EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ABCB1 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE ESFEROIDES INTERTINALES DE CÉLULAS CACO-2

Pereyra, Emmanuel; Ricardi, Laura; Zecchinati, Felipe; Arana, Maite; Perdomo, Virginia; Villanueva, Silvina.

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

Introducción: El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión y actividad de transporte de ABCB1 durante la diferenciación de esferoides de células Caco-2. Los cultivos tridimensionales (3D) de células Caco-2 reproducen con mayor fidelidad la organización y diferenciación del epitelio intestinal [1] que los cultivos convencionales en monocapa (2D), constituyendo una herramienta de interés para el estudio de transportadores de eflujo de la familia ABC intestinales. En este contexto, se empleó un modelo reproducible de esferoides Caco-2 obtenido mediante la técnica de superposición líquida [2]. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión y actividad de transporte de ABCB1 durante la diferenciación de esferoides Caco-2.

MÉTODOS

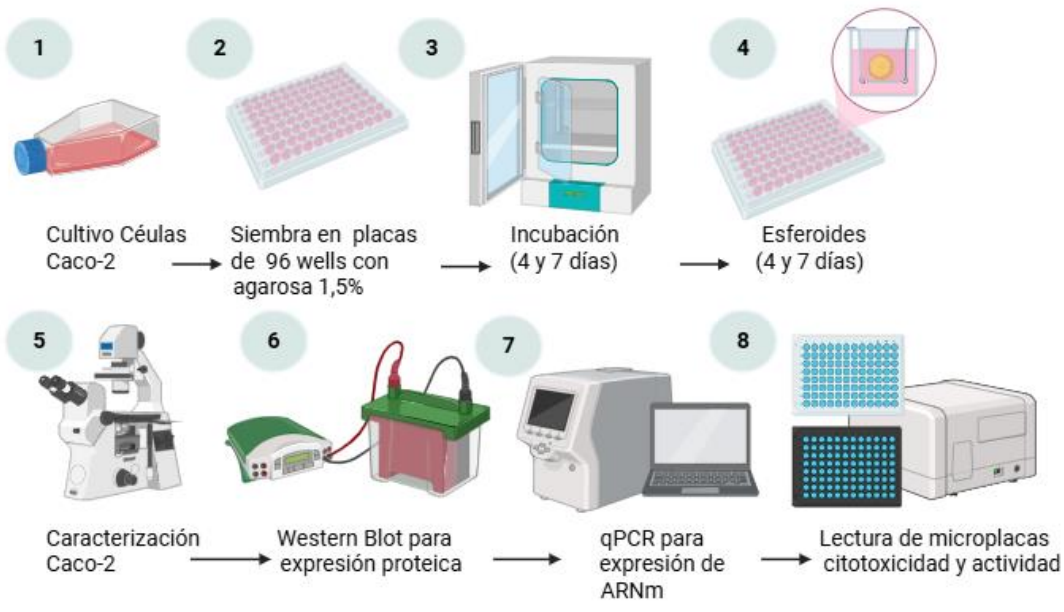


Figura 1: Pasos **1** a **5**. Generación y caracterización de esferoides Caco-2 en placas recubiertas con agarosa cultivadas durante 4 y 7 días. **6)** La expresión de ABCB1 se evaluó mediante Western blot y **7)** RT-qPCR. **8)** La actividad de transporte se evaluó mediante ensayos de eflujo utilizando sustrato doxorrubicina. Se evaluó la respuesta celular frente a doxorrubicina mediante ensayos de viabilidad (MTT) luego de exposiciones de 6 y 24 horas. Los datos se analizaron mediante prueba t con corrección de Holm o Benjamini-Hochberg, y prueba de Wilcoxon cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad. En todos los casos, se comparó con cultivos 2D de células Caco-2.

RESULTADOS

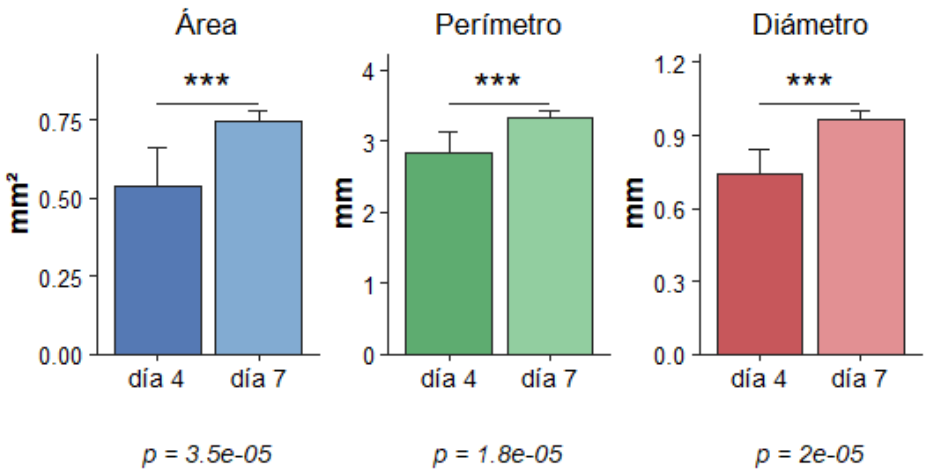
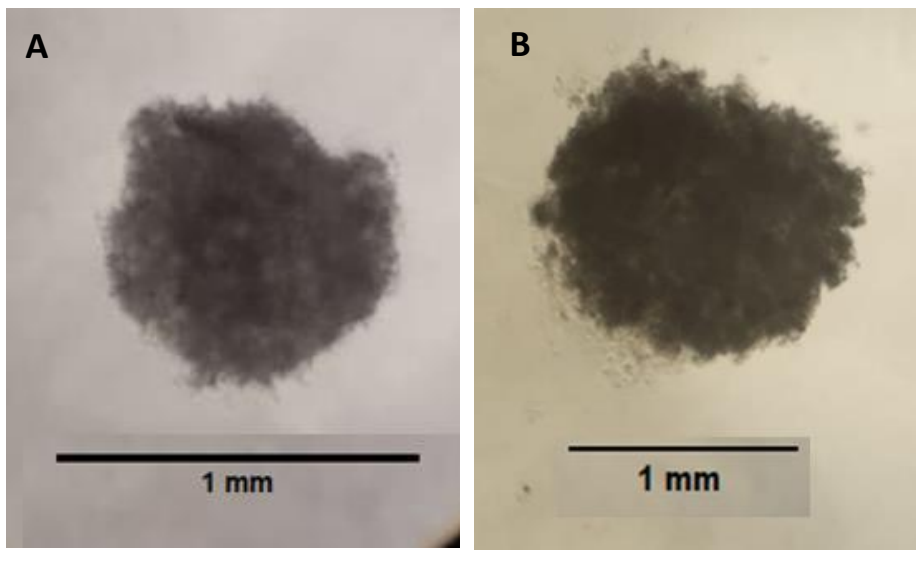


Figura 2: El análisis morfométrico mediante microscopía de contraste de fases reveló un incremento significativo en el tamaño celular a lo largo del tiempo. Los esferoides de 4 días presentaron un diámetro promedio de 744 ± 100 µm, mientras que a los 7 días alcanzaron los 993 ± 9 µm. Esta diferencia en el crecimiento y compactación de las estructuras tridimensionales demostró ser altamente significativa ($P < 0,001$).

Figura 3: Esferoides de 4 días (A) y de 7 días de cultivo (B)



Expresión de ABCB1

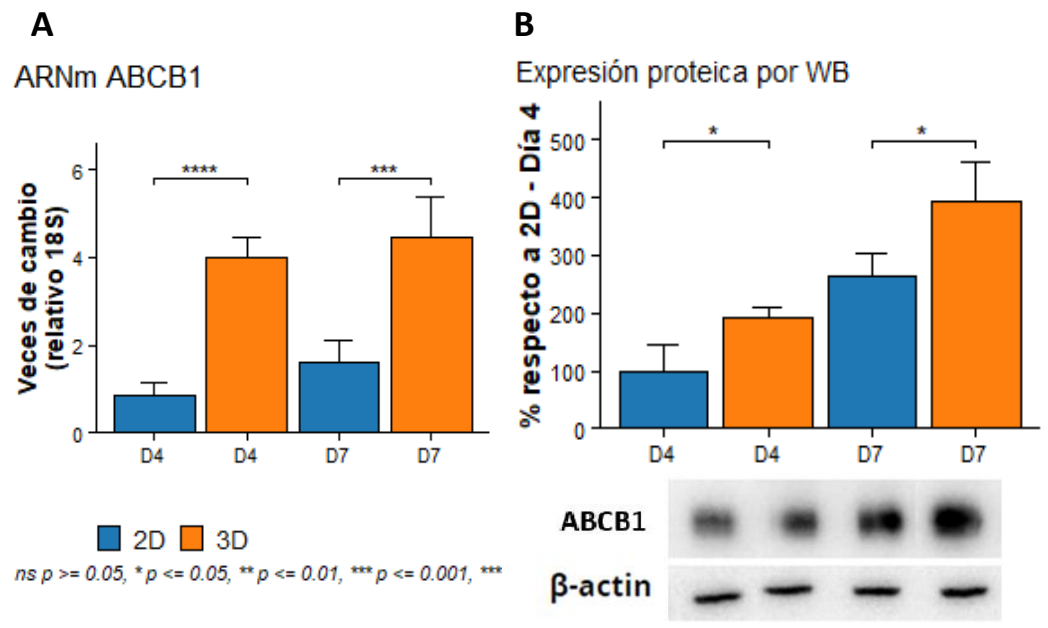


Figura 4. Los esferoides presentaron una mayor expresión de ABCB1 respecto de los cultivos en monocapa. **A.** La expresión génica fue significativamente superior en los cultivos 3D, en relación a los cultivos 2D, tanto a los 4 días ($p = 0,0042$) como a los 7 días ($p = 0,0365$). **B.** El análisis por Western blot confirmó un incremento significativo de la expresión proteica en ambos tiempos de cultivo ($p < 0,05$).

Actividad de ABCB1

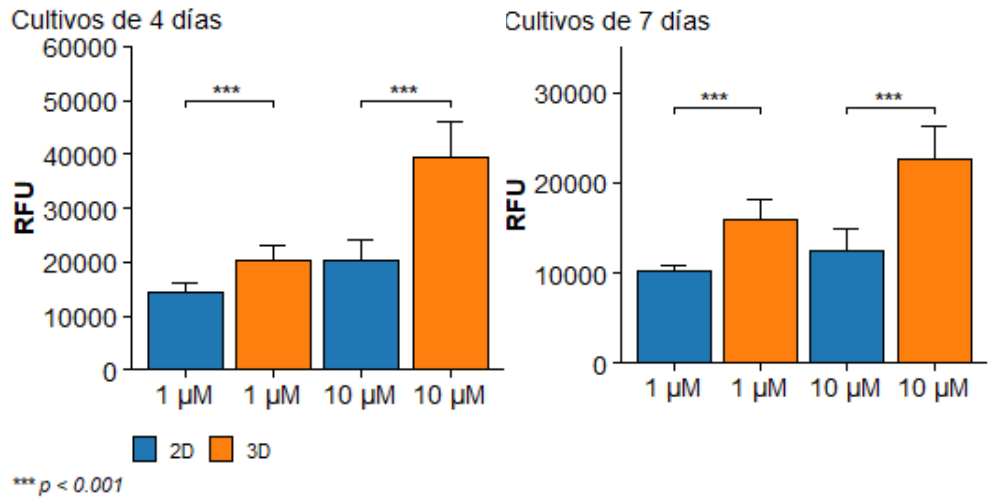


Figura 5: En concordancia, los esferoides exhibieron una mayor actividad de eflujo de doxorrubicina que los cultivos 2D, observándose diferencias significativas para las concentraciones de 1 y 10 µM tanto a los 4 como a los 7 días ($p < 0,001$).

Citotoxicidad

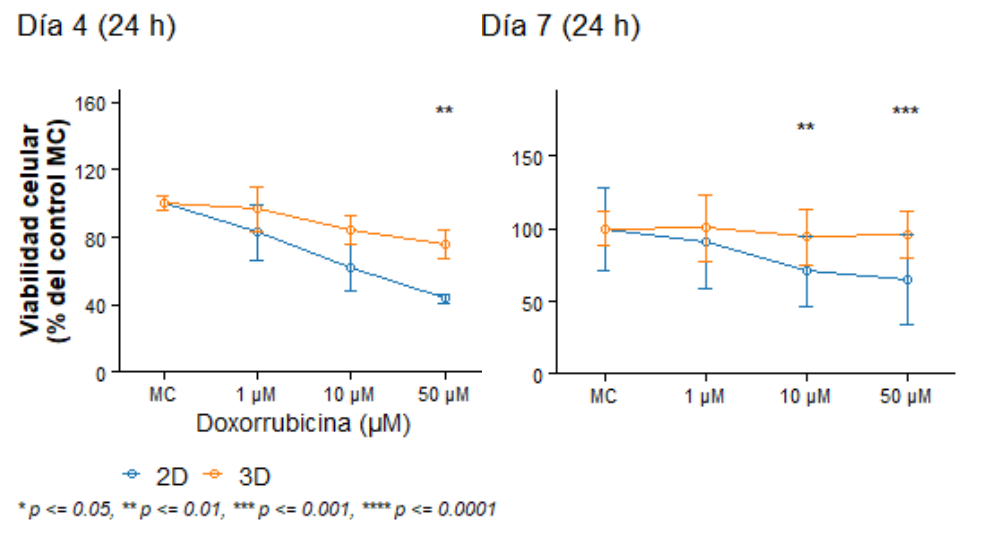


Figura 6: En los ensayos de citotoxicidad los cultivos 3D mostraron una mayor resistencia frente a la doxorrubicina, especialmente luego de 24 horas de exposición.

CONCLUSIÓN: La diferenciación de esferoides derivados de células Caco-2 se asocia con un incremento de la expresión y actividad de eflujo de ABCB1, acompañado de una mayor resistencia frente a los efectos citotóxicos de la doxorrubicina. Estos resultados respaldan el empleo del modelo tridimensional como una plataforma experimental fisiológicamente más relevante para el estudio del transporte intestinal de fármacos y de los mecanismos de respuesta mediados por ABCB1.

[1] K. E. Samy, E. S. Levy, K. Phong, B. Demaree, A. R. Abate, and T. A. Desai, "Human intestinal spheroids cultured using Sacrificial Micromoldingas a model system for studying drug transport," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 9936, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-46408-0.
[2] M. V. Giolito, L. Claret, C. Frau, and M. Plateroti, "A Three-dimensional Model of Spheroids to Study Colon Cancer Stem Cells," *Journal of Visualized Experiments*, no. 167, Jan. 2021, doi: 10.3791/61783.