

## Resistencia inducida por carboplatino y paclitaxel: ensayo preliminar en células de seminoma y cáncer gástrico

Raquel Luque 1, Cristina Mesas 2, Kevin Doello 1, Laura Cabeza 2, Gloria Perazzoli 3, Francisco Quiñonero 2, Ana Rosa Rama 4.

1 Service of Medical Oncology, Virgen de las Nieves Hospital, Granada, Spain

2Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Granada, Spain

3Department of Nursing, Physiotherapy and Medicine, University of Almería, Spain

4Department of Health Science, University of Jaén, Spain

Corresponding author: arama@ujaen.es

### Abstract

El carboplatino (CAR) y paclitaxel (PTX) son fármacos ampliamente estudiados en diferentes tipos tumorales. No obstante, no está totalmente demostrado el mecanismo de resistencia que pueden inducir estos agentes y si está en relación con el tipo de tumor. En este contexto, dos de los mecanismos más relevantes son lo mediados por la P-glicoproteína codificada por gen de resistencia a multidrogas MDR1 y la proteína 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos codificada por el gen MRP3. En este artículo hemos realizado una experiencia para determinar si CAR y PTX a dosis plasmáticas son capaces de modificar los mecanismos de resistencia mediados por los genes MDR1 y MRP3 en líneas celulares derivadas de cáncer gástrico y seminoma. Con este fin se obtuvieron líneas a partir de cultivos primarios de seminoma y cáncer gástrico (SEM y GAS, respectivamente). Las líneas fueron tratadas con concentraciones próximas a las plasmáticas de CAR, PTX y la combinación de ambas (CAR+PTX) durante 24, 48 y 72h para determinar su efecto en la proliferación y la modulación de los niveles de expresión de ARNm de MDR1 y MRP3. Nuestros resultados mostraron que las líneas SEM y GAS fueron sensibles a ambos fármacos especialmente a las 48 y 72 horas, no existiendo efecto sumatorio cuando se emplearon ambos fármacos juntos. Por otra parte, PTX indujo un rápido y gran aumento de MDR1 tanto en células SEM como en GAS aunque no afecto a la expresión de MRP 3. Por otra, CAR no afecto a la expresión de MDR 1, aumentando de una forma menos intensa la expresión de MRP3. Estos resultados sugieren que el CAR y PTX pueden inducir resistencia por mecanismos MDR1 y MRP3 siendo necesarios más estudios para determinar su relevancia en su aplicación en pacientes.

**Keywords:** seminoma, cáncer gástrico, resistencia; MDR; MRP; paclitaxel; carboplatino

### Introducción

El desarrollo de resistencia a múltiples fármacos (MDR) es una de las principales causas del fracaso del tratamiento quimioterapéutico. Uno de las principales moléculas relacionadas con este fenómeno es P-glicoproteína, una proteína de membrana codificada por el gen MDR1 (1).

Además, la expresión de la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP) y la proteína relacionada con el cáncer de pulmón (LRP) han implicado en la resistencia a los drogas en múltiples tipos de tumores (2). La glicoproteína P es una proteína de flujo de salida del fármaco dependiente de ATP que es capaz de

transportar compuestos estructuralmente no relacionados entre sí para mantener sus concentraciones intracelulares por debajo de los niveles citotóxicos (3). Por otra parte, MRP, miembro de la superfamilia de proteínas de transporte ABC, ha sido detectada en una amplia variedad de tipos de tumores. Su mecanismo de actuación es similar al de P-gp aunque en este caso no se produce el consumo de ATP, y sí una conjugación con glutatión (4).

Los fármacos citotóxicos a base de platino (cisplatino y carboplatino (CAR)), etopósido, doxorubicina y paclitaxel (PTX), utilizados ampliamente en diferentes tipos de tumores, han sido relacionados al desarrollo de resistencia a través de la sobreexpresión de genes como MDR1. No obstante, se desconoce si estos agentes modulan la expresión de otros genes de resistencia y si es una modulación de varios genes lo que finalmente hace ineficaz la quimioterapia en pacientes con patología tumoral. El CAR es un platino cuyo mecanismo de acción es la formación de enlaces coordinados de forma intercalante en el ADN y, con ello, dobles roturas de cadena. El PTX, por el contrario, es un agente que inhibe la despolimerización de microtúbulos del huso mitótico, deteniendo a la célula en fase G2/M (5). Nuestro estudio pretende examinar in vitro la posible la modulación de la expresión de los genes MDR1 y MRP3 en líneas celulares primarias de seminoma y cáncer gástrico tratadas con concentraciones plasmáticas de paclitaxel y carboplatino.

## **Material y Métodos**

### Cultivo de células

Las líneas celulares denominadas SEM (LC00500785) y GAS (LC00500012 (B04/8307) fueron obtenidas a partir de biopsia de un seminoma testicular humano y un cáncer gástrico, respectivamente, en la Red de Bancos de Tumores de Andalucía (Granada, España). Ambas líneas fueron cultivadas con medio Ham's F12K y DEMEM, respectivamente (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (inactivado por calor), 40 mg/L de gentamicina y 500 mg/L ampicilina (Antibioticos SA, España).

### Ensayo de proliferación celular

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (104 células por pocillo). Se usó MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] para el ensayo de proliferación. Cada pocillo se llenó con una solución de MTT (5 mg/ml), se incubó (4 h a 37 ° C), se retiró y luego se agregaron 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se usó el colorímetro multiescan Titertek (Flow, Irvine, CA, EE. UU.) para determinar la densidad óptica (570 nm y 690 nm). Posteriormente, se trataron con CAR (5 µM), PTX (30 µM) y CAR-PTX durante 72 h en base a los datos descritos por Marsh y cols., (2008) (7) y Fukuda y cols., (1999) (8) Los cambios morfológicos fueron analizados por microscopía óptica.

### Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

ADNc obtenido a partir de ARN total (1 µg) (kit Rneasy Mini, Qiagen; Promega, Madrid, España) fue usado para PCR con primers específicos de los genes MDR1 (Sense: 5' ATATCAGCAGCCCACATCAT 3'; antisense: 5' GAAGCACTGGGATGTCCGGT 3') y MRP3 (sense: 5' GAT ACG CTC GCC ACA GTC C3'; antisense: 5' CAG TTG GCC GTG ATG TGG CTG3'. El gen de la β-actina fue usado como control (sense 5'

ATCATGTTTGAGACCTTCAA3'; antisense:5' CATCTCTTGCTCGAAGTCCA 5'). Las amplificaciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa estándar (datos no mostrados). Se obtuvo una valoración cuantitativa de la expresión de los genes de resistencia mediante el sistema de documentación de Quantity One Analysis Software que permite obtener la expresión relativa de los genes en relación a la expresión de beta-actina.

### Análisis estadístico

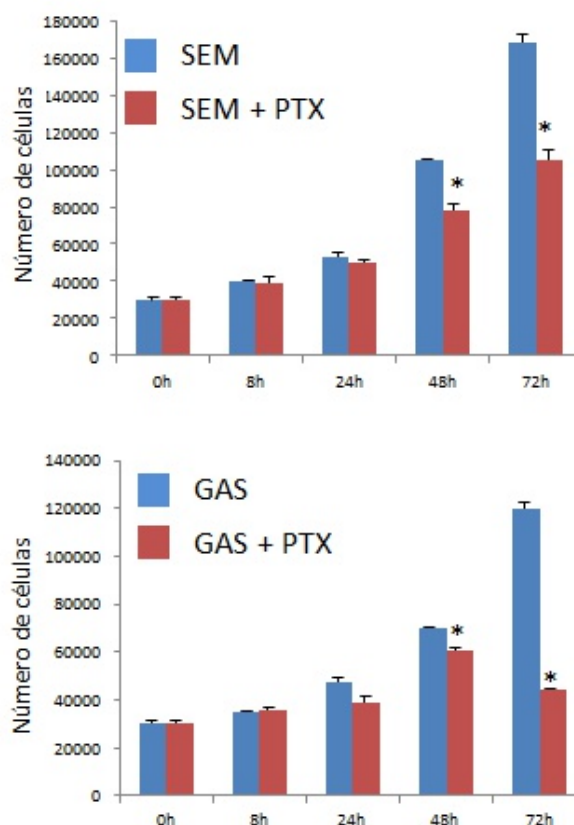
Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Los resultados se compararon con la prueba t de Student. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

### Ensayos de citotoxicidad

Las concentraciones PTX usadas inducen solo un 18.09% y un 37.5% de inhibición de la proliferación en las células de seminoma en los tiempo de exposición 48 y 72 h, respectivamente. Por el contrario, la exposición a 8 y 24 h no induce prácticamente ninguna inhibición de la proliferación. Un comportamiento similar fue encontrado en la línea de carcinoma gástrico GAS en donde la exposición PTX durante 8 y 24 h no provoca alteraciones significativas en su capacidad de replicación. A las 48 horas la inhibición de la proliferación fue de 15.7% y alcanzó un 65.5% cuando la exposición fue de las 72 h.

Por otra parte, concentraciones plasmáticas de CAR fueron testadas sobre las células SEM y GAS dando lugar a similares inhibición de la proliferación (alrededor del 22.02%) a las 72 h. A las 8, 24h e incluso 48h (especialmente en el caso de GAS) no se encontró modulación en la proliferación celular o esta fue muy pequeña. Por último, se realizó un tratamiento de asociación de PTX y CAR. La Figura 3,



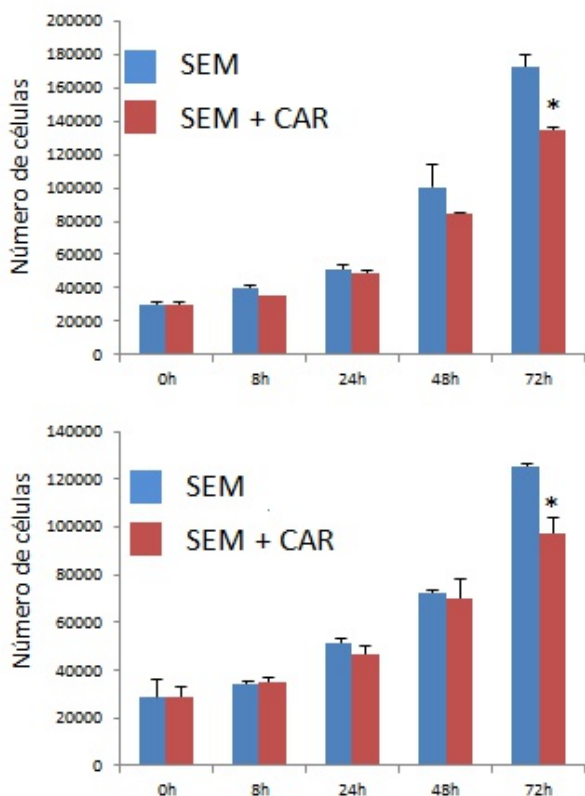
**Figura 1.** Efecto del tratamiento con PTX sobre la proliferación de células SEM y GAS. Los valores representan la media + S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

muestra que la combinación de ambos fármacos provoca un aumento en la inhibición de la proliferación en relación a la utilización de los fármacos utilizados de forma individual. No obstante, no existe un efecto sumatorio, probablemente porque a las concentraciones utilizadas se alcanza un efecto meseta, por saturación de los mecanismos de muerte celular inducida por los fármacos.

### Cambios en la morfología celular

Las células SEM mostraron una morfología de carácter alargado, con forma espiculada y con un crecimiento en monocapa de carácter nuclear con conjuntos de células que mantienen un estrecho contacto intercelular formando una especie de "red" aunque sin perder su morfología inicial. Las células SEM sometidas al tratamiento con PTX+CAR mostraron una reducción en la



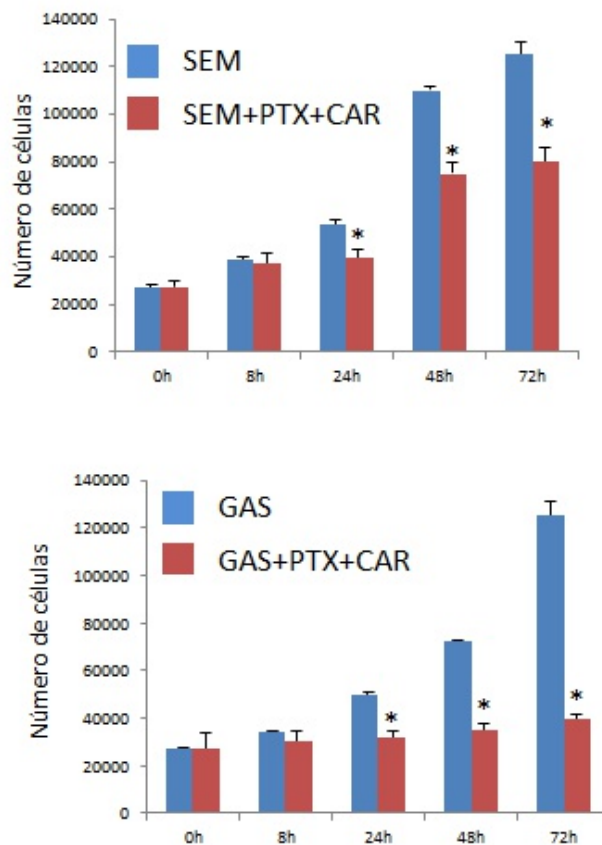


**Figura 2.** Efecto del tratamiento con CAR sobre la proliferación de células SEM y GAS. Los valores representan la media + S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

densidad aunque a las 72 h aparecieron de grupos de células en forma de núcleos celulares, no en monocapa, y que comenzaron a replicarse a pesar de la presión del fármaco. Las células GAS se comportaron de una forma muy similar a la de seminoma. Las células parentales presentaron un aspecto alargado con disposición en paralelo remediando las fibras musculares y creciendo en monocapa sin formar núcleos. La exposición al tratamiento combinado indujo una disminución de la densidad celular a partir de las 48 h. A las 72 h (y también a las 48 h) fue visible la presencia de núcleos de células que posteriormente crecieron en medio con agentes citotóxicos.

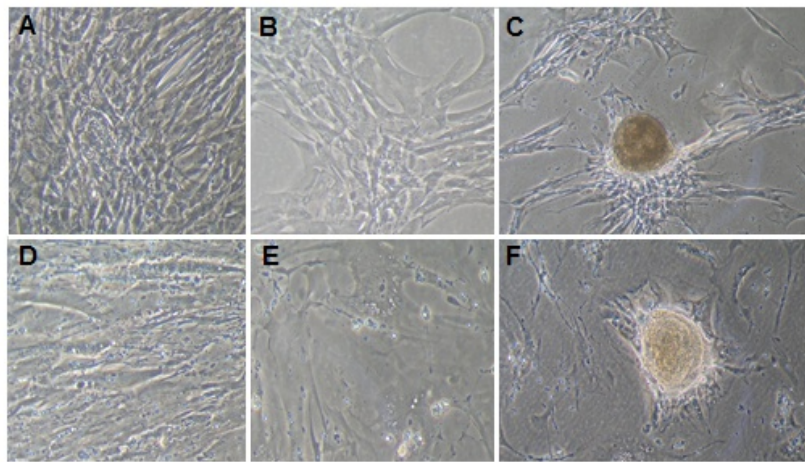
### Modulación de la expresión de MDR1 y MRP3

La valoración de la expresión de genes los genes de resistencia MDR1 y MRP3 se testó

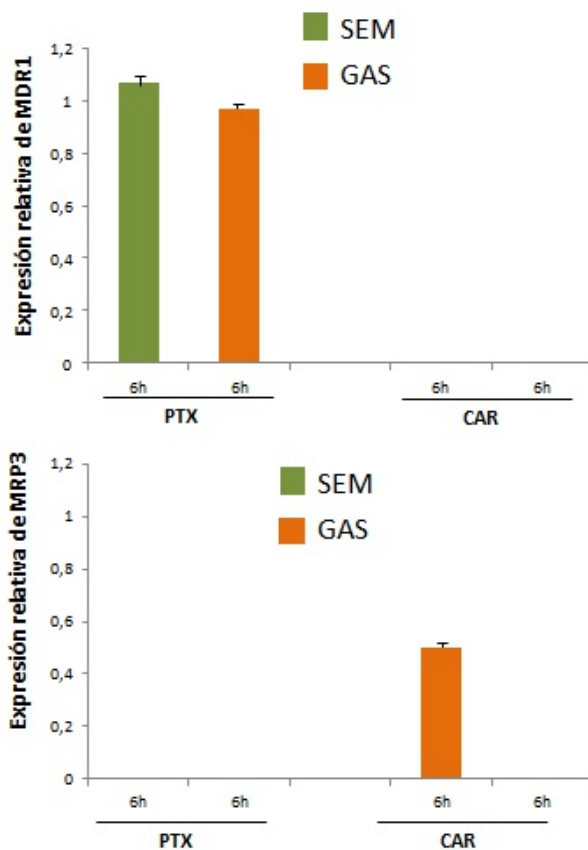


**Figura 3.** Análisis del efecto de la asociación de PTX+CAR en células SEM y GAS. Los valores representan la media + S.D. de cuatro estudios independientes (\* $p < 0.05$  cuando se compararon las células tratadas y no tratadas).

siguiendo el protocolo modificado de Oguri y cols. (2000) (9) con una exposición de células a concentraciones plasmáticas de los fármacos durante 6 horas. Las células SEM y GAS no mostraron tener expresión de ninguno de los dos genes de resistencia testados (Figura 5). La exposición a PTX provocó una ligera expresión de MDR1 en ambas líneas (Figura 5A). Por el contrario, la exposición a CAR no afectó a este gen. La Figura 5 muestra una ratio de  $1.07 \pm 0.03$  en células en SEM mientras que en células GAS la ratio fue de  $0.97 \pm 0.02$  lo que indica una respuesta muy parecida de ambas líneas frente al fármaco. Por otra parte, las líneas SEM y GAS tratadas con PTX no mostraron expresión de MRP3, mientras que CAR claramente aumentó la expresión de este gen en la línea SEM (Figura 5B). En cualquier caso las ratio MRP3/beta actina fue baja ( $0.5 \pm 0.02$ ), indicando un menor efecto del fármaco en estos tipos celulares.



**Figura 4.** Morfología de la línea SEM y GAS en cultivo en presencia del tratamiento combinado PTX+CAR (ver metodología). Se muestra el cultivo control (A y D) y tras la exposición al tratamiento 48 h (B y E) y 72 h (C y F) La imagen C y F muestran la constitución de un núcleo de proliferación. Magnificación x20.



**Figura 5.** Análisis de la expresión del gen MDR1 (A) y MRP3 (B). La gráfica representa el estudio densitométrico de las bandas de PCR (datos no mostrados) obtenidas en células SEM y GAS, cuantificada y normalizada teniendo como referencia las bandas de beta-actina. El estudio fue realizado a las 0h y a las 6h.

## Discusión

Los resultados obtenidos parecen poner de manifiesto los mecanismos de resistencia implicados en la detoxificación del PTX y el CAR en células de seminoma y cáncer gástrico. En el caso del paclitaxel, parece que este fármaco induce la expresión de MDR1 y, por ello, de P-glicoproteína tanto en células de seminoma como de cáncer gástrico. Sin embargo, en el caso del CAR puede observarse que se produce la inducción de MRP3 únicamente en el caso de las células de cáncer gástrico, no así en las de seminoma. Este fenómeno aquí descrito podría explicar por qué los seminomas testiculares son altamente sensibles a los platinos (cisplatino y CAR) y por ello presentan altas tasas de curabilidad mientras el cáncer gástrico es altamente quimiorresistente y mortífero. De hecho, el CAR no se plantea en su tratamiento. En el estudio publicado por Melguizo et al. (2012) (10) con líneas de cáncer de pulmón se observan resultados similares en cuanto a la expresión de MDR1 y MRP3 a los observados con CAR y cáncer gástrico.

## Conficto de interes

No hay conflicto de intereses.

## Referencias

1. Sodani K, Patel A, Kathawala R, Chen Z. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Journal of Cancer*. 2012;31(2):58-72.
2. Zhang Y, Wang Y, Gupta P, Chen Z. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy. *The AAPS Journal*. 2015;17(4):802-812.
3. Waghray D, Zhang Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;61(12):5108-5121.
4. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro A, Pronzato M et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;2013:1-10.
5. Malhotra V, Perry M. Classical Chemotherapy: Mechanisms, Toxicities and the Therapeutic Window. *Cancer Biology & Therapy*. 2003;2(sup1):1-3.
6. De Vita V, Lawrence T, Rosenberg S. *Cancer*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015.
7. Marsh, R.E.; Tuszyński, J.A.; Sawyer, M.B.; Vos, K.J. Emergence of power laws in the pharmacokinetics of paclitaxel due to competing saturable processes. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2008,11, 77–96.
8. Fukuda, M.; Oka, M.; Soda, H.; Terashi, K.; Kawabata, S.; Nakatomi, K.; Takatani, H.; Tsurutani, J.; Tsukamoto, K.; Noguchi, Y.; et al. Phase I study of irinotecan combined with carboplatin in previously untreated solid cancers. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 3963–3969.
9. Oguri T, Isobe T, Suzuki T, y cols. Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer*. 2000; 86(1):95-100.
10. Melguizo C, Prados J, Luque R, Ortiz R, Caba O, Álvarez P et al. Modulation of MDR1 and MRP3 Gene Expression in Lung Cancer Cells after Paclitaxel and Carboplatin Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(12):16624-16635.