincristine-resistant HOB1 lymphoma cell line showing the classical MDR phenotype and altered expression of membrane glycoproteins. *Oncology.* 51(1):2-8.
- [17] Freshney R.I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.* 5a. ed. Wiley-Liss, EEUU. p.p. 672.