

Pereyra, E.I.1; Zecchinati, F.1; Ricardi, L.L.1; Arana, M.R.1; Ceballos, M.P.1; Palma, N.F.1; Perdomo, V.G.2,3; Villanueva, S.S.M.1.

1. Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.
2. Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. 3. CONICET-Rosario

Palabras clave: Esferoides Caco-2; Glicoproteína P (ABCB1); MRP2 (ABCC2); Transportadores ABC; Viabilidad Celular; Western blot

La barrera intestinal, crucial en la farmacocinética de los fármacos, está mediada por transportadores de eflujo como ABCC2/MRP2 y ABCB1/P-gp. Los modelos de cultivo celular en 3D están surgiendo como alternativas fisiológicamente más relevantes que los sistemas de monocapa tradicionales (Caco-2), pero requieren una validación extensa.

- . Desarrollar y caracterizar un modelo tridimensional de esferoide Caco-2 mediante la técnica de superposición líquida.
- . Realizar una caracterización morfológica y funcional completa del modelo tridimensional de la barrera intestinal.
- . Validar la expresión proteica y la actividad funcional de los transportadores de eflujo clave ABCC2 (MRP2) y ABCB1 (P-gp).

A

1 Caco-2 cells

2 96-Wells plates 1,5% agarose

3 Incubation (4 - 7 days)

4 Spheroids (4 - 7 days)

5 Spheroids diameter

6 Viability assays

7 Western blot

8 P-glycoprotein efflux activity

B

C

A. Protocolo de producción de esferoides: 1) Cultivo inicial en matraz. 2) Siembra en placas de 96 pocillos. 3) Formación y cultivo de esferoides. 4) Recolección de esferoides maduros. 5) Medición del tamaño y análisis morfológico. 6) Evaluación de la viabilidad celular. 7) Evaluación de la expresión proteica. 8) Estudios de eflujo de fármacos. Métodos estadísticos: ANOVA, prueba de Kruskal-Wallis y análisis post-hoc apropiados.

B. Esferoides de 4 días y C. de 7 días

A. Expresión de PGP en Cultivos Caco-2
Comparación entre monocapa y esferoides en días 4 y 7

ANOVA $p = 0.0413$ | *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$
Prueba post-hoc: Tukey

Expresión de MRP2 en Cultivos Caco-2
Comparación entre monocapa y esferoides en días 4 y 7

ANOVA $p = 0.000159$ | *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$
Prueba post-hoc: Tukey

Expresión de OCLUDINA en Cultivos Caco-2
Comparación entre monocapa y esferoides en días 4 y 7

ANOVA $p = 8.78e-06$ | *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$
Prueba post-hoc: Tukey

Expresión de VILLINA en Cultivos Caco-2
Comparación entre monocapa y esferoides en días 4 y 7

ANOVA $p = 0.000906$ | *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$
Prueba post-hoc: Tukey

B. Eflujo P-gp en Cultivos Caco-2 Monocapa y Esferoides
Tratamientos con Doxorrubicina y PSC en cultivos de 4 días

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ | Test de Tukey

Eflujo P-gp en Cultivos Caco-2 Monocapa y Esferoides
Tratamientos con Doxorrubicina y PSC en cultivos de 7 días

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ | Test de Tukey

C. Viabilidad Relativa en Cultivos Caco-2 Monocapa vs Esferoides de 4 días
Tratamientos con Doxorrubicina por 6h

Análisis: Kruskal-Wallis - p global: 0.0326 (Post-hoc: bonferroni con Holm)

Viabilidad Relativa en Cultivos Caco-2 Monocapa vs Esferoides de 4 días
Tratamientos con Doxorrubicina por 24h

Análisis: Kruskal-Wallis - p global: 0.00114 (Post-hoc: bonferroni con Holm)

Viabilidad Relativa en Cultivos Caco-2 Monocapa vs Esferoides de 7 días
Tratamientos con Doxorrubicina por 24h

Análisis: Kruskal-Wallis - p global: 0.00273 (Post-hoc: bonferroni con Holm)

Viabilidad Relativa en Cultivos Caco-2 Monocapa vs Esferoides de 7 días
Tratamientos con Doxorrubicina por 6h

Análisis: Kruskal-Wallis - p global: 0.00982 (Post-hoc: bonferroni con Holm)

REFERENCIAS

Este sistema tridimensional constituye una herramienta robusta para el estudio de la regulación de los transportadores ABC intestinales y la evaluación del transporte de fármacos a sustratos, así como la citotoxicidad de sustratos farmacológicamente relevantes. Ofrece ventajas sobre los modelos bidimensionales al reflejar con mayor precisión la fisiología intestinal humana.

