



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS**

**“SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE  
LAS PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA  
APOPTOSIS (IAPs) POR RNAi EN  
ESFEROIDES TUMORALES DE MAMA”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
P R E S E N T A:  
**BIÓL. JUAN CARLOS GALLARDO PÉREZ**

**Facultad de Medicina**



**FACULTAD DE  
MEDICINA**

**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *AGRADECIMIENTOS*

*A los miembros de mi comité tutorial:*

*Dra. Vilma Maldonado Lagunas*

*Dr. Jorge Meléndez Zajgla*

*Dr. Rafael Moreno Sánchez*

*Por sus invaluable enseñanzas que han permitido mi formación en investigación y por todos sus comentarios y acertadas sugerencias que favorecieron el mejor desarrollo de mi proyecto de investigación.*

*A los miembros del Jurado:*

*Dr. Marco A. Cerbón Cervantes*

*Dra. Marcela Lizano Soberón*

*Dra. Mahara Valverde Ramírez*

*Dra Carmen Aceves Velasco*

*Por sus sugerencias para mejorar el escrito de tesis.*

*Asimismo a los investigadores que de alguna forma han realizado críticas que han mejorado mi trabajo y que han redituado en un mejor enfoque: Dra. S. Rodríguez, Dr. J. Morán y Dr. C.F. Arias.*

*Al CONACYT y a la DGEF por la beca otorgada para la realización de esta tesis.*

## DEDICATORIAS

A:

*Adriana Guzmán Gallegos (Peke), el amor de mi vida y la compañera que siempre soñé. Gracias por ser lo mejor que me ha ocurrido, por tu apoyo y comprensión.*

*Mis papás Juan y Judith, por todo su amor de padres, gracias a ustedes trato de ser mejor cada día.*

*Mis hermanas Judith y Silvia; mis sobrinitas Yazmín y Fernanda, porque los breves momentos que pasamos juntos siempre son muy reconfortantes.*

*Mis abuelos Doña Luz, Don Juan (QEPD), Doña Miguelina y Don Arturo; mis tíos, primos y amigos: Arturo, Naty, Daniel, Polo, Consuelo, Reyes, Mtra. Martha.*

*Mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cancerología: Magaly, Floria, Gisela, Rubén, Moisés, Franz, por todos los momentos vividos día a día.*

*Desde hoy, no temas nada, no hace falta ya  
Todo se fue con el huracán.  
Nada queda de las vueltas que el tiempo nos dio  
Todo se fue con el huracán  
E.B.*

*Y, aún hoy, todavía sigue escuchándose el reloj de ébano de la sala de terciopelo. Y entonces, durante un momento, todo se detiene, todo enmudece excepto la voz del reloj. Los sueños se quedan helados, paralizados en sus posturas. Y después, todo no es más que locura, locura de una memoria que se agita en lo abominable.*

*E.A. Poe*

# ÍNDICE

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b><u>Apoptosis</u></b>	<b>4</b>
Caspasas	6
Proteínas inhibidoras de la apoptosis	8
XIAP	13
XIAP, resistencia y cáncer	15
<b><u>RNA de interferencia</u></b>	<b>16</b>
Mecanismo de acción	17
siRNAs terapéuticos	21
<b><u>Esferoideos tumorales multicelulares</u></b>	<b>22</b>
Estructura del esferoide tumoral multicelular (MTS)	23
Crecimiento del MTS	26
Resistencia multicelular	28
<b>II.- JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>III.- HIPÓTESIS</b>	<b>31</b>
<b>IV.- OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>V.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>VI.- RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>VII.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b>	<b>71</b>
Caracterización de los esferoides tumorales	72
Resistencia adquirida	75
El knockdown de XIAP sensibiliza a fármacos antineoplásicos	80
<b>VIII.- REFERENCIAS</b>	<b>85</b>
<b>IX. ANEXO I</b>	<b>93</b>
<b>X, ANEXO II</b>	<b>94</b>

## **RESUMEN**

Las células tumorales cultivadas en modelos tridimensionales brindan un análisis biológico más realista de las fases iniciales del desarrollo tumoral, y de la resistencia a fármacos antineoplásicos, que los cultivos tradicionales en monocapa. Diversos estudios han dilucidado el desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos en células cultivadas en esos modelos tridimensionales, sin embargo, los mecanismos permanecen no comprendidos completamente. En uno de estos modelos, el de los esferoides tumorales multicelulares, se evaluó el papel que podría tener XIAP, una proteína inhibidora de la apoptosis en la resistencia adquirida a fármacos antineoplásicos, debido a que se ha propuesto que esta proteína tiene un papel importante durante el desarrollo tumoral. En efecto, XIAP participa en diversos procesos celulares tales como ciclo celular, vías de señalización que convergen en sobrevivencia celular, inhibición de la apoptosis, etc.

Durante el crecimiento tridimensional de esferoides tumorales de cáncer de mama, se incremento la expresión de XIAP con respecto al cultivo en monocapa. El análisis de las células provenientes del esferoide, mediante su disgregación por tripsina y evaluación de viabilidad celular, permitió observar que las células que han estado en crecimiento constante y prolongado, en ese contexto tridimensional, incrementan su resistencia a la muerte celular inducida por fármacos antineoplásicos, con respecto a las células que siempre han sido cultivadas en monocapa. Adicionalmente, esa mayor resistencia correlacionó con la mayor expresión de XIAP. Al bloquear la expresión de XIAP por medio de un siRNA (RNA de interferencia) específico, se incrementó marcadamente la sensibilidad de las células provenientes del esferoide tumoral a fármacos antineoplásicos, indicando un papel importante de esta proteína en el establecimiento de la resistencia al fármaco y en el crecimiento del esferoide tumoral.

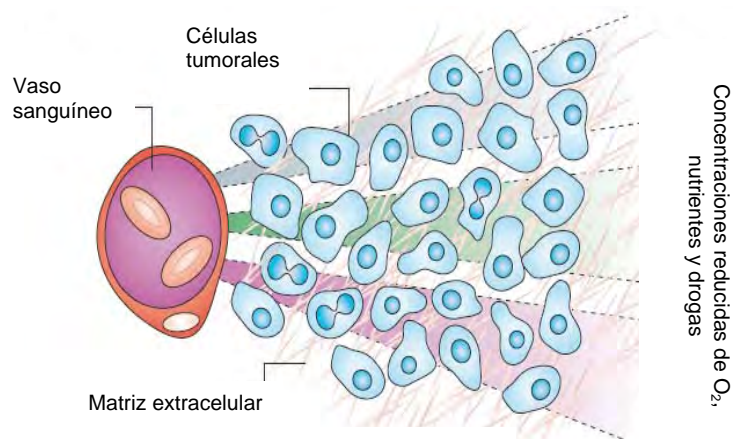
La dilucidación de este y otros factores durante el establecimiento de la resistencia a fármacos permitirá proponerlos como blancos terapéuticos cuyos inhibidores permitirán una mejor eficacia y más sensibilidad hacia fármacos empleados en el tratamiento del cáncer.

## I.- INTRODUCCIÓN.

El cáncer es un conjunto de enfermedades que ocasionan un trastorno del crecimiento y la diferenciación celular y que presentan invasividad y metástasis en tejidos normales, comprometiendo su función (modificado de: European Union Public Health Information System, 2009; World Health Organization, 2009). En la investigación del cáncer, la meta terapéutica es inducir la muerte celular por apoptosis del tumor, bloqueando los factores que la inhiben e induciéndola con fármacos quimioterapéuticos o radioterapia. Por lo tanto, la regulación de la apoptosis es una estrategia terapéutica importante para el control de las células cancerosas debido a que la resistencia a la apoptosis es muy frecuente en diversos tipos de cáncer (Fulda, 2009).

Sin embargo, en un tumor *in vivo*, el tratamiento quimioterapéutico es mucho más complicado debido a diversos factores. El primer obstáculo está dado por el hecho de que los fármacos anticancerosos no logran acceder a todas las células dentro de un tumor sólido.

El segundo hecho implica que, aunque los fármacos alcanzaran a llegar a estas células,



Tomado de Minchinton y Tannock, 2006.

células, la resistencia que éstas células adquieren al encontrarse en presiones

selectivas importantes (hipoxia, depleción de nutrientes, gradiente de pH, etc., Ver recuadro) impide o disminuye su efecto terapéutico (Vaupel, 2008). Estas células hipóxicas resistentes pueden repoblar el tumor después de radioterapia o quimioterapia y comportarse de una forma más agresiva hacia el hospedero.

Existen diversos factores que favorecen la resistencia de las células cancerosas a diversos tipos de terapias: la mayoría de los fármacos anticancerosos ejercen una toxicidad, con cierto grado de selectividad, sobre células que están proliferativamente activas (de manera tal que las células quiescentes, no proliferativas, encontradas entre uno y otro vaso sanguíneo dentro de un tumor sólido, son menos susceptibles a la acción de los fármacos); algunos fármacos son menos activos en condiciones hipóxicas, o de bajo pH o de microambientes deprivados de nutrientes; además, células alejadas de los vasos sanguíneos están expuestas a bajas concentraciones del fármaco, debido a su limitado acceso (Minchinton y Tannock, 2006).

Todo lo anterior se conjunta con el hecho de que existen mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida, algunos aún no dilucidados, que se presentan en las células cancerosas durante su crecimiento dentro del tumor sólido. Algunos ejemplos incluyen la sobreexpresión de la P-glicoproteína, un desintoxicante celular que actúa como una bomba de eflujo de drogas; defectos en procesos celulares tales como los mecanismos de reparación del DNA; alteración de los checkpoints o puntos de revisión del ciclo celular y desregulación de las vías apoptóticas (Wartenberg, et al, 2005; Bindra, et al, 2007; Kim, et al, 2005). Esto último es un factor muy importante en los mecanismos de resistencia ya que la



mayoría de los fármacos antineoplásicos son inductores directos o indirectos de apoptosis. Debido a que muchas vías de señalización se encuentran desreguladas en células tumorales, la apoptosis puede estar activa en diversos tipos celulares, sin embargo, las células no pueden morir y adquieren resistencia debido, de manera importante, a la sobreexpresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (Garber, 2005). La resistencia a fármacos antineoplásicos es en buena medida la resistencia a la apoptosis.

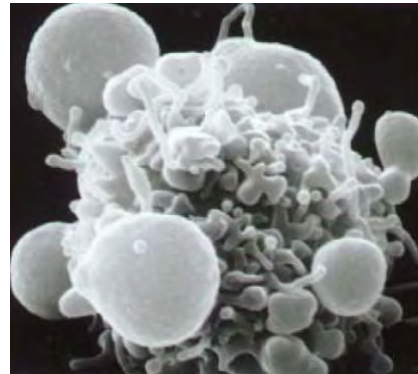
El tumor sólido *in vivo* contiene células distribuidas de forma heterogénea en su interior; algunas se encuentran bajo condiciones normales de oxígeno o nutrientes mientras que otras no. Algunas son hipóxicas, otras quiescentes y cerca de los vasos sanguíneos se encuentran las células proliferativas. Existe un modelo tridimensional *in vitro*, el de los esferoides tumorales multicelulares, que puede recrear las condiciones presentes en los tumores sólidos *in vivo*. Este modelo es importante debido a las dificultades técnicas y éticas en la obtención de biopsias de pacientes para su investigación. El modelo permite manipular microtumores *in vitro* directamente en el laboratorio.

En la actualidad, el cáncer de mama se ha posicionado como una neoplasia maligna importante en mujeres mexicanas.

En este trabajo de Tesis se investigó el papel de una proteína inhibidora de la apoptosis, XIAP, en la resistencia a fármacos antineoplásicos, durante el crecimiento tridimensional *in vitro* de células de cáncer de mama.

## **APOPTOSIS.**

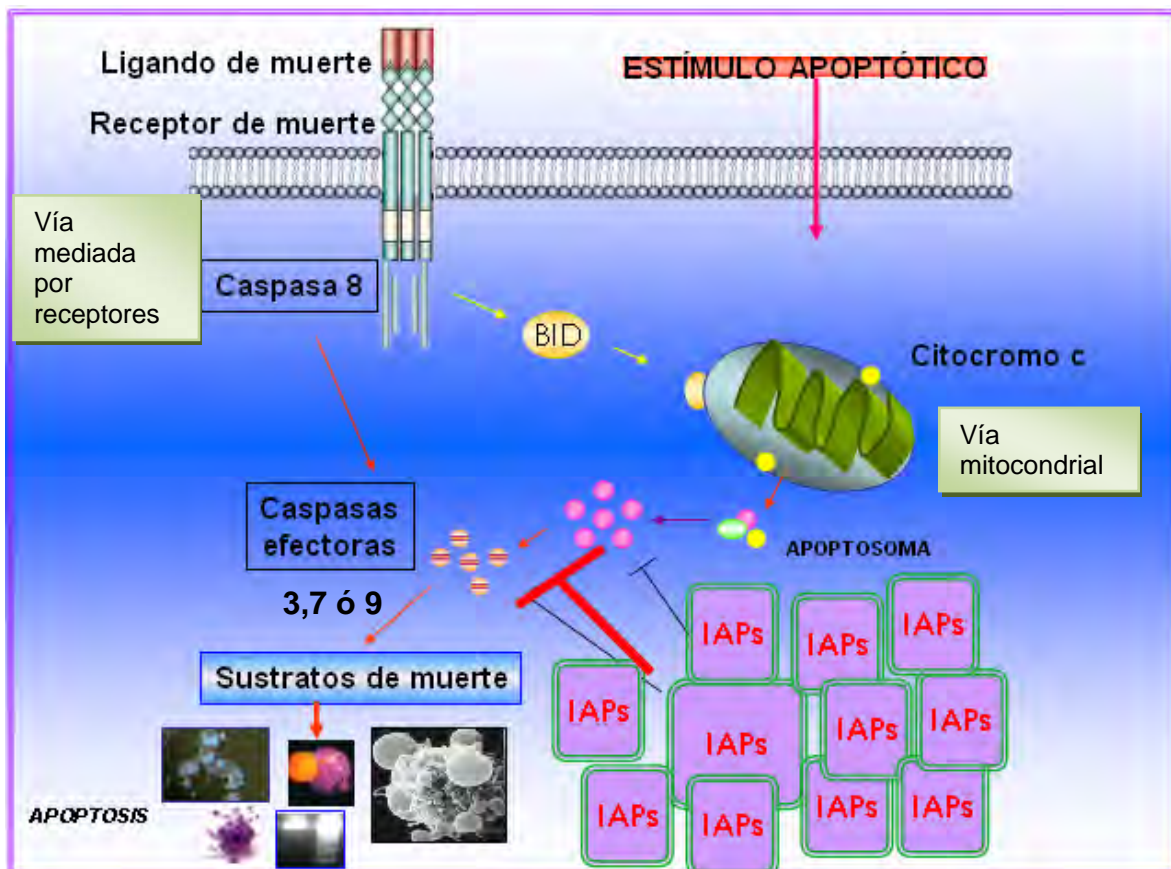
La apoptosis es un mecanismo complementario a la proliferación celular el cual mantiene la homeostasis de todos los tejidos. El término apoptosis fue acuñado originalmente por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir un tipo de muerte celular con características morfológicas y bioquímicas que la distinguen de la muerte celular necrótica o patológica (Hengartner, 2000). El término apoptosis es un término griego que describe la caída de las hojas en otoño y esa era la idea que se tenía sobre las consecuencias de la apoptosis cuando se observó por primera vez, en el microscopio, el desprendimiento de estructuras subcelulares conocidas posteriormente como cuerpos apoptóticos (Ver recuadro; linfocito con cuerpos apoptóticos, Molecular Probes).



La apoptosis es un mecanismo que debe estar regulado de manera adecuada ya que los defectos en la maquinaria apoptótica pueden conducir a la extensión de la supervivencia celular y a la expansión de células neoplásicas. La extensión de la supervivencia celular crea un ambiente favorable para la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones. Se ha establecido que las vías que limitan la respuesta proliferativa en células normales, como es el caso de la apoptosis, están perturbadas en la mayoría de los tipos de cáncer (Evan y Vousden, 2001). Los modelos de ganancia y pérdida de función de genes en el centro de la maquinaria apoptótica sugieren que la perturbación de la homeostasis celular es de vital

importancia en mamíferos, por lo que una apoptosis insuficiente puede manifestarse como cáncer o enfermedad autoinmune (MacFarlane, 2009). Además, los defectos en las vías apoptóticas confieren resistencia a la quimioterapia y a la radiación de células tumorales.

Dos vías de señalización distintas, pero intercomunicadas, regulan la activación de la apoptosis (Figura 1) y pueden ser divididas en aquellas que inicialmente disparan la muerte mediada por mitocondria y aquellas que señalizan a través de receptores de muerte. (MacFarlane, 2009).



**Figura 1.-** Vías de muerte por apoptosis.

La vía intrínseca o mitocondrial es mediada principalmente por miembros de la familia de Bcl-2. Como respuesta de un estímulo externo (por ejemplo los que causan daño al DNA, incremento de calcio intracelular, quimioterapia, radiación, etc.) existe una liberación de citocromo c desde la mitocondria (MacFarlane, 2009; Ceballos-Cancino, et al, 2007) el cual, junto con Apaf-1 y caspasa 9, forman un complejo llamado apoptosoma que corta y activa a la caspasa 3.

La segunda vía es la vía extrínseca mediada por miembros de la familia de receptores TNF (como Fas y TRAIL) los cuales, al unirse con sus ligandos, reclutan una serie de moléculas adaptadoras en la cara interna de la membrana plasmática que activan caspasa 8 y finalmente caspasa 3. La activación de caspasa 3 y otras caspasas ejecutoras conduce a las lesiones estructurales características de la apoptosis como son la condensación del citoplasma y la cromatina y la fragmentación del DNA (Golstein, 1997).

### **Caspasas.**

En humanos la familia de caspasas consiste de 14 enzimas proteolíticas (caspasas 1-14). En términos de distribución celular, las caspasas han sido encontradas en el citoplasma principalmente aunque existen excepciones (Martin y Green, 1995).

Las caspasas son un grupo de proteasas de cisteína que reconocen sustratos con especificidad para ácido aspártico. Las caspasas son zimógenos: existen como polipéptidos inactivos los cuales pueden ser activados por la remoción de prodominios regulatorios lo que conlleva al ensamblaje de la proteasa

heteromérica activa (Evan y Vousden, 2001). Las caspasas contienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) los cuales son importantes para su interacción antes de la activación (Hengartner, 2000).

Las caspasas son activadas por procesamiento proteolítico de un pro-brazo del fragmento amino terminal y por procesamiento endoproteolítico para crear dos fragmentos de aproximadamente 10 (p10) y 20 (p20) Kda. Las caspasas pueden ser agrupadas de acuerdo a la longitud de su probrazo o por especificidad al sustrato. Las caspasas de un pro-brazo largo son caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 19), mientras que las que tienen un pro-brazo corto son activadas por las iniciadoras y son llamadas efectoras (3, 6, y 7) ya que actúan sobre diversos blancos para iniciar la muerte por apoptosis (LeBlanc, 2003; Hunter, et. al, 2003).

La activación de una caspasa efectora (3 ó 7) es realizado por una caspasa iniciadora (como la 9) por medio de un corte en un residuo *Asp* interno específico que separa la subunidad grande de la pequeña. Las caspasas iniciadoras, sin embargo, pueden autoactivarse. Por ejemplo, a través de la asociación con FADD, la procaspasa 8 es reclutada en DISC lo que resulta en su autocorte y activación. La procaspasa 9 es reclutada por factores liberados de la mitocondria (apoptosoma) y su interacción permite su activación (Shi, 2002).

La activación de las caspasas conduce al corte de diversos sustratos, lo que lleva a la presencia de las lesiones estructurales características de la muerte por apoptosis. Entre los sustratos de las caspasas se localizan ICAD (DNasa activada por caspasa inhibida) el cual, luego del corte por caspasa 3 libera su dominio inhibitorio y esto permite que la nucleasa corte el DNA en fragmentos

internucleosomales de tamaño definido (que al ser corridos en un gel de agarosa muestran el patrón característico en escalera), proteínas del citoesqueleto como lamina nuclear, gelsolina, fodrina que permiten la compactación de la célula y la pérdida de la forma celular, reguladores de la reparación del DNA como la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), proteína del aparato mitótico nuclear (NuMA), proteínas del ciclo celular (incluidas Rb y proteína activada por p21), entre otros (Hengartner, 2000).

Las vías apoptóticas dependientes de caspasas son susceptibles de ser reguladas en muchos puntos, sin embargo, existe uno que es crucial ya que actúa directamente sobre los ejecutores de la señal de muerte: las caspasas iniciadoras y efectoras. Este punto de regulación lo brinda la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (**IAPs** por sus siglas en inglés: **I**nhibitor of **A**poptosis **P**roteins), las cuales se unen a e inactivan directamente a las caspasas inhibiendo así la muerte celular por apoptosis.

### **Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis.**

Estas proteínas suprimen la apoptosis en células normales al modular la actividad de las caspasas efectoras de la muerte celular (Hunter, et al, 2003).

Estas proteínas fueron identificadas en baculovirus (los cuales son virus que infectan artrópodos) debido a su capacidad para sustituir funcionalmente al antiapoptótico viral p35 (Clem y Duckett, 1997) y a que brindan un mecanismo para incrementar la propagación viral mediante la inhibición de la apoptosis (Verhagen, 2001). En los estudios anteriores se observó que estas proteínas

previenen la apoptosis del hospedero y favorecen la replicación viral.

Las IAPs se encuentran conservadas en la evolución. La presencia de estas proteínas en diversos organismos (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, levaduras, vertebrados y mamíferos) llamó la atención en cuanto a su importancia evolutiva en la inhibición de la apoptosis. El estrecho parecido entre las IAPs baculovirales y las IAPs de insectos sugiere que las primeras pueden haber sido adquiridas a través de transferencia génica desde las células hospederas del insecto (Huang, et al, 2000). Se ha llegado a pensar que las IAPs pudieron haber evolucionado en eucariontes para facilitar la vida celular y entonces evolucionaron para inhibir la muerte.

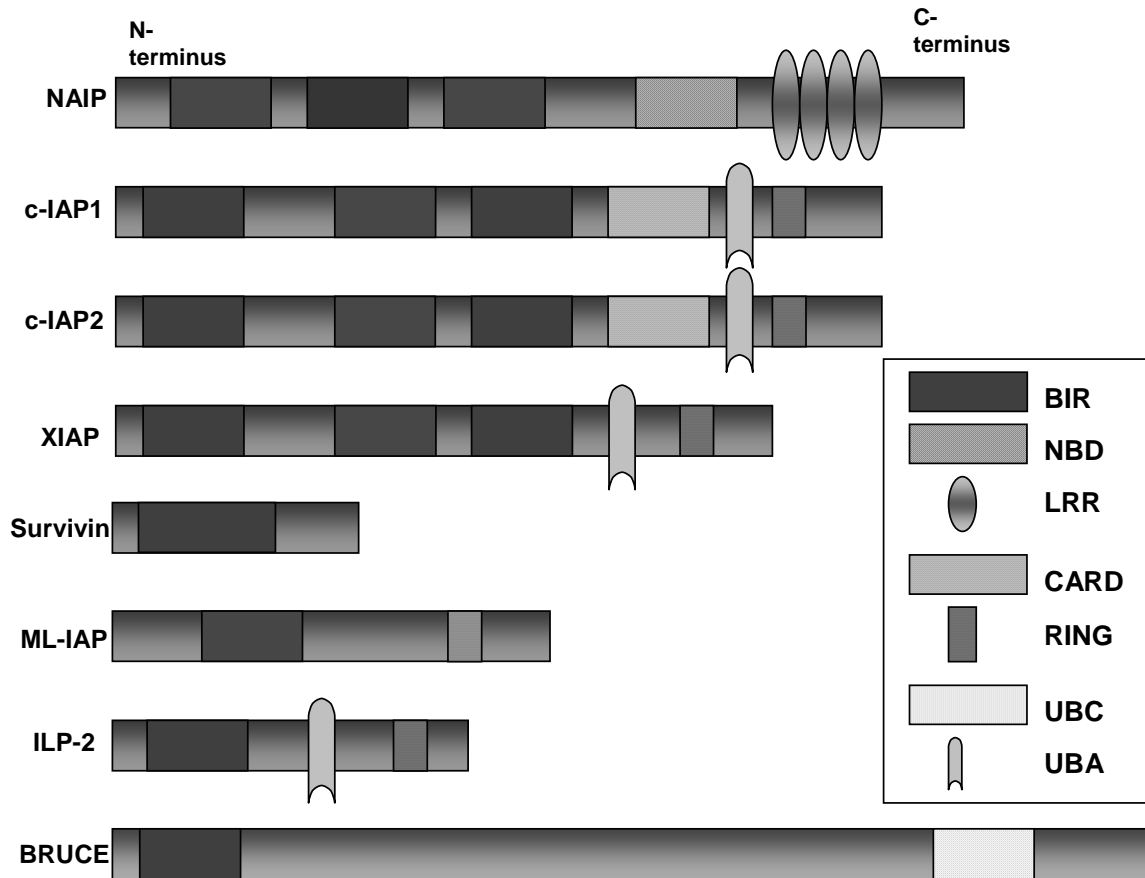
Recientes trabajos han sugerido que las IAPs son proteínas con funciones de amplio espectro incluyendo la regulación directa de caspasas con inhibición de apoptosis, respuesta adaptativa al estrés celular, espermatogénesis, desarrollo lobuloalveolar de la mama, proliferación celular, diferenciación, respuesta inmune, homeostasis del cobre, sobrevivencia de células infectadas con HIV latente, progresión del cáncer y metástasis ( Revisado en: Dubrez-Daloz, et al. 2008; Srinivasula and Ashwell, 2008; Wang, et al. 2005; Berro, et al, 2007; Olayioye, et al. 2005, Fulda, 2009a).

Una de las características principales de estas proteínas es la presencia en el extremo amino terminal de una, dos o tres repeticiones de aminoácidos de aproximadamente 70 residuos llamados **Repeticiones de IAP Baculovirales** (dominios BIR; figura 2) (Deveraux, 1999). La importancia crucial del dominio BIR reside en su capacidad de unirse a las caspasas y de esta forma bloquearlas

impidiendo que la apoptosis continúe aún cuando ya se haya activado por receptores o por la salida de citocromo c desde la mitocondria (Miller, 1999; Liston, et al, 2003; Luque, et al, 2002). Asimismo, las IAPs contienen un dominio RING (Really Interesting New Gene) que codifica para una E3 ubiquitina ligasa (Clem y Duckett, 1997) la cual media la degradación de proteínas con las que interactúan o bien de ellas mismas a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Joazeiro y Weissman, 2000).

Ocho genes que codifican IAPs (*NAIP*, *c-IAP1*, *c-IAP2*, *XIAP*, *Survivina*, *livin/ML-IAP*, *Ts-IAP/ILP-2* y *BRUCE/Apolon*) se han encontrado en el genoma humano y algunos de ellos están sobreexpresados en muchos tipos de cáncer, incluyendo mama, colon, esófago, melanoma, glioma, diversos tipos de leucemia, carcinoma de próstata, renal, hepático, de pulmón, etc., y en líneas celulares tumorales resistentes a múltiples fármacos (Lima, et al, 2004; LaCasse, et al, 1998; Tamm, et al, 2000; Schimmer, et al, 2005; Notarbartolo, et al, 2004), en donde inhiben a las caspasas favoreciendo la resistencia de las células cancerosas a la apoptosis (Hunter, et al, 2007) (figura 1).





**Figura 2.-** Proteínas inhibidoras de la apoptosis. Por sus siglas en ingles: BIR= Baculoviral IAP Repeating-contans; NBD= Nucleotide Binding Domain; LRR= Leucine Rich Repeats; CARD= Caspase Recruiting Domain; UBC= Ubiquitin Binding Conjugating; UBA= ubiquitn-associated domain. NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein; c-IAP: cellular inhibitor of apoptosis proteins; XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein; ML-IAP: melanoma inhibitor of apoptosis protein; ILP-2: inhibitor of apoptosis protein type-2; BRUCE: BIR ubiquitin conjugating enzyme (Modificada de Liston, et al, 2003).

Entre los humanos se agrupó inicialmente a c-IAP1, c-IAP2, XIAP, MLIAP y NAIP. El segundo grupo de IAPs incluyó a Survivina y BRUCE. Estas últimas presentan solo un dominio BIR más grande que el de las IAPs del primer grupo. La presencia de IAPs tipo survivina y su función conservada en un amplio rango de organismos sugiere que éstas representan las IAPs más tempranas en la evolución. Es posible que, siguiendo un evento de duplicación génica, los dominios BIR de las IAPs evolucionaron hasta tener una función diferente: la de interactuar e inhibir caspasas (Deveraux y Reed, 1999).

El espectro de estímulos apoptóticos que son bloqueados por las IAPs es muy amplio e incluye a ligandos y transductores de la familia de receptores de TNF, miembros proapoptóticos de la familia de bcl-2, citocromo c y agentes quimioterapéuticos (Liston, et al, 2003).

Uno de los principales puntos de regulación de la expresión de las IAPs es mediado por el factor de transcripción NFkappaB, el cual presenta actividad transcripcional en células tumorales (Mendoza, et al, 2006).

Existen 3 mecanismos de regulación de IAPs (Salvensen y Duckett, 2002):

1. Control transcripcional/post-transcripcional (por ejemplo, survivina es regulada en la fase G2-M; NFkappaB regula la expresión de XIAP, c-IAP1 y c-IAP2; el elemento IRES favorece la traducción de XIAP),
2. Control post-traducciona (ubiquitinación y autoubiquitinación mediada por el dominio RING; degradación mediante el proteasoma) y,
3. Control de su función mediante proteínas regulatorias (Smac/DIABLO, Omi, caspasas, XAF-1, NRAGE, Chk1).

## **XIAP.**

La proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X es la más potente inhibidora de caspasas. Se ha visto que tiene constantes de inhibición ( $K_i$ ) de 0.2 a 0.8 nM en comparación con el rango de 1-20 nM observado para otras IAPs (Holcik y Korneluk, et al, 2001; Deveraux y Reed, 1999). Además, se ha observado su sobreexpresión en un panel de 60 líneas tumorales humanas (Tamm, et al, 2000). Es expresado como un mRNA de casi 9 kb, pero la región codificante tiene solo 1.9 kb de largo (Holcik, et al, 2001). Contiene 3 dominios BIR y un RING en el extremo carboxilo terminal. Esta proteína inhibe la actividad de caspasas 3, 7 y 9. El principal punto de contacto entre caspasas 3 y 7 y XIAP involucra una región linker, o enlazante, inmediatamente debajo del BIR2 de XIAP. Esta región enlazante forma un contacto directo con el sitio catalítico de las caspasas y de esta manera bloquea su actividad (Verhagen, 2001).

Se ha observado que XIAP promueve la degradación de la caspasa 3 pero únicamente en su forma activa (Suzuki, et al, 2001). Una vez que XIAP se ha unido a una caspasa la marca con ubiquitina y la envía a la degradación proteasomal. La ubiquitinación es mediada por la presencia del dominio RING de XIAP y esto favorece su actividad antiapoptótica. El RING también favorece la autoubiquitinación de XIAP.

Cuando se aplican bajas dosis de radiación ionizante a células de carcinoma de pulmón se observa un incremento en la regulación traduccional de XIAP que correlaciona con la resistencia a la radiación en estas células tumorales. La

sobreexpresión transitoria de XIAP deja a las células del carcinoma resistentes a la radiación (Holcick, et al, 2000). Esto es importante debido a que la radiación se ha establecido como la terapia preferente para la mayoría de los pacientes con cáncer, en la cual se les aplican múltiples fracciones de dosis pequeñas. Esta sobreexpresión está mediada por un mecanismo de unión interno del ribosoma vía un elemento IRES (Sitio de Entrada Interno al Ribosoma) localizado dentro de la región 5' no traducida de XIAP. Es traducida por un mecanismo de inicio de la traducción independiente de cap y es mediado por un elemento de secuencia IRES (Holcick, et al, 1999), por lo que se puede sintetizar bajo diferentes condiciones de estrés (depleción de suero, infección viral, hipoxia y radiación) situación en que la traducción de la mayoría de las proteínas celulares se detiene.

Los pacientes con bajos niveles de XIAP tienen tiempos de supervivencia mayores que los pacientes que tienen niveles incrementados. Debido a que XIAP se ha propuesto como un blanco terapéutico para contrarrestar la apoptosis en células tumorales, Schimmer y colaboradores diseñaron y analizaron una serie de compuestos químicos combinados con especificidad para bloquear XIAP (Schimmer, et al, 2004). Ellos identificaron una serie de polifenilureas con alta afinidad hacia XIAP y observaron que estos compuestos estimulan una mayor actividad de las caspasas luego de diversos estímulos apoptóticos en diferentes líneas celulares de cáncer.

Además de estas polifenilureas, se ha hecho otro análisis computacional basado en estructura para diseñar pequeñas moléculas inhibitoras de XIAP. Por medio de una base de datos de estructuras tridimensionales de hierbas

medicinales tradicionales se descubrió embelina, un inhibidor pequeño de bajo peso que se une al BIR3 de XIAP. En células Jurkat, la embelina disminuye el efecto protector de XIAP y sensibiliza a las células a la apoptosis inducida por etopósido (Nicolovska-Coleska, et al, 2004).

### **XIAP, resistencia y cáncer.**

Se ha observado que el tejido normal presenta niveles estables de expresión de XIAP, sin embargo, en muchos tipos de cáncer su nivel de expresión se dispara (Notarbartolo, et al, 2004). Además, su mayor expresión correlaciona con estadios clínicos iniciales y avanzados de la enfermedad por lo que su presencia representa un mal pronóstico. Una de sus primeras funciones descubiertas fue que XIAP bloquea caspasas, sin embargo, en la actualidad se sabe que participa en vías de señalización (Akt, BMP, TGF- $\beta$  y algunas otras) (Lin, et al, 2007) favoreciendo la sobrevivencia celular. Finalmente, y más importante, es que su presencia brinda resistencia a los fármacos antineoplásicos y a la radiación, lo cual es uno de los principales obstáculos en el tratamiento de tumores sólidos. Asimismo, se ha reportado que la expresión de IAPs ocasiona resistencia a la apoptosis en carcinoma de mama (Tanaka, et al, 2000), una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres en México. De esta forma, la supresión de estas proteínas permitiría la libre acción de las caspasas ejecutoras y, por lo tanto, la reactivación y la pérdida de la resistencia a la apoptosis en células cancerosas. Existe un mecanismo de silenciamiento génico conocido como RNAi, a través del cual se puede disminuir la expresión de un gen específico y cuya

eficacia terapéutica está siendo evaluada en modelos *in vivo* con resultados alentadores (Check, 2004).

### **RNA DE INTERFERENCIA.**

El RNA de interferencia (RNAi) es una respuesta biológica conservada a RNA de doble hebra (dsRNA) la cual media la resistencia a ácidos nucleicos patógenos y regula la expresión de genes que codifican proteínas (Hannon, 2002). Puede haber evolucionado para interferir con la replicación viral o la actividad de transposones o para responder a otras formas inapropiadas de expresión génica (Moss, 2001). El mecanismo se ha empleado en la actualidad para reducir la actividad de un gen específico. Debido a que es un mecanismo biológico presente en las células de muchos organismos, incluido el humano, representa una estrategia novedosa y altamente específica para la inhibición fisiológica de la expresión de un gen en particular (Nakamura, et al, 2009).

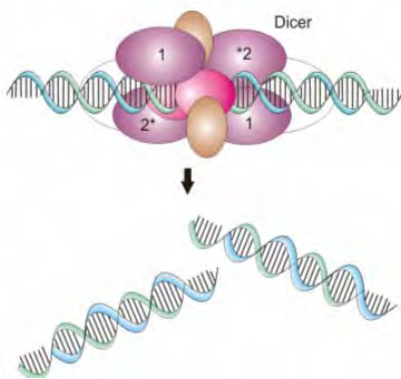
Este fenómeno del RNAi fue primero observado en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans* como una respuesta a dsRNA (Fire, 1998). En el 2001, Fire y colaboradores demostraron que, secuencias dúplex de RNA de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, inducen inhibición del mRNA específico de secuencia en células de mamífero transfectadas, de manera transitoria, sin invocar respuestas antivirales no específicas (como la del interferón) típicamente activadas por moléculas grandes de RNA. Ese mismo año el grupo de Tuschl introdujo siRNAs dúplex sintéticos y mostraron el silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia (Elbashir, et al,

2001).

El RNA de interferencia es, por lo tanto, un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional que inicia con la presencia de pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). La maquinaria del RNAi opera a muchos niveles como son: remodelación de la cromatina, inhibición de la traducción y, el más conocido, inhibición y degradación del mRNA específico de un gen. El mecanismo descrito en este trabajo representa la inhibición específica del mRNA.

### **Mecanismo de acción.**

Los siRNAs son necesarios para iniciar la maquinaria del RNAi. Estos pequeños RNAs de interferencia pueden provenir de grandes moléculas de RNA



**Figura 3.** Generación de siRNAs a partir de RNA de doble hebra (Tomado de Hannon, 2002)

(por ejemplo RNA viral o RNAs provenientes del núcleo). La generación de pequeños RNAs de interferencia derivados de RNA viral es llevada a cabo por una enzima conocida como Dicer (Bosher & Labouesse, 2000). Dicer es un miembro

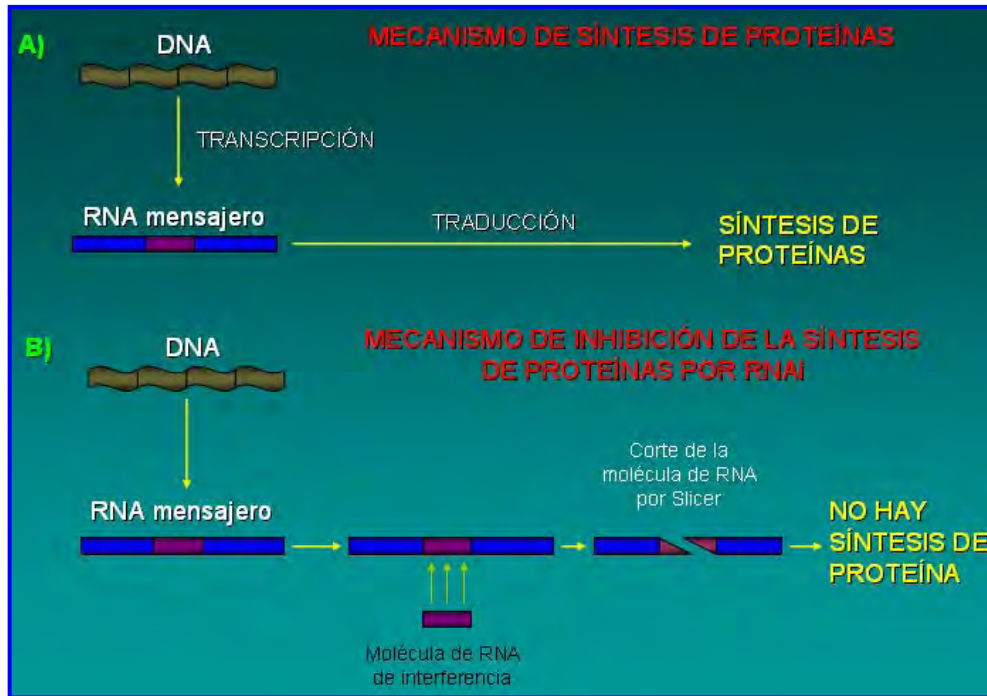
de la familia de ribonucleasas RNasa III, la cual está conservada evolutivamente (Tong, et al, 2005). Esta enzima corta los dsRNA y los deja

como siRNAs con características específicas (figura 3) (Carmell & Hannon 2004; Hammond, 2005).

El mecanismo del RNAi puede también inducirse mediante la presencia de siRNAs sintéticos, o bien, siRNAs generados a partir de un vector de DNA

que contiene un promotor específico de tejido (como el U6 de humano) y que sintetiza constantemente a estos siRNAs. Cualquiera que sea su origen los siRNAs presentan algunas características en común: contienen de 21 a 23 nucleótidos de longitud y son dúplex con morfología tipo pasador o tallo-asa (estructura tipo-hairpin); contienen un extremo 5' fosforilado y un extremo 3' con dos nucleótidos que sobresalen de la estructura tipo pasador (Zamore, et al, 2000). Además, algunos programas bioinformáticas contienen algoritmos que permiten incrementar la eficiencia de siRNAs sintéticos (Ui-Tei, et al, 2006). Esas características lo hacen específico para que pueda ser reconocido por otro componente del RNAi conocido como RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA de doble hebra). RISC es una nucleasa multicomponente efectora que reconoce al siRNA dúplex y, como presenta actividad helicasa, procede a deshebrar al siRNA dúplex, con el ingreso de ATP (Zamore, 2001) y entonces el RISC, junto con el siRNA de una sola hebra, detecta al mRNA blanco al reconocerlo por apareamiento de bases de Watson y Crick altamente específica. El silenciamiento génico postranscripcional es el resultado del corte endonucleolítico del mRNA detectado mediante una enzima con actividad de RNasa H conocida como Slicer (Figura 4). El corte inicia en un sitio que se encuentra 10 nucleótidos río arriba del extremo 5' de la hebra del siRNA (Juliano, et al, 2005). El proceso del RNAi es citoplasmático.

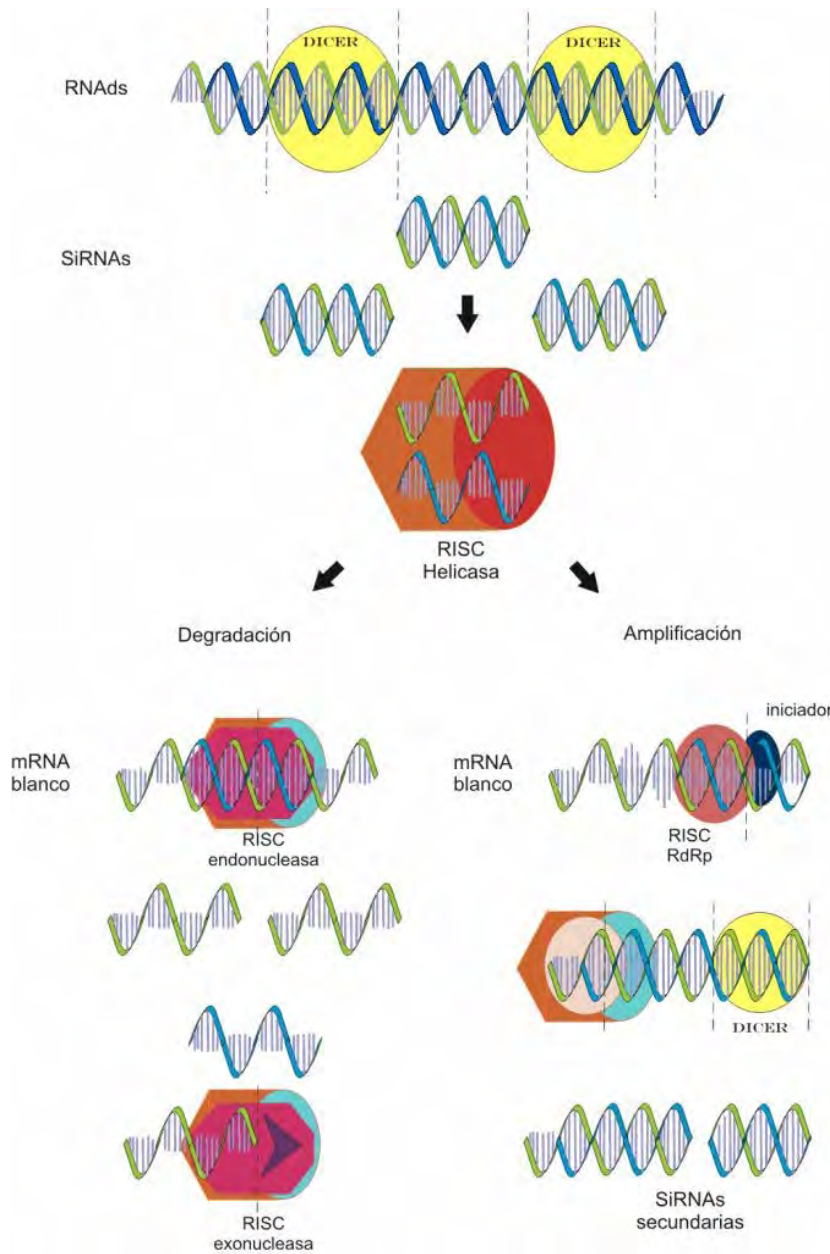




**Figura 4.** Silenciamiento génico postranscripcional por RNAi.

El corte endonucleolítico ocurre solo en la región homóloga entre el mRNA y el siRNA, pero RISC contiene también actividad de degradación con lo que elimina completamente al mRNA. Además de todo esto, RISC posee actividad de polimerasa por lo que puede copiar a los siRNAs y generarlos en cantidades mayores para amplificar la señal de silenciamiento (Figura 5) (Hannon, 2002). Este es un fenómeno conocido en plantas en donde los siRNAs copiados por la actividad de polimerasa de RISC cruzan la pared celular, llegan a otras partes de la planta y regula procesos tales como la floración.

Los siRNAs son altamente específicos en cuanto a longitud: si son menores de 18 nucleótidos, no son detectados por la célula y no inducen ningún tipo de respuesta; si son mayores a 26 nucleótidos, inducen una respuesta del interferón,

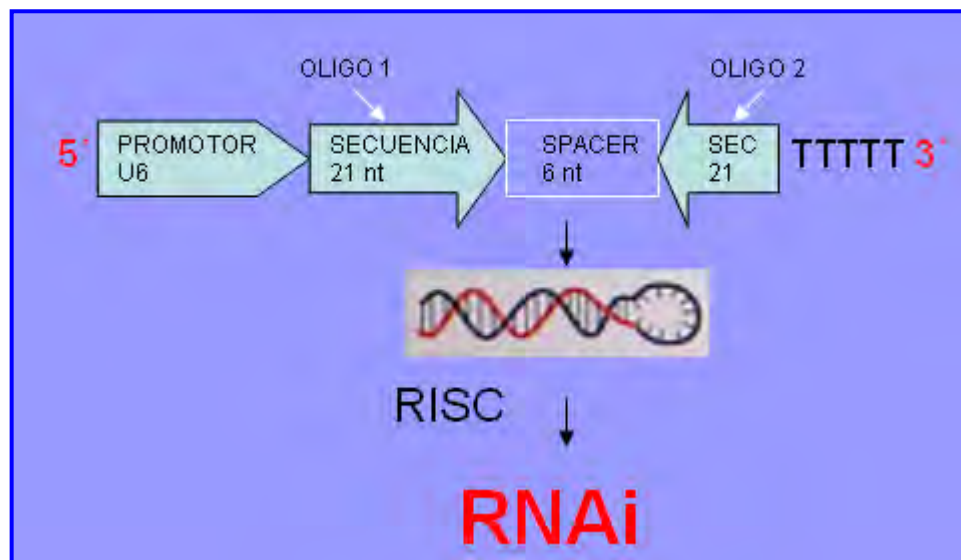


**Figura 5.** Mecanismo de degradación de mRNA blanco y amplificación de siRNAs mediante RISC (Modificado de Déctor y Arias, 2004)

una respuesta natural de la célula contra RNA viral. En un estudio, Heidel y colaboradores (2004) han reportado que es posible suministrar siRNAs sintéticos desnudos (es decir, sin ser clonado en un vector) sin que las células presenten activación de la respuesta contra virus vía el interferón.

**siRNAs terapéuticos.**

En la actualidad existen novedosas metodologías para introducir un siRNA en células de mamíferos. Algunas presentan mayores dificultades que otras. En un principio se transfectaban células con siRNAs desnudos (sin vector) y se observaba una disminución de su efecto silenciador sobre el gen específico, después de cierto tiempo. Por lo anterior se decidió utilizar siRNAs basados en vectores de DNA, es decir, un vector que generara siRNAs constantemente bajo el control de un promotor tejido específico, casi siempre el promotor U6 de humano.



**Figura 6.** Hacia el 5´ se coloca el promotor U6, después la secuencia de 21-25 nucleótidos seleccionada, una secuencia espaciadora, la misma secuencia seleccionada pero invertida y una cola de timinas. La RNA polimerasa III transcribe esta secuencia y se genera la estructura tipo tallo-asa la cual es reconocida por RISC.

Este promotor es sumamente necesario y específico para generación de siRNAs, es una secuencia promotora para la RNA polimerasa III la cual

genera RNAs pequeños y se despega de la secuencia de DNA luego de encontrar una cola de poliT. La estrategia para crear el siRNA en un vector está representada en la figura 6.

Más recientemente se están empleando vectores virales para infectar células de humanos. Los retrovirus, como los que se emplearon en este trabajo de Tesis, muestran una buena infección de una amplia gama de células de mamífero y el efecto únicamente se observaba en células a las que infectan (Devroe y Silver, 2004). También se están empleando vectores adenovirales competentes a la replicación y virus oncolíticos que pueden llegar a capas más profundas de los tumores (Tong, et al, 2005).

### **ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES.**

A diferencia de los tumores, los cultivos en monocapa son esencialmente homogéneos en cuanto al estado nutricional, tensión de oxígeno, estado proliferativo, pH y eliminación de productos de desecho. Las interacciones tridimensionales no pueden ser recreadas en el modelo de cultivo en monocapa, en donde los contactos célula-célula están disminuidos y pierden la heterogeneidad asociada con un tumor sólido. Este problema se ha resuelto en parte con el uso de nuevos cultivos orientados a hacer que los modelos *in vitro* semejen la intrincada y compleja red tridimensional de las células en un organismo (Gallardo-Pérez, et al, 2006). Holtfreter al final de la década de los setenta y posteriormente Moscona implementaron el cultivo celular tridimensional en fibroblastos de ratón (Folkman y Moscona, 1978). Más adelante, Sutherland los

utilizó en la evaluación de la eficacia de fármacos terapéuticos utilizando células humanas de cáncer (Siemann y Sutherland, 1992).

Estos cultivos, denominados esferoides tumorales multicelulares (MTS, del inglés: **M**ulticellular **T**umor **S**pheroids), tienen una complejidad intermedia entre los cultivos bidimensionales *in vitro* y los tumores sólidos *in vivo*. Los MTS presentan una compleja red organizada con contactos e interacciones tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular, por lo que cada célula individual está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrientes (Mueller-Kliesser, 1997; Kunz-Schughart, et al, 1998).

#### **Estructura del esferoide tumoral multicelular (MTS).**

De acuerdo con su origen, existen dos tipos de esferoides tumorales. Los MTS clonogénicos y los MTS agregados. Los del primer tipo provienen de una o unas cuantas células o un explante pequeño de tejido (éste último conocido como OMS: esferoide multicelular organotípico y se cultivan en una primera fase en recipientes que contienen una superficie antiadherente y estática lo que permite la creación de un núcleo primario. La superficie antiadherente puede estar constituida por agarosa, la cual es la base de la técnica de líquido sobrelapante o *liquid overlay*, desarrollada tiempo atrás (Yuhas, et al, 1977). Después, los esferoides son sometidos a una segunda fase de agitación orbital suave que favorece la consolidación del MTS (Gallardo-Pérez, et al, 2006) (figura 7). Estudios recientes revelan que la capacidad que poseen las células para crecer en forma tridimensional está influida por factores de señalización del suero tales como

antígeno carcinoembrional, interferón- $\gamma$ , IGF-II, heregulina  $\beta_1$ , plasmina, y E-cadherina (Novak y Tronca, 2005). La presencia de E-cadherina es fundamental al inicio de la formación del esferoide, sin embargo, la capa externa de células en proliferación de los esferoides deja de expresar E-cadherina (Kawano, et al, 2001).

El segundo tipo de crecimiento en esferoide son los MTS agregados. En estos esferoides no existe la formación de un núcleo primario ya que las células se colocan inmediatamente en agitación orbital constante para permitir su agregación (Figura 7).



**Figura 7.** Modelo de la formación de MTS agregados A) y clonogénicos B). C) Apariencia de MTS clonogénicos tal y como se cultivan en el laboratorio.

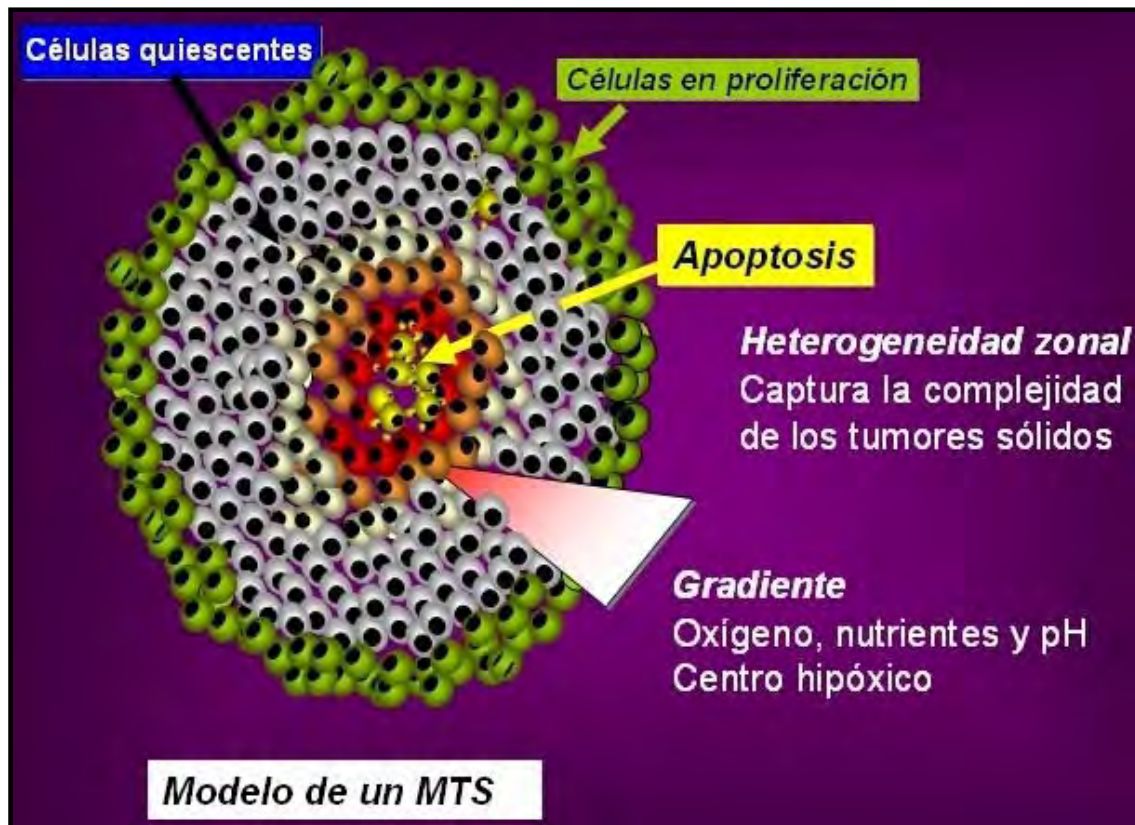
Las células en los agregados permanecen unidas entre sí por un tiempo determinado. En este tiempo se reconocen y comienzan a formar uniones tipo gap y desmosomas.

Los MTS de tipo agregado pueden ser fácilmente disociados por fuerzas mecánicas. Es importante distinguir entre MTS clonogénicos y MTS agregados ya que solo los primeros forman una estructura compartimentalizada como en los microtumores sólidos (Figura 8). En este trabajo de Tesis nos referiremos principalmente a los MTS clonogénicos. A nivel estructural se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares en los MTS: un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes con tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación. El centro necrótico/apoptótico aparece en MTS de más de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 8) (Kunz-Schughart, et al, 1998).

### **Crecimiento del MTS.**

La formación de las diferentes capas crea microambientes con un distinto suministro de oxígeno, nutrientes, concentración de glucosa, lactato, ATP, factores de crecimiento derivados del suero, concentración de productos de desecho y pH (Walenta, et al, 2002). La capa central e intermedia del esferoide constituye un microambiente hostil en el cual existe menor cantidad de nutrientes y oxígeno (zonas hipóxicas).





**Figura 8.** Estructura de un MTS clonogénico indicando sus tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas.

En los MTS existe un aumento en los niveles de Fas/CD95 y de  $TNF\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral) y el  $TGF\beta$  (Factor de Crecimiento Tumoral), factores inducidos por hipoxia. De esta forma se activa la vía de Fas/CD95 en la capa de células en las capas hipóxicas contribuyendo así a la formación del centro apoptótico/necrótico. Las células de capas intermedias que sufren hipoxia pero no a niveles letales, adquieren una mayor resistencia a la radiación y drogas (Kunz-Schughart, et al, 1998).

### **Resistencia multicelular.**

En los tumores sólidos *in vivo*, las células que presentan mayor resistencia a quimioterapia o radioterapia se presentan a una distancia entre 100 y 150  $\mu\text{m}$  entre los vasos sanguíneos y áreas necróticas con reducida concentración de oxígeno (Vaupel, et al, 1989; Helmlinger, et al, 1997). Dentro del esferoide, al incrementarse el número de células, y compartimentalizarse, se incrementa también su resistencia a la presencia de diversos fármacos, tal y como sucede *in vivo*. Esto se conoce como resistencia multicelular. Esta resistencia multicelular incluye a la quimioterapia, radiación, terapia vectorial y mecanismos de defensa, y sólo puede ser estudiada en un concepto tridimensional. La mayor resistencia a la radiación y a las drogas fue descrita originalmente por Sutherland y la llamó “efecto de contacto”. Posteriormente Desoize y Jardillier (2000) dividieron a la resistencia multicelular en dos tipos: resistencia adquirida y resistencia intrínseca o inherente a la estructura del esferoide. La resistencia intrínseca es la que presenta el tumor desde su origen, es una resistencia conocida como *de novo* e incluye la activación de oncogenes o genes supresores de tumor; aunado a lo anterior, se presenta la expresión de ciertos genes celulares que se piensa que están involucrados en la resistencia a drogas (Kerbel, et al, 1994). La resistencia adquirida se presenta después de un tratamiento con fármacos antineoplásicos y es generada por diversos factores relacionados con hipoxia. En los esferoides tumorales se han encontrado algunos mecanismos responsables de este proceso de resistencia como la sobreexpresión de glicoproteína P, la cual actúa como

bomba de eflujo de drogas desintoxicando a las células cancerosas, o la desregulación de proteínas de reparación del DNA, el incremento de Hsp 70 o la desregulación de procesos celulares como la apoptosis, la cual es un paso crítico en la generación y mantenimiento del cáncer, y cuyo mecanismo implica la sobreexpresión de Bcl-2 y DR5 (Kim, et al, 2005) y, probablemente, de IAPs.

La mayoría de los fármacos citotóxicos convencionales inducen la muerte de células que se encuentran proliferando. Debido a la presencia de diversas capas en el esferoide, el fármaco convencional, aunque llegue a las capas más profundas, es ineficaz contra las células quiescentes, en fase G<sub>0</sub>. Uno de los principales problemas en la terapia contra el cáncer, es que las drogas o los vectores usados no pueden ser fácilmente introducidos en toda la población celular dentro de un tumor. La erradicación exitosa de los tumores, mediada por fármacos, depende de un fenómeno llamado “efecto bystander”, en donde las células tumorales adyacentes son sensibles al efecto citotóxico o terapéutico debido a las uniones que se establecen entre las células. Este efecto también es encontrado en los MTS y es factible gracias a la presencia de uniones tipo gap que permiten que la transfección, o la incorporación de un fármaco a tan sólo una minoría de células tumorales, sea capaz de conducir a la regresión tumoral efectiva (Luo, et al, 1997). La correcta comprensión de los mecanismos asociados a la resistencia multicelular permitirá diseñar nuevos y mejores fármacos que superen la inescrutabilidad en la penetración del tumor sólido *in vivo*. Existe una excelente revisión (Kunz-Schughart, et al, 2004) en donde se evidencia el potencial de los MTS para el desarrollo de nuevos fármacos.

## **II.- JUSTIFICACIÓN.**

Los esferoides tumorales multicelulares se comportan biológicamente más parecidos a los tumores sólidos *in vivo* que el cultivo en monocapa. Este tipo de cultivos, por lo tanto puede brindar información con respecto al rol de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (particularmente XIAP) en la resistencia a fármacos antineoplásicos durante el crecimiento tridimensional tumoral.

El cáncer de mama es un grave problema en México, ocupando un importante lugar en incidencia y muerte por cáncer en mujeres. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis pueden ser un buen blanco terapéutico para modificar la apoptosis o su sensibilidad a ella en células de cáncer de mama en un modelo de crecimiento celular tridimensional.

### **III.- HIPÓTESIS.**

La expresión de XIAP tiene un rol importante en la resistencia a fármacos que se presenta durante el crecimiento tridimensional por lo que su inhibición sensibilizará a las células tumorales a la inducción de muerte por apoptosis.

#### **IV.- OBJETIVOS.**

##### **OBJETIVO PRINCIPAL:**

- Determinar el efecto de la inhibición de XIAP por RNAi sobre la resistencia a fármacos antineoplásicos en esferoides tumorales multicelulares.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Establecer el cultivo de los esferoides tumorales multicelulares y su caracterización (capas celulares, niveles de expresión de IAPs).
2. Determinar la resistencia de las células del esferoide a distintos fármacos antineoplásicos (taxol, cisplatino, estaurosporina, tamoxifeno).
3. Determinar y comparar los niveles de XIAP y c-IAP1 en líneas celulares de cáncer con crecimiento en monocapa y en esferoide.
4. Determinar si los niveles de XIAP coinciden con la resistencia a drogas observadas en células del esferoide.
5. Generación de siRNAs para inhibir a XIAP.
6. Determinar si la inhibición de XIAP por RNAi revierte la resistencia y sensibilidad a la apoptosis generada por fármacos antineoplásicos en células de esferoides tumorales multicelulares.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### *Cultivo celular.*

Las líneas celulares T47-D (cáncer de epitelio ductal mamario, grado 3) y HEK293 (células humanas embrionarias transformadas) fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron mantenidas rutinariamente en cultivo en monocapa con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco), con 8% de suero fetal bovino (FBS), en una atmósfera a 37° C y con 5% (v/v) de dióxido de carbono en el aire.

### *Cultivo de esferoides tumorales multicelulares.*

Diversas líneas celulares fueron analizadas para observar su capacidad de formar esferoides tumorales multicelulares (MTS). Estas fueron HeLa, HEK293, HepG2, SW48, T47-D y Calo. De entre todas estas se seleccionaron dos líneas celulares T47-D y HEK 293. Para iniciar el cultivo de esferoides tumorales las líneas celulares fueron cultivadas en monocapa hasta un 70% de confluencia. En este momento las células fueron tripsinizadas, contadas con una cámara de Neubauer y resembradas de acuerdo con la técnica de *liquid overlay* o líquido sobrelapante (Yahas, et al, 1977) modificada, para generar MTS. Brevemente,  $5 \times 10^4$  células fueron sembradas en cajas de Petri (60X15 mm) previamente cubiertas con una delgada capa de agarosa al 2%, o bien, las células fueron sembradas en cajas Petri de grado bacteriológico, durante una a dos semanas. Después de este tiempo los esferoides que se formaron fueron transferidos a

tubos Falcon de 15 ml, y colocados en una incubadora rotatoria, durante 1 ó 2 semanas más, a 37° C y con medio Leibovitz L-15 (invitrogen Corp.) suplementado con 8% de FBS. En estas condiciones el medio fue reemplazado cada 2-3 días y los esferoides que no se formaron (defectuosos, muy pequeños o no esféricos) fueron removidos. El tamaño, en diámetro de los esferoides T47-D y HEK 293, fue medido con la ayuda de una retícula graduada a 1 mm (Carl Zeiss), y se seleccionaron los tiempos de cultivo asociados a un diámetro específico para subsecuentes experimentos. De este modo, para T47D se emplearon esferoides de 7, 14, 21 y 28 días; para HEK 293 se emplearon esferoides de 4, 8, 12 y 16 días.

#### *Inmunohistoquímica.*

Esferoides tumorales multicelulares de tamaño mayor a 800  $\mu\text{m}$  de diámetro fueron fijados con etanol al 70% y deshidratados a través de distintos grados de alcohol en orden ascendente. Después fueron limpiados con xilano y embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 5-10  $\mu\text{m}$  de grosor con ayuda de un microtomo. Posteriormente el corte histológico se colocó en laminilla silanizada (silano al 2% en acetona) para su conservación.

Las laminillas se desparafinaron y rehidrataron y, posteriormente, fueron incubadas con una solución comercial de permeabilización (Antigen Retrieval, Dako) con el fin de descubrir los epítopes. A continuación las laminillas se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario (HIF-1 $\alpha$ , XIAP; Oncogene) durante tres horas en una solución de PBS y bloqueador (Kit Catalyzed Signal



Amplification System; DakoCytomation). Después de la fase de lavados se utilizó un anticuerpo secundario específico y un sistema de amplificación, el cual incluye estreptavidina y peroxidasa. Finalmente la unión del anticuerpo fue revelada con diaminobenzidina, el cromógeno sustrato de la peroxidasa. Las laminillas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio (Carl Zeiss) empleando epifluorescencia con el filtro apropiado.

Adicionalmente, algunas laminillas fueron empleadas para su tinción con hematoxilina de Harris.

#### *TUNEL*

Esferoides tumorales multicelulares de tamaño mayor a 800  $\mu\text{m}$  de diámetro fueron empleados para obtener laminillas de la misma forma que para la inmunohistoquímica, solo que en esta ocasión las laminillas fueron incubadas con la DNA polimerasa desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El revelado se realizó empleando el sustrato para peroxidasa con lo que se observó la inducción de apoptosis.

#### *Microscopía confocal.*

Esferoides tumorales multicelulares de tamaño mayor a 800  $\mu\text{m}$  de diámetro fueron fijados con etanol al 37% durante 15 minutos y permeabilizados con Tritón X100 al 0.1% en PBS durante 15 minutos. Después, los esferoides fueron tratados con una solución de rodamina (1 $\mu\text{g/ml}$ ) durante 5 minutos y analizados con un microscopio confocal.

*Extracción de proteínas y Western Blot.*

Esferoides tumorales multicelulares de cada diámetro indicado en las figuras, y células en monocapa, fueron resuspendidos en buffer de lisis RIPA (RadiolImmuno Precipitation Assay Buffer) con inhibidores de proteasas. Las células fueron disociadas con fuerza mecánica mediante diversos pases a través de una jeringa de insulina. Los lisados fueron centrifugados a 10,000 Xg durante 30 minutos. El sobrenadante fue obtenido y guardado a -20 °C.

Para la realización del western blot, cantidades equivalentes de proteína (40-50 µg) fueron resueltas en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida. Las proteínas separadas en los geles fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (Amersham Pharmacia, UK), bloqueadas con leche durante 1 hora y entonces se incubaron con los anticuerpos monoclonales indicados (XIAP, c-IAP1 o tubulina; Oncogene) durante una noche. Los anticuerpos primarios fueron detectados con el anticuerpo secundario IgG-HRP anti-conejo o anti-ratón según fuera el caso. La unión del anticuerpo fue determinada usando quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia, UK) en placas X-Omat AR (Kodak, México).

*Ensayos de viabilidad celular y resistencia a drogas.*

Las líneas celulares T47-D y HEK 293 fueron cultivadas en monocapa a una densidad de  $25 \times 10^3$  células por pozo en placas de 24 pozos. Se permitió que las células llegaran a subconfluencia y después fueron tratadas con cantidades

variables de taxol (Bristol), estaurosporina (Sigma), tamoxifeno o cis-platino, durante diferentes tiempos, para obtener la dosis letal media (IC50) de cada droga. Después del tratamiento de cada fármaco, las células que permanecieron adheridas a la placa fueron fijadas con etanol frío al 70% durante 20 minutos y luego teñido con 100 µg/pozo de cristal violeta al 0.75% en ácido acético al 30% durante 10 minutos. Al final, las placas fueron enjuagadas y secadas. Se adicionó ácido acético para solubilizar las células teñidas y la absorbancia de cada pozo fue leída a 570 nm con un lector de microplacas. El porcentaje de la viabilidad de las células tratadas fue definida como la absorbancia relativa a las células control. Con esto se logró obtener el IC50 de cada droga. Adicionalmente se realizó la visualización de núcleos apoptóticos: las células fueron fijadas con etanol frío al 70% durante 15 minutos y pre-tratadas con RNasa (10 µg/ml) en PBS durante 30 minutos y a 37 °C. Los núcleos fueron teñidos con bromuro de etidio (5 µg/ml) en PBS; después, las células fueron lavadas con PBS y visualizadas con la ayuda de un microscopio Zeiss usando epifluorescencia y fotografiadas con una cámara digital (Nikkon 4,500).

El IC50 obtenido en cultivo de células en monocapa para cada droga fue empleado para evaluar la resistencia a estos fármacos de las células cultivadas en esferoide tumoral. Para esto, esferoides de T47-D y HEK 293 de cada diámetro seleccionado (21 días para T47-D y 8 días para HEK 293) fueron disgregados con PBS-EDTA-Tripsina, sus células fueron contadas y sembradas a baja confluencia (10,000 células/pozo) en placas de 24 pozos (para su cultivo en monocapa). Así se mantuvieron durante 3-4 días en los cuales se les reemplazó

medio DMEM y se permitió que llegaran a subconfluencia. A continuación, estas células provenientes del esferoide fueron tratadas con el IC50 de cada droga obtenido previamente.

*Ensayos de células del esferoide resembradas en monocapa a diferentes generaciones.*

Esferoides tumorales multicelulares de 21 días (T47-D) y 8 días (HEK 293) fueron disgregados con PBS-EDTA-Tripsina. Las células fueron resembradas como monocapa en placas de 24 pozos a baja confluencia (10,000 células/pozo), hasta que alcanzaron la subconfluencia (3-4 días), y con reemplazamiento diario de medio DMEM. Hasta este punto, a las células provenientes del esferoide y resembradas en monocapa hasta subconfluencia se le denominó el primer “pase”, el cual incluyó aproximadamente 3 ó 4 generaciones. En este primer pase se realizó la extracción de proteínas, un ensayo de viabilidad con el IC50 obtenido de cada droga y se emplearon células para cultivarlas nuevamente en monocapa hasta que llegaran a subconfluencia. A esto se le denominó el segundo pase y se realizó lo mismo que para el primer pase y así hasta el cuarto pase.

Al final se realizó western blot para observar la expresión de XIAP en cada pase y se compararon las viabilidades obtenidas en cada pase.

*Generación de RNA de interferencia para XIAP y c-IAP1.*

Para el RNA de interferencia de XIAP se utilizó una secuencia publicada (Lima, et al, 2004) de 22 nucleótidos de longitud que reconoce el dominio BIR1. La secuencia fue analizada con la base de datos del GeneBank usando el algoritmo

BLAST y construida (ver figura 6) con ayuda del algoritmo siRNA Designer (BD Biosciences). La secuencia fue flanqueada en el extremo 5' con una secuencia para la enzima EcoRI, y en el extremo 3' con una secuencia para la enzima BamHI. Primero, la secuencia fue alineada con su contraparte empleando un termociclador para obtenerla en dúplex. Después de esto, la secuencia completa fue ligada en el vector viral pSIREN (Clontech), el cual contiene sitios de clonación para las enzimas mencionadas. La construcción fue empleada para transformar bacterias (TransformAid Kit; Invitrogen), clonarla y purificar la construcción en grandes cantidades (Plasmid Purification Kit; Invitrogen).

La construcción se transfectó con Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen) en células empaquetadoras PT67 (BD Bioscience, Clontech) para la generación de partículas virales. Las partículas virales liberadas al medio por las células PT67 fueron empleadas para su titulación. Brevemente, diluciones de  $10^0$  a  $10^6$  fueron añadidas a células T47-D cultivadas en monocapa en placas de 24 pozos y a subconfluencia durante 24 horas. Después, se extrajo el medio viral y se colocó DMEM con puromicina para seleccionar a las células infectadas con el virus, que tiene la construcción (el siRNA), durante 1 semana. Al final se extrajo el medio y se fijaron las células con etanol al 70% y se contó el número de colonias en cada dilución al teñirlas con cristal violeta.

Luego de la obtención del título viral, se empleó la dilución seleccionada para infectar células T47D y HEK293 cultivadas en monocapa en placas de 24 pozos y luego seleccionarlas con puromicina ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) para obtener líneas celulares estables para el RNAi de XIAP. A estas células se les extrajo proteína, como se

describió anteriormente, se realizó western blot para la expresión de XIAP y se emplearon para generar esferoides.

*Inhibición de la resistencia con el siRNA de XIAP.*

Esferoides tumorales multicelulares generados con las líneas celulares estables para el RNAi de XIAP fueron disgregados como se describió anteriormente y resembrados en monocapa en placas de 24 pozos hasta subconfluencia. Después, se empleó el IC50 de los fármacos obtenido anteriormente y se midió viabilidad celular con la técnica de cristal violeta.

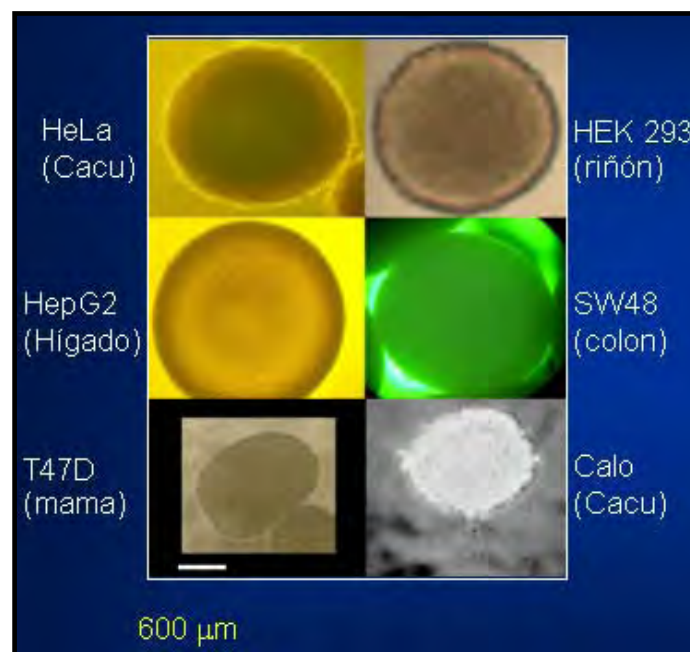
*Análisis estadístico.*

Los datos fueron presentados como valores promedio  $\pm$ SEM de por lo menos 3 experimentos realizados por separado. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

## **VI. RESULTADOS.**

### *Generación de esferoides tumorales multicelulares.*

Mediante el empleo de la técnica de líquido sobrelapante o *liquid overlay* modificada se realizó un análisis, con diversas líneas celulares de cáncer, para evaluar su capacidad de formar esferoides tumorales multicelulares. La generación de MTS fue distinta para cada línea celular analizada, tanto en tiempo como en tamaño. La figura 9 muestra los MTS de las líneas celulares evaluadas.



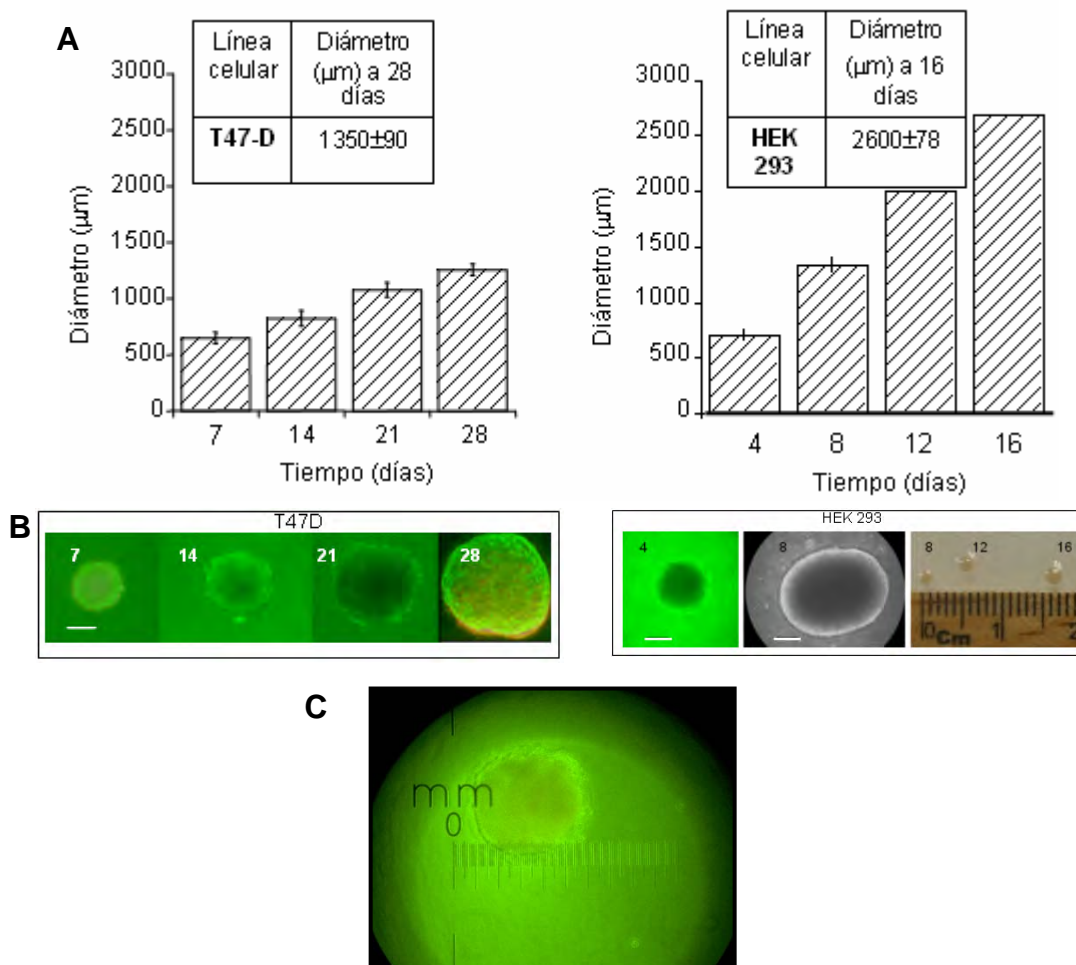
**Figura 9.** Microfotografía de luz de diversas líneas celulares de cáncer formando esferoides tumorales. HeLa, HepG2, SW48 y Calo forman esferoides redondeados y de tamaño mayor a 1 mm de diámetro, sin embargo, su tiempo de crecimiento sobrepasa los 30 días. La línea celular transformada HEK293 genera esferoides grandes en poco tiempo (1 a 2 semanas), mientras que T47D genera esferoides en un tiempo intermedio (2-3 semanas). Barra= 10 μm; amplificación= 10-

40X

De éstas líneas celulares se decidió utilizar T47-D (carcinoma ductal de mama) y HEK293 (Riñón embrionario transformado), debido a que su cultivo en esferoide, es relativamente sencillo, en tiempos mas cortos que para otras líneas celulares y la cantidad de esferoides defectuosos es mínima. Adicionalmente, para el caso de T47-D, se emplearon debido a que, en la actualidad en México, el cáncer de mama es un problema grave de salud y los resultados obtenidos en esta investigación podrían, posteriormente y con otro tipo de protocolos, ser trasladados a estudios clínicos. En el caso de las células HEK293 se emplearon para dilucidar si los efectos encontrados en cáncer de mama pudieran ser generales y no específicos de una línea celular.

La cinética de crecimiento evaluada permite observar la diferencia en el crecimiento de ambas líneas celulares seleccionadas (Figura 10).



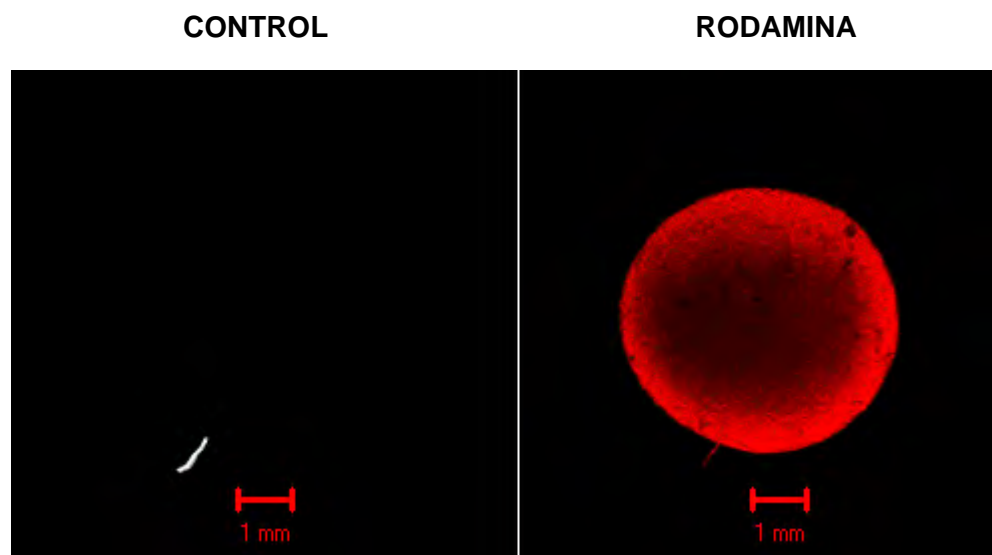


**Figura 10.** Tiempo de cultivo (en días) y tamaño de los MTS de T47-D y HEK293 (incluido el máximo diámetro alcanzado, Ver recuadro) (A). Microfotografía de esferoides tumorales representativos de cada día de cultivo seleccionado (B). Microfotografía de luz mostrando la retícula graduada empleada para las mediciones de los diámetros de cada esfroide (C). Los datos representan el promedio de por lo menos 10 mediciones diferentes. Barra en B= 300  $\mu\text{m}$ .

Los MTS de T47-D crecen más lentamente que los HEK 293. Además, éstos últimos alcanzan un diámetro mayor en menos tiempo que los T47-D. Después del tiempo máximo encontrado para el cultivo de cada línea celular (28 días para T47-

D y 16 días para HEK 293) se observó que los esferoides dejan de crecer y las células a su alrededor comienzan a desprenderse.

El crecimiento de los esferoides fue estandarizado de acuerdo con el tiempo. Por ejemplo, para T47D, a los 7 días se obtienen esferoides de aproximadamente 600  $\mu\text{m}$ , a los 14 días de 800  $\mu\text{m}$ , a los 21 de 1,100  $\mu\text{m}$  y a los 28 de 1,300  $\mu\text{m}$ . Aquellos esferoides que no lograron el tamaño indicado al tiempo indicado fueron eliminados. Asimismo, la estructura del esferoide se pudo observar empleando microscopía confocal y rodamina, un marcador mitocondrial, el cual puede marcar a las células metabólicamente activas dentro del esferoide (Figura 11).

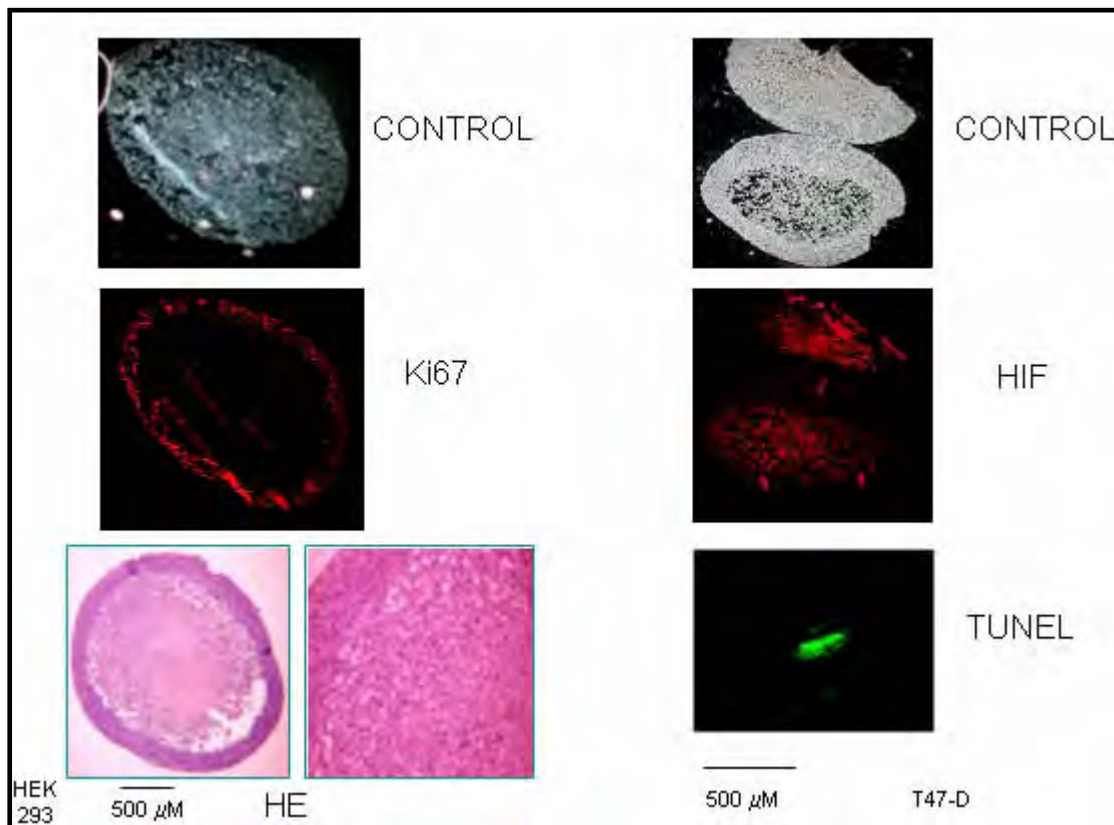


**Figura 11.** Imagen obtenida de microscopía confocal que muestra la incorporación de rodamina en un esferoide HEK293 de 2.6 mm de diámetro.

#### *Caracterización de los MTS.*

Para conocer si en estos cultivos de esferoides se presentan las distintas capas celulares que están descritas en la literatura y que se mencionan en la

Introducción, se realizó inmunohistoquímica o el ensayo de TUNEL para marcar cada capa dentro del esferoide. Para tal motivo se realizó a fijación de esferoides (de 21 días para T47-D y de 12 días para HEK293), y se prepararon como si se tratara de muestras histológicas montadas en laminillas para la inmunohistoquímica (figura 12).

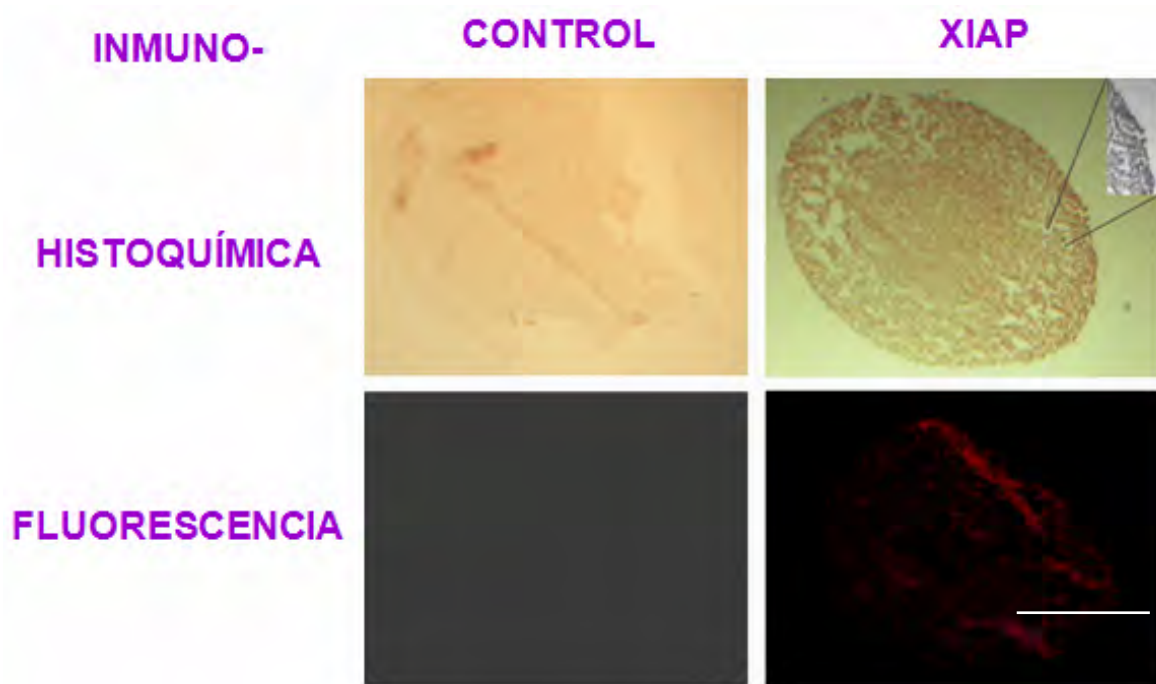


**Figura 12.** Microfotografía de luz o de microscopio de epifluorescencia para la observación de las distintas capas dentro del esferoide tumoral de HEK 293 ó T47-D. Ki67 es un marcador de la capa proliferativa (la capa externa), mientras que no se revela en las capas intermedias (capas quiescentes) o en las centrales; la presencia de HIF indica que el esferoide presenta un limitado acceso al oxígeno en sus capas intermedias y centrales; la presencia de células centrales apoptóticas es visualizada por TUNEL; la hematoxilina eosina (HE) permite distinguir viabilidad en las capas externas.

La inmunohistoquímica para Ki67, un marcador de células en proliferación, mostró que las capas más externas del esferoide contienen a las células que se encuentran en constante proliferación. El marcaje con HIF1- $\alpha$ , una proteína que es inducida directamente por bajas concentraciones de oxígeno, muestra que casi todo el esferoide tiene presente este factor de transcripción, y que la expresión de este factor va del centro y disminuye un poco hacia la periferia. La técnica de TUNEL reveló que existe apoptosis sólo hacia el centro del esferoide, mientras que la tinción con Hematoxilina-Eosina permitió distinguir que la mayor viabilidad celular se presenta de la periferia al centro debido a que el limitado acceso de oxígeno o nutrientes hacia el interior induce muerte celular.

En adición se realizó inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de XIAP en esferoides tumorales de la línea celular HEK293 encontrándose que éstos expresan XIAP

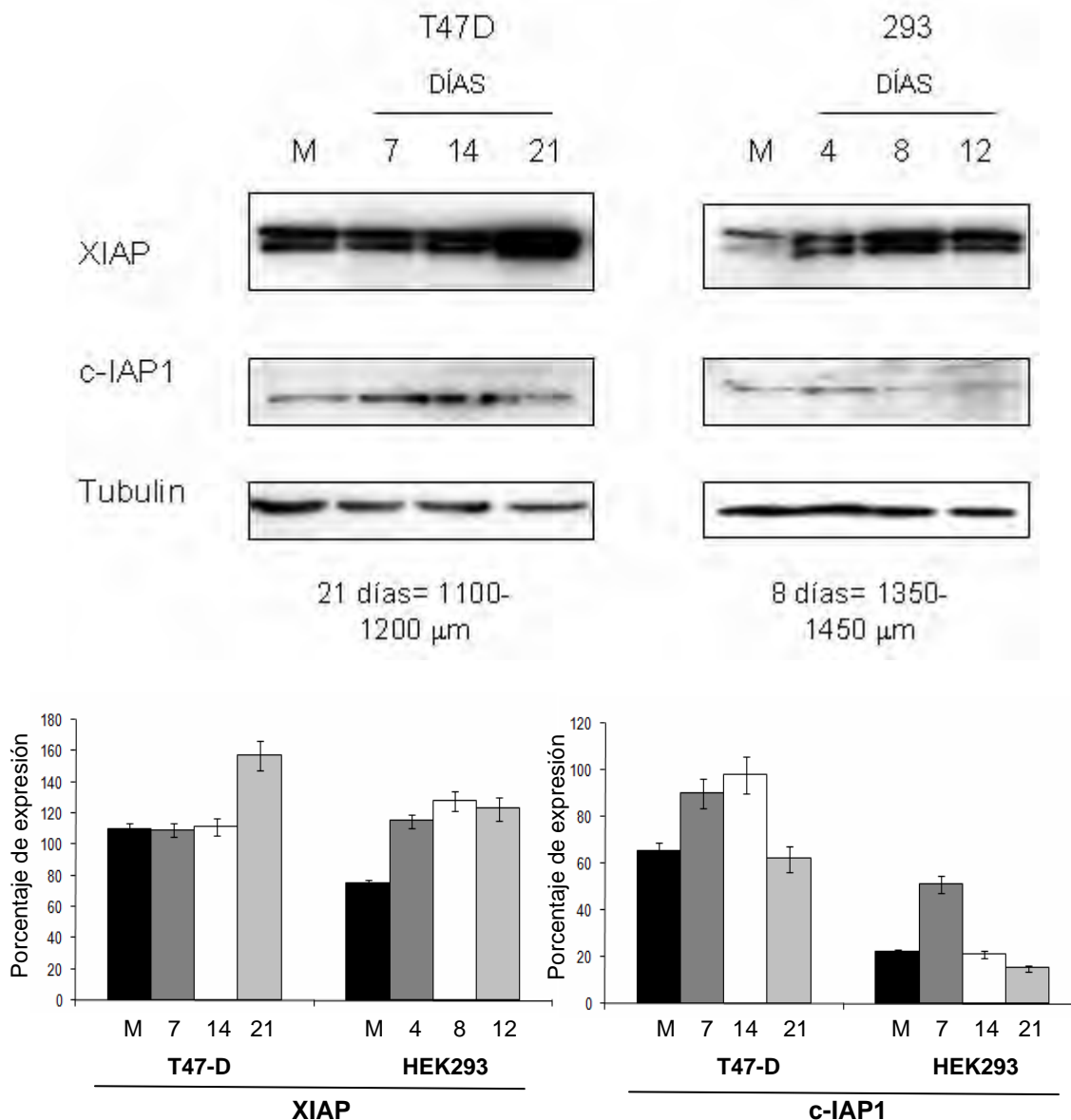
en casi todo el esferoide y que justo las capas más externas, las proliferativas, expresan más cantidad que el resto (figura 13). Debido a la baja resolución de las imágenes no se pudo realizar un análisis cuantitativo estricto.



**Figura 13.** Microfotografía de luz (inmunohistoquímica) o de epifluorescencia (immunofluorescencia) para visualizar la expresión de XIAP dentro del esferoide tumoral (barra= 500  $\mu\text{m}$ ).

*Expresión de XIAP en los esferoides tumorales.*

A continuación, esferoides (de 21 días para T47-D y de 12 días para HEK293) fueron empleados para la extracción de proteínas y el análisis de la expresión de XIAP y de c-IAP1, otro miembro de la familia de IAPs (figura 14).



**Figura 14.** Expresión de XIAP y c-IAP1 durante el crecimiento de esferoides tumorales de T47-D y HEK293 analizadas por western blot. Densitometrías que muestran el porcentaje de expresión de cada proteína con respecto a su tubulina. M= monocapa.

Durante su crecimiento, esferoides T47-D expresan mayores cantidades de XIAP y c-IAP1 que esa misma línea celular cultivada en monocapa. Asimismo, esferoides HEK 293 expresan mayores cantidades de XIAP, aunque desde su

inicio de formación, con respecto a esa misma línea celular cultivada en monocapa. Para el caso de ambas IAPs y en los dos tipos de esferoides, la expresión disminuye después de alcanzar el máximo nivel, es decir, al día 28 para T47D y al día 16 para HEK293 (observaciones no mostradas). Debido al máximo nivel de expresión de XIAP, la más potente proteína inhibidora de caspasas y la proteína que puede estar asociada a la resistencia a fármacos antineoplásicos en tumores, se decidió utilizar esferoides del día 21 de cultivo (diámetro de 1,100 a 1.200  $\mu\text{m}$ ) para T47D, y del día 12 de cultivo (diámetro de 1350 a 1450  $\mu\text{m}$ ) para HEK 293 en los experimentos siguientes.

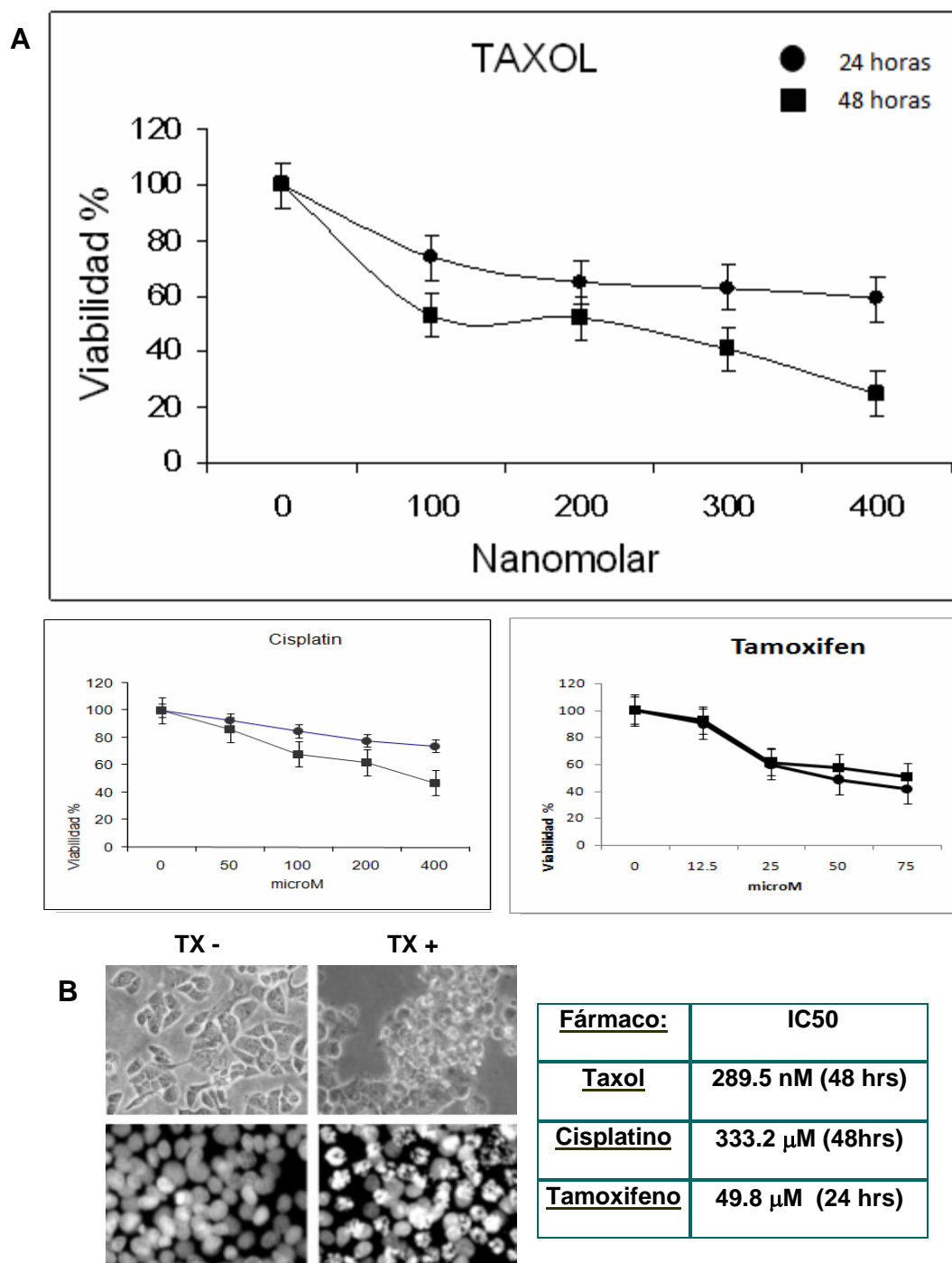
*Obtención del IC50 de fármacos en células en monocapa.*

Con el fin de obtener un parámetro que permitiera la comparación entre las células cultivadas en monocapa y las células cultivadas en esferoide, se obtuvo la dosis letal media o IC50 (dosis de un fármaco con la cual muere el 50% de la población) en células en monocapa. Los fármacos utilizados en este estudio fueron aquellos que son empleados para el tratamiento de cáncer de mama y cuyo IC50 se encontrara en concentraciones similares al que se emplea en la clínica: para el caso de T47-D se utilizó taxol (un inhibidor mitótico que causa muerte celular al perturbar la dinámica normal de los microtúbulos), cisplatino (un agente que causa daño al DNA e induce apoptosis) y tamoxifeno (un modulador del receptor de estrógenos que bloquea el ciclo celular); mientras que para HEK293 se empleó taxol, cisplatino y estaurosporina (un amplio inhibidor de cinasas que afecta vías de sobrevivencia celular e induce apoptosis). El caso de HEK293 se

utilizó para observar los efectos de los fármacos en otra línea celular además de T47-D.

En la figura 15 se observan los diferentes fármacos empleados y las concentraciones utilizadas para obtener su IC50. Los fármacos fueron evaluados en dos tiempos distintos, 24 y 48 horas, debido a que algunos son más eficaces en una línea celular que en otra y esto fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al fármaco. El porcentaje de viabilidad celular después del tratamiento con cada fármaco fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Adicionalmente, para determinar si la reducción de la viabilidad en células T47-D y HEK 293 expuestas a los fármacos durante el tiempo establecido fue a causa de la apoptosis, se analizó la morfología celular y nuclear con bromuro de etidio, una tinción fluorescente. Con esta técnica se pudo observar la condensación citosólica y la condensación y fragmentación nuclear típicas de la muerte celular por apoptosis.

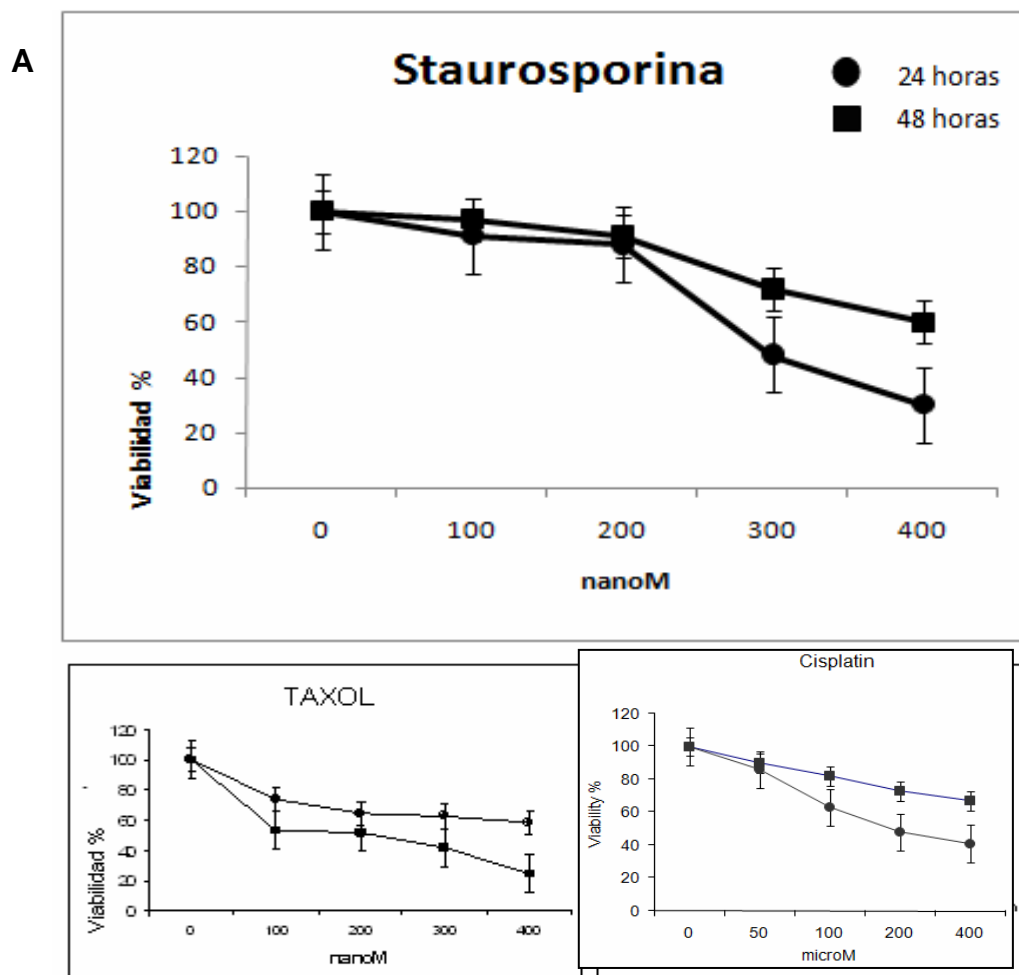




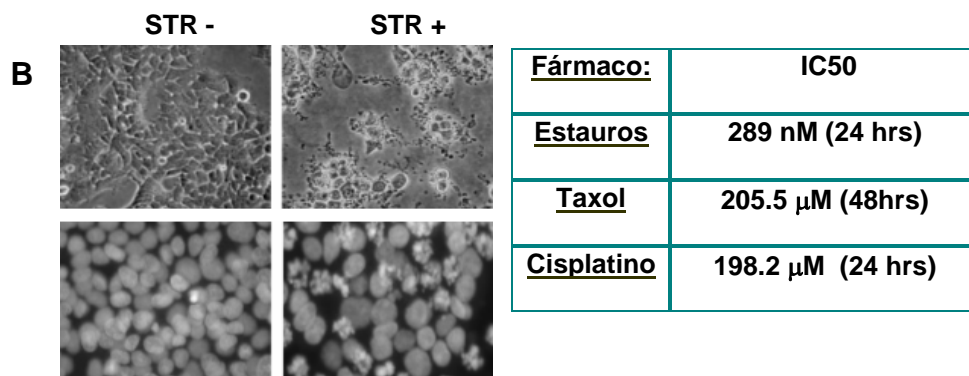
**Figura 15.** Obtención del IC50 de fármacos en células T47-D cultivadas en monocapa. Taxol, cisplatino y tamoxifeno fueron evaluados en distintas concentraciones a las 24 (círculos) y a las 48 (cuadros) horas (A). La dosis letal a la cual muere el 50% de la población fue obtenida de la gráfica (ver tabla insertada). En el recuadro se observa la morfología de células T47-D en monocapa luego de ser retadas con el IC50 de taxol (TX). Panel superior, microscopía de luz; panel inferior, tinción

nuclear con bromuro de etidio y visualización en microscopía de epifluorescencia. Todos los datos representan el promedio ( $\pm$ SE) de por lo menos 3 experimentos independientes. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

En la figura 16 se observa lo mismo que en la figura 13 pero para las células HEK 293.



**Figura 16.** Continúa en la siguiente página.



**Figura 16.** Obtención del IC50 de fármacos en células HEK293 cultivadas en monocapa.

Estaurosporina, taxol y cisplatino fueron evaluados en distintas concentraciones a las 24 (círculos) y a las 48 (cuadros) horas (A). La dosis letal a la cual muere el 50% de la población fue obtenida de la gráfica (ver tabla insertada). En el recuadro se observa la morfología de células HEK293 en monocapa luego de ser retadas con el IC50 de estaurosporina (STR). Panel superior, microscopía de luz; panel inferior, tinción nuclear con bromuro de etidio y visualización en microscopía de epifluorescencia. Todos los datos representan el promedio ( $\pm$ SE) de por lo menos 3 experimentos independientes. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

#### *Resistencia a fármacos en células cultivadas como esferoides tumorales.*

Para determinar si las células que fueron cultivadas como esferoides tumorales incrementan o no su resistencia a la muerte inducida por diversos fármacos, esferoides con el diámetro seleccionado fueron disgregados con PBS-EDTA-Tripsina y después resembrados en monocapa en placas de 24 pozos hasta subconfluencia. Se realizó este procedimiento para permitir que todas las células del esferoide estuvieran en contacto con la droga, lo cual no ocurre a los mismos

tiempos ni a la misma concentración, en las células dentro del esferoide. Paralelamente se sembraron células de cada línea tumoral, que solo se han cultivado en monocapa, también en placas de 24 pozos hasta subconfluencia. Se aplicó el IC50 de cada droga obtenida anteriormente en monocapa y se analizó la viabilidad celular con la técnica de cristal violeta. En la figura 17 se observa que las células tanto T47-D como HEK 293 que estuvieron en un contexto tridimensional dentro del esferoide son menos susceptibles a la muerte inducida por los fármacos examinados que las células en monocapa, lo cual indica que estas células adquirieron un tipo de resistencia. Sin embargo, para el caso de HEK 293, sus esferoides son más susceptibles a la muerte inducida por cisplatino y taxol, y más resistentes a la estaurosporina.

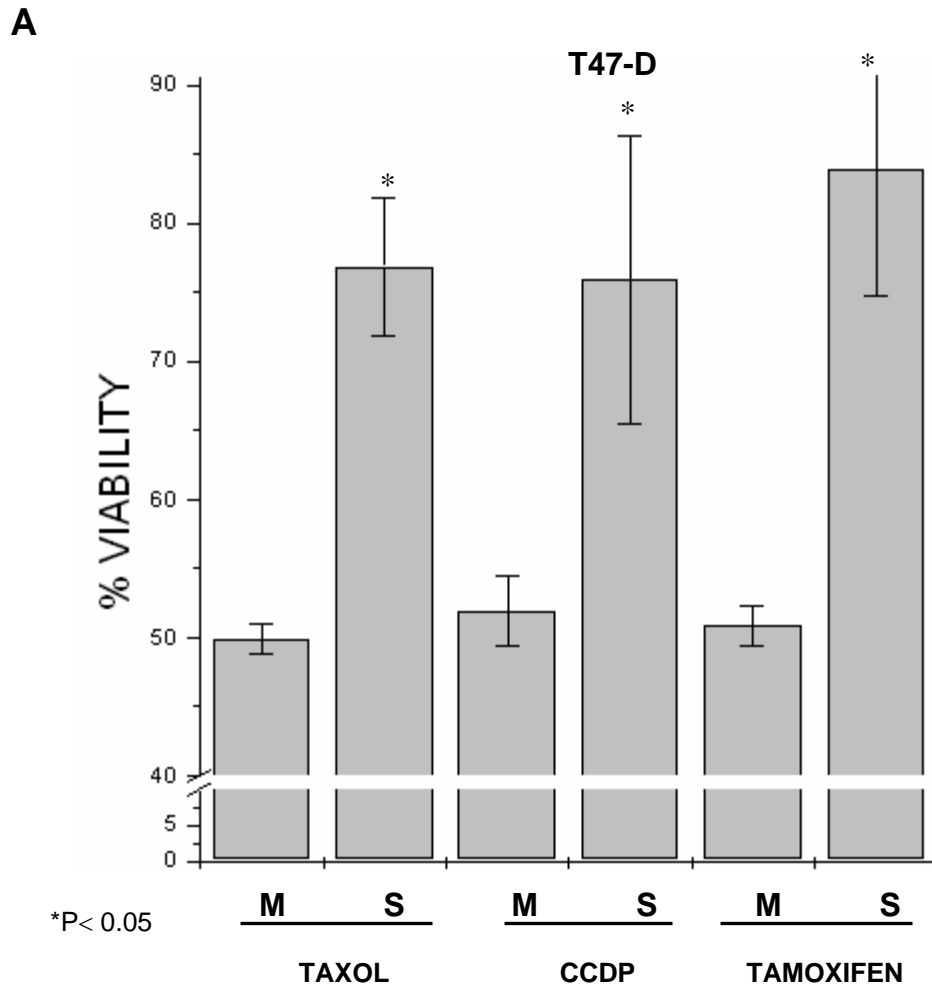
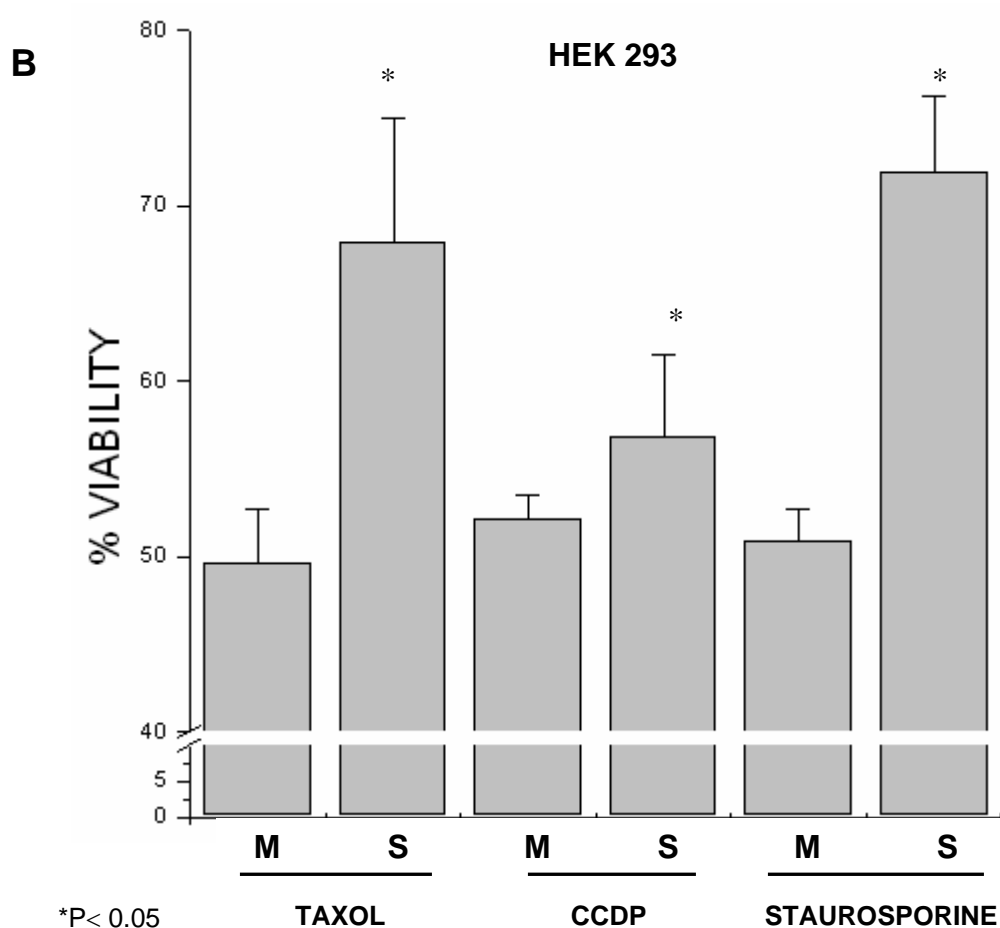


Figura 17. Continúa en la siguiente página.



**Figura 17.** Resistencia a fármacos antineoplásicos en células T47-D (A) y HEK 293 (B) que fueron cultivadas en esferoide tumoral. Células en monocapa (M) fueron comparadas contra células provenientes del esferoide sembradas en monocapa (S). Luego de que ambos sistemas llegaron a subconfluencia se les añadió el IC50 de cada fármaco, previamente obtenido, y se evaluó su resistencia a la muerte inducida por el fármaco mediante un ensayo de viabilidad. CCDP= cisplatino. Todos los datos representan el promedio ( $\pm$ SE) de por lo menos 3 experimentos independientes. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

Debido a que el taxol es más empleado en ensayos clínicos que los otros fármacos en pacientes con cáncer de mama, se decidió utilizar para los siguientes experimentos, el estímulo de taxol para T47-D. Estaurosporina fue empleada para HEK293 ya que presentó mayor resistencia que los otros fármacos evaluados.

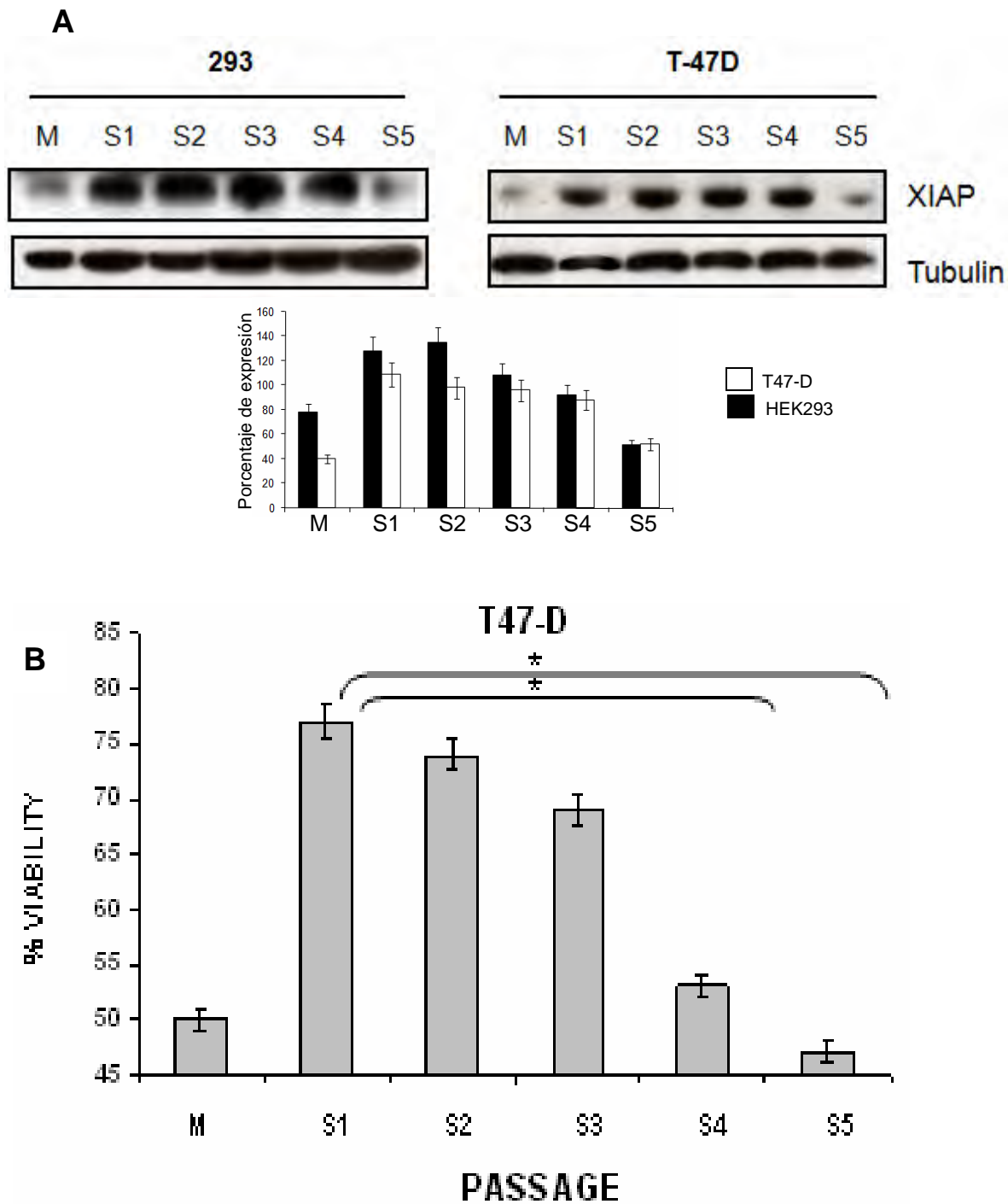
*La expresión de XIAP está relacionada con la mayor resistencia durante el crecimiento tridimensional.*

Para determinar si la mayor expresión de XIAP en células de esferoides está asociado con la mayor resistencia observada, se realizó un experimento de “pases” o generaciones siguientes en monocapa, luego del cultivo en esferoides. Para este fin, los esferoides del diámetro seleccionado para cada línea celular fueron disgregados con PBS-EDTA-Tripsina y sembrados en monocapa en placas de 24 pozos hasta que alcanzaron la subconfluencia. Esto fue denominado el primer pase y, de éste cultivo, se tomaron células para cultivarlas nuevamente hasta subconfluencia, siendo éste el segundo pase, y así hasta el cuarto.

La figura 18 muestra que las células que han estado en contexto tridimensional dentro del esferoide, mantienen un incrementado nivel de XIAP, hasta el cuarto pase, cuando los niveles disminuyen considerablemente, en ambas líneas celulares. Además, este nivel de expresión de XIAP correlaciona, parcialmente, con la resistencia evaluada con taxol para T47-D y estaurosporina para HEK 293 en cada pase. De este modo, puede observarse una cierta correlación en cuanto a resistencia: a mayor cantidad de XIAP, mayor resistencia a la muerte celular inducida por taxol o estaurosporina; y entre menor cantidad de XIAP, menor

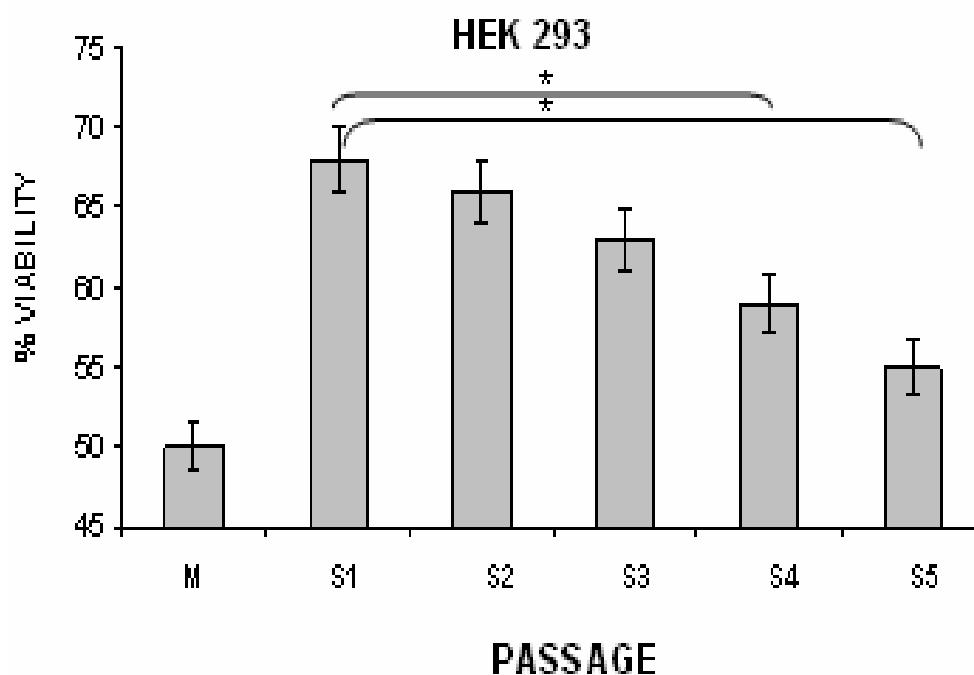


resistencia a la muerte celular inducida por ambos fármacos durante el crecimiento tridimensional de los esferoides.



**Figura 18.** Continúa en la siguiente página.

C



**Figura 18.** Células provenientes de esferoides tumorales mantienen su resistencia a fármacos antineoplásicos. Expresión de la proteína XIAP, por western blot, en células provenientes de esferoides resemebradas en monocapa durante 4 pases (aproximadamente 12 generaciones). M= monocapa, S1= esferoide completo, S2= esferoide disgregado resemebrado en monocapa (primer pase), S3= esferoide disgregado resemebrado en monocapa (segundo pase), etc. Densitometrías que muestran el porcentaje de expresión de la proteína con respecto a su tubulina en cada fase de crecimiento (A). La resistencia a la muerte inducida por fármacos fue medida mediante viabilidad celular la cual fue evaluada en cada uno de los pases luego de añadir el IC50 de taxol para T47-D (B) y estaurosporina para HEK 293 (C). Todos los datos representan el promedio ( $\pm$ SE) de por lo menos 3 experimentos independientes. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

*Generación de un RNA de interferencia para XIAP.*

Para determinar si la expresión de XIAP es parte del mecanismo de resistencia de las células del esferoide tumoral a distintos fármacos antineoplásicos, se generó un siRNA (con especificidad para el dominio BIR1) de una secuencia publicada para XIAP (Lima, et al, 2004). La secuencia seleccionada es la siguiente:

GGAGATACCGTGCGGTGCT y los oligonucleótidos complementarios para el siRNA de XIAP se presentan a continuación:

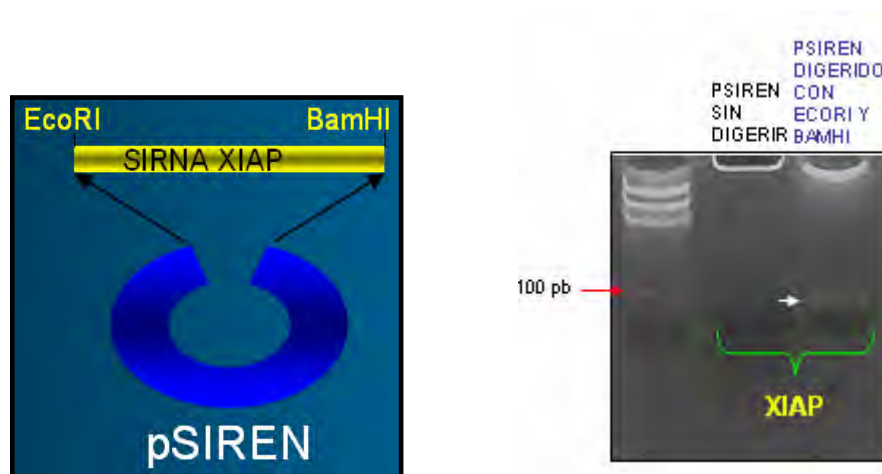
<b>Top Strand (length 63)</b>	<b>5'</b>	gatccGGAGATACCGTGCGGTGCTTTCAAGAGAAGCACCGCACGGTATCTCCTTTTTTg-- --	<b>3'</b>
<b>Bottom Strand (length 63)</b>	<b>5'</b>	aattcAAAAAAGGAGATACCGTGCGGTGCTTCTCTTGAAAGCACCGCACGGTATCTCCg-- --	<b>3'</b>

La adición de los sitios de clonación en el vector pSIREN y la alineación de los oligonucleótidos permitió tener a la secuencia de la siguiente manera:

<b>Top Strand (length 63)</b>	<b>5'</b>	gatccGGAGATACCGTGCGGTGCTTTCAAGAGAAGCACCGCACGGTATCTCCTTTTTTg	<b>3'</b>
<b>Bottom Strand (length 63)</b>	<b>3'</b>	gCCTCTATGGCACGCCACGAAAGTTCTCTTCGTGGCGTGCCATAGAGGAAAAAAacttaa	<b>5'</b>

La secuencia fue alineada primeramente y después clonada en el vector retroviral pSIREN (el cual contiene un promotor de humano: U6) que presenta los

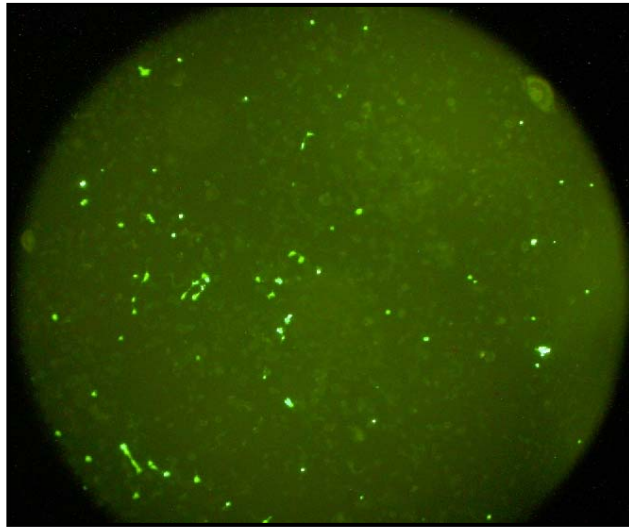
sitios de clonación EcoRI y BamHI. La secuencia también contiene estos sitios de clonación, de manera tal que se realizó la ligación, transformación de bacterias y purificación del plásmido con MidiPrep. Esta construcción fue nombrada siRNA XIAP. Para observar que la secuencia estuviera realmente clonada en el vector, se realizó una digestión con EcoRI y BamHI y los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida. En la figura 19 se muestra el siRNA liberado de la digestión (banda de aproximadamente 72 pb).



**Figura 19.** Clonación del siRNA de XIAP en el vector retroviral pSIREN. A la izquierda se observa un esquema del vector y el inserto. A la derecha se visualiza el gel de poliacrilamida con la liberación del oligonucleótido clonado, el cual contiene la secuencia para el siRNA de XIAP.

Puesto que el vector pSIREN requiere de células especializadas para encapsularse y generar partículas virales, el vector construido fue transfectado con Lipofectamina Plus 2000 en células empaquetadoras PT67, diseñadas precisamente para ese fin. Previamente se analizó la eficiencia de transfección en las mismas células pero con un vector que codifica EGFP (figura 20) y analizando

diversos liposomas (FUGENE, lipofectamina y Escort). La transfección con lipofectamina mostró la mejor eficiencia de transfección (aproximadamente 30-40% comparada contra 10-15% de los demás liposomas).

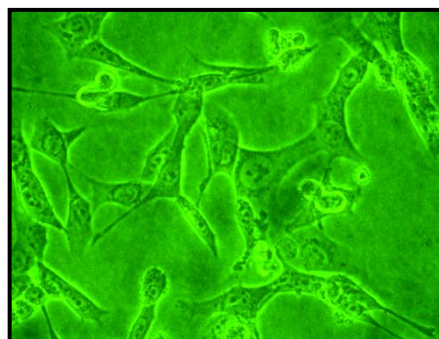


**Figura 20.** Microfotografía de microscopio de epifluorescencia que muestra la eficiencia de transfección de un vector que contiene EGFP transfectado con Lipofectamina Plus 2000 en células empaquetadoras PT67.

El vector contiene una señal  $\psi$  (de empaquetamiento) que es reconocida por los genes *gag*, *pol* y *env* codificados por el genoma de las células PT67 y que son los encargados de encapsular al vector y generar la envoltura proteica del virión. Los virus formados de esta manera son liberados al medio y éste se recolecta para titularlo mediante diluciones seriales. El medio fue diluído de  $1 \times 10^0$  hasta  $1 \times 10^6$  y fue empleado para infectar, durante 24 horas, células T47-D cultivadas en monocapa.

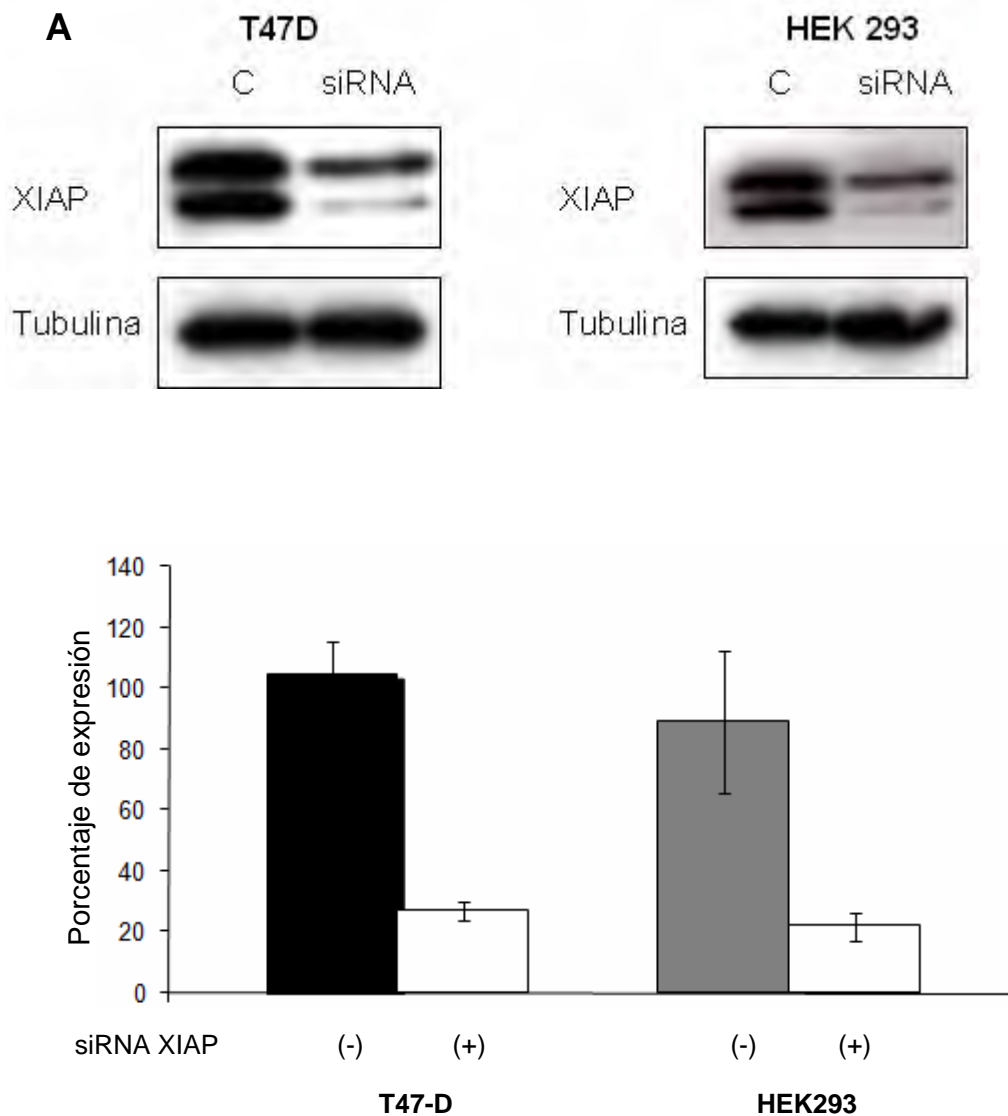
Después de transcurrido el tiempo las células fueron tratadas con puromicina (ya que el vector contiene una secuencia que brinda resistencia a este fármaco) y las colonias formadas fueron observadas después de una semana con la técnica de cristal violeta. La misma metodología se realizó para el siRNA de luciferasa (Luc; empleado como control). En la tabla 1 se observa el número de colonias formadas en cada dilución. Puesto que se encontraron colonias en la máxima dilución realizada, se empleó esta dilución para infectar células T47-D y HEK 293 y seleccionarlas para hacerlas estables en la expresión del siRNA para XIAP o Luc.

<u>XIAP</u>	Control	10 <sup>0</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
T47-D	-	25	19	14	10	7	5	2
<u>Luc</u>								
T-47-D	-	31	26	21	16	10	8	5

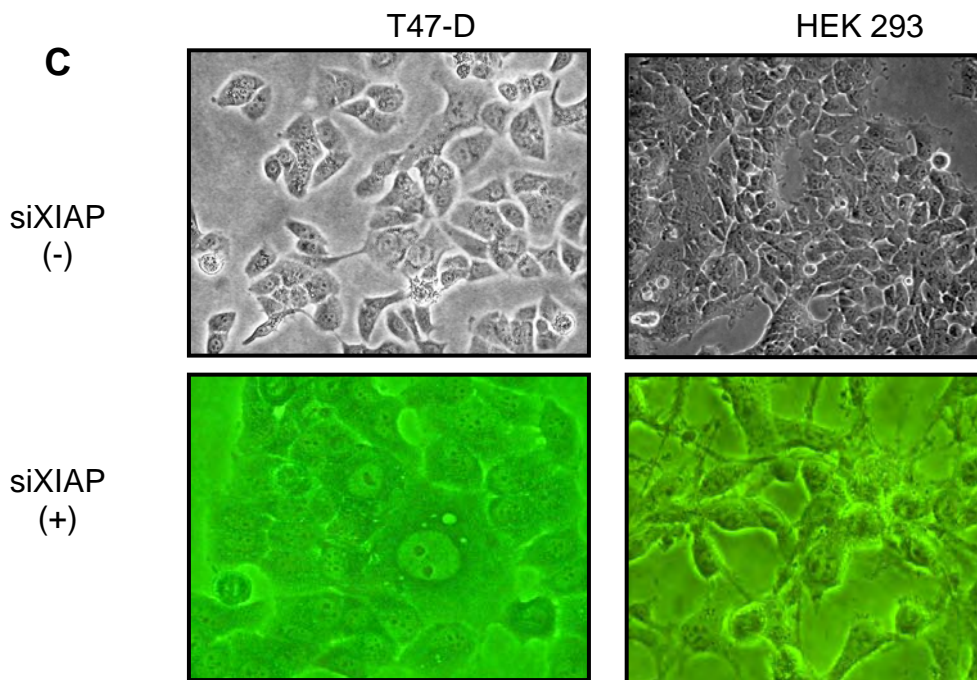


**Tabla 1.** Determinación del título viral del siRNA de XIAP y Luciferasa. El cuadro muestra el número de colonias encontradas en cada dilución. Microfotografía de luz mostrando la morfología de las células T47-D transfectadas con siXIAP.

A estas células estables se les extrajo proteínas para realizar el western blot para XIAP y observar el porcentaje de disminución de la proteína (disminución de 20-30%) (figura 21). Esferoides tumorales generados por estas líneas celulares mostraron la misma disminución en la expresión de XIAP.



**Figura 21.** Continúa en la siguiente página.



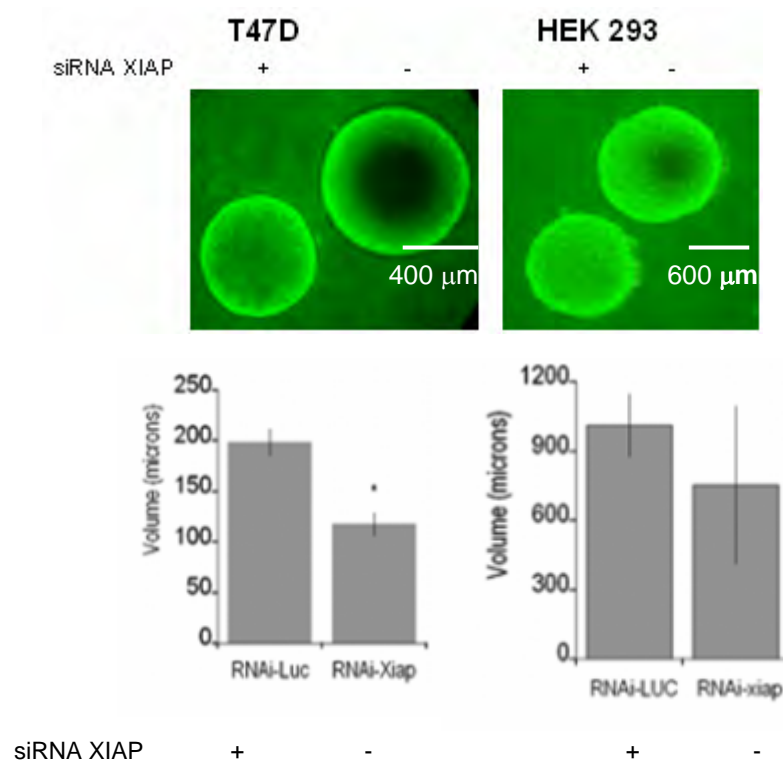
**Figura 21.** Western blot de proteínas extraídas de las células T47-d y HEK293 infectadas con el siRNA de XIAP. Densitometrías que muestran el porcentaje de expresión de la proteína XIAP con respecto a su tubulina (A). Microfotografía de luz que muestra la apariencia de las células transfectadas con el vector de siXIAP. Amplificación de 20X.

*Generación de esferoides tumorales con las líneas estables para el siRNA de XIAP.*

Las líneas celulares T47-D y HEK 293 estables para el siRNA de XIAP o de Luciferasa fueron cultivadas como esferoides tumorales multicelulares de acuerdo con la técnica descrita previamente. En la figura 22 se muestra que los esferoides generados con las líneas estables para el siRNA de XIAP tuvieron un tamaño más



pequeño a un tiempo determinado (14 días para T47-D y 8 días para HEK 293) que los esferoides de las líneas estables para el siRNA de luciferasa.



**Figura 22.** Microfotografía de luc que muestra el tamaño menor de los esferoides generados con las líneas estables para el siRNA de XIAP. siRNA XIAP (-) significa que son esferoides generados con la línea estable para el siRNA de luciferasa (esferoides con el siRNA control). Las gráficas muestran la desviación de por lo menos 3 experimentos por separado. La barra indica el tamaño en cada caso y la diferencia en el tamaño es más evidente para T47-D que para HEK293. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

*XIAP tiene un papel importante en la resistencia a fármacos antineoplásicos durante el crecimiento tridimensional.*

Para determinar el papel que juega XIAP en la resistencia observada a fármacos antineoplásicos los esferoides generados con las células estables para el siRNA de XIAP o de Luciferasa (de 21 días para T47-D y de 12 días para HEK293) fueron disgregados y resembrados en monocapa a baja confluencia. Después, se les aplicó el IC50 de taxol (para T47-D) y de estaurosporina (para HEK 293) durante los tiempos indicados y su viabilidad fue evaluada con cristal violeta. La figura 23 muestra que las células provenientes del esferoide mantienen su mayor resistencia, con respecto a las células cultivadas en monocapa, aún cuando son estables para el siRNA de Luciferasa. Sin embargo, esas células disminuyen considerablemente su resistencia cuando se les induce una menor producción de XIAP con RNA de interferencia. Ambas líneas celulares, T47-D y HEK 293, mostraron el mismo comportamiento.

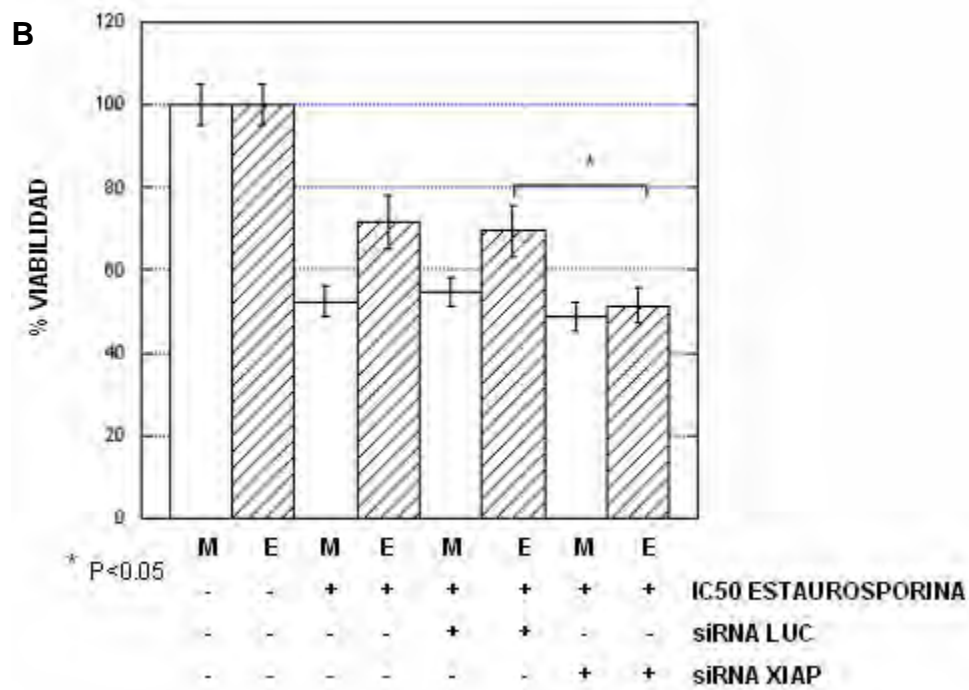
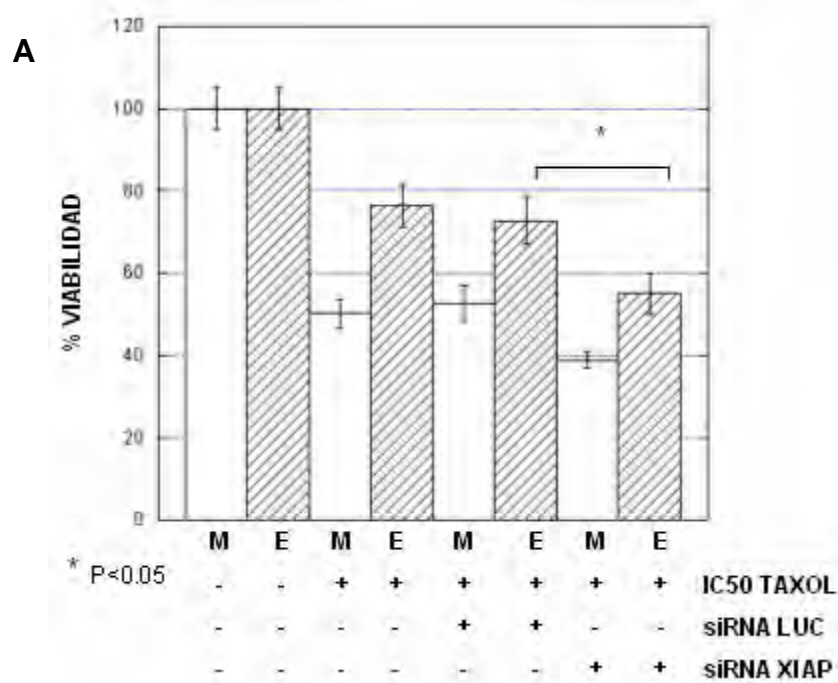
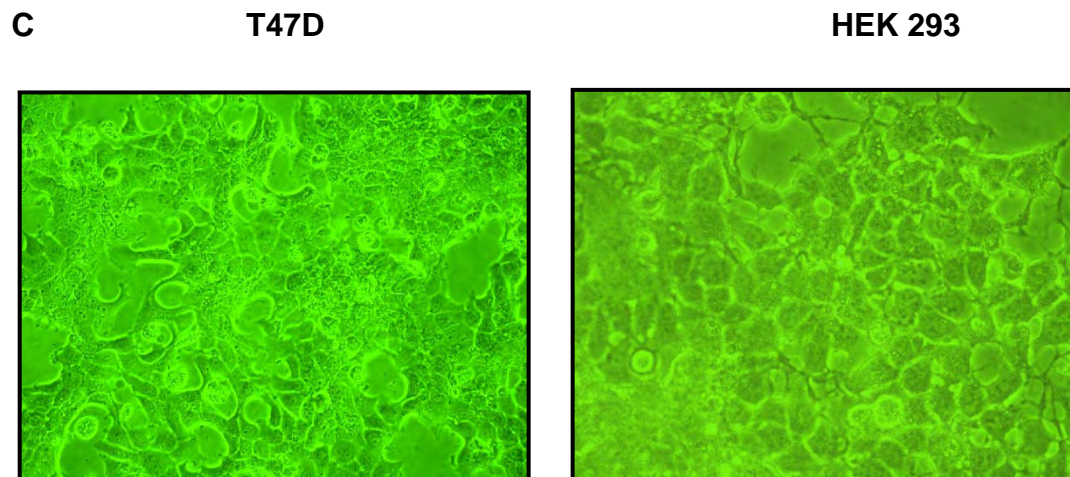


Figura 23. Continúa en la siguiente página.



**Figura 23.** Rol de XIAP en la resistencia a fármacos antineoplásicos durante el crecimiento tridimensional en esferoide. El siRNA de XIAP revierte la resistencia a taxol en células T47-D (A) y a estaurosporina en células HEK293 (B). Microfotografía de luz que muestra la apariencia de las células provenientes de los esferoides con el siRNA estable para XIAP y resembradas en monocapa antes de la adición del fármaco (C). M= monocapa; E= esferoides disgregados y resembrados en monocapa. Todos los datos representan el promedio ( $\pm$ SE) de por lo menos 3 experimentos independientes. Los grupos controles y experimentales fueron comparados estadísticamente usando una prueba *t* de Student de datos no apareados. Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado significativo.

## **VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.**

La resistencia fármacos quimioterapéuticos en cáncer es un problema clínico importante debido a que, gracias a esto, las células cancerosas no pueden responder adecuadamente a los distintos tratamientos. Existen dos tipos de resistencia: la resistencia intrínseca que es con la que ya cuentan las células cancerosas; y la resistencia adquirida que se hace notoria después del tratamiento con algún tipo de fármaco y en donde las células que sobreviven adquieren características que les permiten ser más agresivas por haber estado expuestas a condiciones de baja concentración de oxígeno o nutrientes. Estas características adquiridas incluyen la sobreexpresión de P-glicoproteína (una proteína de membrana que actúa como bomba de eflujo desintoxicando a las células), la desregulación de los mecanismos de reparación (mismatch repair) o la sobreexpresión de miembros de la familia de Bcl-2 que confieren resistencia a la muerte celular entre otras (Bindra, et al, 2007; Wartenberg, et al, 2005).

La resistencia a la apoptosis es un tópico de gran interés y de actualidad ya que la mayoría de los fármacos antineoplásicos actúan, ya sea inicialmente o en alguna etapa de su mecanismo de acción, mediante la inducción de la apoptosis. Por lo que, el desarrollo de resistencia de las células cancerosas, dentro de un tumor sólido, a fármacos antineoplásicos es el resultado de la resistencia a la apoptosis (Tsuruo, et al, 2003, Landowski, et al, 1997). En las células cancerosas todas las vías de señalización se encuentran desreguladas y una respuesta a esto es que las células mantienen activadas a las caspasas. Las células cancerosas

escapan a la apoptosis mediante dos mecanismos principales: el primero es por la sobreexpresión de miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2; y el segundo mecanismo es por la sobreexpresión de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Éste último mecanismo es el que favorece la interrupción de la actividad enzimática de las caspasas y favorece la sobrevivencia e inmortalidad de las células cancerosas (Dubrez-Daloz, et al, 2008). Dentro de estas IAPs, XIAP es la proteína que más se ha estudiado debido a que es la que se une con mayor afinidad a las caspasas y la más eficiente en bloquearlas (Liston, et al, 2003). XIAP participa de forma importante en la resistencia de diversas líneas celulares tumorales y con diversos tratamientos como etopósido, cisplatino y radioterapia en cultivos celulares bidimensionales (Dean, et al, 2007).

A pesar de la existencia de otros 7 miembros más de la familia de IAPs, parece ser que sólo XIAP adquirió la capacidad de inhibir caspasas (Eckelman, et al, 2006) ya que otras IAPs, como c-IAP1 y c-IAP2, por ejemplo, a pesar de unirse a caspasa 7 y 9, carecen de los dominios asociados a la inhibición (Eckelman y Salvesen, 2005), además de que la inhibición de caspasas no se ha visto *in vivo* para estas IAPs.

Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado el papel que juega XIAP en la resistencia a fármacos en un contexto tridimensional, es decir, cuando las líneas celulares tumorales crecen al igual que en un microtumor sólido *in vivo*.

### **Caracterización de los esferoides tumorales.**

Para estudiar lo anterior se generaron esferoides tumorales multicelulares de diversas líneas celulares y se emplearon aquellas líneas que generaran esferoides

relativamente grandes (Figura 9). Se utilizaron finalmente dos líneas celulares: una de carcinoma ductal de mama (T47-D) que se utilizó como línea principal, y otra de riñón embrionario transformado (HEK 293) con el fin de observar si los efectos en la primer línea celular son un poco más generales y se presentan en otra línea también.

De este modo, se pudo observar que la línea celular HEK 293 forma esferoides mucho más grandes y en menos tiempo que los esferoides T47-D (Figura 10), debido probablemente, a que contienen secuencias virales de promotores que les permiten replicar su DNA mucho más rápido y constante que las células tumorales. Además se observa actividad mitocondrial en casi todo el esferoide cuando se visualizó por incorporación de rodamina 123 en microscopía confocal (Figura 11).

Los esferoide empleados en este estudio se nombraron “esferoides maduros” y corresponden a 21 días ó 0.8 mm para T47-D y de 12 días ó 1.8 mm para HEK 293.

Los esferoides T47-D generados mimetizan las etapas iniciales avasculares de los microtumores sólidos *in vitro*, es decir, microtumores que se encuentran normalmente en los organismos vivos y que a veces permanecen en ese estado durante mucho tiempo y que después, pueden llegar a crecer y a metastasizar a causa de alguna mutación extra o de alguna inmunodepresión (Chervenak, 1987).

En este trabajo se estandarizó el tiempo y el diámetro en que se cosechaba cada esferoide, de manera tal que el diámetro y la estructura interna de cada esferoide variara lo menos posible, y por lo tanto, la extracción de proteínas y los análisis de resistencia estuvieran realizados bajo las mismas condiciones. Cabe

señalar, que el cultivo de esferoides tumorales es un método relativamente largo (2 a 4 semanas) y, tal vez eso sea su principal desventaja.

Por otro lado, en los esferoides cultivados en este trabajo fue posible observar algunas de las capas internas y características propias del modelo descritas en la literatura y que, a su vez, se presentan en los microtumores sólidos *in vitro* (Figura 12). Así, la inmunohistoquímica para Ki67 permitió observar que sólo las células de las capas más externas del esferoide presentan un alto índice proliferativo en esferoides de tamaño intermedio. No existe mayor proliferación hacia el interior debido a que en esas regiones se localizan células quiescentes y necróticas. Asimismo, el marcaje de los esferoides con un anticuerpo anti-HIF-1 $\alpha$ , un factor de transcripción inducido por hipoxia, reveló que en los esferoides se presenta un gradiente de oxígeno, que disminuye hacia el interior y que favorece la traducción de esta proteína. Además, HIF-1 $\alpha$  esta prácticamente expresada en todo el esferoide y sólo las capas más externas, las que están en contacto con oxígeno, no lo han expresado. El factor de transcripción, a pesar de ser inducido en zonas internas del esferoide, puede estabilizarse hacia capas más externas, con mayores concentraciones de oxígeno, debido a que es un factor que se activa por muchas otras vías de señalización, que se encuentran activadas en tumores, como la de Ras o HER2/neu, inactivación de supresores de tumor como PTEN, p53, VHL, así como el lactato liberado de células tumorales glicolíticas (Lim, et al, 2004; Laughner, et al, 2001; Emerling, et al, 2008; Bárdos and Ashcroft, 2004; Marín-Hernández, et al, 2009).



Asimismo, la marcación del esferoide con TUNEL permitió dilucidar que las células apoptóticas se presentaron exclusivamente hacia el centro, mientras que la hematoxilina-eosina mostró que las células viables, las que tienen un suplemento aún óptimo de oxígeno y nutrientes, se presentan en las capas más externas; asimismo las células no viables, las que han comenzado a morir a causa del deficiente suplemento oxigénico y de nutrientes, se presentan hacia el centro y forman parte del material necrótico en disolución. La proteína XIAP se pudo visualizar en todo el esferoide por inmunohistoquímica, aunque principalmente se alcanza a apreciar un mayor contenido hacia las zonas periféricas (Figura 13), siendo estas zonas las más proliferativas y las más resistentes a fármacos quimioterapéuticos. Estos datos nos indican que nuestro modelo se comporta como mimetizador de condiciones cercanas a las fisiológicas, encontradas en verdaderos tumores sólidos, por lo que nos ayuda en el estudio de la resistencia multicelular adquirida.

### **Resistencia adquirida.**

Resulta de consideración analizar los efectos de algún fármaco o de algún blanco terapéutico, en un contexto tridimensional, no solo porque es una situación más parecida a lo que ocurre *in vivo*, sino porque algunos factores importantes en la resistencia o en el funcionamiento de las vías de señalización de supervivencia, se encuentran exacerbados dentro del tumor sólido hipóxico y, en ocasiones, se pierden o disminuyen en el cultivo en monocapa. Un ejemplo es la P-glicoproteína la cual presenta mayor actividad de desintoxicación en células cultivadas como esferoide tumoral, que en esas mismas células en cultivo en monocapa (Ponce de

Leon y Barrera-Rodriguez, 2005). En este contexto tridimensional es posible que las células vuelvan a sobreexpresar factores que les confieren resistencia debido a que ahora se encuentran en presiones selectivas hipoxicas, y cabe mencionar que la hipoxia, la cual no se presenta en el cultivo en monocapa, es un fuerte inductor, mediado por HIF, de genes como el de la P- glicoproteína (Wartenberg, et al, 2005).

La proteína inhibidora de la apoptosis, XIAP, mantiene este perfil de expresión, en donde en condiciones similares al tumor, en este caso células cultivadas como esferoides, es sobreexpresada y en cultivos en monocapa disminuye su expresión. Como se pudo observar en el western blot (Figura 14), XIAP se encuentra sobreexpresada en células cultivadas durante algunas semanas en esferoides tumorales con respecto a las células que sólo han sido cultivadas en monocapa, tanto para la línea celular T47-D como HEK 293. Este efecto podría deberse al mismo cambio en el patrón de expresión génica dictado desde un contexto tridimensional e hipoxico. Aunque no tan evidente, el mismo efecto pudo ser observado para otro miembro de la familia de las IAPs: c-IAP1. Cabe señalar la presencia de dos bandas en el western blot de XIAP: la banda de mayor peso molecular corresponde a XIAP fosforilada, se sabe que XIAP es un blanco de Akt, la cual la fosforila en residuos específicos y la protege contra su propia degradación (Dan, et al, 2004).

Datos no mostrados, indicaron que en esferoides del máximo tamaño obtenido (28 días para T47-D y 16 días para HEK 293) disminuye la expresión de XIAP y justo ocurre al momento en que las capas más externas dejan de proliferar y comienzan a desprenderse de la masa esferoidal. Hay que tener en cuenta que

XIAP no sólo es un potente inhibidor de caspasas (y de la apoptosis por lo tanto) sino que tiene otros roles en el favorecimiento de la sobrevivencia celular y, probablemente, en la transición epitelio-mesénquima, características que pueden observarse en las células de la periferia del esferoide en donde las células que comienzan a desprenderse dejan de expresar E-caderina y son capaces de invadir (Deckers, et al, 2006; Kawano, et al, 2001).

Para determinar el grado de resistencia que presentan las células tumorales seleccionadas se realizaron ensayos de viabilidad. El IC50 de cada fármaco empleado (taxol, cisplatino, tamoxifen y estauroporina) fue obtenido en células T47-D y HEK 293 cultivadas en monocapa (Figuras 15 y 16). Éste índice, que nos indica la concentración de cada fármaco necesaria para disminuir el 50% de la viabilidad celular, fue utilizado, precisamente, para comparar la resistencia entre células tumorales cultivadas siempre en monocapa y células tumorales cultivadas en un contexto tridimensional dentro de los esferoides tumorales multicelulares.

Los fármacos empleados fueron taxol (un inhibidor mitótico que causa muerte celular al romper la dinámica normal de los microtúbulos), cisplatino (un agente que se intercala en el DNA causando aductos e induciendo apoptosis), estaurosporina (un inhibidor de proteínas cinasas que afecta vías de sobrevivencia y causa apoptosis) y tamoxifen (un modulador del receptor de estrógenos que bloquea el ciclo celular (Gallardo Pérez, et al, 2009).

Para poder hacer una comparación de los efectos de los fármacos bajo los mismos criterios fue necesario disgregar, por acción enzimática, los esferoides tumorales y resembrar esas mismas células en monocapa. Con lo anterior se consigue que todas las células estén expuestas a las mismas concentraciones del

fármaco empleado, de modo tal que los efectos observados sean realmente a causa de la naturaleza intrínseca de las células cultivadas en esferoide y no el hecho de que el fármaco no pueda penetrar, rápida y eficientemente, a las capas más internas de la masa esferoidal compacta. De este modo, fue posible observar que las células que se encuentran en el esferoide adquieren una mayor resistencia en general a estos fármacos empleados (debido a que su viabilidad no disminuyó al 50% sino entre un 20 y 30% para el caso de T47-D y entre un 30 y 40% para el caso de HEK 293) con respecto a la misma línea celular cultivada en monocapa únicamente (Figura 17).

Ahora bien, los esferoides, al ser disgregados y resembrados en monocapa deben ser mantenidos algunos días en condiciones de observación estricta: primero, existen muchas células quiescentes que tardan en reactivar su ciclo celular; segundo, hay mucho material necrótico que debe ser eliminado mediante el cambio constante de medio DMEM. Por lo anterior, los experimentos de viabilidad deben ser realizados cuando se observe que las células comienzan a dividirse y alcancen un 50-70% de confluencia. Este lapso de tiempo comprende alrededor de 3-4 días, y aún así, se observa que las células mantienen algunas características del esferoide como es su mayor resistencia a fármacos antineoplásicos, particularmente se observa el caso de la resistencia a taxol para T47-D y de estaurosporina para HEK 293 (Figura 18). Para dilucidar cuántas generaciones se mantiene esta resistencia incrementada hacia estos fármacos en las células del esferoide resembradas en monocapa, se realizó un seguimiento en el que las células del esferoide fueron resembradas en monocapa hasta el cuarto "pase". En cada pase se midió el número de células iniciales y finales y se

determinó que cada pase involucra de 3 a 4 generaciones. Estas generaciones implican que las células provenientes del esferoide fueron resembradas en monocapa a baja confluencia y se permitió que alcanzaron el 80% de confluencia, en este momento fueron tripsinizadas y resembradas nuevamente en monocapa a baja subconfluencia, y así hasta el cuarto pase. La extracción de proteína en cada pase permitió observar que XIAP se mantiene en alto niveles con respecto a las células que solo han sido cultivadas en monocapa pero sólo hasta el cuarto pase (para ambas líneas celulares) cuando su expresión cae considerablemente casi a los niveles encontrados en monocapa. Esto indica que las células mantienen el posible cambio en el cassette de expresión génica sólo por algunas pocas generaciones, después de las cuales comienzan nuevamente a comportarse como las células cultivadas en monocapa. Este cambio de expresión génica puede deberse al hecho de que las células del esferoide resembradas en monocapa ya no están sometidas a presiones de depleción de nutrientes, estrés hipóxico, etc.

Además y de manera importante, se encontró en el análisis de la resistencia (medido con la disminución de la viabilidad con el IC50 de taxol y estauroporina obtenido anteriormente) que existe una cierta correlación entre la mayor o menor cantidad de XIAP con una mayor o menor resistencia a estos fármacos en células que forman esferoides y que luego son resembradas en condiciones de monocapa. Cuando XIAP disminuye en la última generación, disminuye también su resistencia, tal y como se encuentra en células en monocapa exclusiva (Figura 18). Estos resultados indican la posible participación de XIAP en la resistencia asociada al crecimiento tridimensional en el cultivo de esferoides tumorales multicelulares.

### **El knockdown de XIAP sensibiliza a fármacos antineoplásicos.**

Para determinar la participación de XIAP en la resistencia asociada con el crecimiento tridimensional se generó un RNA de interferencia para disminuir establemente la expresión de la proteína (knockdown).

La selección de la mejor secuencia para inhibir un gen de interés permanece siendo un proceso aleatorio. En este trabajo se intentó generar una secuencia original, un siRNA de 21 nucleótidos de XIAP, sin embargo, este no fue específico y existieron demasiados problemas en la clonación. Además, en la actualidad la única forma de validar un siRNA es mediante un análisis *in silico* en el cual, la secuencia es evaluada en las bases de datos del GeneBank y se observa que no sean específicos a otros genes que no estén bajo estudio. El siRNA inicialmente generado también bloqueó otras proteínas que no estaban sujetas a este estudio.

Por esa razón se decidió emplear una secuencia previamente publicada (Lima, et al, 2004). Con este siRNA se generaron partículas virales capaces de infectar células blanco, con lo que se generaron líneas celulares estables para el siRNA de XIAP (Figuras 19, 20 y Tabla 1). La inhibición de esta proteína empleando el siRNA fue de aproximadamente más del 80% (Figura 21).

El primer paso fue generar esferoides con estas líneas estables. La primer observación fue que las células estables para el siRNA de XIAP pierden su capacidad para generar esferoides grandes, del mismo tamaño y al mismo tiempo que los esferoides control (Figura 22). Esto puede deberse a dos factores principales: uno de ellos implica el hecho de que la proteína XIAP tiene un rol importante en la transducción de señales de sobrevivencia. De hecho Colin

Duckett, el biólogo molecular que clonó XIAP en 1995 ha establecido que XIAP promueve el cáncer como una molécula de señalización, más que por inhibir caspasas (Garber, 2005). La forma en que XIAP participa en vías de señalización es mediante la interacción con el receptor de BMP (proteína morfogenética ósea) tipo I y con su molécula de señalización TAB (Miller, 1999). Interactúa con BMP tipo I a través de su dominio RING y con TAB1 a través del BIR2. Lo anterior presumiblemente le permitiría a XIAP localizar a la membrana plasmática, lo que le permitiría reclutar y activar factores que favorecen la sobrevivencia celular.

Ratones knockout para XIAP son viables y no muestran defectos obvios en la apoptosis (Revisado en Schimmer y Dalili, 2005) lo que precisamente demuestra que las células normales no dependen tanto de XIAP como si lo hacen las células cancerosas. En este sentido, se ha observado una amplia distribución de la expresión de la proteína XIAP en diversos tejidos humanos normales, además de que su distribución subcelular (nuclear) puede contribuir a regular su función (Vischioni, et al, 2006) ya que proteínas como XAF-1 (factor asociado a XIAP) lo secuestran en el núcleo celular.

Se ha investigado el efecto de la inhibición o eliminación de XIAP en células normales humanas y se ha observado que participa en la homeostasis del cobre en ratones (Burstein, et al, 2004) y en la homeostasis de la respuesta inmune, en donde su expresión, de forma defectuosa en pacientes, origina un síndrome linfoproliferativo asociado al cromosoma X (Rigaud, et al, 2006).

De allí que los posibles tratamientos anticancerosos con inhibidores de XIAP puedan tener un éxito relativo ya que sus efectos podrían ser o no tan específicos y sensibilizar, a las células tumorales a la muerte inducida por diversos fármacos.

Por lo que estrategias terapéuticas empleando oligonucleótidos antisentido de segunda generación contra XIAP, deberán analizarse en un marco preclínico más amplio (LaCasse, et al, 2006).

El otro factor por el que la disminución de XIAP ocasiona un menor tamaño de los esferoides implica el hecho de que al no existir XIAP, o disminuir sus cantidades, las caspasas, activadas de forma constante en células de cáncer, actúen libremente cortando sustratos y haciéndolas más susceptibles a la muerte celular por apoptosis.

Para determinar si la disminución de la expresión de XIAP, además de disminuir el índice proliferativo en las células del esferoide, las sensibiliza a la acción de los fármacos empleados, esferoides estables para el siRNA de XIAP fueron disgregados y sembrados en monocapa a baja confluencia, hasta que se recuperaran de la tripsinización y alcanzaran el 60 – 70 % de confluencia. En este momento se les aplicó el IC50 de taxol (T47-D) o estaurosporina (HEK 293) y se midió la viabilidad con cristal violeta. Con lo anterior, fue posible observar que las células del esferoide, con el siRNA de XIAP revierten su resistencia (casi al nivel de las células cultivadas exclusivamente en monocapa) a la muerte inducida por los fármacos evaluados (Figura 23). Debido a que un vector control (siRNA Luc) no tuvo efecto sobre la viabilidad de las células cultivadas en esferoide, se deduce que XIAP es uno de los responsable por el que las células cancerosas, cultivadas en un contexto tridimensional dentro de los esferoides tumorales multicelulares, incrementan su resistencia a la muerte inducida por taxol para el caso de T47-D y estaurosporina, para el caso de HEK 293.



Resultados adicionales obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que NF kappaB, el factor de transcripción responsable de la expresión de XIAP, también incrementa su actividad en un contexto tridimensional (dentro del crecimiento esferoidal) y su inhibición mediante el empleo de un mutante negativo impide la formación del esferoide. Por lo tanto, XIAP y NF kappaB son esenciales para la formación y resistencia a fármacos antineoplásicos observada en los esferoides tumorales multicelulares (Gallardo-Pérez, et al, 2009).

Finalmente, estos resultados indican que XIAP es un factor importante en la resistencia a drogas durante el crecimiento tridimensional, y por lo tanto un blanco terapéutico en las primeras etapas de formación de tumores sólidos *in vivo*, pero además, abren el paso para dilucidar otros factores que también contribuyen a la resistencia tumoral y que se hacen evidentes en un contexto tridimensional, la cual, permanece siendo uno de los problemas clínicos importantes en el tratamiento del cáncer.

**Conclusiones finales.**

- Las células T47-D y HEK 293 que han estado cultivadas en un contexto tridimensional dentro del esferoide tumoral expresan mayor cantidad de XIAP (y c-IAP1) con respecto a las células cultivadas exclusivamente en monocapa.
- Las células T47-D y HEK 293 que han estado en un contexto tridimensional dentro del esferoide tumoral incrementan su resistencia a la muerte celular inducida por taxol y estauroporina respectivamente, con respecto las células cultivadas exclusivamente en monocapa. Adicionalmente, esa resistencia correlaciona con el nivel de expresión de XIAP.
- La inhibición de XIAP en células T47-D y HEK 293 cultivadas como esferoides tumorales multicelulares, mediante RNAi, revierte su resistencia a la presencia de taxol y estauroporina respectivamente e impide el crecimiento tumoral.

**VIII. REFERENCIAS.**

Bárdos JL, Ashcroft M. 2004. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*. **26**, 262-9.

Berro R, de la Fuente C, Klase Z, Kehn K, Parvin L, Pumfery A, Agbottah E, Vertes A, Nekhai S, Kashanchi F. 2007. Identifying the membrane proteome of HIV-1 latently infected cells. *J Biol Chem*. **282**, 8207-18.

Bindra RS, Crosby ME, Glazer PM. 2007. Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev*. **26**, 249-60.

Bosher JM, Labouesse M. 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nature Cell Biol*. **2**, E31-E36.

Burstein E, Ganesh L, Dick RD, van de Sluis B, Wikinson JC, et al. 2004. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J*. **23**, 244-254.

Carmell MA & Hannon GJ. 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Struct Mol Biol*. **3**, 214-218.

Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Meléndez Zajgla J. 2007. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*. **26**, 7569-75

Check E. 2004. Hopes rise for RNA therapy as mouse study hits target. *Nature*. **432**, 136.

Chervenak R. 1987. Prevention of growth of metastases in rat liver by perioperative immunoactivation. *Cancer Res*. **47**, 2748.

Clem RJ, Duckett CS. 1997. The *iap* genes: unique arbitrators of cell death. *Trends Cell Biol*. **7**, 337-339.

Dan, H.C., M. Sun, S. Kaneko, R.L. Feldman, S.V. Nicosia, H. Wang, B.K. Tsang, y J. Q. Cheng. 2004. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem*. **279**, 5405-5412.

Dean EJ, Ranson M, Blackhall F, Dive C. 2007. X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. **11**, 1459-71.

Deckers M, Dinther M, Buijss J, et al. 2006. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 2202-2209.

Déctor MA, Arias CF. 2004. Interferencia por ARN: un sistema de defensa primitivo. *Ciencia.* **55**, 25-36.

Desoize B, Jardillier JC. 2000. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol.* **36**, 193-207.

Deveraux QL, Reed JC. 1999. Iap's family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.

Devroe E, Silver PA. 2004. Therapeutic potencial of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin Biol Ther.* **4**, 319-327.

Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. 2008. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle.* **7**, 1036-46.

Eckelman BP, Salvesen GS. 2005. The human antiapoptotic proteins, cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem.* **281**, 3254-60

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* **7**, 988-994.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **411**, 494-498.

Emerling BM, Weinberg F, Liu JL, Mak TW, Chandel NS. 2008. PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a). *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**, 2622-7.

European Public Health Information System, 2009.

[http://www.euphix.org/object\\_document/o5610n27171.html](http://www.euphix.org/object_document/o5610n27171.html)

Evan GI, Vousden KH. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* **411**, 342-348.

Folkman J, Moscona A. 1978. Role of cell shape in growth control. *Nature.* **273**, 345-349.

Fire A, S. Xu M, Montgomery S, Kostas S, Driver & Mello C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.

*Nature*. **391**, 806-810.

Fulda S. 2009. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*. **124**, 511-5.

Fulda S. 2009a. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia*. **23**:467-76.

Gallardo-Pérez JC, Espinosa M, Meléndez J, Maldonado V. 2006. Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *Rev Educ Bioquímica*. **25**, 101-107.

Gallardo-Pérez JC, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Daniel A, Rodríguez-Enríquez S, Avilés A, Moreno-Sánchez R, Meléndez-Zajgla J, Maldonado V. 2009. NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids. *J Cell Biochem*. **108**, 169-180.

Garber K, 2005. New apoptosis drugs face critical test. *Nature Biotech*. **23**, 409-411.

Golstein P. 1997. Controlling cell death. *Science*. **275**, 1081-1082.

Hammond SM. 2005. Dicing and slicing. The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*. **579**, 5822-5829.

Hannon GH. 2002. RNA interference. *Nature*. **418**, 244-251.

Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. 2004. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* **22**, 1579-1582.

Helmlinger G, Yuang F, Dellian M, Jain RK. 1997. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*. **3**, 177-182

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. **407**, 770-776.

Holcik M, Korneluk RG. 2001. XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**, 550-6.

Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. 2001. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*. **6**, 253-261.

Holcik M, Yeh C, Korneluk RG, Chow T. 2000. Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*. **19**, 4174-4177.

Holcik M, Lefebvre C, Yeh C, Chow T, Korneluk RG. 1999. A new internal ribosome entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nature Cell Biol.* **1**, 190-192.

Huang QH, Deveraux QL, Maeda S, et al. 2000. Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1427-1432.

Hunter KM, Kottachchi D, Levis J, Duckett CS, Korneluk RG, Liston P. 2003. A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO. *J Biol Chem.* **278**, 7494-7499.

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis.* **12**, 1543-1568.

Joazeiro CA, Weissman AM. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell.* **102**, 549-552.

Juliano RL, Dixit VR, Kang H, Kim TY, Miyamoto Y, & Xu D. 2005. Epigenetic manipulation of gene expression: a toolkit for cell biologist. *J Cell Biol.* **6**, 847-857.

Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH. 2001. Integrin  $\alpha3\beta1$  engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res.* **262**, 180-196.

Kerbel RS, Kobayashi H, Graham CH. 1994. Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? *J Cell Biochem.* **56**, 37-47.

Kim K, Wilson SM, Abayasiriwardana, et al. 2005. A novel in vitro model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Resp Cell Mol Biol.* **33**, 541-548.

Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. 2004. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* **9**, 273-85.

Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. 1998. Multicellular tumour spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology. *Int J Exp Path.* **79**, 1-23.

LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene.* **17**, 3247-3259.

LaCasse EC, Cherton Horvac GG, Hewitt KE, Jerome LJ, Morris SJ, Kandimalla ER, et al. 2006. Preclinical characterization of AEG35156/GEM 640, a second generation antisense oligonucleotide targeting X-linked inhibitor of

apoptosis. *Clin Cancer Res.* **12**, 5231-41.

Landowski TH, Gleason-Guzman MC, Dalton WS. 1997. Selection for drug resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis. *Blood.* **89**, 1854-61.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol.* **21**, 3995-4004.

LeBlanc AC. 2003. Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neur Psychopharm Biol Psych.* **27**, 215-299.

Lim JH, Lee ES, You HJ, Lee JW, Park JW, Chun YS. 2004. Ras-dependent induction of HIF-1alpha785 via the Raf/MEK/ERK pathway: a novel mechanism of Ras-mediated tumor promotion. *Oncogene.* **23**, 9427-31.

Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH. 2004. Specific downregulation of bcl-2 and XIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* **11**, 309-316.

Lin SC, Huang Y, Lo YC, Lu M, Wu h. 2007. Crystal structure of the BIR1 domain of XIAP in two crystal forms. *J Mol Biol.* **372**, 847-54

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. 2003. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than bcl-2. *Oncogene.* **22**, 8568-8580.

Luo C, MacPhail SH, Dougherty GJ, Naus CC, Olive PL. 1997. Radiation response to connexin43-transfected cells in relation to the "contact effect". *Exp Cell Res.* **234**, 225-232.

Luque LE, Grape KP, Junker M. 2002. A highly conserved arginine is critical for the functional folding of inhibitor of apoptosis (IAP) BIR domain. *Biochem.* **41**, 13663-13671.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. 2009. HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini-Reviews Med Chem.* **9**, 1084-1101.

Martin SJ, Green D. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* **82**, 349-352.

MacFarlane M. 2009. Cell death pathways-potential therapeutic targets.

*Xenobiotica*. **39**, 616-624.

Mendoza J, Zamora R, Gallardo JC, Ceballos G, Aldana A, Espinosa M, Maldonado V Meléndez J. 2006. NFκB does not influence the induction of apoptosis by ukrain. *Cancer Biol Ther*. **5**, 788-793.

Miller LK. 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Cell Biol*. **9**, 323-328.

Minchinton AI, Tannock IF. 2006. Drug penetration in solid tumors. *Nature Rev Cancer*. **6**, 583-592.

Moss EG. 2001. RNA interference: it's a small RNA world. *Curr Biol*. **11**, R772-R775.

Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*. **273**, C1109-C1123.

Nakamura-López Y, Esparza-Aguilar ML, Garrido-Olvera L, Palomar-Olguin VM, Gallardo-Pérez JC. 2009. Aplicaciones terapéuticas del RNA de interferencia. *Bioquímica*. **34**, 26-36.

Nicolovska-Coleska Z, Xu L, Hu Z, Tomita Y, Li P, Soller P, et al. 2004. *J Med Chem*. **47**, 2430-2440.

Notarbartolo M, Cervello M, Poma P, Dusonchet L, Meli M, D'Alessandro N. 2004. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncol Rep*. **11**, 133-136.

Novak JF, Tronka F. 2005. Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res*. **25**, 1157-77.

Olayioye MA, Kaufmann H, Pakusch M, Vaux DL, Lindeman GJ, Visvader JE. 2005. XIAP-deficiency leads to delayed lobuloalveolar development in the mammary gland. *Cell Death Differ*. **12**, 87-90.

Ponce de León V, Barrera-Rodríguez R. 2005. Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids. *Cancer Cell Int*. **5**, 20.

Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P. 2006. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*. **444**, 110-114.

Salvensen GS, Duckett CS. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's



door. *Mol Cell Biol.* **3**, 401-410.

Schimmer AD, Dalili S. 2005. Targeting the IAP Family of Caspase Inhibitors as an Emerging Therapeutic Strategy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* **2005**, 215-9.

Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, et al. 2004. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell.* **5**, 25-35.

Shi Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* **9**, 459-470.

Srinivasula SM, Ashwell JD. 2008. IAPs: what's in a name? *Mol Cell.* **30**, 123-35.

Siemann DW, Sutherland RM. 1992. Potentiation of alkylating chemotherapy by dual function nitrofurans in multi-cell spheroids and solid tumors. *Radiother Oncol.* **24**, 239-245.

Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, y R. Takahashi. 2001. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 8662-8667.

Tamm I, Kornblau SM, Segall H, et al. 2000. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1796-1803.

Tanaka T, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. 2000. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* **6**, 127-134.

Tong AW, Zhang YA, Nemunaitis J. 2005. Small interfering RNA for experimental cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther.* **7**, 114-124.

Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. 2003. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* **94**, 15-21.

Ui-Tei K, Naito Y, Saigo K. 2006. Essential notes regarding the design of functional siRNAs for efficient mammalian RNAi. *J Biomed Biotech.* **2006**, 1-8

Vaupel P. 2008. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist.* **13**, 21-6.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff, P. 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* **49**, 6449–6465.

Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. 2001. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* **7**, 1-10.

Vischioni B, van der Valk P, Span SW, Kruyt FAE, Rodríguez JA, Giaccone G. 2006. Expression and localization of inhibitor of apoptosis proteins in normal human tissues. *Human Pathol.* **37**, 78-86.

Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W. 2002. Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Engineering.* **18**, 149-262.

Wang Y, Suominen JS, Parvinen M, Rivero-Muller A, Kiiveri S, Heikinheimo M, Robbins I, Toppari J. 2005. The regulated expression of c-IAP1 and c-IAP2 during the rat seminiferous epithelial cycle plays a role in the protection of germ cells from Fas-mediated apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* **245**, 111-20.

Wartenberg M, Ling FC, Müschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Pütz V, Hescheler J, Sauer H. 2003. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. *FASEB J.* **17**, 503-5

Wartenberg M, Hoffmann E, Schwindt H, Grünheck F, Petros J, Arnold JR, Hescheler J, Sauer H. 2005. Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Lett.* **579**, 4541-4549.

World Health Organization, 2009.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>

Yuhás JM, Li AP, Martínez AO, Ladman AJ. 1977. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **37**, 3639-3643.

Zamore PD. 2001. RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Struct Biol.* **8**, 746-750.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* **101**, 25–33.

**IX. ANEXO I.**

Artículo internacional publicado como resultado  
de este trabajo de Tesis.

**X. ANEXO II.**

Artículos publicados en los que participé  
durante mi trabajo de Tesis.

## NF-kappa B Is Required for the Development of Tumor Spheroids

J.C. Gallardo-Pérez,<sup>1</sup> M. Espinosa,<sup>2</sup> G. Ceballos-Cancino,<sup>2</sup> A. Daniel,<sup>1</sup>  
S. Rodríguez-Enríquez,<sup>3</sup> A. Aviles,<sup>1</sup> R. Moreno-Sánchez,<sup>3</sup>  
J. Melendez-Zajgla,<sup>2\*\*</sup> and V. Maldonado<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Biology Laboratory, Sub-Direction of Basic Research, National Institute of Cancerology, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Functional Genomics Laboratory, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez," Mexico City, Mexico

### ABSTRACT

Tumor cells cultured in three-dimensional models provide a more realistic and biologically meaningful analysis of the initial phases of cancer development and drug resistance. Several studies have demonstrated that culture of cancer cells in three dimensions induces cellular resistance to a variety of anti-neoplastic drugs by poorly understood mechanisms. The role of the transcription factor NF-κB and inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) in the onset and development of drug resistance during tumor spheroid growth has not been established. In this work, we found a significant increase in the activity and expression of NF-κB and its downstream target XIAP (X-linked IAP) in cancer cells grown as multi-cellular tumor spheroids. Blocking XIAP expression with RNA interference markedly increased the sensitivity of cancer tumor spheroid cells toward anti-neoplastic drugs, indicating a role for IAPs in establishing drug resistance. In turn, inhibition of NF-κB by negative dominants suppressed spheroid formation, whereas overexpression of the upstream kinase IκBκβ increased their growth and resistance. The present data suggested that NF-κB and its downstream target XIAP were essential for the growth and drug resistance of small avascular tumor. *J. Cell. Biochem.* 108: 169–180, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** CANCER; TRANSDUCTION PATHWAYS; DRUG RESISTANCE; NF-KAPPA B; THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE; X-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEINS

Tumor cells may aggregate and interact in three dimensions to form multi-cellular tumor spheroids (MTS). This cellular array causes oxygen and nutrient gradients to develop between the inner and external layers, thus generating hypoxic and nutrient-deficient microenvironments [Sutherland, 1988]. Differences in gene expression among the spheroid cell layers [Shweiki et al., 1995] promote biochemical and physiological changes [Rodríguez-Enríquez et al., 2008], and behavior modifications of small avascular tumors in vivo [Kunz-Schughart, 1999]. Therefore, MTS constitute an excellent in

vitro experimental model that mimics the complexity of a solid tumor [Mueller-Klieser, 1987]. Since the cells in the external layers of an MTS are in contact with high concentrations of oxygen, nutrients, and growth factors, they are able to maintain a high proliferation index [Burkowski, 1977]. In contrast, cells in the central area are poorly provided with oxygen, nutrients, and growth factors, which induces the overexpression of pro-apoptotic proteins such as Bax, and hence apoptosis and necrosis [Khaitan et al., 2006]. Cells in the intermediate layers of the MTS are in a quiescent state regarding

Abbreviations used: MTS, multi-cellular tumor spheroid; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein; cIAP-1, cellular inhibitor of apoptosis-1; NF-κB, nuclear factor kappa B; IκBκβ, inhibitor of kappa B kinase beta; Bcl-3, B-cell lymphoma-3; HIF-1α, hypoxia-inducible factor-1α.

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Grant number: C01 42309.

\*Correspondence to: V. Maldonado, Molecular Biology Laboratory, Sub-Direction of Basic Research, National Institute of Cancerology, Av. San Fernando 22, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico. E-mail: vilmaml@gmail.com

\*\*Correspondence to: Dr. J. Melendez-Zajgla, Functional Genomics Laboratory, Research Direction, National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur No. 4124, Torre Zafiro II, Piso 6 Col. Ex Rancho de Anzaldo, Álvaro Obregón 01900, Mexico City, Mexico. E-mail: jmelendez@inmegen.gob.mx

Received 15 January 2009; Accepted 8 May 2009 • DOI 10.1002/jcb.22237 • © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Published online 26 June 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

proliferation and intermediary metabolism [Freyer, 1998]; they also show a high tendency to differentiate [Kunz-Schughart, 1999].

Tumor spheroids from several sources show resistance to radiation [Dertinger and Hulser, 1981] and to high concentrations of several anti-neoplastic drugs [Olive and Durand, 1994]. It is well documented that in MTS, in contrast to monolayer models, several changes occur in the expression and sub-cellular distribution of proteins involved in tumor drug resistance such as P-glycoprotein [Xing et al., 2007], topoisomerase II $\alpha$  [Oloumi et al., 2000], p21 [St Croix et al., 1996], MDR1 [Kolchinsky and Roninson, 1997], E-cadherins, and AKT pathway components [Kang et al., 2007]. However, the mechanisms involved in the acquisition of drug resistance have not been completely elucidated.

Most chemotherapeutic treatments induce cell death by releasing mitochondrial proteins to the cytosol, where they activate caspases that degrade key substrates, leading to apoptosis. Usually, cancer cells overexpress caspases 3, 7 or 9; in some cases, these proteins are also constitutively activated [Philchenkov, 2004]. Cancer cells survive caspase action by overexpressing inhibitory proteins such as X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), the most abundant member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family [Nachmias et al., 2004]. An imbalance in the survival versus death pathways can favor cellular resistance to diverse hostile microenvironments and apoptotic stimuli, including anti-neoplastic drugs.

Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) is the key member of the survival transduction pathway, and is commonly overexpressed or constitutively active in cancer cells such as human leukemia and colorectal and prostate cancers [Cilloni et al., 2006]. In unstimulated cells, NF- $\kappa$ B is located in the cytosol constitutively bound to inhibitory proteins of the I $\kappa$ B family, so that this factor is maintained in inactive dimeric complexes. After a stimulus, I $\kappa$ B is phosphorylated and degraded by the proteasome pathway. Proteasome degradation of I $\kappa$ B releases monomeric NF- $\kappa$ B and promotes its internalization by the nucleus, inducing the transcriptional transactivation of specific genes [Zhivotovsky and Orrenius, 2006]. NF- $\kappa$ B mediates the transcription of genes involved in the inflammatory and immune responses, the induction of cancer and the regulation of apoptosis [Okamoto et al., 2007]. It has also been implicated in carcinogenesis and in cellular resistance to chemotherapy [Piva et al., 2006]. Interestingly, NF- $\kappa$ B is activated by hypoxia, acidic pH, and nutrient deficiency, conditions usually found in the tumor microenvironment [Bonello et al., 2007].

Chemo-resistance of solid tumors has been found in response to drugs such as taxol (a mitotic inhibitor that causes cell death by disrupting the normal microtubule dynamics), cisplatin (a DNA damaging agent that induces apoptosis), staurosporine (a protein kinase inhibitor that affects survival pathways), and tamoxifen (an estrogen receptor modulator that blocks cell cycle). Furthermore, these drugs are commonly used in cancer treatment including cervical, breast, and head and neck carcinomas and chemo-resistance is observed in all cases [Mekhail and Markman, 2002]. In the present work, the mechanisms by which MTS acquire resistance toward cisplatin, taxol, tamoxifen, and staurosporine were analyzed. The four anti-neoplastic drugs were applied to MTS at doses similar to those used in the clinical practice. As these anti-neoplastic drugs have different targets, it was evaluated whether the resistance mechanisms were

shared among them. It was found that MTS resistance to the four anti-neoplastic drugs was associated with increased XIAP levels, which in turn were connected to the activation of the NF- $\kappa$ B pathway and to the hypoxia generated in the inner and intermediate layers of the MTS.

## MATERIALS AND METHODS

### MTS CULTURE

Cancer cell lines 293 (a human transformed embryonic kidney cell line), T-47D (human breast cancer), HeLa (human cervical cancer), and KB (human head and neck cancer) were obtained from the ATCC and grown to sub-confluence as monolayers in DMEM (Gibco BRL, NY) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% (v/v) CO<sub>2</sub> in air. Spheroids were cultured by the liquid overlay technique as previously described [Yuhás et al., 1977]. Aliquots of 50,000 cells were cultured in 2% agarose on Petri dishes for 1 week and then placed in a rotary incubator at 37°C with Leibovitz L-15 medium (Invitrogen, CA) supplemented with FBS. The medium was changed every 2 days to avoid cytotoxicity. Spheroid diameters were measured at times indicated for each cell line using an eyepiece reticule (Zeiss, Germany). The volumes of at least 10 spheroids were calculated using the formula  $V = 4/3\pi r^3$ .

### CELL VIABILITY ASSAYS

Cells grown as monolayers were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates and exposed for 24 or 48 h to staurosporine, taxol, or cisplatin (all at 0.1–400  $\mu$ M), or tamoxifen (12.5–75  $\mu$ M), to determine IC<sub>50</sub> values (see Table I). After drug exposure, cell viability was determined by the crystal violet method [Baker et al., 1986]. Briefly, the cells were fixed in 70% ethanol for 10 min at –20°C, and then stained with 1% vital colorant in 70% ethanol for 20 min, washed several times and dissolved in 33% (v/v) acetic acid. Viability was determined from the absorbance changes at 570 nm. Means were calculated from at least three independent experiments performed in triplicate.

### CELLULAR PASSAGE

From the four cell lines employed to generating spheroids, two were selected for “cellular passage experiments.” Thus, to compare mechanisms of drug resistance, a human transformed (293) cell line that produce large spheroids in a few days and a human cancer cell line

TABLE I. IC<sub>50</sub> Values Obtained in Monolayer Cells in the Presence of Anti-Neoplastic Drugs

	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	T-47D	293
Taxol	0.3 $\pm$ 0.01	205 $\pm$ 0.05
Cisplatin	333 $\pm$ 0.6	198 $\pm$ 0.13
Staurosporine	ND	0.3 $\pm$ 0.02
Tamoxifen	50 $\pm$ 0.03	ND

T47-D and 293 cells were cultured in Petri dishes in the presence of different anti-neoplastic drugs: cisplatin (100–400  $\mu$ M), staurosporine (0.1–400  $\mu$ M), tamoxifen (12.5–75  $\mu$ M), or taxol (0.1–0.4  $\mu$ M). IC<sub>50</sub> value was determined after 24 h in 293 monolayer cultures, except for taxol (48 h); and after 48 h in T-47D monolayer cultures, except for tamoxifen (24 h). Values represent mean  $\pm$  SD of five different preparations.

(T-47D) that produce spheroids in almost 1 month were selected. T-47D spheroids of 21 days ( $1.2 \pm 0.05 \text{ mm}^3$ ) and 293 spheroids of 8 days ( $1.4 \pm 0.05 \text{ mm}^3$ ) (both named mature spheroids) were dispersed using a PBS-EDTA-trypsin mix. The cells were re-seeded in monolayer at 25% confluence on 24-well plates until sub-confluence was reached (it was named "first passage" or S1); one sample was exposed to drug treatment for 24 h and subjected to protein extraction, while a parallel sample was trypsinized and re-seeded in monolayer again for cellular growth for 2 or 3 days until sub-confluence ("second passage" or S2) was reached. Afterwards, the cells were trypsinized and cultured for three more passages (named S3-S5).

### PROTEIN EXTRACTION

Briefly, cells isolated from MTS were incubated in RIPA lysis buffer (RadioImmuno Precipitation Assay Buffer: 1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 mM PMSF). To avoid protein degradation a protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Germany) was added. The samples were then mechanically disrupted using an insulin syringe and centrifuged at  $10,000g$  for 30 min. The cellular supernatants were kept at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

### WESTERN BLOTTING

Cellular protein (40  $\mu\text{g}$ ) was electrophoresed on 12% SDS-PAGE and electroblotted on to PVDF membranes. The blots were incubated in TBS-Tween-20 (0.1%) with 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. Afterwards, each blot was incubated in fresh blocking solution in the presence of the specific primary antibody overnight at  $4^\circ\text{C}$ . After 12 h, the blots were washed four times with TBS-T for 15 min and incubated with 1:3,000 (v/v) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Finally, they were washed with TBS-T four times for 30 min and subjected to a chemiluminescence reaction. Chemiluminescence was detected using ECL plus Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, UK). hILP/XIAP, B-cell lymphoma-3 (Bcl-3),  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ , p65, p50, p52, tubulin, cellular inhibitor of apoptosis-1 (cIAP-1), and XIAP antibodies (dilutions from 1:200 to 1:1,000) were obtained from BD Biosciences (NJ); anti-mouse IgG (H + L) HRP-conjugate, and anti-rabbit IgG (H + L) HRP-conjugate were from Promega (WI). Actin was a generous gift by Dr. R. Herrera (Instituto Politécnico Nacional, Mexico).

### IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Spheroids were fixed in 4% formalin for 20 min and washed with PBS, carefully sectioned in 4–8  $\mu\text{m}$  slices and placed on paraffin. The samples were then deparaffinated and rehydrated in graded ethanol and finally incubated in sodium citrate buffer according to Arellano-Llamas et al. [2006]. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 5 min, and non-specific conjugation was inhibited with 5% BSA. Each sample was incubated at room temperature with the primary antibody (Ki67, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), or Bcl-3, each diluted 1:100) for 30 min, then rinsed with fresh PBS and re-incubated with a secondary antibody (Rabbit Polydetector Bio SB, Santa Barbara, CA) for 30 min. The peroxidase substrate was diaminobenzidine (Dako, Denmark). The slides were finally counterstained with Gill's hematoxylin for 8 min.

### TUNEL

Paraffin-spheroid layers of 4–8  $\mu\text{m}$  were examined by a terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) assay to identify apoptotic cells. Apoptosis was identified by detecting cleaved DNA using the in situ ApoTag Kit (Chemicon International, Temecula, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, slides were treated with proteinase K (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 15 min, then incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase buffer for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , and washed. Incorporated fluorescein-labeled nucleotide was visualized with an Olympus epifluorescence microscope.

### NF- $\kappa\text{B}$ MODULATION

To manipulate NF- $\kappa\text{B}$  activity, plasmids that induce overexpression of inhibitor of kappa B kinase beta ( $\text{I}\kappa\text{B}\kappa\text{B}$ ) and  $\text{I}\kappa\text{B}\text{S}32/\text{S}36$  were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), selected for 2 weeks with 450  $\mu\text{g}$  G418/ml, cloned, and expanded before spheroid formation. The  $\text{I}\kappa\text{B}\kappa\text{B}$  plasmid was created by sub-cloning the  $\text{I}\kappa\text{B}\kappa\text{B}$  open-reading frame, amplified by PCR, in a pCDNA 3.1 plasmid (Invitrogen). Expression was verified by Western blotting and the plasmid was sequenced to verify identity and absence of mutations. The plasmid with the dominant negative version of  $\text{I}\kappa\text{B}$  (mutated at serine-32 and -36) was a kind gift by Dr. P. Bauerle (University of Munich). At least three independent experiments were performed, each in triplicate.

### siRNA CONSTRUCTION AND TRANSFECTION

siRNA for XIAP was generated by sub-cloning specific or transversed sequences of 21 bp (AGGAGATACCGTGC GTGCTT) and for Bcl-3 (CAACCTACGGCAGACACCG) into the pSIREN vector (Clontech, CA). All clones were sequenced to verify identity. The siRNAs specificity was verified by RT-PCR and Western blotting. T-47D or 293 cells were transfected with 1  $\mu\text{g}$  of the siRNA construct using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 6 h in serum-free DMEM and further 12–36 h incubation in DMEM with serum. Then, the cells were selected for 2 weeks with 450  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of G418, cloned, and expanded.

### GENE REPORTER ASSAYS

HeLa cells were stably transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with pHTS-Neo-NF- $\kappa\text{B}$  vector (Biomyx, CA), which contains five NF- $\kappa\text{B}$  enhancer elements upstream of a luciferase open-reading frame. The cells were then grown as MTS for 2 days and lysed with  $1 \times$  passive lysis buffer (Promega). Parallel MTS were disaggregated and seeded as monolayers for 12 h and lysed with the same buffer. Transfected cells grown as monolayers without previous culture as MTS were used as control. Protein concentration was determined with a DC Protein Assay kit (BioRad, CA). Luciferase activity in equal amounts of protein was measured with a Dual Luciferase Assay Kit (Promega, Madison) according to the manufacturer's instructions, using a Multimode Detector DTX880 (Beckman Coulter, CA). Experiments were performed three times.

### STATISTICAL ANALYSES

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the indicated number of separate experiments. The experimental and control groups were compared statistically using an unpaired two-tailed Student's *t*-test;



*P*-values less than 0.05 were considered significant. For other statistical analyses, ANOVA was used.

## RESULTS

### CHARACTERIZATION OF TUMOR SPHEROIDS FROM SEVERAL CANCER CELL LINES

All tumor cell lines used in the present study were able to generate spheroids and hence the experiments were carried out with MTS

from each cell line. However, for conciseness, only selected results were shown in figures, although similar data were attained with the other tumor cell lines.

MTS of HeLa, 293, T-47D, and KB cells showed different proliferation patterns (Fig. 1A). Although all growth curves showed behavior fitting the Gompertz law, each revealed distinctive characteristics [Deakin, 1975; Mueller-Klieser, 1987]. HeLa ( $63 \pm 6 \text{ mm}^3$ ), KB ( $96 \pm 4 \text{ mm}^3$ ), and 293 ( $80 \pm 13 \text{ mm}^3$ ) MTS reached their maximal sizes after 20, 28, and 16 days,

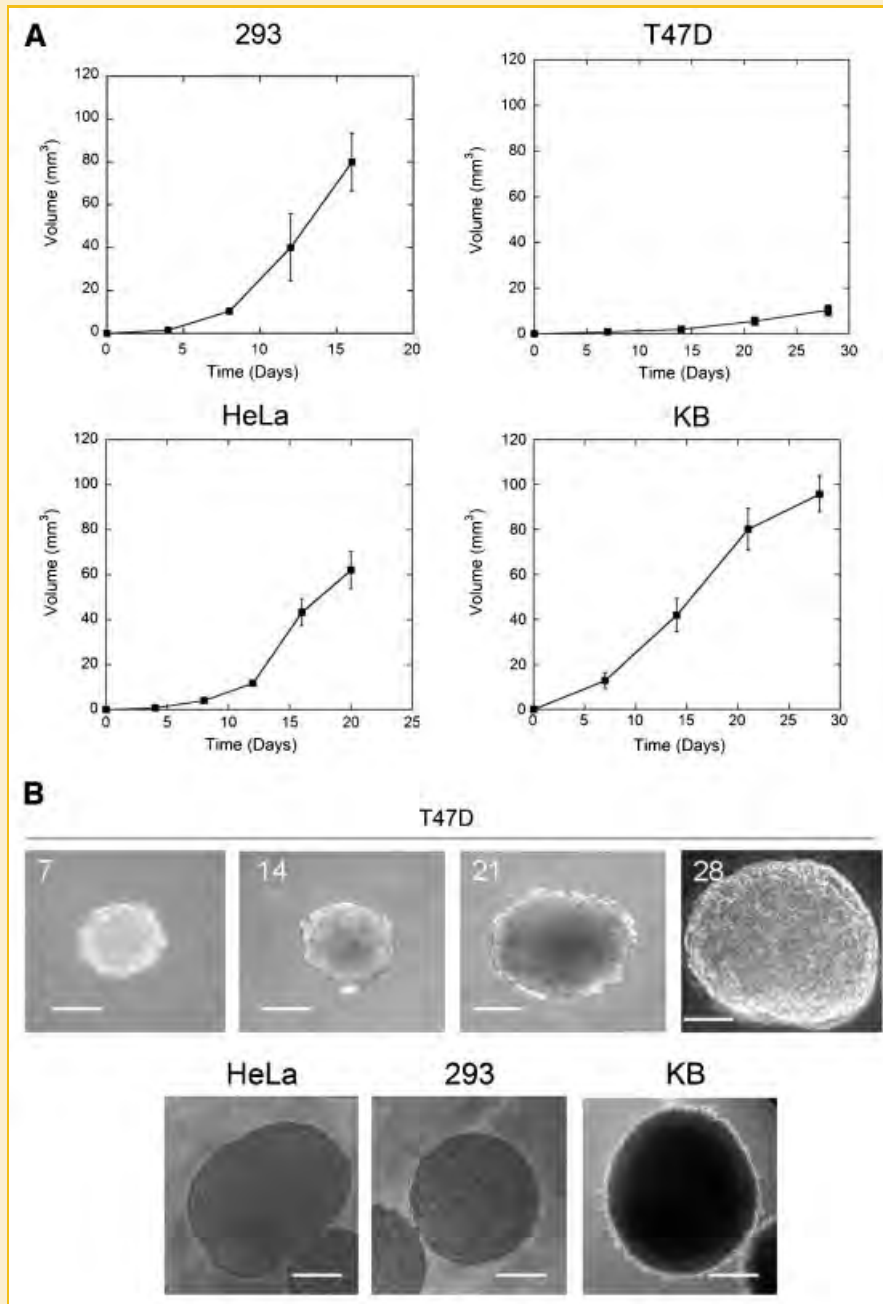


Fig. 1. Growth of multi-cellular tumor spheroids. A: Growth curves of tumor spheroids from 293, T-47D, HeLa, and KB carcinoma cell lines. B: Morphological features of tumor spheroids. Upper panel: Growth of T-47D for the indicated times in days. Lower panel: Mature spheroids derived from HeLa, 293, and KB cancer cells. Bar represents 300  $\mu\text{m}$ . The results are the mean  $\pm$  SD of four independent experiments.



(diameters of 2, 3.1, and 2.6 mm), respectively. In turn, T-47D MTS showed a lower proliferation rate, forming mature or adult-tumor spheroids ( $13.5 \pm 1.8 \text{ mm}^3$  and diameter of 0.8 mm) at day  $28 \pm 2$ .

It has been pointed out that differences between monolayers versus spheroids are observed when a diameter of  $500 \mu\text{m}$  is reached by MTS [Kunz-Schughart, 1999]. Hence, spheroids of more than  $500 \mu\text{m}$  diameter were used in the following experiments, independently of day of culture.

Structurally, the peripheries of HeLa and KB spheroids were amorphous, suggesting a dispersion of cells at the spheroid's edge. In contrast, MTS from 293 and T-47D cells showed compact structures with well-defined edges (Fig. 1B).

As has been described for human glioma cells, prostate and cervical cancer spheroids, MTS from HeLa, 293, KB, and T-47D developed three characteristic cellular layers [Ng et al., 1986; Gronvik et al., 1996; Sauer et al., 1998]. The intermediate and central cellular layers showed high HIF-1 $\alpha$  expression and low levels of Ki67 protein (a cellular proliferation marker) in comparison with the

external layer; in addition, a well-defined apoptotic center was detected in all spheroids (Fig. 2).

#### DRUG RESISTANCE IN TUMOR SPHEROIDS

It is well documented that MTS derived from human ovarian, prostate, and breast cancer are less sensitive to metabolic and anti-neoplastic drugs (2-deoxyglucose, gossypol, vinblastin, doxorubicin) and proteasome inhibitors such as PS-341 than their monolayer counterparts [Frankel et al., 2000; Walker et al., 2004; Rodriguez-Enriquez et al., 2008]. To assess drug resistance in 293, T-47D, HeLa, and KB MTS without interference from different drug diffusion rates, the spheroid cells were gently separated and cultured as monolayers before drug exposure. The proliferation rates of MTS and monolayer cells derived from them were similar, indicating no apparent changes in cell replication (data not shown). As shown by the  $\text{IC}_{50}$  values (Table I), MTS-derived 293 cells were significantly more resistant to taxol, cisplatin, and staurosporine than their respective original monolayer cultures (Fig. 3A). MTS-derived T-47D cells also showed higher resistance

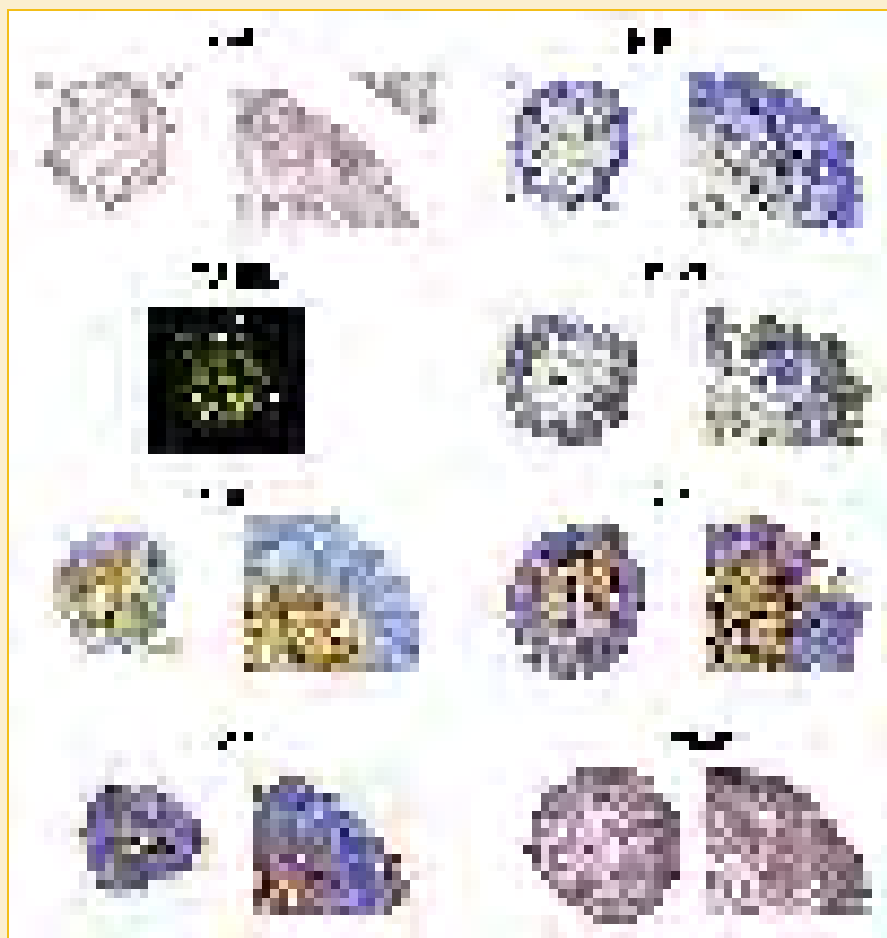


Fig. 2. Characterization of multi-cellular tumor spheroids. Representative immunohistochemistry of mature T-47D spheroid at 21 days of culture showing signal for Ki67, HIF-1 $\alpha$ , Bcl-3, p50, p65, and p52. Magnification 20 $\times$ , insets 40 $\times$ . Bar represents  $300 \mu\text{m}$ . In addition, a TUNEL reaction was performed to reveal apoptotic cells.

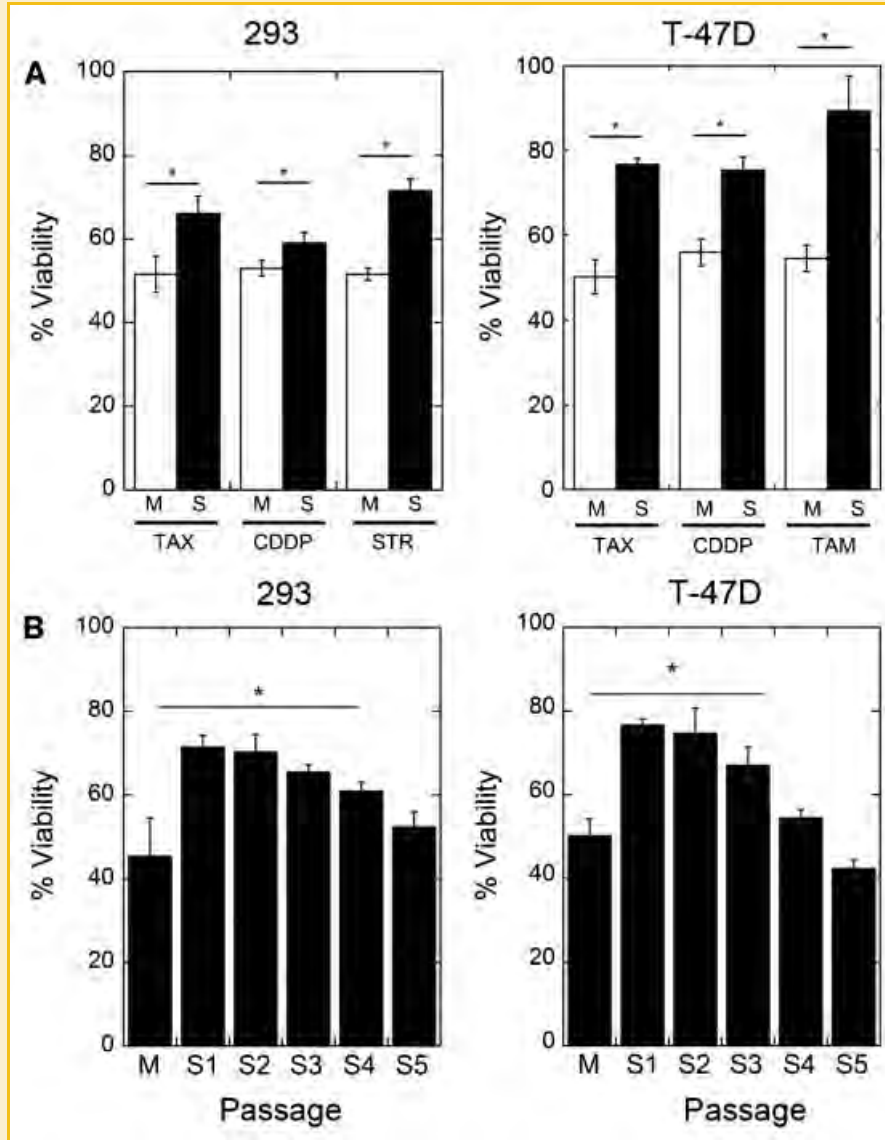


Fig. 3. Growth of tumor cells as multi-cellular tumor spheroids induces resistance to anti-neoplastic agents. A: Mature spheroids of 293 ( $70 \pm 2.6 \text{ mm}^3$ ) or T-47D ( $13 \pm 0.09 \text{ mm}^3$ ) cells were disaggregated and reseeded for 48 h. The  $\text{IC}_{50}$  values for taxol (TAX), cisplatin (CDDP), tamoxifen (TAM), and staurosporine (STR) identified in monolayer cultures (Table I) were applied for an additional 24 or 48 h. Left panel: 293 cells, right panel: T-47D cells. Abbreviations: M, monolayer; S, mature spheroids; B: 293 (left panel) or T-47D (right panel) spheroid-derived cells grown as monolayers (S1: first passage; S2: second passage; and so on). Each passage was exposed to  $\text{IC}_{50}$  values (see Table I) of anti-neoplastic drugs and viability was measured. Results are the mean  $\pm$  SD of five independent experiments performed in quintuplicate.

to taxol, cisplatin, and tamoxifen (Fig. 3A). However, the spheroids viability data should be interpreted with caution since some cells are dying or dead, and the exposure to trypsin for disaggregation may induce further damage, increasing trypan-blue-positive cells.

Tamoxifen was the drug used at the highest concentration, because the four cell lines employed here were ER (estrogen receptor) negative and tamoxifen targets cells via ER. In consequence, relatively higher concentrations of tamoxifen (with respect to taxol or staurosporine) were required to induce an inhibitory effect. Similar results were obtained for the other two tumor cell lines tested (HeLa and KB, data not shown). The higher drug resistance phenotype was apparent in

MTS-derived monolayer cultures after 3–4 passages (12–15 cellular generations) (Fig. 3B).

#### CHANGES IN THE NF- $\kappa$ B SURVIVAL PATHWAY IN TUMOR SPHEROIDS

It is well established that NF- $\kappa$ B decreases the sensitivity of monolayer tumor cell cultures to diverse anti-cancer drugs through expression of proteins that inhibit apoptosis and cell-cycle progression [Cilloni et al., 2006]. Hence, NF- $\kappa$ B transcriptional activity and protein content were determined in MTS. In agreement with the increased drug resistance, the level of NF- $\kappa$ B was higher in HeLa spheroids of  $43 \pm 6 \text{ mm}^3$  than in their monolayer counterpart

(Fig. 4A). Proliferation data indicate a higher rate (>30–40%) in HeLa monolayer cells than in spheroids (data not shown). The NF- $\kappa$ B increase was maintained in monolayer cultures derived from these MTS. S/M culture showed a higher NF- $\kappa$ B transcriptional activity than the MTS because the latter included viable and dead cells, whereas S/M cells only included viable cells.

Furthermore, increased expression of I $\kappa$ B $\alpha$  (a regulator of the canonical route and a direct target of NF- $\kappa$ B) and of Bcl-3, an atypical regulator of the non-canonical NF- $\kappa$ B survival pathway, was also detected (Fig. 4B). In contrast, levels of I $\kappa$ B $\epsilon$  (a late regulator of p65 and p50) remained unaltered in both cultures. In accordance with the transcriptional activity data (Fig. 4A), the protein levels of the main NF- $\kappa$ B sub-units, p65 and p50 proteins, were also higher in three-dimensional cultures than in monolayer cultures (Fig. 4B). The cellular location of Bcl-3 was mainly nuclear in the cells of the MTS intermediate and hypoxic layers, suggesting that Bcl-3 is transcriptionally active in these regions, as opposed to the external layer, where the location was cytosolic (Fig. 2). Similarly, p50, p52, and p65 were also nuclear in the intermediate and hypoxic layers (Fig. 2). These results showed that the expression of proteins from the NF- $\kappa$ B transduction pathway, and probably its increased activity, was associated with the hypoxic center of the MTS.

#### XIAP AND cIAP-1 LEVELS IN MTS

The expression levels of other proteins involved in NF- $\kappa$ B-mediated protection against apoptosis, XIAP, and cIAP-1 (two well-characterized

apoptosis inhibitor proteins) were analyzed in MTS. Overexpression of IAPs may play a role in tumor cell resistance to drug-induced apoptosis [Notarbartolo et al., 2004]. Both IAPs are directly regulated by NF- $\kappa$ B [Stehlik et al., 1998; Wang et al., 1998; Bandala et al., 2001]. Indeed, cIAP-1 and XIAP protein levels in T-47D and 293 tumor spheroids were 1.5–2.5 times higher than in their monolayer counterparts (Fig. 5A). In situ analyses showed that XIAP is expressed mainly in the intermediate spheroid layers, correlating with the expression of HIF-1, although significant expression was also found in the outer layer (Fig. 2).

Analysis of the time courses of both IAPs in MTS revealed that cIAP-1 levels increased after the initial stages of spheroid formation, whereas the cIAP and XIAP levels were markedly higher at the later spheroid stages (Fig. 5C) and remained constant after the spheroids reached their maximal size ( $73.6 \pm 0.6 \text{ mm}^3$  for 293 and  $9.2 \pm 0.3 \text{ mm}^3$  for T-47D). Furthermore, when the spheroids were disaggregated and the cells seeded on Petri dishes, the high IAP levels were maintained until the third passage (Fig. 5B), which correlated with the increased drug resistance phenotype of MTS, that was also maintained in monolayer cultures (Fig. 3B). Similar patterns were also observed for HeLa and KB MTS and S/M cultures (data not shown).

#### INHIBITION OF NF- $\kappa$ B AND XIAP EXPRESSION MODIFIES THE GROWTH OF MTS AND ITS RESISTANCE AGAINST CHEMOTHERAPY

To further elucidate the role of NF- $\kappa$ B on MTS formation, growth, and increased drug resistance, siRNA technology and negative

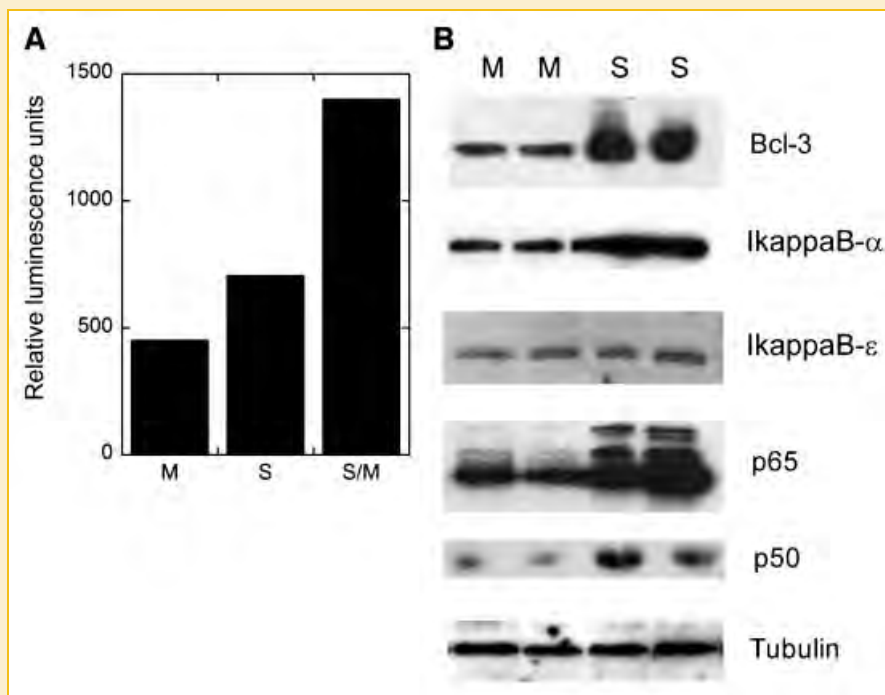


Fig. 4. MTS formation activates NF- $\kappa$ B transduction pathway. A: NF- $\kappa$ B transcriptional activity determined by gene reporter assays. HeLa cells stably transfected with a plasmid containing a luciferase gene under the control of tandem consensus sites for NF- $\kappa$ B were grown (Reporter cell line HeRNFKB) as multi-cellular tumor spheroids or monolayers. They were lysed and equal amounts of protein were assayed for luciferase activity. The panel shows a representative experiment of three independent assays. Abbreviations: M, monolayer culture; S; multi-cellular tumor spheroids; S/M, cells disaggregated from multi-cellular spheroids and grown as monolayers for 12 h. B: Western blot of NF- $\kappa$ B components in monolayer cells and tumor spheroids. Total protein extracts were prepared from mature multi-cellular spheroids and parallel control monolayer cultures. Equal amounts of protein were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with Bcl-3, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , p50, p65, and p52 antibodies. The panel shows two independent experiments of four. Abbreviations: M, monolayer culture; S, multi-cellular tumor spheroids.

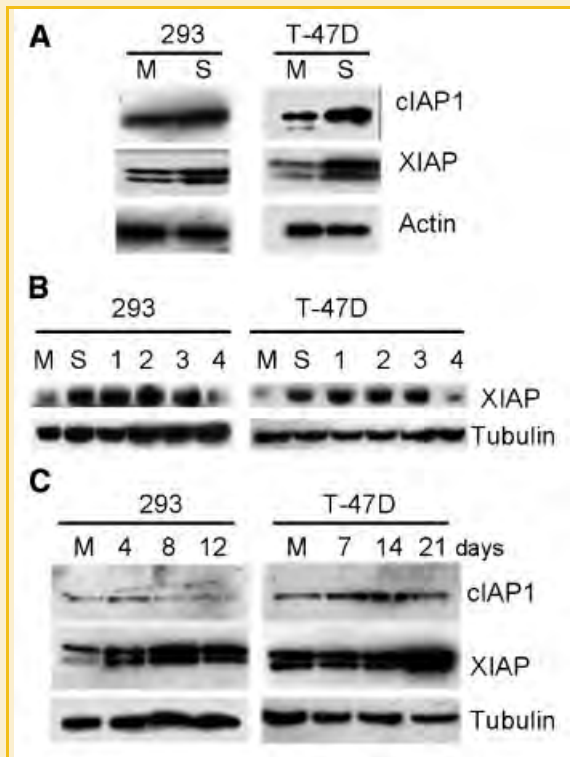


Fig. 5. IAP levels in multi-cellular tumor spheroids. Total protein extracts were prepared from mature multi-cellular spheroids and parallel control monolayer cultures. Equal amounts of protein were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted against inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). At least three replicates were performed. A: Representative immunoblot of XIAP and cIAP-1 in monolayer versus mature spheroids of 293 and T-47D. B: Representative immunoblot of XIAP in passages 1–5 of disaggregated tumor spheroid cells. C: Representative immunoblot of XIAP and cIAP-1 during 293 or T-47D MTS growth. Experiments were performed four times.

analysis of drug resistance in these MTS (Fig. 7A). Overexpression of  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$  (the main upstream NF- $\kappa\text{B}$  activator) induced a significant fourfold increase in the size of HeLa MTS (from  $45 \pm 5$  to  $195 \pm 21 \text{ mm}^3$ ) (Fig. 7B), suggesting that NF- $\kappa\text{B}$  is essential for spheroid formation and growth.

## DISCUSSION

Several authors have described a close similarity between three-dimensional tumor cell models and solid small avascular tumors [MacDonald and Howell, 1978; MacDonald et al., 1978; Lord and Nardella, 1980; Mueller-Klieser, 1997; Kunz-Schughart, 1999]. Indeed, MTS formed from T-47D, 293, HeLa, and KB cells showed the classic three-dimensional geometry comprising two specific cellular layers and an apoptotic center. Growth of MTS from T-47D, 293, HeLa, and KB cells followed Gompertz-type kinetics, although each particular cell line developed a distinctive proliferation rate and maximal size. In the outer cellular layer of the MTS there was specific overexpression of certain genes such as Ki67 protein, indicating active cellular proliferation; in contrast, overexpression of HIF-1 $\alpha$  was found mainly in the intermediate cellular layer, reflecting a lower oxygen concentration.

NF- $\kappa\text{B}$ -deficient HeLa cells in monolayer culture maintained high viability and proliferation rates (data not shown), indicating that NF- $\kappa\text{B}$  has a negligible role in the control of cell-cycle progression, at least in these cells. In contrast, during MTS development the inner cell layers undergo hypoxic stress, which may lead to apoptosis and growth delay; however, NF- $\kappa\text{B}$ -deficient cells did not form mature spheroids, but only small cellular aggregates ( $4.4 \pm 0.1 \text{ mm}^3$ ), suggesting that NF- $\kappa\text{B}$  was essential for the assembly, formation, and maturity of tumor multi-cellular spheroids. The well-known anti-apoptotic effect of NF- $\kappa\text{B}$  on the viability of non-tumorigenic cells might be involved [Egan et al., 2004]. However, other processes may also take place to support apoptotic events in three-dimensional models [Barbone et al., 2008].

Regarding the specific mechanisms of NF- $\kappa\text{B}$  up-regulation, it has been documented that a hypoxic environment and low pH, similar to that found in the spheroid center, activates NF- $\kappa\text{B}$  [Cummins et al., 2007]. Supporting our data, a previous report has shown that NF- $\kappa\text{B}$  is activated in glioma spheroids, becoming relatively resistant to TNF- $\alpha$  [Sudheerkumar et al., 2008]. Although not studied, IAPs could mediate this resistance, since it is well known that they can also repress apoptosis induced by TNF- $\alpha$  [Uren et al., 1996]. It is noteworthy that XIAP, which is regulated by NF- $\kappa\text{B}$ , was found in the intermediate layer of the three-dimensional structures, where HIF-1 $\alpha$  was also expressed (Fig. 2), supporting the view that hypoxia and low pH have a role in NF- $\kappa\text{B}$  activation. In this regard, it has shown that NF- $\kappa\text{B}$  trans-activates the HIF-1 $\alpha$  gene and induces the accumulation of its protein, and this is an important physiological contributor to the hypoxic response [Rius et al., 2008].

Cells derived from MTS and further cultured in 24-well plates showed increased resistance to cisplatin, taxol, staurosporine, and tamoxifen (Fig. 3A). Interestingly, MTS-derived cells preserved the higher drug resistance phenotype for several generations, indicating a stable change in the genetic and biochemical regulatory

dominants were used to regulate nuclear factor activity and XIAP expression [Devroe and Silver, 2004] (Fig. 6A). The addition of siRNAs to block XIAP production in T-47D and 293 monolayer cultures brought about the formation of smaller spheroids ( $1.79 \pm 0.5$  and  $2.6 \pm 0.4 \text{ mm}^3$ , respectively, at days 28 and 16, respectively) in comparison with the wild-type cells ( $9.2 \pm 0.3$  and  $73.6 \pm 1.4 \text{ mm}^3$ , respectively) (Fig. 6B), suggesting that activation of the apoptosis machinery precludes spheroid maturity and growth. Cell death by caspase activation was not evaluated here, although other cellular XIAP-mediated processes, such as deregulation of cell cycle (XIAP can activate Akt, a signal protein that induces cell-cycle progression) might also affect spheroid growth [Yamaguchi et al., 1999]. This remains to be evaluated. Interestingly, the smaller T-47D and 293 spheroids were 35–45% more sensitive to taxol and staurosporine than normal spheroids (Fig. 6C). HeLa and KB monolayer cells treated with siRNA XIAP and cultured as MTS showed a similar altered behavior (data not shown).

On the other hand, inhibition of the NF- $\kappa\text{B}$  pathway, with an  $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ -expressing dominant or by using Bcl-3-siRNA, promoted a drastic reduction (80%) in the size of the spheroids formed (from  $26.5 \pm 6.4$  to  $4.4 \pm 0.1 \text{ mm}^3$  at day  $16 \pm 2$ ), which prevented reliable

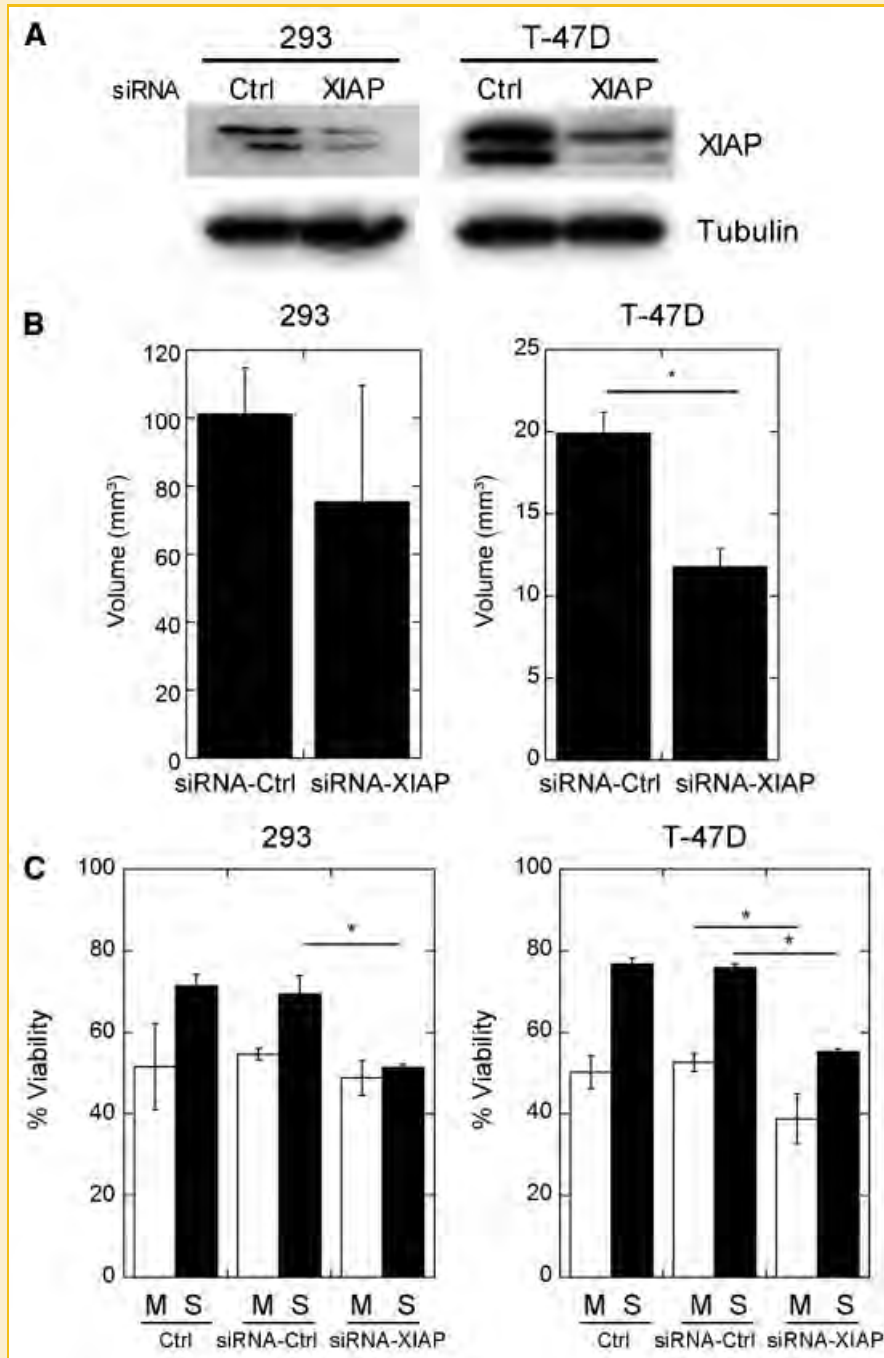


Fig. 6. Effect of XIAP siRNA on MTS growth and anti-neoplastic resistance. 293 and T-47D MTS were stably transfected with a XIAP siRNA-expressing vector. A: XIAP down-regulation visualized by Western blotting. B: 293 and T-47D cells with stable XIAP silencing were used to generate MTS; their volumes were compared with those derived from cells expressing a control siRNA. C: 293 and T-47D cells with silenced XIAP or expressing a control siRNA were used to generate MTS. After reaching maturity, these MTS were disaggregated, cultured for an additional 48 h, and exposed to IC<sub>50</sub> values of staurosporine for 293 and taxol for T47-D (Table I) for a further 24 h; viability was measured by staining with crystal violet. Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. Abbreviations: M, monolayer culture; S, cells derived from multi-cellular tumor spheroids.

mechanisms. This phenomenon correlated with the persistent activation of NF- $\kappa$ B in these cells.

Another stable change was the elevated IAP content. In this regard, it is known that hypoxia activates I $\kappa$ BK $\beta$ , the main upstream modulator of NF- $\kappa$ B, providing a possible mechanism for the

activation of this transcription factor [Cummins et al., 2006]. This change could be perpetuated by a positive feedback mediated by cytokine production, since cells cultured in MTS show a cytokine auto-regulatory loop mediated by a stress response [Jack et al., 2007]. Further experiments inhibiting these loops could help to



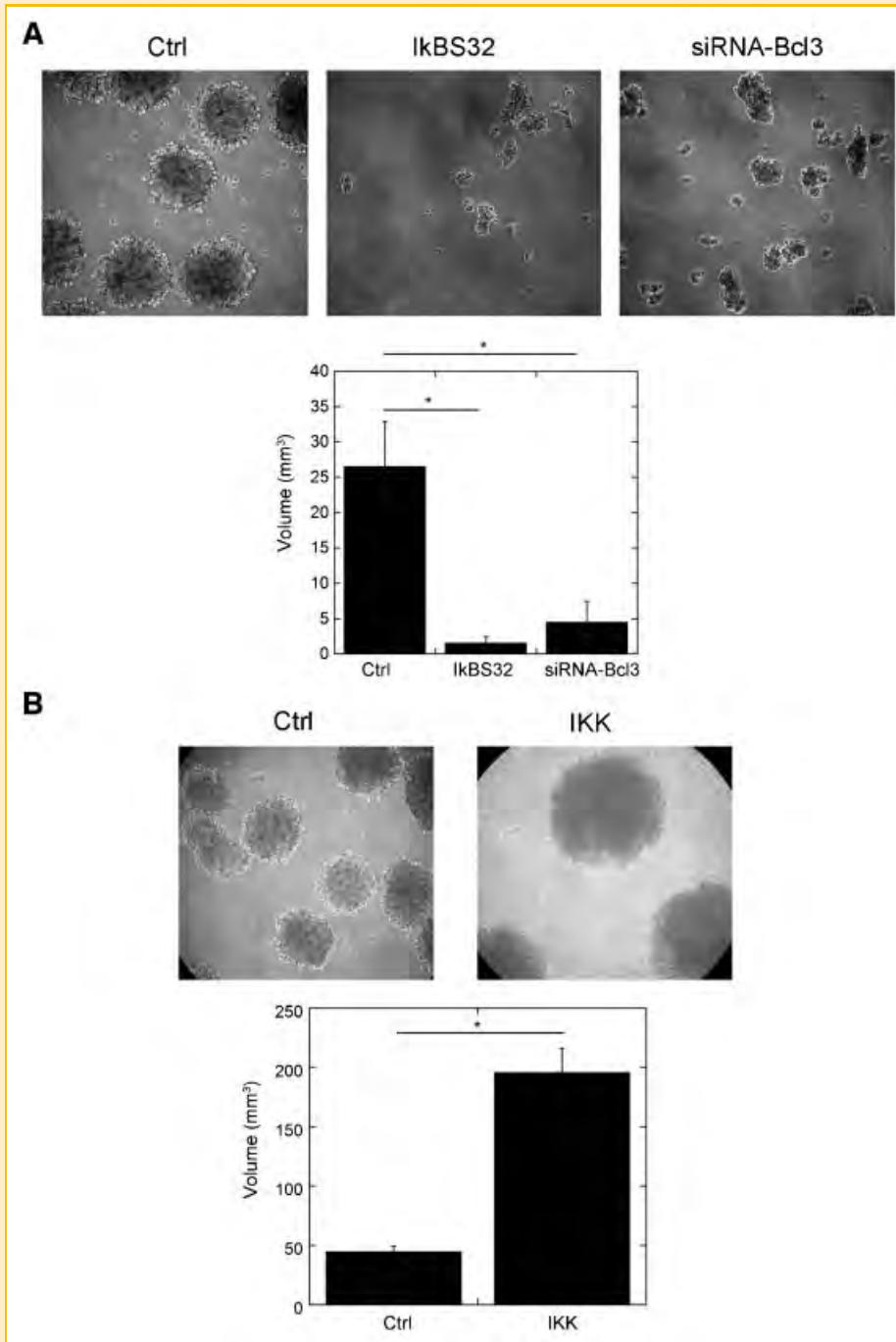


Fig. 7. NF- $\kappa$ B pathway regulates MTS growth. The NF- $\kappa$ B pathway was suppressed or activated by the transfection of plasmids that express either a dominant-negative version of the I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor, a siRNA directed to Bcl-3, or the upstream activator of the pathway, I $\kappa$ BK $\beta$ . A: Inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. Micrographs showing the morphology (upper panel) and volume (lower panel) of spheroids derived from cells expressing the dominant-negative version of I $\kappa$ B $\alpha$ , IkBS32, or an siRNA directed toward Bcl-3. B: Activation of the NF- $\kappa$ B pathway. Micrographs showing the morphology (upper panel) and volume (lower panel) of spheroids derived from cells that overexpress the NF- $\kappa$ B pathway activator I $\kappa$ BK $\beta$  (IKK). Results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

answer this question. Also, an epigenetic mechanism might be involved in the increased drug resistance of MTS.

Both XIAP and cIAP-1 levels remained elevated in spheroid-derived monolayer cultures, and this correlated with the acquired drug resistance phenotype. The decrease in XIAP levels induced by RNAi transfection brought about a significant diminution in

spheroid growth (65%), which was lower than that achieved by NF- $\kappa$ B blocking. These findings suggested that NF- $\kappa$ B modulates other genes associated with the cell-cycle regulation or cell survival pathways [Karin, 2006]. In turn, both IAP repression and NF- $\kappa$ B blocking led to a return of the drug-dependent apoptosis threshold in cellular spheroids to values similar to those found in original

monolayers. Therefore, the data from the present study indicated that the increase of XIAP mediated by NF- $\kappa$ B plays an important role in the increased drug resistance of MTS.

A clinically relevant problem in cancer treatment is the ability of tumor cells to develop drug resistance. However, most studies on this subject have been carried out on tumor cell monolayer cultures. In the monolayer culture model, cells are exposed to a homogeneous environment regarding oxygen concentration, nutrients, pH, and growth factors. This feature does not resemble the physiological microenvironment inside of a solid tumor that favors drug resistance. In consequence, a model that better mimics the presence of a microenvironment with oxygen and other metabolite gradients should be used for studies on drug resistance. Interestingly, we found that in tumor spheroids NF- $\kappa$ B could be a pharmacological target, because its inhibition blocked tumor growth in vitro. As tumor spheroids represent the first stages of tumor growth (before vascularization), the findings of the present study suggested that tumor growth can be inhibited and sensitized to chemotherapy more effectively in earlier stages of formation by targeting NF- $\kappa$ B.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant CONACYT CO1 42309 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, to V. Maldonado. J.C. Gallardo-Pérez was supported by a fellowship from CONACYT and the present work was part of his doctoral thesis from the UNAM in Biomedical Sciences Doctorate Program, Faculty of Medicine.

## REFERENCES

- Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. 2006. High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer* 6:256.
- Baker FL, Spitzer G, Ajani JA, Brock WA, Lukeman J, Pathak S, Tomasovic B, Thielvoldt D, Williams M, Vines C, Tofilon P. 1986. Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell-adhesive matrix and supplemented medium. *Cancer Res* 46:1263–1274.
- Bandala E, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. 2001. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol* 62:13–19.
- Barbone D, Yang TM, Morgan JR, Gaudino G, Broaddus VC. 2008. Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *J Biol Chem* 283:13021–13030.
- Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T, Grolach A. 2007. Reactive oxygen species activate the HIF-1 $\alpha$  promoter via a functional NF $\kappa$ B site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:755–761.
- Burkowski FJ. 1977. A computer simulation of the growth of a tumour in vitro. *Comput Programs Biomed* 7:203–210.
- Cilloni D, Messa F, Arruga F, Defilippi I, Morotti A, Messa E, Carturan S, Giugliano E, Pautasso M, Bracco E, Rosso V, Sen A, Martinelli G, Baccharani M, Saglio G. 2006. The NF- $\kappa$ B pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* 20:61–67.
- Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. 2006. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase- $\beta$ , giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18154–18159.
- Cummins EP, Comerford KM, Scholz C, Bruning U, Taylor CT. 2007. Hypoxic regulation of NF- $\kappa$ B signaling. *Methods Enzymol* 435:479–492.
- Deakin AS. 1975. Model for the growth of a solid in vitro tumor. *Growth* 39:159–165.
- Dertinger H, Hulser D. 1981. Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. *Radiat Environ Biophys* 19:101–107.
- Devroe E, Silver PA. 2004. Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin Biol Ther* 4:319–327.
- Egan LJ, Eckmann L, Greten FR, Chae S, Li ZW, Myhre GM, Robine S, Karin M, Kagnoff MF. 2004. I $\kappa$ B kinase- $\beta$ -dependent NF- $\kappa$ B activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2452–2457.
- Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS. 2000. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res* 6:3719–3728.
- Freyer JP. 1998. Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids. *J Cell Physiol* 176:138–149.
- Gronvik C, Capala J, Carlsson J. 1996. The non-variation in radiosensitivity of different proliferative states of human glioma cells. *Anticancer Res* 16:25–31.
- Jack GD, Cabrera MC, Manning ML, Slaughter SM, Potts M, Helm RF. 2007. Activated stress response pathways within multicellular aggregates utilize an autocrine component. *Cell Signal* 19:772–781.
- Kang HG, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, May WA, Ng T, Reynolds CP, Triche TJ, Sorensen PH. 2007. E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res* 67:3094–3105.
- Karin M. 2006. Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 441:431–436.
- Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line: Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 4:12.
- Kolchinsky A, Roninson IB. 1997. Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. *Anticancer Res* 17:3321–3327.
- Kunz-Schughart LA. 1999. Multicellular tumor spheroids: Intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int* 23:157–161.
- Lord EM, Nardella G. 1980. The multicellular tumor spheroid model. II. Characterization of the primary allograft response in unsensitized mice. *Transplantation* 29:119–124.
- MacDonald HR, Howell RL. 1978. The multicellular spheroid as a model tumor allograft. I. Quantitative assessment of spheroid destruction in alloimmune mice. *Transplantation* 25:136–140.
- MacDonald HR, Howell RL, McFarlane DL. 1978. The multicellular spheroid as a model tumor allograft. II. Characterization of spheroid-infiltrating cytotoxic cells. *Transplantation* 25:141–145.
- Mekhail TM, Markman M. 2002. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* 3:755–766.
- Mueller-Klieser W. 1987. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J Cancer Res Clin Oncol* 113:101–122.
- Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: From molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* 273:C1109–C1123.
- Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. 2004. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): An emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 14:231–243.

- Ng CE, Keng PC, Sutherland RM. 1986. Density distributions of human squamous carcinoma cells: Influence of growth conditions, proliferative status and DNA content. *Int J Cancer* 38:413–418.
- Notarbartolo M, Cervello M, Giannitrapani L, Meli M, Poma P, Dusonchet L, Montalto G, D'Alessandro N. 2004. Expression of IAPs and alternative splice variants in hepatocellular carcinoma tissues and cells. *Ann N Y Acad Sci* 1028:289–293.
- Okamoto T, Sanda T, Asamitsu K. 2007. NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Des* 13:447–462.
- Olive PL, Durand RE. 1994. Drug and radiation resistance in spheroids: Cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev* 13:121–138.
- Oloumi A, MacPhail SH, Johnston PJ, Banath JP, Olive PL. 2000. Changes in subcellular distribution of topoisomerase IIalpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Res* 60:5747–5753.
- Philchenkov A. 2004. Caspases: Potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 8:432–444.
- Piva R, Belardo G, Santoro MG. 2006. NF-kappaB: A stress-regulated switch for cell survival. *Antioxid Redox Signal* 8:478–486.
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. 2008. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453: 807–811.
- Rodriguez-Enriquez S, Gallardo-Perez JC, Aviles-Salas A, Marin-Hernandez A, Carreno-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, Moreno-Sanchez R. 2008. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol* 216:189–197.
- Sauer H, Ritgen J, Hescheler J, Wartenberg M. 1998. Hypotonic Ca<sup>2+</sup>-signaling and volume regulation in proliferating and quiescent cells from multicellular spheroids. *J Cell Physiol* 175:129–140.
- Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:768–772.
- St Croix B, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM, Kerbel RS. 1996. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2: 1204–1210.
- Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. 1998. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 188:211–216.
- Sudheerkumar P, Shiras A, Das G, Jagtap JC, Prasad V, Shastry P. 2008. Independent activation of Akt and NF-kappaB pathways and their role in resistance to TNF-alpha mediated cytotoxicity in gliomas. *Mol Carcinog* 47:126–136.
- Sutherland RM. 1988. Cell and environment interactions in tumor micro-regions: The multicell spheroid model. *Science* 240:177–184.
- Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. 1996. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4974–4978.
- Walker J, Martin C, Callaghan R. 2004. Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *Eur J Cancer* 40:594–605.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680–1683.
- Xing H, Wang S, Weng D, Chen G, Yang X, Zhou J, Xu G, Lu Y, Ma D. 2007. Knock-down of P-glycoprotein reverses taxol resistance in ovarian cancer multicellular spheroids. *Oncol Rep* 17:117–122.
- Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K. 1999. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 18:179–187.
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. 1977. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37:3639–3643.
- Zhivotovsky B, Orrenius S. 2006. Carcinogenesis and apoptosis: Paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis* 27:1939–1945.



Research Paper

# NF- $\kappa$ B Does Not Influence the Induction of Apoptosis by Ukrain

Julia Mendoza

Ruben Zamora

Juan C. Gallardo

Gisela Ceballos

Aida Aldana

Magali Espinosa

Vilma Maldonado\*

Jorge Melendez-Zajgla\*

Molecular Biology Laboratory; Subdireccion de Investigacion Basica; Instituto Nacional de Cancerologia; Mexico City, Mexico

\*Correspondence to: Vilma Maldonado; Laboratorio de Biología Molecular; División de Investigación Básica; Instituto Nacional de Cancerología; Av. San Fernando # 22. Tlalpan 14000; México, D.F. Mexico; Tel.: 525.628.0425; Fax: 525.628.0426; Email: vilmaml@gmail.com/Jorge Meléndez-Zajgla; Laboratorio de Biología Molecular; División de Investigación Básica; Instituto Nacional de Cancerología; Av. San Fernando # 22. Tlalpan 14000; México, D.F. Mexico; Tel.: 525.628.0427; Fax: 525.628.0432; Email: jorgezajgla@gmail.com

Received 03/03/06; Accepted 03/26/06

Previously published online as a *Cancer Biology & Therapy* E-publication: <http://www.landesbioscience.com/journals/cbt/abstract.php?id=2752>

## KEY WORDS

apoptosis, Ukrain, NF- $\kappa$ B, Bcl-3, IKK2, I $\kappa$ B $\alpha$

## ABBREVIATIONS

IKK2 Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase 2  
NF $\kappa$ B Nuclear Factor  $\kappa$ B  
Bcl-3 B-cell lymphoma 3

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by grants CONACyT-2004-C01-45728 to J.M.Z. and CONACyT-2002-C01-42039 to V.M. We thank Dr Luis Herrera for critically reading the manuscript.

## ABSTRACT

Ukrain is a reaction product of different alkaloids from *Chelidonium majus L.* (celandine) conjugated with thiophosphoric acid. It has immunoregulatory effects on T lymphocyte subsets and cytotoxic and cytostatic effects on various malignant cells. Although Ukrain has been reported to induce alterations in the cell cycle and tubulin polymerization, the specific cellular target has not been described. Since antineoplastic agents induce NF- $\kappa$ B and their effects are regulated by this transcription factor, we investigated its possible participation in the apoptotic effects of Ukrain.

Ukrain induced apoptosis in a panel of cancer cell lines by activating the intrinsic cell death pathway, as demonstrated by the cleavage of caspase 9 and the upregulation and cleavage of caspase 3. The effect was reversible, since long exposures (24 hours or more) were needed, as verified by clonogenic assays. Gene reporter assays showed that Ukrain activated NF- $\kappa$ B. Nevertheless, this activation was not required for, and did not modulate, the Ukrain effect: neither blockage of activation by a dominant negative version of I $\kappa$ B  $\alpha$  or a Bcl-3 siRNA, nor activation of the pathway by overexpression of IKK2, changed the response to the drug.

In conclusion, Ukrain induced apoptosis in HeLa cervical cancer cells by activating the intrinsic pathway. In contrast to other antineoplastic drugs, the effects of Ukrain were not regulated by NF- $\kappa$ B.

## INTRODUCTION

Ukrain (Tris(2-([5bS-(5ba,6b,12ba)]-5b,6,7,12b,13, 14-hexahydro-13-methyl[1,3] benzodioxolo[5,6-v]-1-3- dioxolo[4,5-i]phenanthridinium-6-ol]-ethaneaminy) phosphinesulfide.6HCl) is a reaction product of different alkaloids from *Chelidonium majus L.* (celandine) conjugated with thiophosphoric acid.<sup>1</sup> It has immunoregulatory effects on T lymphocyte subsets<sup>2</sup> and is reported to exert cytotoxic and cytostatic effects on various malignant cells.<sup>3</sup>

The mechanism of action of Ukrain remains uncertain. Exposure of cancer cell lines to this compound results in growth inhibition concomitant with cell cycle arrest in G<sub>2</sub>/M. This inhibition is associated with altered expression of mitotic cyclins A and B1 and of cyclin-dependent kinases CDK1 and CDK2 and the CDK inhibitor p27 is upregulated.<sup>4</sup> Panzer et al. found that Ukrain inhibits tubulin polymerization, leading to impaired microtubule dynamics, resulting in activation of the spindle checkpoint and thus a metaphase block.<sup>5</sup> In addition, Ukrain has been found to decrease the synthesis of DNA, RNA and proteins,<sup>6</sup> and to inhibit cellular oxygen consumption.<sup>7</sup> Ukrain can induce apoptosis in cancer cells in vitro<sup>4,8,9</sup> and in vivo<sup>10</sup> by a mechanism independent of changes in bcl-2 or bax expression.<sup>9</sup> There are two characterized signal pathways leading to apoptosis: the death receptor and the mitochondrial pathway. Both are orchestrated by the activation of caspases, a family of conserved proteases that cleave crucial cellular substrates. The mitochondrial pathway is characterized by the release of mitochondrial cytochrome c to the cytosol where, together with the adapter protein APAF-1 and procaspase 9, it assembles the apoptosome, a multiprotein complex.<sup>11</sup> This complex induces the activation of caspase 9, which cleaves and activates downstream caspases that cleave a broad spectrum of cellular targets, resulting in the typical apoptotic morphology. Caspases are in turn regulated by a conserved group of cellular inhibitors, the Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs).<sup>12</sup> The IAPs must be downregulated or inhibited to allow activated caspases to cleave their substrates.<sup>13</sup> A key component of steady-state IAP regulation is the transcription factor NF- $\kappa$ B.<sup>14</sup> This important regulator induces the transcription of several antiapoptotic factors including XIAP, IAP-1 and IAP-2.<sup>15</sup> NF- $\kappa$ B is commonly upregulated in cancer

cells,<sup>16,17</sup> so several attempts are currently underway to block its activation in order to render cells more susceptible to anti-neoplastic treatments.<sup>16,18-21</sup> More recently, a proapoptotic role for NF- $\kappa$ B has been demonstrated in various models, through the upregulation of death receptors such as CD95L, TNF and TRAIL and of transcriptional factors such as p53 and c-myc.<sup>22,23</sup>

Although it has been reported that Ukrain induces alterations in the cell cycle and tubulin polymerization, the specific cellular target has not been identified. Since antineoplastic agents induce NF- $\kappa$ B<sup>24</sup> and their effects are regulated by this transcription factor,<sup>25</sup> we investigated the participation of NF- $\kappa$ B in the apoptotic effects of Ukrain.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell lines and culture.** Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were maintained as a monolayer at 37°C and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium containing 8% (v/v) fetal bovine serum in a humidified atmosphere with 5% (v/v) carbon dioxide in air. In order to generate a transgenic cell line defective in the canonical NF- $\kappa$  pathway, we transfected HeLa cells with plasmid vectors containing a wild type or a dominant-negative I $\kappa$ -B (mutated at serine 32 and 36), kindly provided by P. Baeuerle. The S32/36 mutation prevents ubiquitination and degradation of I $\kappa$ -B protein and, thus blocks the activation of NF- $\kappa$ B. Cells were then selected and analyzed (see below). Cells were thereafter termed HeKB (wild type I $\kappa$ -B) and HeKS32 (I $\kappa$ -B mutated at S32/36). To generate cells in which the pathway is constitutively activated, HeLa cells were transfected with a plasmid vector containing the IKK2 sequence; it has previously been shown that overexpression of this kinase induces constitutive activation.<sup>26</sup> To generate stable cell lines, cultures were selected with G418 for 4 weeks. Cells were thereafter referred as HeIKK. In order to avoid clonal variation, six clones were pooled and tested for transgene expression and NF- $\kappa$ B responsiveness. In order to obtain a cell line defective in Bcl-3, we transfected HEK293 cells with a plasmid (pSIREN, Clontech) containing the sequence for producing a double stranded 23 base pair siRNA directed against Bcl-3, under the control of an U6 promoter. After selection and screening, retroviral supernatants were collected, titrated and stored in liquid nitrogen. To generate the HeBcl3- cell line, ten million HeLa cells were infected at a multiplicity of infection of 1 x 10<sup>7</sup>, selected for 4 weeks with G418, cloned and six clones pooled. All cell culture reagents were obtained from Invitrogen (Frederick, MD).

**Cellular viability and cytotoxic effects.** Cells were seeded in 24 chamber dishes at the density described and exposed to several concentrations of Ukrain for 24 or 48 hours. The concentrations used to determine the IC<sub>50</sub> ranged from 1 to 100  $\mu$ g/ml. For the rest of the experiments, the IC<sub>50</sub> value at 48 hours was used (40  $\mu$ g/ml). The cells were then fixed in 70% ethanol at -20°C, washed in PBS and stained with crystal violet (1% in water). After washing, the

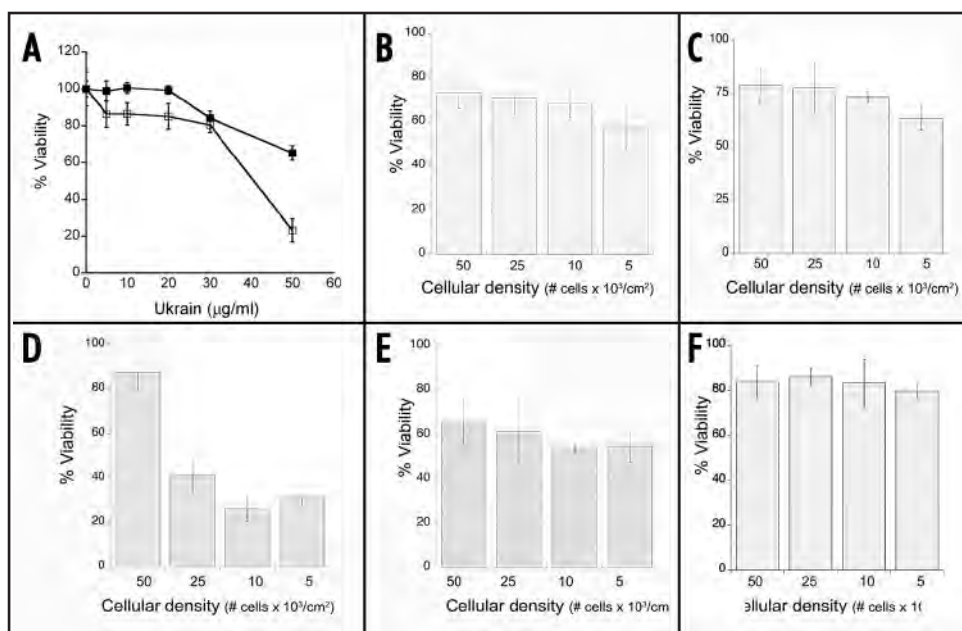


Figure 1. Effects of Ukrain on cell lines. A) Viability of HeLa cells exposed to various concentrations of Ukrain for 48 ( $\square$ ) or 24 ( $\blacksquare$ ) hours, expressed as percentage of cells exposed to vehicle (deionized water). Other panels: viability of human colon cancer SW480 cells (B), human renal carcinoma HEK293 cells (C), human cervical cancer HeLa cells (D), human osteosarcoma MG-63 cells (E) and immortalized human hTERT fibroblasts (F) exposed to 40  $\mu$ g/ml Ukrain for 48 hours. The means were calculated from four independent experiments each performed by triplicate. The bars represent standard deviations.

stain was solubilized in 33% acetic acid and the absorbance was determined in an ELISA reader at 570 nm. Clonogenic assays were performed as reported previously.<sup>27</sup> The analyses were performed at least in triplicate in four independent experiments.

**Nuclear staining.** Cells were fixed with cold ethanol at 70% for 15 min and pretreated with RNase (10  $\mu$ g/ml) in PBS for 30 min at 37°C. The nuclei were stained with ethidium bromide (5  $\mu$ g/ml) in PBS and washed twice with PBS. Finally, the cells were visualized with a Zeiss microscope using epifluorescence and photographed with a digital camera (Nikon 4500).

**Western blot analysis.** Cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and total extracts were prepared by lysis in 500  $\mu$ l of Laemmli buffer, sonication for 20 seconds and centrifugation at 8000 x g for 30 minutes at 4°C. Equal amounts of protein were separated and electrophoresed on an 8–15% SDS-polyacrylamide gel (PAGE). After transferring to a PVDF membrane (Amersham-Pharmacia, UK) and blocking in nonfat milk for 1 hour, the blot was incubated with monoclonal or monospecific polyclonal antibodies against caspases 8, 9 and 3, I $\kappa$ B  $\alpha$ , Bcl3 and actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). After washing, the blots were reincubated for 2 hours with a mouse or anti-rabbit IgG-HRP antibody (Amersham-Pharmacia, UK). Antibody binding was determined using enhanced chemiluminescence (Amersham-Pharmacia, UK) with X-Omat AR films (Kodak, México).<sup>28</sup>

**Gene reporter analyses.** To measure NF- $\kappa$ B activity, we established a HeLa cell line derivative (hereafter termed HeNFR) in which the plasmids pNF- $\kappa$ B-Luc and pBK-CMV (Stratagene CA) were cotransfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen, MD) in a 10:1 ratio, selected for 4 weeks in G418 (Invitrogen, MD), cloned and pooled. HeNFR cells were tested for linear activation of the reporter and reproducibility using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TNF- $\alpha$  exposure (not shown).

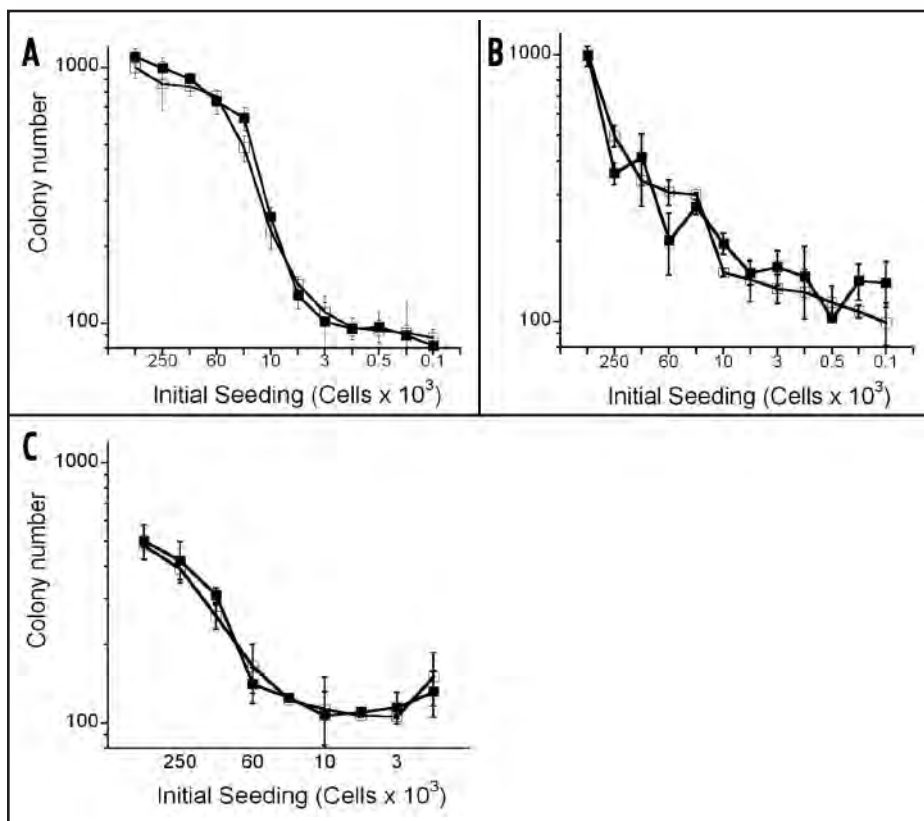


Figure 2. Effects of Ukrain on clonogenic survival of selected cancer cell lines. Cells exposed for 18 hours to the calculated  $IC_{50}$  Ukrain concentration (■) for each cell line, or to vehicle (□), were assayed for colony forming capability after 2 weeks, as described in Material and Methods. (A) HeLa cells, (B) HEK 293 cells, (C) MG-63 cells.

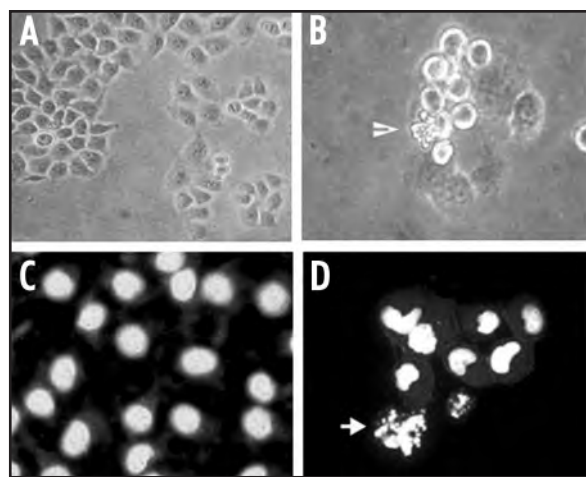


Figure 3. Morphology of HeLa cells exposed for 48 hours to a 40  $\mu$ g/ml concentration of Ukrain. (A) and (B), phase contrast microscopy. (C) and (D), nuclei stained with ethidium bromide and visualized by fluorescence microscopy. Original magnification x40.

The cells were exposed to Ukrain for the times described and NF- $\kappa$ B activity was analyzed by the luciferase assay system (Promega, WI), using a microplate luminometer as described by the manufacturer. All experiments were performed in triplicate in three independent experiments.

**Statistical analysis.** Data are expressed as means  $\pm$  SD from at least three independent experiments performed by triplicate. A Student's *t* test was used to compare individual data with control value. For western blot densitometric analyses, a Bonferroni *t* test was used. A probability of  $p < 0.05$  was taken as denoting a significant difference from control data.

## RESULTS

To determine whether Ukrain induces apoptosis in cancer cells, we exposed HeLa cells to several concentrations (1 to 100  $\mu$ g/ml) of the compound for 24 or 48 hours. As shown in Figure 1, Ukrain induced a marked dose and time-dependent decrease of viability. To examine the generality of this effect, we tested several other cancer cell lines (Fig. 1, and other data not shown). Sensitivity to Ukrain, defined as the relative decrease of cellular viability, varied among cell lines, from an  $IC_{50}$  of  $43 \pm 6$   $\mu$ g/ml in HeLa cells to  $78 \pm 9$   $\mu$ g/ml in SW480 colon cancer cells.

Interestingly, nontransformed fibroblasts (hTERT cell line) were insensitive to the drug. The cytotoxic effect of Ukrain on sensitive cell lines depended on cell confluence, suggesting that it might be modulated by the cell cycle or cell-cell contact (Fig. 1). Unexpectedly, clonogenic assays using different doses of Ukrain for less than 24 hours failed to show a reproducible death effect on several cancer cell lines (Fig. 2), indicating a requirement for long time exposure to the drug. To determine whether the decrease of viability in cells exposed to Ukrain for 48 hours was due to apoptosis, we analyzed cellular and nuclear morphology using a fluorescent assay. Figure 3 illustrates the cytosolic condensation, membrane convolution and nuclear condensation and fragmentation seen in cells exposed to Ukrain, typical of apoptotic cell death. Similar results were found in all the cell lines analyzed (not shown).

During apoptosis, cell death is executed by the cleavage-dependent activation of caspases. Caspases comprise two distinct classes, the initiators and the effectors. Initiator caspases 8 and 10 mediate death factor-mediated or extrinsic apoptosis, whereas caspase 9 mediates intrinsic or mitochondria-regulated apoptosis.<sup>12</sup> To identify the mechanism of apoptosis induced by Ukrain, we performed western blot analyses of caspases 8 and 9 and the effector caspase 3 in HeLa cells exposed to the drug. Figure 4 shows that Ukrain induced cleavage of the caspase 9 precursor, with a concomitant increase in effector caspase 3 protein and cleavage of its proform. As expected in view of the previously-reported dependence of antineoplastic agents on the intrinsic cell death pathway,<sup>29</sup> caspase 8 was not cleaved. These results clearly show that Ukrain induces apoptosis in cervical cancer cells by activating the intrinsic cell death pathway.



NF- $\kappa$ B is a pleiotropic transcription factor with a crucial and complex regulatory role in apoptosis. It mediates an antiapoptotic signal in response to a wide range of stimuli, including chemotherapeutic drugs.<sup>24,25</sup> Depending on the cellular context, this signaling can either impair the response to the death stimuli or be superseded by death signaling. Paradoxically, recent reports show that NF- $\kappa$ B can also induce apoptosis in certain cells by inducing the extrinsic death pathway.<sup>22</sup> To assess the importance of this cascade in our model, we used a gene reporter assay to determine the rate of NF- $\kappa$ B transcription in cells exposed to Ukrain. Figure 5 shows that the drug induced NF- $\kappa$ B activation, as indicated by the increased enzymatic activity of the reporter protein, secreted alkaline phosphatase. To test whether NF- $\kappa$ B activation modulated the cellular response to Ukrain, we created four transgenic HeLa cell lines. HeKS32 expresses a dominant negative version of I $\kappa$ B  $\alpha$  and is thus unable to activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway; HeKB overexpresses a wild type I $\kappa$ B  $\alpha$  protein; HeBcl3- is a stable derivative with defective Bcl-3, a positive modulator of the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway; and finally, HeIKK cells overexpress IKK2, the main activating kinase of the canonical NF- $\kappa$ B pathway.<sup>30</sup> When these cells were exposed to Ukrain, we found that blocking the canonical (e.g., HeKS32 and HeKB) or non canonical (e.g., HeBcl3-) NF- $\kappa$ B transduction pathways did not increase the cytotoxic effects of the drug (Fig. 6), as would be expected from previous reports in which classical antineoplastic agents were used.<sup>25</sup> In agreement with these results, we found that the opposite approach, that is, activating the NF- $\kappa$ B cascade by IKK2 overexpression, did not change the response to the drug (Fig. 6). All these results show that, even when NF- $\kappa$ B is activated after Ukrain exposure, this transduction pathway neither participates nor modulates the cytotoxic response to the drug.

## DISCUSSION

Ukrain is a novel semi-synthetic compound that has received attention because of its possible use as an effective cancer drug.<sup>31</sup> Nevertheless, its mechanism of action remains elusive. Initially, changes in oxygen consumption were found,<sup>32</sup> along with a requirement for the metabolic redox chain, but no direct cause-effect relationship was shown between these changes and the cytotoxic effects. Liepins<sup>8</sup> reported that Ukrain induces two modes of cell death in K562 leukemia cells, one compatible with apoptosis and the second with mitotic crisis. The induction of apoptosis by Ukrain *in vitro* has been further demonstrated in Chinese Hamster Ovary cells,<sup>33</sup> prostate cells<sup>9</sup> and epidermoid cancer cells, including vulvar and cervical.<sup>4</sup> Reduction in DNA, RNA and protein synthesis and inhibition of tubulin polymerization have been observed after exposure to Ukrain,<sup>6,34</sup> but no direct relationship between these cellular effects and cytotoxicity has been demonstrated. In the present paper we found that Ukrain induced apoptosis in cervical, colonic and kidney cancer cells, but not in a nontransformed cell line derived from human fibroblasts. The effect required long exposure to the compound, since the clonogenic sensitivity assays required more than 24 hours in culture to show reproducible death. This accords with the report of Panzer et al.,<sup>35</sup> who found that the antimetabolic effects of Ukrain were reversible. Although the exact reason for this phenomenon is currently unknown, the doubling time of the HeLa cell line ( $22 \pm 0.2$  hours in our laboratory) and confluence-dependent modulation of the

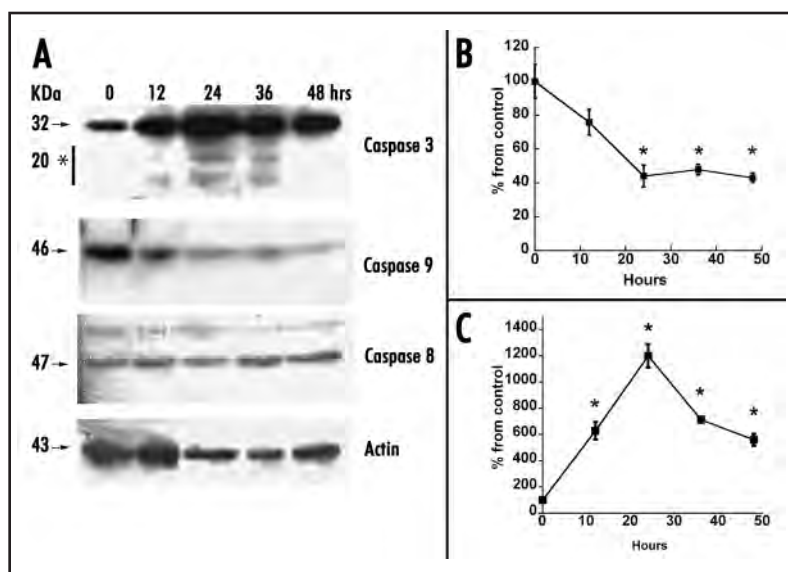


Figure 4. (A) Representative western blots of Caspases 8, 9 and 3 in HeLa cells exposed to 40  $\mu$ g/ml Ukrain for the times shown. (C) Densitometric analysis of cleaved caspase 3. (B) Densitometric analysis of precursor caspase 9. These results were derived from triplicate experiments and normalized using densitometric analysis for actin. The bars represent standard deviations. \* $p < 0.5$  by Bonferroni T-test, individual values compared to control.

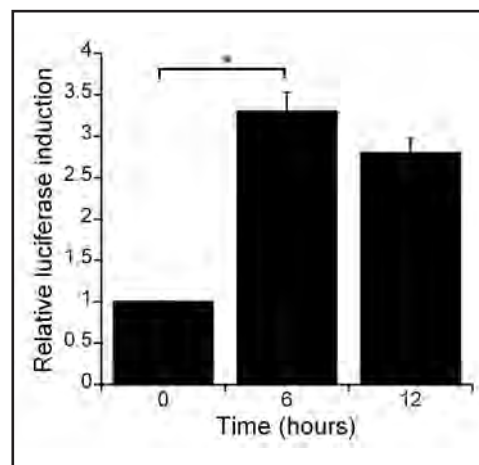


Figure 5. NF- $\kappa$ B activity in cells exposed to Ukrain. HeLa cells were exposed to Ukrain and NF- $\kappa$ B transactivating activity was assessed by gene reporter assays, as described in Material and Methods. Luciferase activity is presented as relative values of promoter activity. Experiments were performed by triplicate. The bars represent standard deviations. \* $p < 0.5$  by Bonferroni T-test.

effect of Ukrain (Fig. 1) could indicate a cell cycle requirement for the action of the drug.

As expected in view of reports on other antineoplastic drugs,<sup>19</sup> apoptosis induced by Ukrain was mediated by the intrinsic pathway, as demonstrated by the cleavage of caspases 9 and 3. This is also supported by the data of Roublevskaia et al.,<sup>36</sup> who demonstrated that overexpression of Bcl-2, a regulator of the mitochondrial pathway, impaired responsiveness to Ukrain.

Alterations in tubulin polymerization by antineoplastic drugs usually involve the participation of the extrinsic pathway, as exemplified by paclitaxel, an anticancer compound that also targets

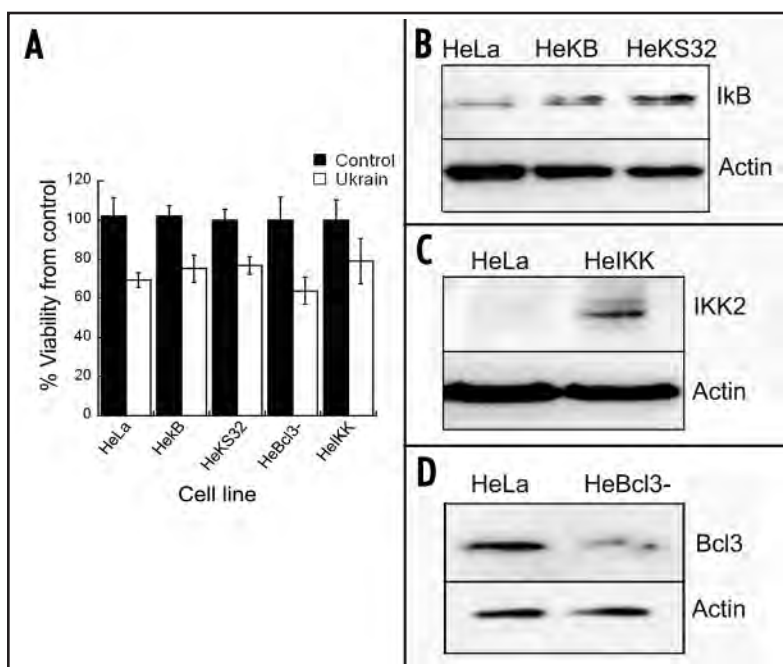


Figure 6. Effect of NF- $\kappa$ B inhibition on cytotoxic effects of Ukrain. (A) HeLa cell line, or stable HeLa derivative HeBcl3-, which expresses a siRNA for Bcl-3; HeKB, expressing I- $\kappa$ B; HeKS32, which expresses an I- $\kappa$ B negative dominant; and HeIKK, which overexpresses IKK2; were exposed to the IC<sub>50</sub> of Ukrain for 48 hours and viability was assessed as described in Material and Methods. Experiments were performed in triplicate in three independent assays. The bars represent standard deviations. (B) Western blot assays of I $\kappa$ B  $\alpha$  (upper panel) and actin (lower panel) in HeKB cells to demonstrate expression of the transgene. (C) Western blot assays of IKK2  $\alpha$  (upper panel) and actin (lower panel) in HeIKK to demonstrate expression of the transgene. (D) Western blot assays of Bcl-3 (upper panel) and actin (lower panel) in HeBcl3- cells to demonstrate the effect of Bcl-3 siRNA.

microtubules. This drug induces the death receptor (DR)-mediated apoptotic pathway in HeLa cells, involving TRAIL-dependent activation of caspase-8, as well as the mitochondrial-mediated pathway.<sup>37</sup> Since we found no activation of caspase 8, participation of the extrinsic pathway in our model is excluded. Although further investigation is necessary, our results could indicate a secondary role for tubulin as the main target for Ukrain, as suggested by others.<sup>34</sup>

NF- $\kappa$ B is a pleiotropic transcription factor that modulates cellular processes such as proliferation and cell death in response to external and internal stimuli such as cytokines and growth factors, inflammation and stress. It is one of the most important antiapoptotic factors, as demonstrated by the embryonic lethality induced by massive liver apoptosis in knockout mice deficient in the RelA component of NF- $\kappa$ B.<sup>38</sup> This effect is mediated by direct upregulation of several proteins that inactivate caspases (IAPs), block mitochondrial release of apoptogenic factors (Bcl-2 family members) or displace caspase 8 from the death-inducing signalling complex (FLIP and isoforms). Recently, it has been shown that NF- $\kappa$ B regulates not only antiapoptotic signals but also proapoptotic signals through the regulation of death receptors and death receptor ligands such as CD95L, TNF and TRAIL (for a review see Ref. 23). This further complexity in the regulation of apoptosis by NF- $\kappa$ B probably depends on additional cross-talking cellular factors that allow for specific spatial and temporal outcomes in multicellular organisms.<sup>39</sup> Indeed, it has been shown that transcription factors such as Sp1<sup>40</sup> and TAF(II)105<sup>41</sup> can bind to the same promoter site as, or interact directly with, NF- $\kappa$ B, regulating its specificity and activity. In view of the previously reported immunomodulatory effects of Ukrain<sup>2,42</sup> and the fact that NF- $\kappa$ B plays a very important role in innate and adaptive immunity,<sup>43</sup> we reasoned that this factor could be mediating or at least regulating the response to Ukrain in cancer cells. In the present report, we show for the first time that even when Ukrain activates NF- $\kappa$ B, this activation does not modify the drug response. This follows from the observation that neither blockage of canonical NF- $\kappa$ B, which relies on I $\kappa$ B degradation and the release of prototypic p50/p65 homodimers, nor the depletion of bcl-3, which is

required for the transactivation activities of noncanonical p50 and p52 homo or heterodimers, inhibited the action of Ukrain. In support of these data, constitutive activation of the canonical pathway, induced by overexpression of its main activator, IKK2,<sup>30</sup> did not change the responsiveness to the drug. These novel results showing the activation of NF- $\kappa$ B, along with recent reports demonstrating the immunoregulatory effects of Ukrain on T lymphocyte subsets and on the antitumor effect of NK cells,<sup>2,42</sup> provide new grounds for investigating whether NF- $\kappa$ B regulation could also be responsible for the immunomodulatory effects of Ukrain.

In conclusion, we have shown that Ukrain induces apoptosis in cancer cells by activating the intrinsic death pathway by a mechanism that does not depend on the activation of NF- $\kappa$ B.

#### References

- Nowicky J, Greif M, Hamler F, Hiesmayr W, Staub W. Biological activity of Ukrain in vitro and in vivo. *Chemioterapia* 1987; 6:683-5.
- Nowicky JW, Manolakis G, Meijer D, Vatanasapt V, Brzosko WJ. Ukrain both as an anti cancer and immunoregulatory agent. *Drugs Exp Clin Res* 1992; 18:51-4.
- Ugilyanitsa KN, Nefyodov LI, Doroshenko YM, Nowicky JW, Volchek IV, Brzosko WJ, Hodysh YJ. Ukrain: A novel antitumor drug. *Drugs Exp Clin Res* 2000; 26:341-56.
- Roublevskaia IN, Polevoda BV, Ludlow JW, Haake AR. Induced G<sub>2</sub>/M arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma cell lines by semisynthetic drug Ukrain. *Anticancer Res* 2000; 20:3163-7.
- Panzer A, Joubert AM, Bianchi PC, Hamel E, Seegers JC. The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. *Eur J Cell Biol* 2001; 80:111-8.
- Nowicky JW, Hiesmayr W, Nowicky W, Liepins A. Influence of Ukrain on DNA, RNA and protein synthesis in malignant cells. *Drugs Exp Clin Res* 1996; 22:81-91.
- Jagiello-Wojtowicz E, Kleinrok Z, Urbanska EM. Ukrain (NSC-631570) in experimental and clinical studies: A review. *Drugs Exp Clin Res* 1998; 24:213-9.
- Liepins A, Nowicky JW, Bustamante JO, Lam E. Induction of bimodal programmed cell death in malignant cells by the derivative Ukrain (NSC-631570). *Drugs Exp Clin Res* 1996; 22:73-9.
- Roublevskaia IN, Haake AR, Ludlow JW, Polevoda BV. Induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP by Ukrain. *Drugs Exp Clin Res* 2000; 26:141-7.
- Ugilyanitsa KN, Maciuk JR, Fomin KA, Nefyodov LI, Kravchuk RI, Vinogradova LM, Nowicky JW, Brzosko WJ. Influence of Ukrain on patients with surgically treated breast cancer. Part IV. Electronmicroscopic and cytochemical evaluation. *Drugs Exp Clin Res* 1996; 22:147-53.
- Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 2004; 23:2850-60.

12. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:897-907.
13. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): An emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14:231-43.
14. Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF- $\kappa$ B or die? *Curr Biol* 1997; 7:R94-6.
15. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Trends Cell Biol* 1998; 8:107-11.
16. Haefner B. NF- $\kappa$ B: Arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov Today* 2002; 7:653-63.
17. Rayet B, Gelinas C. Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; 18:6938-47.
18. Young MR, Yang HS, Colburn NH. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF- $\kappa$ B and Pcdcd4. *Trends Mol Med* 2003; 9:36-41.
19. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53:153-9.
20. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:297-309.
21. Monks NR, Biswas DK, Pardee AB. Blocking anti-apoptosis as a strategy for cancer chemotherapy: NF- $\kappa$ B as a target. *J Cell Biochem* 2004; 92:646-50.
22. Hacker H, Karin M. Is NF- $\kappa$ B2/p100 a direct activator of programmed cell death? *Cancer Cell* 2002; 2:431-3.
23. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:745-56.
24. Maldonado V, Melendez-Zajgla J, Ortega A. Modulation of NF- $\kappa$ B, and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells. *Mutat Res* 1997; 381:67-75.
25. Bandala E, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol* 2001; 62:13-9.
26. Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. I $\kappa$ B kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  and NIK. *Science* 1997; 278:866-89.
27. Hernandez P, Olivera P, Duenas-Gonzalez A, Perez-Pastenes MA, Zarate A, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 48:488-92.
28. Melendez-Zajgla J, Garcia C, Maldonado V. Subcellular redistribution of HSP72 protein during cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40:253-61.
29. Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 2004; 9:691-704.
30. Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B: The enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6:203-208.
31. Ernst E, Schmidt K. Ukrain—A new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. *BMC Cancer* 2005; 5:69.
32. Philchenkov AA. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochemistry (Mosc)* 2003; 68:365-76.
33. Kurochkin SN, Kolobkov SL, Votrin II, Voltchek IV. Induction of apoptosis in cultured Chinese hamster ovary cells by Ukrain and its synergistic action with etoposide. *Drugs Exp Clin Res* 2000; 26:275-8.
34. Panzer A, Hamel E, Joubert AM, Bianchi PC, Seegers JC. Ukrain(TM), a semisynthetic Chelidonium majus alkaloid derivative, acts by inhibition of tubulin polymerization in normal and malignant cell lines. *Cancer Lett* 2000; 160:149-57.
35. Panzer A, Joubert AM, Bianchi PC, Seegers JC. The antimetabolic effects of Ukrain, a Chelidonium majus alkaloid derivative, are reversible in vitro. *Cancer Lett* 2000; 150:85-92.
36. Roublevskaia IN, Haake AR, Polevoda BV. Bcl-2 overexpression protects human keratinocyte cells from Ukrain-induced apoptosis but not from G<sub>2</sub>/M arrest. *Drugs Exp Clin Res* 2000; 26:149-56.
37. Lee KH, Yim EK, Kim CJ, Namkoong SE, Um SJ, Park JS. Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005; 98:45-53.
38. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the *RelA* component of NF- $\kappa$ B. *Nature* 1995; 376:167-70.
39. Wallach D, Arumugam TU, Boldin MP, Cantarella G, Ganesh KA, Goltsev Y, Goncharov TM, Kovalenko AV, Rajput A, Varfolomeev EE, et al. How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF- $\kappa$ B activation by members of the TNF/NGF receptor family. *Arthritis Res* 2002; 4:S189-96.
40. Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I, Scheidreit C. Functional interference of Sp1 and NF- $\kappa$ B through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol* 1998; 18:1266-74.
41. Yamit-Hezi A, Nir S, Wolstein O, Dikstein R. Interaction of TAFII105 with selected p65/RelA dimers is associated with activation of subset of NF- $\kappa$ B genes. *J Biol Chem* 2000; 275:18180-7.
42. Grinevich Y, Shalimov S, Bendyuh G, Zahriyuk O, Hodysh Y. Effect of Ukrain on the growth and metastasizing of Lewis carcinoma in C57BL/6 mice. *Drugs Exp Clin Res* 2005; 31:59-70.
43. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:141-79.

# Energy Metabolism Transition in Multi-Cellular Human Tumor Spheroids

SARA RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ,<sup>1\*</sup> JUAN CARLOS GALLARDO-PÉREZ,<sup>1</sup>  
ALEJANDRO AVILÉS-SALAS,<sup>2</sup> ALVARO MARÍN-HERNÁNDEZ,<sup>1</sup> LILIANA CARREÑO-FUENTES,<sup>1</sup>  
VILMA MALDONADO-LAGUNAS,<sup>2</sup> AND RAFAEL MORENO-SÁNCHEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico, Mexico

<sup>2</sup>Departamentos de Biología Molecular y de Patología, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico, Mexico

It is thought that glycolysis is the predominant energy pathway in cancer, particularly in solid and poorly vascularized tumors where hypoxic regions develop. To evaluate whether glycolysis does effectively predominate for ATP supply and to identify the underlying biochemical mechanisms, the glycolytic and oxidative phosphorylation (OxPhos) fluxes, ATP/ADP ratio, phosphorylation potential, and expression and activity of relevant energy metabolism enzymes were determined in multi-cellular tumor spheroids, as a model of human solid tumors. In HeLa and Hek293 young-spheroids, the OxPhos flux and cytochrome *c* oxidase protein content and activity were similar to those observed in monolayer cultured cells, whereas the glycolytic flux increased two- to fourfold; the contribution of OxPhos to ATP supply was 60%. In contrast, in old-spheroids, OxPhos, ATP content, ATP/ADP ratio, and phosphorylation potential diminished 50–70%, as well as the activity (88%) and content (3 times) of cytochrome *c* oxidase. Glycolysis and hexokinase increased significantly (both, 4 times); consequently glycolysis was the predominant pathway for ATP supply (80%). These changes were associated with an increase (3.3 times) in the HIF-1 $\alpha$  content. After chronic exposure, both oxidative and glycolytic inhibitors blocked spheroid growth, although the glycolytic inhibitors, 2-deoxyglucose and gossypol (IC<sub>50</sub> of 15–17 nM), were more potent than the mitochondrial inhibitors, casiopeina II-gly, laherradurin, and rhodamine 123 (IC<sub>50</sub> > 100 nM). These results suggest that glycolysis and OxPhos might be considered as metabolic targets to diminish cellular proliferation in poorly vascularized, hypoxic solid tumors.

J. Cell. Physiol. 216: 189–197, 2008. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

The field of tumor energy metabolism seemed resolved by 1956, when Warburg proposed that an energy deficiency caused by an irreversible damage of the mitochondrial function induced increased glycolysis, which presumably supported the energy demand for tumor formation and growth. Since then, it has been thought that Warburg's hypothesis applied to all or most cancer cell types (Weber, 2001; Stubbs et al., 2003; Xu et al., 2005). Such an asseveration may indeed be particularly valid for solid tumors, in which the lower inner oxygen concentration activates, via the hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), the transcription and translation of glycolytic genes (GLUT-1 and -3, HK, phosphofructokinase type I, aldolase, GAPDH, phosphoglycerate kinase, enolase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase) (Dang and Semenza, 1999), which in turn, stimulates the glycolytic flux. However, oxidative phosphorylation (enzyme activities and flux) has not been analyzed in parallel.

In this regard, recent data from numerous sources on the role of oxidative phosphorylation (OxPhos) during tumor development (Lampidis et al., 1983; Guppy et al., 2002; Zu and Guppy, 2004; Rodríguez-Enríquez et al., 2006a; Moreno-Sánchez et al., 2007) have prompted a re-evaluation of Warburg's hypothesis. For instance, it has been shown in human (HeLa, MCF-7, HL-60) and rodent (hepatoma AS-30D) tumors that mitochondrial ATP may indeed support the accelerated cellular proliferation rate (Sweet and Singh, 1995; Guppy et al., 2002; Rodríguez-Enríquez et al., 2006a) and, in consequence, anti-mitochondrial drugs are able to abolish tumor growth (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). For several aggressive metastatic human carcinomas (HeLa, CRL 1420 pancreas, MCF-7 breast, MB49 bladder) and osteosarcomas, OxPhos inhibitors alone, such as casiopeina II-gly and rhodamines (123, 6G), or in combination with glycolytic drugs have been effectively used to decrease the proliferation rate (reviewed in Moreno-Sánchez et al., 2007).

It should be noted, however, that most of the above-mentioned studies have been carried out with cellular suspensions or monolayer culture cells. It is usually assumed that energy metabolism of monolayer cultures (i.e., enzyme activity, metabolic pathway flux, and sensitivity to metabolic drugs) is similar to that found in solid tumors. Solid tumors maintain a complex physiological structure derived from their three-dimensional organization (i.e., cell-matrix interactions, variations in nutrient supply due to glucose, lactate, pH, and oxygen gradients; as well as variations in the expression of HIF-1 $\alpha$  and c-Myc), which might result in gene regulation changes and, hence, in enzyme expression with respect to monolayer cultures and cell suspensions (Sutherland, 1988; Khaitan et al., 2006).

This article includes Supplementary Material available from the authors upon request or via the Internet at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0021-9541/suppmat>.

**Abbreviations:** ANT, adenine nucleotide translocator; casII-gly, casiopeina II-gly; COX, cytochrome *c* oxidase; GAPDH, glyceraldehyde 3P-dehydrogenase; GLUT-1, glucose transporter 1; HK, hexokinase; rhod 123, rhodamine 123; 2-DOG, 2-deoxyglucose.

Contract grant sponsor: CONACyT-Mexico;  
Contract grant numbers: Salud-2002-C01-7677, SEP-2007-60517.

\*Correspondence to: Sara Rodríguez-Enríquez, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano No. 1 Sección XVI, Tlalpan, Mexico D.F. 14080, Mexico.  
E-mail: saren960104@hotmail.com

Received 24 October 2007; Accepted 11 December 2007

DOI: 10.1002/jcp.21392



Spheroids of tumor cells (multi-cellular tumor spheroids, MCTS) provide a suitable three-dimensional *in vitro* model that resembles the cellular environment in poorly vascularized, hypoxic solid tumors more closely than conventional monolayer cultures (Sutherland, 1988; Kunz-Schughart et al., 2004).

Studies on energy metabolism in MCTS with diameter  $\geq 0.5$  mm (hamster fibroblast V76, mammary EMT6/Ro, rat glioma C6, human glioma U-118MG, carcinoma HT29, melanomas BEX and WIX, *ras* transfectant Fisher 344 rat embryo fibroblast Rat 1-T1) have been carried out (Freyer et al., 1984; Freyer and Sutherland, 1985; Mueller-Klieser et al., 1986; Carlsson and Acker, 1988; Acker et al., 1992; Hystad and Rofstad, 1994; Kunz-Schughart et al., 2000). The rate of oxygen uptake in MCTS incubated under normoxia is considerably lower ( $\sim 50$ – $80\%$ ) than that found in tumor cells derived from monolayer cultures harvested in exponential phase (Freyer et al., 1984; Hystad and Rofstad, 1994; Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). Unfortunately, a parallel evaluation of the glycolytic flux has not been always undertaken (Freyer et al., 1984; Mueller-Klieser et al., 1986; Hystad and Rofstad, 1994), or it has been determined indirectly as glucose consumption (Freyer and Sutherland, 1985; Khaitan et al., 2006). Glycolysis in large spheroids may increase (1.8 times) (Kunz-Schughart et al., 2000; Khaitan et al., 2006) or decrease (1.9–3.5 times) (Carlsson and Acker, 1988; Acker et al., 1992; Kunz-Schughart et al., 2000) in comparison to smaller spheroids (with diameter  $< 0.5$  mm).

It has been determined that tumor cells consume glutamine (Reitzer et al., 1979) at high rates. As glutaminolysis may generate lactate, it is possible that glycolysis in tumor cells may be over-estimated. Hence, lactate formation should also be evaluated in the absence of added glucose and in the presence of a glycolytic inhibitor (2-deoxyglucose, arsenite, iodoacetate, gossypol), which allows estimating the true glycolytic flux (from external glucose to lactate) (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). Similarly, OxPhos, as determined by the rate of cellular oxygen consumption in most studies with tumor cells, is also usually over-estimated since oligomycin sensitivity is not evaluated. In this regard, it has been documented that, in squamous carcinoma spheroids and in normal cell spheroids, the activity of several non-mitochondrial oxygen-consuming enzymes (heme oxygenase and cytochrome P<sub>450</sub>) increases 2.5–5 times in comparison with their counterparts in monolayer cultures (Murphy et al., 1993; Wu et al., 1999).

Therefore, in the present work the predominant energy metabolic pathway was identified in spheroids by determining the rates of glycolysis and OxPhos, as well as activity and content of relevant enzymes (HK, COX) of both pathways. In addition, to establish the relationship between spheroid formation and the energy status, the ATP/ADP ratio and phosphorylation potential were evaluated. Once the principal ATP-production source was identified, metabolic therapy was assessed as an alternative treatment to diminish solid tumor formation and growth.

## Materials and Methods

### Monolayer and MCTS culturing

HeLa (cervico-uterine stage IV) and Hek293 (transformed embryonic kidney) human tumor lines were maintained in Dulbecco's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal serum and 10,000 U penicillin streptomycin/ml (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). Monolayer tumor cells at 90–95% confluence were removed by treatment with 0.25% trypsin/EDTA and washed once by centrifugation with cold Krebs-Ringer buffer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, pH 7.4). All culture chemicals were of analytical grade and were obtained from GIBCO Life Technologies (Rockville, MD).

Monolayer cells used to produce clonogenic spheroids of homogeneous geometry and size with the liquid overlay technique (Carlsson and Yuhas, 1984) derived from cultures with less than three passages. Briefly, tumor cells were seeded in 2% (w/v) agarose-coated culture dishes (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) at a final concentration of  $0.5$ – $1 \times 10^5$  cells per dish in 3 ml DMEM. Five or six days after initiation of spheroid formation, the old medium in the Petri dishes containing the cellular clusters was replaced with fresh DMEM (5 ml) and placed under slow orbital shaking (20–50 rpm) at 37°C and 95% air/5% CO<sub>2</sub>. Spheroids could also be formed when cellular clusters were placed immediately under slow orbital shaking in agarose-coated dishes, but high disintegration was observed.

Spheroid diameter was determined at different culture times by measuring orthogonal diameters using a calibrated reticule (1/10 mm) in an inverted phase contrast microscope (Zeiss, Thornwood, NY). To maintain growth conditions fairly constant, the old medium was replaced with fresh medium every 24 h. Intact spheroids were collected and washed once with cold Krebs-Ringer medium.

### Oxygen consumption and glycolysis

The OxPhos flux of cells and intact spheroids (5–10 mg/ml) was determined by measuring the oligomycin-sensitive oxygen consumption with a Clark-type electrode at 37°C in an air-saturated Krebs-Ringer medium in the presence of physiological concentrations of both glycolytic (5 mM glucose) and oxidative (0.4 mM glutamine) substrates (Stahl and Frick, 1978). Under these conditions, a linear correlation between the rate of O<sub>2</sub> uptake and biomass (from 1 to 10 mg protein) was attained (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). For glycolysis, cells and intact spheroids (5–10 mg protein/ml) were pre-incubated for 1 min in Krebs-Ringer medium. Then, 5 mM glucose plus 0.4 mM glutamine were added. The reaction was stopped with 3% perchloric acid after both 1 and 11 min of incubation and further neutralized with 3 N KOH/0.1 M Tris. L-lactate was determined by using a standard enzymatic assay (Bergmeyer, 1974) and the glycolytic flux was estimated from the rate of lactate formation. Under these conditions, the rate of lactate formation was linear with the protein concentration from 5 to 10 mg protein (Marín-Hernández et al., 2006). The neutralized samples were also used to determine ATP and ADP (Bergmeyer, 1974). For intracellular Pi, spheroids were gently homogenized with a Teflon pestle (Glass-Col, IN) and centrifuged through a 1-bromododecane layer into 3% (v/v) HClO<sub>4</sub> at 16,000g for 4 min. The HClO<sub>4</sub> extracts were neutralized with 10 N KOH/0.1 M Tris and the precipitated KClO<sub>4</sub> was removed by centrifugation. Phosphate in the neutralized sample was determined with a standard colorimetric assay (Sumner, 1964).

### Enzyme activities

Activities of HK and GAPDH were assayed in monolayer cultures and spheroid extracts following standard protocols (Marín-Hernández et al., 2006). Monolayer cultures (15–20 mg protein/ml) and MCTS (10 mg/ml) re-suspended in 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT and 1 mM PMSF, pH 7.6, were subjected to three freeze-thaw cycles. The lysates were centrifuged at 39,000g for 20 min at 4°C and the supernatant was recovered to determine enzyme activity. Glycerol (10%, w/v) was added to preserve enzyme activities.

HK was assayed in 50 mM MOPS, pH 7.0, with the cellular extract (50–100  $\mu$ g protein/ml), 2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase (Roche, IN), 1 mM NADP<sup>+</sup>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP at 37°C. Reaction was started by adding 2 mM glucose after 1 min incubation. For GAPDH activity, cellular extracts (20–40  $\mu$ g protein/ml) were incubated in 50 mM MOPS, pH 7.0, with 5 mM cysteine, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 10 mM arsenate. Reaction was started by adding 1.5 mM glyceraldehyde 3-phosphate (Marín-Hernández et al., 2006). Both enzymatic assays yielded a linear response with



respect to the indicated range of protein. No reaction developed when the specific substrate was omitted in the assay. In addition, each activity was assayed in the presence of saturating substrate concentrations (at least 10 times above the  $K_m$  value).

COX activity was determined polarographically with a Clark-type oxygen electrode in monolayer culture cells and MCTS (0.5–1 mg protein/ml) permeabilized with 0.02% Triton X-100 in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 5 mM sodium ascorbate, and 50  $\mu$ M horse muscle cytochrome *c* at 30°C; the reaction was started by adding 2.7 mM N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (Brautigan et al., 1978; Hansford and Castro, 1985). At the end of each trace, 10 mM sodium azide was added. COX activity was calculated from the azide-sensitive oxygen consumption rate.

### Histochemistry of MCTS

From 5 to 10 spheroids were fixed in 70% methanol and incubated at 4°C overnight. Afterwards, the fixed-material was rinsed with fresh phosphate-buffer saline (PBS) medium, embedded in paraffin and sectioned into 3- $\mu$ m thick layers. Cut layers were stained with hematoxylin and eosin to determine histological changes.

### Western blot assay

HeLa cells cultured as monolayers or spheroids were mixed with Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing the anionic detergent Igepal P40 (0.5%) and a mixture of protease inhibitors (Calbiochem, CA). Samples containing 100  $\mu$ g protein and SDS-PAGE loading buffer with 5%  $\beta$ -mercaptoethanol were boiled for 5 min, and loaded on a 12.5% polyacrylamide gel. Electrophoretic transfer to nylon membranes (BioRad, CA) was followed by immunoblotting with anti-COX-IV, anti-HK-II, anti-GLUT-1, anti-HIF 1 $\alpha$ , anti-ANT (Santa Cruz, CA), and anti- $\beta$ -actin (Sigma Co., MO) human antibodies. This was followed by hybridization with a secondary antibody conjugated with peroxidase (Santa Cruz, CA). The signal was detected by chemi-luminescence using the ECL-Plus detection system (Amersham Bioscience, NJ).

### Half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) for glycolytic and oxidative phosphorylation inhibitors on HeLa MCTS growth

HeLa MCTS were cultured in DMEM and in the presence of glycolytic (2-DOG, gossypol) or oxidative (rhod 123, casll-gly, laherradurin) drugs. Inhibitors were sterilized by filtration and added at the beginning of the spheroid formation (day 5) at a final concentration of 2 nM to 2  $\mu$ M. The DMEM medium plus the inhibitor was also replaced every 24 h.

## Results

### MCTS growth curves

HeLa cells derived from a human cervico-uterine stage IV malignant tumor, whereas Hek293 cells came from a transformed embryonic kidney epithelial cells line, which shows a similar phenotype to that of fast-growing tumor cells regarding metabolic and physiological characteristics, that is, high HIF-1 $\alpha$  expression (Hu et al., 2003), active glycolysis (Zhang et al., 2003), and accelerated proliferation (von Wangenheim and Peterson, 1998).

The growth of spheroids was followed by measuring the orthogonal diameter. The initial aggregation of monolayer cells plated for spheroid formation lasted 4 (Hek-293) or 5 (HeLa) days (Fig. S1). These small cellular clusters transformed into compact spheroids at day 5 (Hek 293) or day 6 (HeLa), with a diameter of around 155  $\mu$ m. Young MCTS were collected on days 11–12 (HeLa) with an orthogonal diameter of  $479 \pm 37 \mu$ m,  $n = 40$ ; and days 8–9 (Hek293) with a diameter of  $370 \pm 105 \mu$ m,  $n = 20$ . The maximal diameter for HeLa spheroids ( $1,100 \pm 200 \mu$ m,  $n = 40$ ) was reached on days 14–15, and remained constant for 1 or 2 days more. On the other hand, the Hek293 MCTS reached their optimal growth ( $800 \pm 100 \mu$ m,  $n = 20$ ) on days 11–12, indicating a faster population doubling time. However, Hek293 MCTS did not reach the plateau phase in the growth curve due to faster spheroid disintegration after day 12 (Fig. S1, right part).

### Energy metabolism fluxes in young and old-MCTS

Young HeLa and Hek293 MCTS showed a similar rate of OxPhos (Table 1) to that determined in monolayer cultures (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). In contrast, old spheroids with a diameter around 1 mm showed threefold lower mitochondrial activity than young-MCTS or monolayer cultures (Rossignol et al., 2004) (Table 1). Despite the prolonged incubation with a high oligomycin concentration, the respiratory rates of HeLa and Hek293 old-MCTS were poorly inhibited ( $35 \pm 5\%$ ,  $n = 5$ ; and  $28\%$ ,  $n = 2$ , respectively), suggesting an active oxygen consumption not associated with OxPhos and possibly related to non-mitochondrial oxidases (Murphy et al., 1993). However, HeLa young- and old-MCTS were highly sensitive to cyanide (a respiratory complex IV inhibitor), thus indicating that all oxygen consumption derived from mitochondria (see legend in Table 1 for values).

A considerable increase of 2.4 and 4.2 times was determined in the rate of glycolysis of HeLa and Hek293 young spheroids, respectively, in comparison with their counterparts in monolayer cultures. Glycolysis increased 1.5–2 times in old-MCTS versus young MCTS (Table 1). The

TABLE 1. Energy metabolism in HeLa and Hek293 MCTS and monolayer cultures

	OxPhos ng atom oxygen (min mg protein) <sup>-1</sup>	Glycolysis nmol lactate (min mg protein) <sup>-1</sup>	% OxPhos for ATP supply	ATP (nmol/mg protein)	ADP (nmol/mg protein)	Pi (nmol/mg protein)	ATP/ ATP	ATP/ (ADP+Pi)
HeLa								
2D	19 ± 2 (5)	16 ± 1.5 (4)	75 ± 8	1.7 ± 0.1 (3)	0.5 ± 0.05 (3)	2.1 ± 0.1 (3)	3.4	1.6
Young-MCTS	27 ± 3 (6)	39 ± 19 (4)	63 ± 7	1.8 ± 0.2 (4)	0.6 (2)	2.5 ± 0.2 (3)	3	1.2
Old-MCTS	5 ± 3* (5)	60.5 ± 25* (6)	17 ± 10	0.7 ± 0.1* (4)	0.4 (2)	2.1 ± 0.25 (4)	1.7	0.8
Hek293								
2D	23 ± 4 (3)	9 ± 3 (3)	86 ± 15	1.6 ± 0.1 (3)	0.6 ± 0.1 (3)	2.7 ± 0.4 (3)	2.6	0.9
Young-MCTS	21 (2)	38 (2)	58	2.3 ± 1 (3)	0.32 (1)	1.9 (2)	2.8	1.4
Old-MCTS	8.5 (2)	81 (2)	20	0.48 (2)	0.71 (1)	3.2 ± 0.3 (3)	0.7	0.2

Oxidative and glycolysis fluxes were determined as described in the Materials and Methods Section. ATP derived from mitochondria was calculated by assuming an ATP/O ratio of 2.5 (Nakashima et al., 1984). OxPhos, oxidative phosphorylation; 2D, monolayer culture. Because the three-dimensional arrangement of tumor spheroids could diminish the oligomycin access to the inner area, a relatively long incubation (10 min) in the presence of high inhibitor concentration (5 or 10  $\mu$ M) was performed to ensure the total abolishment of OxPhos; longer incubation times (5–10 min more) did not increase the spheroid's sensitivity to oligomycin. Glycolysis was corrected for by subtracting the 2-DOG-insensitive lactate formation. The values shown represent the mean ± SEM with the number of different preparations assayed between parentheses.

\* $P < 0.05$  versus 2D cultures. Cyanide (0.6 mM) and rotenone (10  $\mu$ M) were also assayed on HeLa cellular respiration. Rotenone (complex I inhibitor) induced, after a 10-min incubation, a low inhibition on cellular respiration of monolayer (53%,  $n = 2$ ); young (50%,  $n = 1$ ) and old (60%,  $n = 1$ ) MCTS. In contrast, cyanide (complex IV inhibitor) immediately abolished 100% oxygen consumption in the three models assayed, without previous incubation.

hexose-phosphate isomerase inhibitor, 2-DOG, diminished 75–100% the glycolytic flux in both spheroid and monolayer cell cultures, indicating that lactate formation was derived from glucose-6-phosphate oxidation but not from glutaminolysis, a very active pathway in tumor cells (Reitzer et al., 1979; Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). In non-tumoral cells, cytosolic lactate may also be formed from glycogen. However, in the absence of exogenous glucose, glycolysis was close to zero in HeLa monolayers, young and old MCTS (data not shown). This observation indicated that glycogen degradation did not support glycolysis in HeLa cells and hence the measured glycolytic flux fully derived from exogenous glucose.

To evaluate the energy status of MCTS, the energy sensing parameters, ATP/ADP ratio and phosphorylation potential ( $ATP/(ADP \times Pi)$ ), were determined under glycolytic steady state conditions. For HeLa and Hek293 young-spheroids, no changes in the nucleotide and Pi contents respect to monolayer cells were observed (Table 1). In contrast, a significant diminution (60–70%) in the ATP content was determined in HeLa and Hek293 old-spheroids (Table 1), whereas no changes in the ADP and Pi contents were observed.

The change in ATP content in HeLa old-spheroids brought about a 50% diminution in both ATP/ADP and  $ATP/(ADP \times Pi)$  ratios (Table 1). Unfortunately, neither the ATP/ADP nor  $ATP/(ADP \times Pi)$  ratios have been evaluated in other tumor spheroids. Estimation of the contribution to the ATP supply by each pathway revealed that, in monolayer culture cells, 75% of ATP derived from OxPhos; in young spheroids the ATP supply was provided by both energy pathways and in old spheroids there was a drastic metabolite transition in which the ATP demand was predominantly supported by the glycolytic pathway (Table 1).

#### Content and activity of energy metabolism proteins in HeLa monolayer and MCTS

The relationship between the energy metabolic fluxes with the expression pattern of relevant oxidative (COX-IV and ANT) and glycolytic (GLUT-1, HK-II, and GAPDH) proteins and the HIF-1 $\alpha$  levels was examined in the three HeLa cell systems. Western blot analysis revealed an increase of 3.3 times in HIF-1 $\alpha$  levels in young and old-MCTS in comparison to

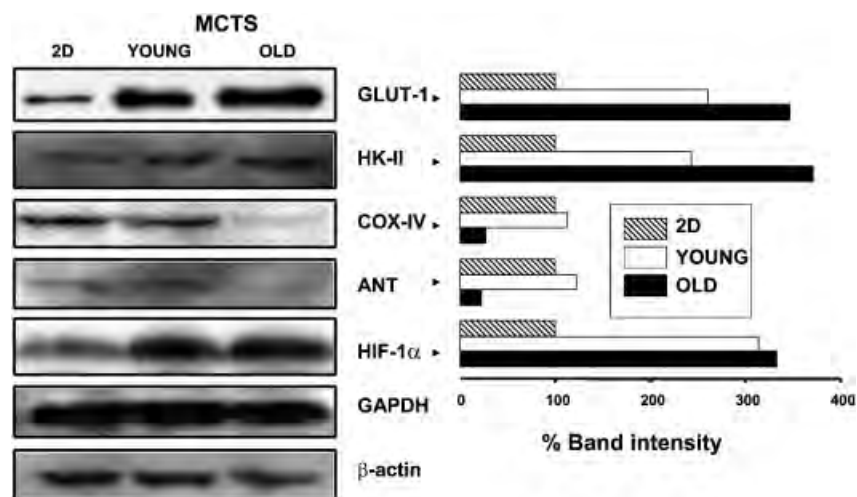
monolayer culture cells (Fig. 1). As a result of HIF-1 $\alpha$  over-expression, HK-II (2.4–3.7 times) and GLUT-1 (2.6–3.4 times) proteins also increased markedly in young and old-MCTS. In contrast, significant lower levels of ANT (4.5 times) and COX-IV (3.7 times) were detected in both types of HeLa spheroids in comparison with monolayer cells (Fig. 1).

The immunohistochemical analysis showed that HK-II and GAPDH localization was apparent in all areas of young spheroids, although in the central area their contents were lower than in the periphery area (data not shown).

The relative content of protein, determined by Western blotting, correlated with the maximal activities of glycolytic and oxidative enzymes. The HK activity was significantly higher in old-MCTS (2.5 times) than in monolayer culture cells, whereas a similar GAPDH activity pattern was determined for the three experimental systems (Table 2). On the other hand, COX activity diminished 88% in old MCTS in comparison with monolayer cells (Table 2).

#### Effect of glycolytic or oxidative inhibitors on HeLa MCTS growth

To evaluate the hypothesis that spheroids growth can be modulated by using drugs affecting energy metabolism (Moreno-Sánchez et al., 2007), the effect of glycolytic (2-DOG, gossypol) and oxidative (cas-Ilgly, rhod 123, laherradurin) inhibitors on HeLa spheroid formation and growth was determined. Casiopeina II-gly and rhodamine 123 diminish the mitochondrial activity due to their respiratory chain inhibitory and uncoupling effect, respectively (Lampidis et al., 1983; Marín-Hernández et al., 2003). Laherradurin, an acetogenin derived from *Annonaceae* plants, is a very potent respiratory chain site I inhibitor (González-Coloma et al., 2002). On the other hand, gossypol inhibits GAPDH and lactate dehydrogenase activities (Qian and Wang, 1984). Both types of metabolic inhibitors abolished the spheroid growth at clinically relevant low (nanomolar) doses (Fig. 2A). Furthermore, the  $IC_{50}$  values determined in MCTS were lower than those estimated for HeLa monolayer cultures (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). Because the growth sensitivity towards metabolic inhibitors (Table 3, Fig. 2B) was determined in old-spheroids in which glycolysis predominates, the  $IC_{50}$  values showed that



**Fig. 1.** Western blot analysis of ANT, COX-IV, HK-II, GLUT-1, GAPDH, and HIF-1 $\alpha$  in monolayer and spheroids of HeLa cells. Intensity band was normalized against actin (ANT, HK-II, and GLUT-1) or GAPDH (COX-IV and HIF-1 $\alpha$ ). For densitometry analysis, 2D-monolayer contents were considered as 100% after normalization with actin or GAPDH. Data are representative of two independent assays.

TABLE 2. Changes in mitochondrial and glycolytic enzyme activities in monolayer cultures and spheroids of HeLa cells

	2D	Young MCTS	Old MCTS
		mU (mg prot) <sup>-1</sup>	
COX	20 ± 8 (5)	40 (2)	2.4 ± 1.6* (3)
HK	40 ± 20 (5)	50 ± 20 (3)	100 ± 30* <sup>a</sup> (3)
		U (mg prot) <sup>-1</sup>	
GAPDH	1.4 ± 0.6 (4)	1.1 ± 0.2 (3)	2 ± 0.1 (3)

Enzyme activities were determined as described in the Materials and Methods Section. The values represent the mean ± SD with the number of independent preparations assayed between parentheses.

\*P < 0.01 versus monolayer culture.

<sup>a</sup>P < 0.01 versus young-spheroid.

glycolytic inhibitors were more potent blockers of MCTS growth than oxidative inhibitors; IC<sub>50</sub> values of glycolytic inhibitors were 6- to 11-fold higher for spheroids growth at day 12 (data not shown). Unfortunately, the toxic effect of energy metabolism drugs has not been evaluated in other tumor spheroids.

Discussion

Morphology and growth of MCTS

The monolayer culture cell model has been traditionally used to advance in the understanding of the biochemistry and physiology of tumors. However, it has been realized that data obtained from monolayer cultures often fail to reproduce the biological phenomena observed in vivo (Camphausen et al., 2005; Leek et al., 2005). To this regard, the model of multi-cellular tumor spheroids (MCTS) has been developed to simulate the micro-environment of solid tumor in which micro-regions with different phenotypes evolve as a consequence of increasing distances from the nourishing capillaries (Sutherland, 1988; Kunz-Schughart et al., 2004). Encouragingly, the histological examination and drug

TABLE 3. Toxicity index (IC<sub>50</sub>) for glycolytic and mitochondrial inhibitors on HeLa spheroids formation and growth

Inhibitor	IC <sub>50</sub> (nM)
2-DOG	17
gossypol	15.5 ± 10 (n = 3)
rhod 123	104 ± 21 (n = 3)
casII-gly	113
laherradurin	136 (n = 2)

For estimation of IC<sub>50</sub> values, orthogonal diameters of day 18 spheroids were determined at different inhibitor concentrations. Number of independent preparations assayed is indicated between parentheses; for 2-DOG and casII-gly, n = 1.

toxicological response of MCTS reveal striking similarities with solid tumors (Leek et al., 2005). Therefore, the energy metabolism exhibited by the MCTS model might be similar to that found during the in vivo initial stages and avascular micro-regions of solid tumor formation.

HeLa and Hek293 spheroids (cf. Fig. S1) showed a similar growth behavior to that described for human carcinoma HepG2, human glioblastoma SNB19, mouse mammary EMT6 spheroids (Bourrat-Floeck et al., 1991; Hauptmann et al., 1998; Kelm et al., 2003), and T47-D and Hek293 spheroids (Gallardo-Pérez JC and Maldonado V, unpublished work). In all these models the maximal diameters reached were around 1 mm.

Hek293 MCTS did not reach the plateau phase in the growth curve due to faster spheroid disintegration after day 12 (cf. Fig. S1); a similar pattern has also been described for glioma BMG-1 (Khaitan et al., 2006). The presence of a necrotic zone in the center of spheroids with large diameters is a well documented phenotypic characteristic (Sutherland, 1988; Freyer et al., 1991; Pavelic et al., 1991; Hauptmann et al., 1998; Walenta et al., 2000). HeLa spheroids developed a large central necrotic area (cf. supplemental Fig. S2) as has also been described for 30-day-old EMT6/Ro spheroids (Freyer, 1988a; Freyer et al., 1991). Certainly, the development of a necrotic central region in old-spheroids may lead to an underestimation of functional parameters when referring data to total protein content; thus, it seems appropriate to correct for dead cells, which usually amount to about 30% of spheroids mass (data not shown).

Is there a diminished mitochondrial function during MCTS growth?

The high rates of OxPhos determined in young spheroids and monolayer culture cells (see Table 1) were similar to the total oxygen consumption rates documented in melanoma WIX-c 600-µm spheroids and monolayer cells (Hystad and Rofstad, 1994), and in Rat1-T1 500-µm spheroids (Wu et al., 1999). Furthermore, the marked diminution in OxPhos capacity in HeLa and Hek293 old-spheroids in comparison to their respective young counterparts (see Table 1) agreed with the diminution (1.2–4.5 times) in cellular oxygen consumption described for large spheroids (diameter >800 µm) from tumor human glioma U-118MG, human colon carcinoma HT29 (Carlsson and Acker, 1988), rat glioma C6 (Acker et al., 1992), rat transformed fibroblast Rat1-T1 and MRI (Kunz-Schughart et al., 2000), mouse mammary tumor EMT6/Ro (Freyer, 1988b), and normal hamster fibroblast V-79 (Freyer et al., 1984).

However in these last studies and others, where oxygen consumption has been analyzed (Freyer et al., 1984; Carlsson and Acker, 1988; Freyer, 1988b; Acker et al., 1992; Hystad and Rofstad, 1994; Kunz-Schughart et al., 2000), the oligomycin-sensitive respiration was not assessed. Therefore, due to the high non-mitochondrial oxidase activities, especially heme oxygenase (Murphy et al., 1993), and cytochrome P<sub>450</sub> activity

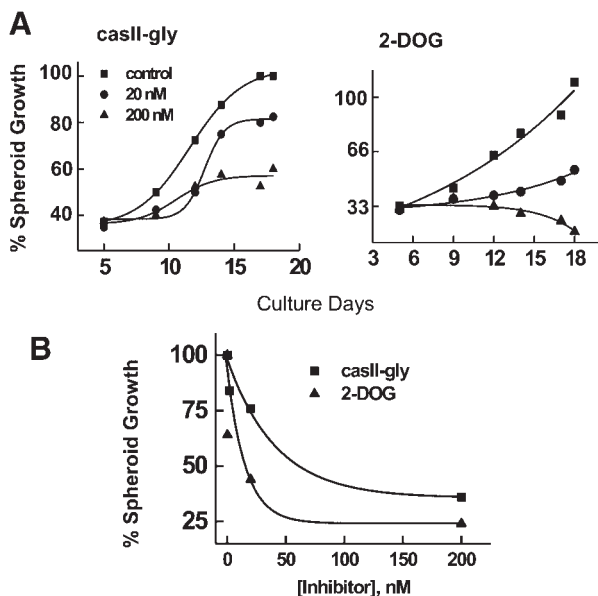


Fig. 2. Effect of oxidative and glycolytic inhibitors on HeLa MCTS growth. Spheroids were grown as described under Materials and Methods Section. Glycolytic and oxidative inhibitors were added at the beginning of spheroid formation (day 5). Spheroids growth values were normalized versus non-inhibited growth at day 18 (diameter of 1.1 ± 0.2 mm; n = 40).



(Yu et al., 2001), detected in tumor spheroids versus monolayer, and to the mitochondrial  $H^+$  passive diffusion that also consumes oxygen, OxPhos has not been rigorously determined.

Indeed, oligomycin-sensitive respiratory rate of HeLa and Hek293 young spheroids was similar to that of their monolayer culture counterpart. This observation indicated that (i) young spheroids consume oxygen at high rates even in the presence of glucose (cf. Table 1), that is, a negligible Crabtree effect is apparent, and that (ii) the hydrophobic specific ATP synthase inhibitor, oligomycin, may access its specific target in spheroids, after providing adequate concentration and time of incubation. In ascites tumor cells, the Crabtree effect is strong, as exogenous glucose inhibits the OxPhos flux by 60–80% through a multi-site mechanism involving changes in the intracellular pH and Pi content (Rodríguez-Enriquez et al., 2001). OxPhos of HeLa monolayer cells is also sensitive to glucose inhibition although to a lower extent than ascites cells (Melo et al., 1998). Therefore, the most appropriate physiological condition to determine OxPhos should be in the presence of physiological glucose.

Whereas the mitochondrial function in young spheroids has been overlooked or ignored, several hypotheses have been proposed to explain the diminution in mitochondrial functionality in mature spheroids. In 800- $\mu\text{m}$  EMT6/Ro spheroids, mitochondrial content was lower than in monolayer culture cells, but a marked increase in the content of lysosomes and phagolysosomes has been described (Bredel-Geissler et al., 1992), suggesting an active mitochondrial digestion or mitophagy (Rodríguez-Enriquez et al., 2006b). In 1,300- $\mu\text{m}$  Rat1-T1 and MRI old spheroids, a significant diminution in rhodamine 123 uptake has been determined in comparison with 300- $\mu\text{m}$  young spheroids (Kunz-Schughart et al., 2001), suggesting loss of mitochondrial function rather than of mitochondrial content.

A second hypothesis suggests that, in old spheroids (EMT6/Ro, L9), the decrease in the rate of respiration can be attributed to a progressive accumulation of quiescent cells in inner regions of the viable rim (Sutherland, 1988). Although the mechanisms leading to cellular quiescence in the inner regions of spheroids are unknown, it has been shown that an acidic pH or substrate limitation does not induce it (Freyer and Sutherland, 1986). Therefore, other factors, such as intercellular contact, absence of mitogenic agents or the presence of growth-inhibitory factors may participate as inducers of this process (Freyer and Sutherland, 1986). Interestingly, the existence of a “quiescence program” that contains genes that force the cell to a non-dividing state has been demonstrated in human fibroblasts. By using micro-array analysis, it was shown that some genes that encode for enzymes of carbohydrate metabolism are up-regulated during cellular quiescence (Coller et al., 2006); however, this evaluation has not been performed for OxPhos enzymes.

A third hypothesis suggests that the reduced respiration is the result of inward oxygen, ATP and nutrient gradients, as well as outward metabolite (lactate) gradients, analogous to the situation in poorly vascularized regions of solid tumors (Kunz-Schughart et al., 2004). However, we determined that intact HeLa old-MCTS exhibited almost identical OxPhos and glycolysis rates (see Table 1) to those determined in dissociated old-MCTS: 2.6 ngAO/(min  $\times$  mg protein) and 56.6 nmol lactate/(min  $\times$  mg protein), respectively, as has also been reported for old V-79 fibroblast spheroids (Freyer et al., 1984). These observations suggest that the old spheroid microenvironment did not affect directly oxygen consumption of cells inside spheroids, that is, the changes in the mitochondrial metabolism were not an effect of substrate (oxygen, glucose or glutamine) limitation (see section of “Underlying mechanisms. . .” below).

As a consequence of the low OxPhos capacity, cellular ATP levels of both HeLa and Hek293 old-spheroids declined 60–70% as compared with young spheroids or monolayer culture cells. A significant ATP reduction in other old spheroids (EMT6, T-47D, Rat1-T1, MRI) has been determined by means of histographic mapping, imaging bioluminescence, or HPLC (Kunz-Schughart et al., 2001; Valenta et al., 1990, 2002). Unfortunately, in most of these studies, the ATP levels were not determined in their monolayer cultures counterparts. The ATP content determined in the present study is within the same range reported for HeLa monolayer culture cells (Marín-Hernández et al., 2006) and for young T-47D and EMT6 spheroids determined by HPLC (Valenta et al., 2002) and NMR (Ronen et al., 1991).

The reduction in ATP content promoted a marked decrease in the ATP/ADP and phosphorylation potential ratios (cf. Table 1). Both parameters are directly related with the cellular energy status during proliferation. The ATP/(ADP $\times$ Pi) ratio reflects the free energy available for ATP-demand processes. When the ATP level decreases, spheroids proliferation may diminish because several ATP-dependent enzymes and cellular processes may diminish their activities (Schwacha and Bell, 2001). On the contrary, ADP and Pi content did not change in old HeLa spheroids in comparison with monolayer cultures and young spheroids. In this regard, it has been shown by means of  $^{31}\text{P}$ -NMR that Pi content does not change in 447- $\mu\text{m}$  and 1,067- $\mu\text{m}$  EMT6/Ro spheroids; but, in older spheroids (diameter  $> 1,500\text{-}\mu\text{m}$ ), a decrease of 30–40% was determined (Freyer et al., 1991). Thus, the present results indicate that in young HeLa-MCTS the ability to maintain an elevated energy status (high ATP, ATP/ADP, and ATP/(ADP  $\times$  Pi) ratios) is preserved, whereas in old MCTS the energy status is significantly decreased.

### Enhanced glycolysis in MCTS

Glycolysis rates in HeLa and Hek293 spheroids were 2.4–4 times (young spheroids) and four- to ninefold (old spheroids) higher than in monolayer culture cells. In human glioma BMG-1 old-spheroids, glycolysis was also 2.5 times higher than in monolayer cells (Khaitan et al., 2006). In contrast, in old spheroids of transformed fibroblast MRI, rat glioma C6, and human glioma U-118 MG, glycolysis diminished 1.3–5 times in comparison with young spheroids. In Rat1-T1, glycolysis either increased (1.4 times) (Kunz-Schughart et al., 2000) or remained constant (Valenta et al., 2000) during spheroid formation.

In all these studies, glycolysis has been determined in the presence of external glucose. However, to attain the true value of glycolysis rate, flux should be determined also in the absence of exogenous glucose and in the presence of glycolytic inhibitors (2-DOG, arsenite or iodoacetic acid) to correct for the glycogenolysis and glutaminolysis contribution to lactate formation, respectively. In the present study, the glycolytic flux was also evaluated in the absence of added glucose and in the presence of 2-DOG to assess how much lactate and ATP derived actually from external glucose.

The enhanced glycolysis in old HeLa and Hek293 spheroids correlated with the increment in protein expression and activity of HK (cf. Table 2 and Fig. 1), one of the steps with high flux-control in fast-growth tumor cells (Marín-Hernández et al., 2006). Although HK activity increased 2.5 times in HeLa-old spheroids, this enzyme was still slower than the rest of the glycolytic enzymes evaluated in HeLa monolayer cultures (Marín-Hernández et al., 2006). Interestingly, the protein content and activity of GAPDH, an enzyme with negligible control on the glycolysis flux, did not significantly change in the three experimental systems used (cf. Fig. 1 and Table 2). These observations indicate that HK may be considered as a target to

diminish proliferation rate in tumor spheroids or solid tumors larger than 1 mm.

### Underlying biochemical mechanisms governing the energy metabolic transition in MCTS

In tumor cells, enhanced glycolysis is associated with hypoxia. However, it should be noted that, although the  $O_2$  concentration in the center of solid tumor and three-dimensional spheroids is lower (8–57  $\mu M$ ) than in well-aired tissues (Vaupel et al., 1989; Gorlach and Acker, 1994); the  $K_m$  of COX for  $O_2$  is 0.1–0.4  $\mu M$  (Gnaiger et al., 1998; Pecina et al., 2004). In consequence, the lower  $O_2$  concentration in the central area of tumors is not expected to affect COX activity and, hence, neither the respiratory and OxPhos rates. Therefore, the significant diminution (70–90%) in the OxPhos and COX activity found in HeLa-old spheroids suggests that the mechanism involved was an adaptive transcriptional change in the enzyme expression pattern induced by a relatively long exposure to hypoxia (for details see Moreno-Sánchez et al., 2007) instead of a kinetic  $O_2$  limitation (Warburg, 1956; Weber, 2001; Stubbs et al., 2003; Xu et al., 2005).

Hypoxia stabilizes HIF-1 $\alpha$  that, in turn, induces gene expression of several glycolytic enzymes (Dang and Semenza, 1999; Robey et al., 2005; Moreno-Sánchez et al., 2007). The levels of HIF-1 $\alpha$  in HeLa spheroids increased proportionally with the spheroid age (6.2 times) as compared with monolayer culture cells (cf. Fig. 1). Furthermore, the over-expression of HIF-1 $\alpha$  in old HeLa spheroids was accompanied by increased HK-II and GLUT-1 activities and protein levels (cf. Table 2 and Fig. 1) and glycolytic flux (cf. Table 1); as well as decreased COX activity and protein level (cf. Table 2 and Fig. 1), OxPhos flux, ATP level, and phosphorylation potential (cf. Table 1).

In BMG-1 old spheroids, HIF-1 $\alpha$  is also increased as compared to young spheroids, whereas HIF-1 $\alpha$  is not detected in BMG-1 monolayer cultures, suggesting that the high oxygen level in two-dimensional cultures induces HIF-1 $\alpha$  degradation (Khaitan et al., 2006). Unfortunately, in this last study, the  $\beta$ -actin western blot assay used to monitor protein charge in monolayer cultures was also used for spheroids, raising confusion in data interpretation. In contrast, a low, but significant content of HIF-1 $\alpha$  was detected in HeLa monolayer cells under normoxia (cf. Fig. 1). HIF-1 $\alpha$  expression is indeed not detected in several monolayer carcinomas (MCF-7 breast, HT-29 colon, MiaPaCa pancreatic, A549 lung and BX-PC3 prostate cancer), whereas an endogenous level of HIF-1 $\alpha$  is observed in highly metastatic cell lines (MDA-mb-435, U87 glioblastoma, DU145 prostate, renal carcinomas RCCA, and HeLa; Robey et al., 2005).

The HIF-1 $\alpha$  levels in young- and old-spheroids were similar (cf. Fig. 1), whereas the glycolysis rate was higher in old-spheroids (cf. Table 1). This observation suggested that the hypoxic region formed in young-spheroids induced HIF-1 $\alpha$  expression, which, in turn, stimulated expression of glycolytic proteins and, hence, glycolysis. This HIF-1 $\alpha$  effect seemed to be accumulative with time since, in old-spheroids, the glycolytic rate was further increased, but without increasing the HIF-1 $\alpha$  level.

HIF-1 $\alpha$  may contribute to decrease the OxPhos flux by (i) inactivating the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex through trans-activation of the PDH kinase 1 gene (Kim et al., 2006), and (ii) promoting COX-subunit 4 degradation (Dang et al., 1997). Other mitochondrial proteins have not yet been identified as HIF-1 $\alpha$  targets. The tumor suppressor p53 accumulates in the cell after hypoxia treatment and also stabilizes glycolytic enzymes (Mathupala et al., 1997; An et al., 1998). HIF-1 $\alpha$  stabilizes p53 protein avoiding its proteasomal degradation. In tumor spheroids, mutations in p53 maintain cellular survival and proliferation under hypoxic conditions

(Royds et al., 1998). Deficiency in p53 causes a small reduction (25%) in the total  $O_2$  consumption rate and COX activity of HCT116 human colon cancer, suggesting that p53 is not the main transcription factor involved in decreasing OxPhos of old-spheroids (Matoba et al., 2006).

The increased anaerobic glycolysis during MCTS growth leads to intracellular acidosis. An acidic pH (range 6–6.5) may markedly diminish the activity of several glycolytic enzymes, that is, mitochondrial-bound HK (62%) and PFK-1 (50%) (Hand and Carpenter, 1986; Miccoli et al., 1996). However, pH determination in different spheroids (HT29, U118MG, V79-379A, EMT6, HTH7) has revealed a change of only 0.3–0.4 pH units from the center (pH 6.9–7.05) to the periphery (pH 7.3–7.4), indicating that the effect on glycolytic enzymes might not be so severe (Acker et al., 1987; Carlsson and Acker, 1988; Gorlach and Acker, 1994; Vaupel and Schaefer, 1994). On the other hand, a decrease in the intracellular pH in hepatocytes to 6.8 induces a 50% lowering in the ATP/ADP ratio and cytochrome c oxidase activity (Kashiwagura et al., 1984; Brandt and Okun, 1997). These observations suggest that OxPhos may be more affected than glycolysis by the moderate pH variation during spheroids formation and growth. It has been documented that an acidic pH affects DNA synthesis and cell proliferation (Pouyssegur et al., 1984), but these phenomena occur at non-physiological pH values (close to 4.8).

### Metabolic drug therapy

Energy metabolism has been used as a target for antitumor therapy (see for a review Moreno-Sánchez et al., 2007). However, most of these studies have been carried out with cells from monolayer cultures. In this regard, it has been documented that the ineffectiveness of chemotherapy (with cisplatin or adriamycin) and radiotherapy on spheroid models is related to the presence of an altered cellular shape in the three-dimensional model, that is, development of intercellular membrane contacts and junctions and increased cell–cell contact, which alter the DNA-folding, causing low drug-DNA interaction or low DNA exposure to radiation (Olive and Durand, 1985; Sutherland, 1988).

On the other hand, identification of the main pathway for ATP supply in three-dimensional models opens the possibility of using glycolytic and oxidative inhibitors as a selective strategy to stop tumor proliferation. Indeed, 2-DOG and gossypol at nanomolar concentrations and after chronic exposure diminished tumor growth (cf. Fig. 2 and Table 3). Rhod 123, casil-gly or laherradurin also blocked tumor growth in the nanomolar range, suggesting that spheroids growth also depends on ATP derived from mitochondria. In this regard, it has been documented that more than 50% of HK is bound to the mitochondrial inner membrane in HeLa cells (Marín-Hernández et al., 2006), making glycolysis dependent on the OxPhos ATP supply.

HeLa monolayer culture is resistant to glycolytic inhibitors (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a). The  $IC_{50}$  values of HeLa monolayer culture cells for gossypol (6  $\mu M$ ), rhodamine 123 (0.09  $\mu M$ ), and casil-gly (0.4  $\mu M$ ) were one to three orders of magnitude higher (Rodríguez-Enríquez et al., 2006a) than the  $IC_{50}$  values found for the same inhibitors in spheroids growth (cf. Fig. 2 and Table 3). 2-DOG increases 2–3 times the sensitivity to radiation in human glioma spheroids in comparison with monolayer culture cells (Khaitan et al., 2006). Therefore, other energy metabolism inhibitors might increase also the sensitivity to radio- and, probably, chemo-therapy.

### Concluding Remarks

The present study provides a detailed energy metabolism characterization of multi-cellular tumor spheroids. In early stages of spheroid formation, a high ATP demand evolves from

several active processes (proliferation, transport systems, gene activation, ion homeostasis, biosynthesis of macromolecules). In young spheroids, a necrotic area has not been formed (cf. supplemental Fig. S2) and the cells maintain a high metabolic rate (high glycolytic and OxPhos fluxes, and high HK and COX activities) (cf. Tables 1 and 2), despite the presumed limitation in O<sub>2</sub> and substrates diffusion that induces over-expression of HIF-1 $\alpha$  (Fig. 1) and, possibly, of other transcription factors. After further, prolonged exposure to a hypoxic environment under which spheroids keep growing and reach maturation, a necrotic area develops in the center; in parallel, COX expression and activity and OxPhos decrease. Seeking to compensate for the diminution of OxPhos rate in old spheroids, the glycolytic flux is increased fourfold and, although, a lower ATP level is maintained (cf. Table 1), this suffices to preserve spheroid viability. Therefore, the change in the glycolysis and OxPhos protein expression and activity during spheroids growth provide a biochemical understanding of the atypical energy metabolism in tumor cells and indicate strategies to diminish their high proliferation rate.

### Acknowledgments

The authors thank Mr. Rodrigo Velázquez for his expert help with the light microscopy preparations and Dr. Adelina Schlie (Universidad Autónoma de Chiapas) for providing laherradura. This study was supported by CONACyT-Mexico (Salud-2002-C01-7677 and SEP-2007-60517).

### Literature Cited

- Acker H, Carlsson J, Holterman G, Nederman T, Nylen T. 1987. Influence of glucose and buffer capacity in the culture medium on growth and pH in spheroids of human thyroid carcinoma and human glioma origin. *Cancer Res* 47:3504–3508.
- Acker H, Holtermann G, Bolling B, Carlsson J. 1992. Influence of glucose on metabolism and growth of rat glioma cells (C6) in multicellular spheroid culture. *Int J Cancer* 52:279–285.
- An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepec E, Blagosklonny MV, Neckers LM. 1998. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Nature* 392:405–408.
- Bergmeyer HU. 1974. Methods of enzymatic analysis. Weinheim: Verlag Chemie.
- Bourrat-Floek B, Groebe K, Mueller-Klieser W. 1991. Biological response of multicellular EMT6 spheroids to exogenous lactate. *Int J Cancer* 47:792–799.
- Brandt U, Okun JG. 1997. Role of deprotonation events in ubiquinone: Cytochrome c reductase from bovine heart and yeast mitochondria. *Biochemistry* 36:11234–11240.
- Brautigan DJ, Ferguson-Miller S, Margoliash E. 1978. Mitochondrial cytochrome c: Preparation and activity of native and chemically modified cytochromes c. *Methods Enzymol* 53:128–164.
- Bredel-Geissler A, Karbach U, Walenta S, Vollrath L, Mueller-Klieser W. 1992. Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumor cells in monolayer and spheroid culture. *J Cell Physiol* 153:44–52.
- Camphausen K, Purow B, Sproull M, Scott T, Ozawa T, Deen DF, Tofilon PJ. 2005. Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: Convergent profiles under orthotopic conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8287–8292.
- Carlsson J, Acker H. 1988. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer* 42:715–720.
- Carlsson J, Yuhas JM. 1984. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Cancer Res* 95:1–23.
- Coller HA, Sang L, Roberts JM. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol* 4:e83.
- Dang CV, Semenza GL. 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24:68–72.
- Dang CV, Lewis BC, Dolde C, Dang G, Shim H. 1997. Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 29:345–354.
- Freyer JP. 1988a. Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids. *Cancer Res* 48:2432–2439.
- Freyer JP. 1988b. Partial purification of a protein growth inhibitor from multicellular spheroids. *J Cell Physiol* 176:138–149.
- Freyer JP, Sutherland RM. 1985. A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *J Cell Physiol* 124:516–524.
- Freyer JP, Sutherland RM. 1986. Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply. *Cancer Res* 46:3513–3520.
- Freyer JP, Tustanoff E, Franko AJ, Sutherland RM. 1984. In situ oxygen consumption rates of cells in V-79 multicellular spheroids during growth. *J Cell Physiol* 118:53–61.
- Freyer JP, Schor PL, Jarret KA, Neeman M, Sillerud LO. 1991. Cellular energetics measured by phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy are not correlated with chronic nutrient deficiency in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 51:3831–3837.
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R. 1998. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201:1129–1139.
- González-Coloma A, Guadano A, de Inés C, Martínez-Díaz R, Cortés D. 2002. Selective action of acetogenin mitochondrial complex I inhibitors. *Z Naturforsch* 57:1028–1034.
- Gorlach A, Acker H. 1994. pO<sub>2</sub>- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1227:105–112.
- Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V. 2002. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 364:309–315.
- Hand S, Carpenter J. 1986. pH-induced hysteretic properties of phosphofructokinase purified from rat myocardium. *Am J Physiol* 250:R505–R511.
- Hansford RG, Castro F. 1985. Role of Ca<sup>2+</sup> in pyruvate dehydrogenase interconversion in brain mitochondria and synaptosomes. *Biochem J* 227:129–136.
- Hauptmann S, Gebauer-Hartung P, Leclere A, Denkert C, Pest S, Klosterhalfen B, Diel M. 1998. Induction of apoptosis in the centre of multicellular tumour spheroids of colorectal adenocarcinomas—Involvement of CD95 pathway and differentiation. *Apoptosis* 3:267–279.
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-2 $\alpha$  in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23:9361–9374.
- Hystad ME, Rofstad EK. 1994. Oxygen consumption rate and mitochondrial density in human melanoma monolayer cultures and multicellular spheroids. *Int J Cancer* 57:532–537.
- Kashiwagura T, Deutsch CJ, Taylor J, Erecinska M, Wilson DF. 1984. Dependence of gluconeogenesis, urea synthesis, and energy metabolism of hepatocytes on intracellular pH. *J Biol Chem* 259:237–243.
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenecker M, Nielsen LK. 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotech Bioeng* 83:173–180.
- Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line: Implications for tumor therapy. *J Transl Med* 4:12.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3:150–151.
- Kunz-Schughart LA, Doetsch J, Müller-Klieser W, Groebe K. 2000. Proliferative activity and tumorigenic conversion: Impact on cellular metabolism in 3-D culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C765–C780.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. 2004. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9:273–285.
- Kunz-Schughart LA, Habbersett RC, Freyer JP. 2001. Impact of proliferative activity and tumorigenic conversion on mitochondrial function of fibroblasts in 2D and 3D culture. *Cell Biol Int* 25:919–930.
- Lampidis TJ, Bernal SD, Summerhayes IC, Chen LB. 1983. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 43:716–720.
- Leek RD, Stratford I, Harris AL. 2005. The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Res* 65:4147–4152.
- Marín-Hernández A, Gracia-Mora I, Ruiz-Ramírez L, Moreno-Sánchez R. 2003. Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopinas) on mitochondrial functions. *Biochem Pharmacol* 65:1979–1989.
- Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R. 2006. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273:1975–1988.
- Mathupala S, Heese C, Pedersen PL. 1997. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 272:22776–22780.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wrang O, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650–1653.
- Melo RF, Stevan FR, Campello AP, Carnieri EG, de Oliveira MB. 1998. Occurrence of the Crabtree effect in HeLa cells. *Cell Biochem* 16:99–105.
- Miccoli L, Oudard S, Sureau F, Poirson F, Dutrillaux B, Poupon MF. 1996. Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. *Biochem J* 313:957–962.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274:1393–1418.
- Mueller-Klieser W, Freyer JP, Sutherland RM. 1986. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br J Cancer* 53:345–353.
- Murphy BJ, Laderoute VR, Vreman HJ, Grant TD, Gill NS, Stevenson DK, Sutherland RM. 1993. Enhancement of heme oxygenase expression and activity in A431 squamous carcinoma multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 53:2700–2703.
- Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL. 1984. Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res* 44:5702–5706.
- Olive PL, Durand RE. 1985. Effect of intercellular contact on DNA conformation, radiation-induced DNA damage, and mutation in Chinese hamster V79 cells. *Radiat Res* 101:94–101.
- Pavelic K, Slaus NP, Spaventi R. 1991. Growth factors and proto-oncogenes in early mouse embryogenesis and tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 35:209–214.
- Pecina P, Gnaiger E, Zeman J, Pronicka E, Houstek T. 2004. Decreased affinity for oxygen of cytochrome-c oxidase in Leigh syndrome caused by SURF1 mutations. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1384–C1388.
- Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, L'Allemain G, Paris S. 1984. A specific mutation abolishing Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in hamster fibroblast precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4833–4837.
- Qian SZ, Wang ZG. 1984. Gossypol: A potential antifertility agent for males. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24:329–360.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254:2669–2676.
- Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ. 2005. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 7:324–330.
- Rodríguez-Enríquez S, Juárez O, Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R. 2001. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur J Biochem* 268:2512–2519.
- Rodríguez-Enríquez S, Flores-Rodríguez FL, Vital-González PA, Marín-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R. 2006a. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 215:208–217.
- Rodríguez-Enríquez S, Kim I, Currin RT, Lemasters JJ. 2006b. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* 2:39–46.
- Ronen SM, Rushkin E, Degani H. 1991. Lipid metabolism in T47D human breast cancer cells: 31P and 13C-NMR studies of choline and ethanolamine uptake. *Biochim Biophys Acta* 1095:5–16.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. 2004. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64:985–993.

- Royds JA, Dower SK, Qvarnstrom EE, Lewis CE. 1998. Response of tumour cells to hypoxia: Role of p53 and NFkB. *Mol Pathol* 51:55–61.
- Schwacha A, Bell SP. 2001. Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. *Mol Cell* 8:1093–1104.
- Stahl A, Frick A. 1978. Enzymic micro-assay for blood glutamine. *Clin Chem* 24:1730–1733.
- Stubbs M, Bashford CL, Griffiths JR. 2003. Understanding the tumor metabolic phenotype in the genomic era. *Curr Mol Med* 3:49–59.
- Sumner JB. 1964. A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science* 100:413–414.
- Sutherland RM. 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science* 240:177–184.
- Sweet S, Singh G. 1995. Accumulation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells at two energetic cell cycle checkpoints. *Cancer Res* 55:5164–5167.
- Vaupel P, Schaefer C. 1994. Intracellular acidosis in murine fibrosarcomas coincides with ATP depletion, hypoxia, and high levels of lactate and total Pi. *NMR Biomed* 7:128–136.
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review. *Cancer Res* 49:6449–6465.
- von Wangenheim KH, Peterson HP. 1998. Control of cell proliferation by progress in differentiation: Clues to mechanisms of aging, cancer causation and therapy. *J Theor Biol* 193:663–678.
- Walenta S, Dotsch J, Mueller-Klieser W. 1990. ATP concentrations in multicellular tumor spheroids assessed by single photon imaging and quantitative bioluminescence. *Eur J Cell Biol* 52:389–393.
- Walenta S, Dotsch J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. 2000. Metabolic imaging in multicellular spheroids of oncogene-transfected fibroblasts. *J Histochem Cytochem* 48:509–522.
- Walenta S, Feigk B, Wachsmuth I, Dunkern T, Degani H, Muller-Klieser W. 2002. Differential changes in purine nucleotides after doxorubicin treatment of human cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 21:289–296.
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–314.
- Weber G. 2001. Ordered biochemical program of gene expression in cancer cells. *Biochemistry (Mosc)* 66:1164–1173.
- Wu FJ, Friend JR, Rimmel RP, Cerra FB, Hu WS. 1999. Enhanced cytochrome P450 IA1 activity of self-assembled rat hepatocyte spheroids. *Cell Transplant* 8:233–246.
- Xu R, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P. 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65:613–621.
- Yu LJ, Matias J, Scudiero DA, Hite KM, Monks A, Sausville EA, Waxman DJ. 2001. P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. *Drug Metab Dispos* 29:304–312.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. 2003. Impairment of human ether-à-go-go-related gene (HERG) K<sup>+</sup> channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 278:10417–10426.
- Zu XL, Guppy M. 2004. Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 313:459–465.



# ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES EN LA EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ANTICANCEROSAS\*

Juan Carlos Gallardo Pérez, Magali Espinosa Castilla, Jorge Meléndez Zajjla y Vilma Maldonado Lagunas

## RESUMEN

El cultivo de los esferoides tumorales multicelulares (MTS) ha cobrado relevancia en los últimos años como modelo *in vitro* de los tumores sólidos. La estructura general de los MTS mimetiza las etapas iniciales de los microtumores sólidos *in vivo* antes de la vascularización. Por lo anterior han sido utilizados en el estudio de la biología tumoral incluyendo migración, invasión y angiogénesis. La resistencia a diferentes fármacos antineoplásicos de los MTS es similar a la del tumor sólido. Además, empiezan a ser incluidos en pruebas fármaco-toxicológicas y en la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer como paso previo a su aplicación en los tumores sólidos *in vivo*.

**PALABRAS CLAVE:** Esferoides tumorales multicelulares, tumor sólido, resistencia, fármacos, terapia.

## ABSTRACT

In the last years the culture *in vitro* of multicellular tumor spheroids (MTS) has gained relevance as model of solid tumors. The general structure of MTS clearly mimic the initial stages of solid microtumors formation before vascularization. Therefore, MTS have been employed in migration, invasion and angiogenesis studies. The MTS also resemble to solid tumor in multidrug resistance. In addition, MTS begin to be included in pharmaco-toxicologic tests and in evaluation of novel therapeutic strategies against cancer previously to its application in solid tumors.

**KEY WORDS:** Multicellular tumor spheroids, solid tumor, resistance, drugs, therapy.

## INTRODUCCIÓN

En la investigación biomédica el cultivo tradicional *in vitro* de células cancerosas en monocapa (cultivos bidimensionales), ha brindado una enorme gama de resultados con respecto al comportamiento y respuesta celular a diversos agentes terapéuticos. Sin embargo, dichos resultados son muchas veces contradictorios cuando se escalan a nivel clínico. A diferencia de los tumores, los cultivos en monocapa son esencialmente homogéneos en cuanto al estado

nutricional, tensión de oxígeno, estado proliferativo, pH y eliminación de productos de desecho (1). La estructura tridimensional nativa de los carcinomas gobierna numerosas interacciones autócrinas y parácrinas relacionadas a la progresión del tumor. Estas interacciones no pueden ser recreadas en el modelo de cultivo en monocapa, en donde los contactos célula-célula están disminuidos y pierden la heterogeneidad asociada con un tumor sólido. Este problema se ha resuelto, en parte, con el uso de nuevos

modelos en cultivo que semejan la intrincada y compleja red tridimensional de las células en un organismo. Holtfreter, al final de la década de los setenta y posteriormente Moscona instrumentaron el cultivo celular tridimensional de fibroblastos de ratón (2). Posteriormente, Sutherland los utilizó en la evaluación de la eficacia de fármacos terapéuticos utilizando células humanas de cáncer.

Estos cultivos, denominados esferoides tumorales multicelulares (MTS, del inglés: Multicellular Tumor

\*Recibido: 12 de agosto de 2006 Aceptado: 21 de noviembre de 2006

Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Subdirección de Investigación Básica, Laboratorio de Biología Molecular. Av. San Fernando, 22 Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, 14000, México, D.F. Fax: 56 28 04 32. Correo E: jcgallardo@ciencias.unam.mx



Spheroids), tienen una complejidad intermedia entre los cultivos bidimensionales *in vitro* y los tumores sólidos *in vivo*. Los MTS presentan una compleja red organizada con interacciones tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular (uniones comunicantes, desmosomas y E-cadherina, principalmente), por lo que cada célula individual está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrientes (2, 3). Esta revisión pretende enfatizar las ventajas del cultivo de los esferoides tumorales, como modelo *in vitro* de los microtumores sólidos, sus características, su resistencia y la forma en que se han empleado para la evaluación de novedosas estrategias anticancerosas. Si bien es cierto que este modelo es un poco más parecido al tumor sólido que el cultivo en monocapa, también es cierto que carece de algunos elementos como su interacción con otros tipos celulares que rodean y forman al carcinoma y la neovascularización, entre otros.

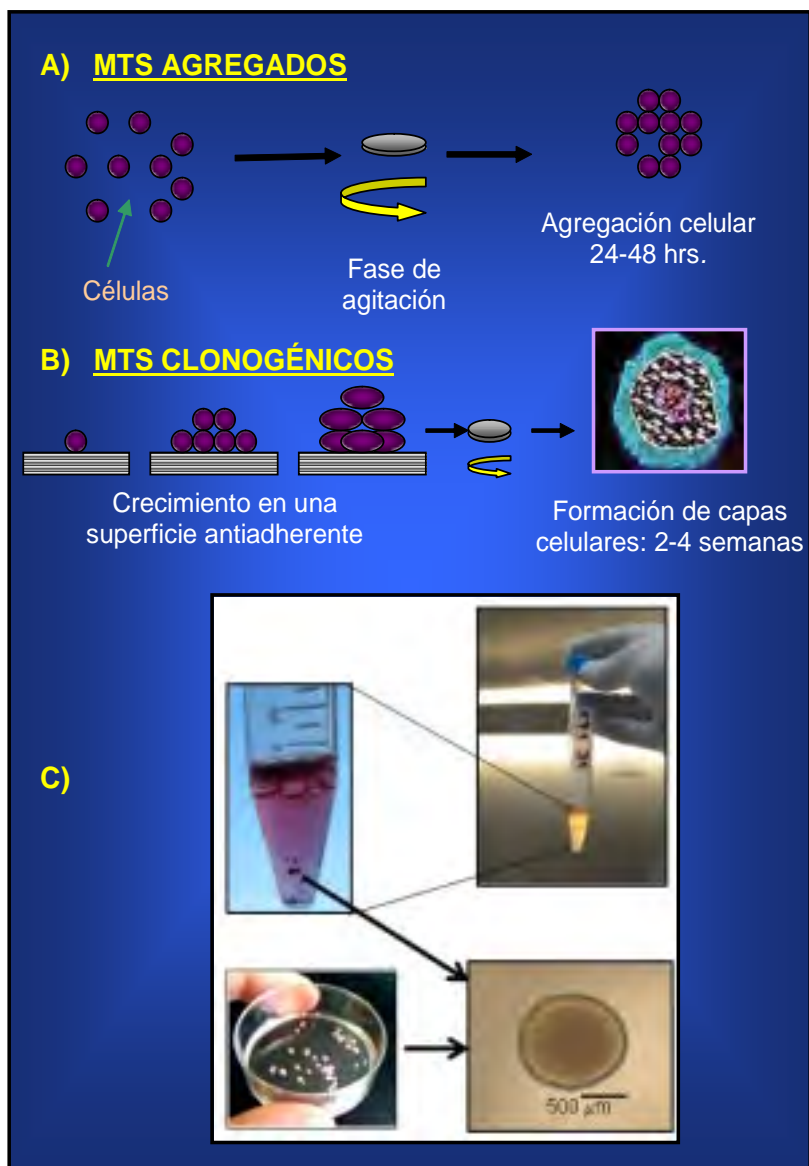
### ESTRUCTURA DEL MTS

De acuerdo a su origen, existen dos tipos de esferoides tumorales. Los MTS clonogénicos y los MTS agregados. Los del primer tipo provienen de una célula tumoral o un pequeño explante de tejido (éste último conocido como OMS: esferoide multicelular organotípico) cultivadas, en una primera fase, en recipientes que contienen una superficie antiadherente y estática, lo que permite la creación de un núcleo primario. Después, los esferoides son sometidos a una segunda fase de agitación orbital, suave (40 a 50 rpm) que favorece la consolidación del MTS (Fig. 1). Estudios recientes revelan que la capacidad que poseen las células para crecer en forma tridimensional está influida por factores de señalización del suero tales como antígeno carcinoembrional, interferón- $\gamma$ , IGF-II, heregulina  $\beta$ 1, plasmina, y E-

cadherina (4). La integridad del esferoide se mantiene por el incremento de uniones estrechas, comunicantes y desmosomas entre las células y un aumento de matriz extracelular. Los MTS clonogénicos pueden ser monocultivos (una sola línea celular) o co-cultivos con fibroblastos, células inmunes, mesenquimales o endoteliales, con lo que se añaden nuevos niveles de complejidad (1).

El segundo tipo de crecimiento en esferoide son los MTS agregados. En

este modelo no existe la formación de un núcleo primario ya que las células tumorales se colocan inmediatamente en agitación orbital constante para permitir su agregación (Fig. 1). Básicamente no hay formación de un centro necrótico y la mayor parte de las capas contienen células en proliferación. Las células en los agregados permanecen unidas entre sí por un tiempo determinado. Los MTS de tipo agregado pueden ser fácilmente disociados por fuerzas mecánicas ya que



**Figura 1.** A) Modelo de la formación de MTS agregados y B) clonogénicos. C) Morfología de MTS clonogénicos derivados de la línea celular CaLo, cultivados con la técnica de "liquid overlay" (ver Tabla 1). El tamaño de estos esferoides tumorales puede llegar a ser de hasta 1500  $\mu$ m de diámetro. Microfotografía tomada con microscopía de luz de campo claro.

sus uniones no son fuertes. Este tipo de esferoides se utiliza cuando se requieren estudios que consuman poco tiempo ya que son de rápida formación de unos cuantos días, por lo que no se les da la oportunidad de compartimentalizarse, con respecto a los esferoides clonogénicos (algunas semanas) y son empleados principalmente para el estudio de penetrabilidad de fármacos o vectores de terapia génica, mientras que los esferoides clonogénicos se prefieren en estudios en donde se analiza el efecto de la hipoxia sobre la estructura esferoidal completa. Casi todas las líneas celulares tumorales pueden generar ambos tipos de esferoides.

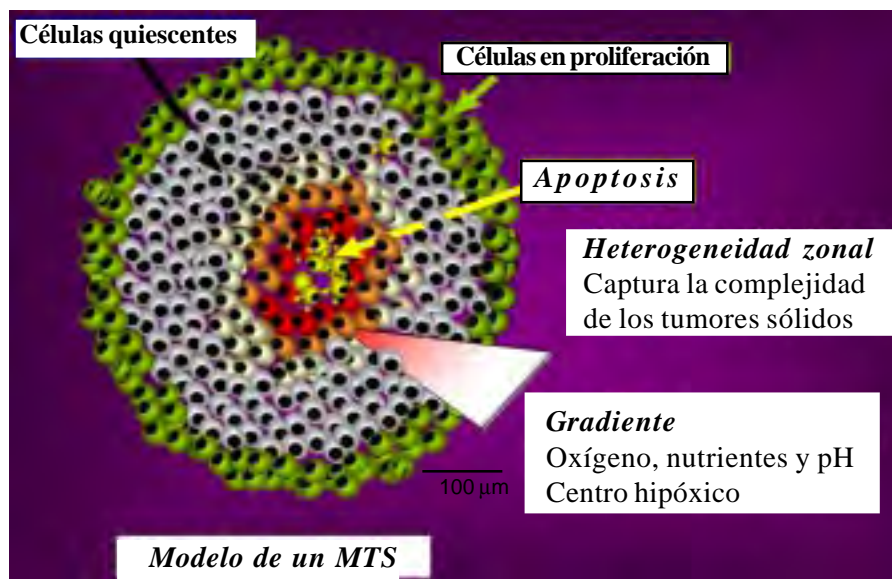
Es importante distinguir entre MTS clonogénicos y MTS agregados ya que sólo los primeros forman una estructura compartimentalizada como en los microtumores sólidos (Fig. 1). En esta revisión nos referiremos principalmente a los MTS clonogénicos. Las principales técnicas de cultivo empleadas para generar MTS pueden revisarse en la Tabla 1. El método más ampliamente utilizado, debido a su bajo costo y fácil implementación en el laboratorio, es el de líquido sobrelapante o "liquid overlay", en el que básicamente se cubre la superficie inferior de una caja de Petri con agarosa, se siembra la línea celular tumoral de interés, a una confluencia de 40-60 % y se mantienen durante una semana en incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego son transferidos a matraces o tubos de cultivo y se mantienen en agitación orbital constante en incubadora. La principal desventaja de este método de cultivo es el tiempo de formación de la estructura esferoidal ya que, dependiendo de la línea celular, se pueden obtener algunos cientos de esferoides en un periodo de 2 a 5 semanas. Las demás técnicas mencionadas en la Tabla 1 derivan del "liquid overlay" y algunas ocupan materiales más especializados, sin embargo, mantienen la prin-

<b>Técnica</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Días</b>	<b>Método</b>
<b>Líquido sobrelapante</b> "Liquid overlay" (clonogénicos)	1-1.5	20 - 40	<b>Fase 1.</b> Las líneas celulares se siembran en cajas cubiertas con agar o agarosa, en una incubadora sin movimiento. <b>Fase 2.</b> Después de 1 semana se trasladan a un matraz con medio fresco y se mantienen en agitación constante (18).
<b>CultiSpherG (clonogénicos)</b>	1-2	30	Emplea cuentas acarreadoras en gelatina macroporosa. Las células se aglutinan más fácilmente entre los poros de la membrana microacarreadora y establecen contactos. Favorece la aglutinación de células independientes (19).
<b>Cytodex-3 (clonogénicos)</b>	1-2	20	Las células se siembran junto con las cuentas microacarreadoras en placas cubiertas con 10% de poli (2-hidroxietilmetacrilato) para prevenir la adhesión celular (20)
<b>Polímero de gelación termo-reversible (TGP) (clonogénicos)</b>	1-1.5	28	Consiste en conjugados de polietilenglicol y poli-N-isopropilacrilamida. Las fases transitorias entre solución y gel son manipuladas al cambiar la temperatura. La solución acuosa del polímero permite el crecimiento tridimensional. El cambio de medio y la obtención de los esferoides se realizan disminuyendo la temperatura, permitiendo así la gelación del polímero (21).
<b>Matraz Spinner o Rotación giratoria (agregados)</b>	0.250	2-4	Las células se colocan en matraces Erlenmeyer de plástico o en tubos de cultivo, con medio. Los matraces se colocan en una incubadora giratoria (22).
<b>Gota colgante (agregados)</b>	0.250	5	Es un método suave para la generación de esferoides, en el cual se forma un esferoide en una gota colgante suspendida de una placa de microtitulación. Los esferoides resultantes son muy homogéneos (23).

cipal desventaja del tiempo de formación del esferoide. Está establecido que los esferoides de una sola línea celular forman tumores sólidos con todas sus características cuando se inyectan en ratones (5).

A nivel estructural se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares en los MTS: un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes con tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación. El centro necrótico/apoptótico aparece en MTS con diámetro mayor de 500 µm (Fig. 2).

La formación de las diferentes capas desarrolla microambientes con gradientes de oxígeno, nutrientes, concentración de glucosa, lactato, ATP, factores de crecimiento derivados del suero, concentración de productos de desecho y pH (6). La capa central e intermedia del esferoide constituye un microambiente hostil en el cual existe menor cantidad de nutrientes y oxígeno (zonas hipóxicas). En general, las capas de los esferoides de más de 1 mm de diámetro contienen aproximadamente un centro necrótico de 50-70% del total, una capa quiescente de 25-45% y una capa externa proliferante de 5-10%.



**Figura 2.** Estructura de un MTS clonogénico de por lo menos 500  $\mu\text{m}$  de diámetro que representa sus tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas.

En los MTS existe un aumento en los niveles de Fas/CD95, de TNF $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral) y de TGF $\beta$  (Factor de Crecimiento Tumoral), factores inducidos por hipoxia. De esta forma se activa la vía de Fas/CD95 en la capa de células hipóxicas contribuyendo así a la formación del centro apoptótico/necrótico. Las células de capas intermedias que sufren hipoxia, pero no a niveles letales, adquieren una mayor resistencia a la radiación y drogas (3).

### CRECIMIENTO DEL MTS

Los MTS se caracterizan por una dinámica de crecimiento como la descrita en el modelo de Gompertz (1), la cual se explica a continuación: al inicio de la formación del esferoide se presenta un crecimiento lento, seguido de una fase de crecimiento exponencial y finalmente se presenta nuevamente un crecimiento lento con una fase de meseta en la cual mantienen su tamaño final, aún cuando el suplemento de nutrientes sea el óptimo, debido a que estos nutrientes ya no alcanzan las capas más profundas. Esto va acompañado por el incremento de la población de células necróticas

y la disminución de la población de células proliferativas. La presencia de E-cadherina es fundamental al inicio de la formación del esferoide; sin embargo, la capa externa de células en proliferación de los esferoides deja de expresar E-cadherina (7).

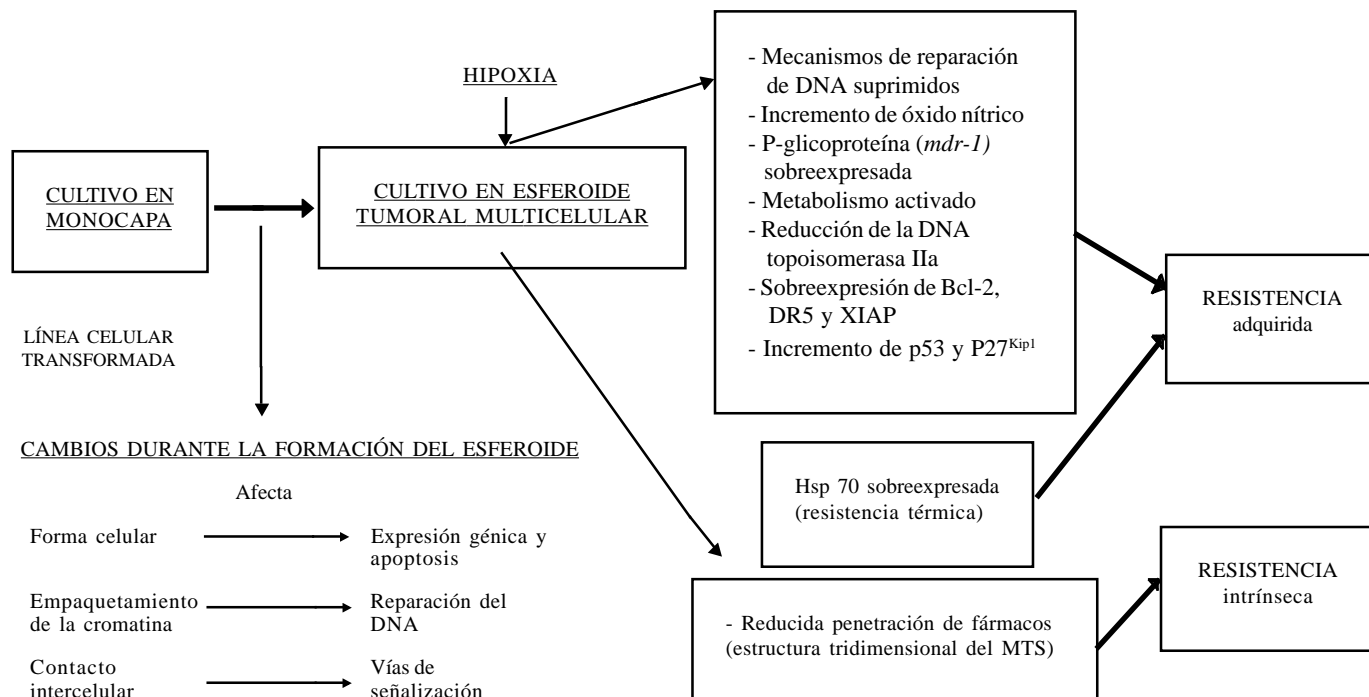
### RESISTENCIA MULTICELULAR

En los tumores sólidos, *in vivo*, las células más resistentes a quimioterapia o radioterapia se ubican a una distancia entre 100 y 150  $\mu\text{m}$  de los vasos sanguíneos y áreas necróticas con reducida concentración de oxígeno. Dentro del esferoide, al aumentar el número de células y compartamentalizarse, se incrementa también su resistencia al efecto de diversos fármacos, tal y como sucede *in vivo*. Esto se conoce como resistencia multicelular e incluye a la quimioterapia, radiación, terapia vectorial y mecanismos de defensa y sólo puede ser estudiada en un concepto tridimensional, es decir, en una situación en la que las células están expuestas a concentraciones diferenciales de oxígeno o a otros elementos ya mencionados, a causa de su posición dentro de la masa tumoral y que favorecen la modulación de la

expresión génica. La mayor resistencia a la radiación y a las drogas fue descrita originalmente por Durand y Sutherland y la llamaron efecto de contacto. Posteriormente Desoize y Jardillier (8) dividieron a la resistencia multicelular en dos tipos: resistencia adquirida y resistencia intrínseca o inherente a la estructura del esferoide. En la figura 3 pueden observarse los dos tipos de resistencia. La resistencia adquirida es generada por diversos factores relacionados con la hipoxia y asociados con el crecimiento tridimensional. La segunda, es la resistencia intrínseca que desarrolla el tumor desde su origen.

La mayoría de los fármacos citotóxicos convencionales (cisplatino, estaurosporina, taxol) matan células (tumores y no tumores) que se encuentran proliferando. Debido a la estructura tridimensional del esferoide y del tumor sólido, la concentración final del fármaco, en las capas más profundas o alejadas de los vasos sanguíneos, es tan baja que resulta ineficaz contra las células ya sean quiescentes o no. Además, hay fármacos que deben ser menos eficaces en condiciones hipóxicas, acídicas o de menores concentraciones de nutrientes (9). Finalmente, las células expuestas a estas condiciones modulan su patrón de expresión génica. En los tumores sólidos así como también en los esferoides tumorales, principalmente clonogénicos, se han descrito como posibles responsables del proceso de resistencia la sobreexpresión de glicoproteína P, la cual actúa como bomba de eflujo de drogas desintoxicando a las células cancerosas, la desregulación de proteínas de reparación del DNA, el incremento de Hsp 70 o la desregulación de procesos celulares como la apoptosis, la cual es un paso crítico en la generación y mantenimiento del cáncer y cuyo mecanismo implica la sobreexpresión de Bcl-2 y DR5 (10) y de IAPs (datos de nuestro grupo no publicados).

## RESISTENCIA MULTICELULAR



**Figura 3.** Eventos celulares que originan la resistencia adquirida e intrínseca durante el crecimiento tridimensional en los MTS

Todo lo anterior constituye el principal problema en el diseño de drogas y en su efectividad contra los tumores, de allí la importancia del modelo de esferoides tumorales en la investigación de blancos terapéuticos.

Uno de los principales problemas en la terapia contra el cáncer, es que las drogas o los vectores usados en terapia génica, no pueden ser introducidos fácilmente en toda la población celular dentro de un tumor. La erradicación exitosa de los tumores depende de un fenómeno llamado efecto "bystander", en donde las células tumorales adyacentes son sensibles al efecto citotóxico o terapéutico. Este efecto también es encontrado en los MTS y es factible gracias a la presencia de uniones comunicantes que permiten que la transfección, o la incorporación de un fármaco a tan sólo una minoría de células tumorales, sea capaz de conducir a la regresión tumoral efectiva.

La correcta comprensión de los mecanismos asociados a la resistencia multicelular permitirá diseñar nue-

vos y mejores fármacos que superen la inescrutabilidad en la penetración del tumor sólido *in vivo*. Existe una excelente revisión de Kunz-Schughart (11) que trata sobre el potencial de los MTS para el desarrollo de nuevos fármacos.

### ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EVALUADAS EN LOS MTS

La proteína transportadora de membrana, glicoproteína P (P-gp), tiene un papel importante en la resistencia farmacocinética al actuar como bomba de eflujo, dependiente de ATP, que exporta drogas al exterior de las células. Se ha observado que en esferoides de cáncer de mama, P-gp se encuentra sobreexpresada, y media el arresto celular en la fase  $G_0$ - $G_1$ , favoreciendo la resistencia de estas células a taxol. El grupo de Walker y colaboradores (12) observó que la P-gp media la resistencia a doxorubicina en MTS de una línea celular de cáncer de mama. Utilizando un potente inhibidor de P-gp, el XR9576, estos investiga-

dores restauraron la eficacia citotóxica de ese fármaco.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) juegan un papel importante en la invasión y angiogénesis tumoral al degradar la matriz extracelular y permitir la migración de células tumorales a tejidos circundantes y permitir la migración de células precursoras de endotelio (13). Se ha establecido que la inhibición de MMPs bloquea la angiogénesis en diversos tumores sólidos. Debido a esto, Wartenberg y colaboradores (13) han evaluado antioxidantes usados en la medicina tradicional china, por su capacidad para disminuir la expresión de MMPs, en esferoides tumorales de próstata. Asimismo, en los MTS se están probando y analizando fármacos relevantes para el tratamiento del hepatocarcinoma celular en conjunto con el efecto de radiación. En estos estudios se ha observado que es posible una disminución de la cantidad de radiación cuando se colocan menores cantidades de fármacos. Esto podría

disminuir los efectos colaterales de ambos tipos de tratamientos utilizados por separado.

Uno de los métodos clásicos propuesto para superar la resistencia multicelular, es el uso de la hialuronidasa testicular, una enzima que rompe interacciones adhesivas intercelulares. En este sentido, las nuevas metodologías se están basando en el uso de anticuerpos monoclonales para intervenir con las interacciones célula-célula mediadas por E-cadherina. Este es un nuevo concepto llamado "quimiosensibilización antiadhesiva", en el cual Green y colaboradores (14) encontraron que la inhibición de la adhesión mediada por E-cadherina sensibiliza a los MTS de adenocarcinoma colorectal al tratamiento con 5-fluorouracilo, taxol, vinblastina y etopósido. Sin embargo, la mayoría de los cánceres humanos no presentan E-cadherina en sus etapas invasivas y estos estudios están proyectados a demostrar que en el inicio del cáncer, las adhesiones celulares pueden ser excelentes blancos terapéuticos en la quimioterapia de los microtumores iniciales.

El herpes simple o los adenovirus, han tomado relevancia como vectores para mejorar y aumentar la eficiencia en la expresión de genes transfectados dentro de los MTS, por su mecanismo infeccioso replicativo. El primer estudio de terapia génica con virus validado en los MTS, lo realizó Fujiwara y colaboradores en 1993 (15), observando el efecto de p53 transducido por un retrovirus y su efecto quimiosensibilizador al tratamiento con cisplatino. En MTS de tumor cerebral se han empleado adenovirus de replicación competente que expresan el gen de la luciferasa y se ha encontrado una expresión transgénica en las células de capas profundas del esferoide.

En una estrategia reciente, De Graaf y colaboradores (16) crearon un adenovirus que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa, una proteína de fusión

que activa glucuronida, un profármaco de doxorrubicina y un anticuerpo de adhesión a células epiteliales. La proteína de fusión retuvo ambas funciones y se expresó en MTS de células de cáncer de mama. La administración intratumoral *in vivo* del vector adenoviral favoreció la disminución del crecimiento del tumor sólido favoreciendo la monoterapia con doxorrubicina. Además de los virus competentes a la replicación, se están ensayando virus oncolíticos selectivos al tumor. Esto indica que los virus se replican en células tumorales y no en células normales. La selectividad puede ser adquirida durante el proceso de infección y/o replicación.

Los mecanismos que se basan en el silenciamiento de genes, como el RNA de interferencia (RNAi), comenzarán a ser evaluados y se verá su importancia en el modelo de los MTS. Al respecto, Lakka y colaboradores (5) utilizaron el promotor del citomegalovirus para inducir RNAi (un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional que disminuye la expresión de un gen en particular a nivel de proteína) y bloquear MMP-9 y catepsina B (los cuales participan en el proceso de crecimiento tumoral, vascularización e invasión) en MTS de glioblastoma humano. Sorprendentemente encontraron una reducción en la conducta invasiva de estas células y una ruptura de la formación de redes capilares, tanto en el modelo de los MTS, como en un modelo *in vivo* e incluso en este último, observaron la regresión del tumor preestablecido.

### CULTIVOS TRIDIMENSIONALES Y CÉLULAS TRONCALES

En la actualidad se están realizando cultivos tridimensionales de células madres o troncales de tejidos adultos, sanos y tumorales, ya que las células troncales tienen una mayor capacidad para formar esferoides que una célula normal debido a que se mantienen en

constante proliferación. En la actualidad se están desarrollando sistemas tridimensionales de cultivo de células epiteliales mamarias humanas, llamados "mamoesferas" (17). Subsecuentemente estas estructuras, de 40 a 100 células, se diferencian en lóbulos y ductos organotípicos complejos, con lumen, núcleos polarizados, desmosomas y microvellosidades sobre su superficie apical. Adicionalmente, se ha logrado demostrar la presencia de los 3 linajes de células mamarias: células mioepiteliales, células epiteliales ductales y células alveolares productoras de leche. Las células dentro de la mamoesfera son clonales, provenientes de una sola célula troncal pluripotente. Los estudios futuros estarán encaminados a exponer estas células troncales a diversos agentes mutagénicos con el objeto de descubrir las consecuencias de la transformación como un mecanismo para la etiología del cáncer de mama.

### PERSPECTIVAS

El uso de MTS ha permitido profundizar en el estudio de la biología tumoral y en la evaluación de diversas estrategias contra el cáncer. Los avances en las investigaciones futuras sobre los temas antes tratados permitirán una mejor comprensión de la biología del cáncer y las alternativas para contrarrestarlo. El estudio de los MTS favorecerá una mejor comprensión de la resistencia a fármacos observada *in vivo* y facilitará el análisis de nuevos blancos terapéuticos previo a su evaluación en modelos animales.

Actualmente, nuestro grupo de investigación realiza el cultivo de MTS de diversas líneas celulares de cáncer humano, como herramienta para estudiar los mecanismos apoptóticos y su relación con las diversas vías de señalización. Lo anterior es de relevancia clínica debido a que permitirá comprender los mecanismos que confieren resistencia a las células cultiva-

das en esferoide. Asimismo, se está implementando el uso de vectores retrovirales con secuencias para generar RNAi contra diversos genes cuyas proteínas participan en la apoptosis. Una vez dentro del MTS, el virus será capaz de interferir con factores antiapoptóticos que pueden sensibilizar al MTS a la muerte por apoptosis, con esto se buscarán posibles blancos terapéuticos.

## REFERENCIAS

- Mueller-Klieser W (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* 273:C1109-C1123.
- Folkman J, Moscona A (1978) Role of cell shape in growth control. *Nature* 273:345-349.
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) Multicellular tumour spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Path* 79:1-23.
- Novak JF, Tronka F (2005) Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res* 25:1157-1177.
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS (2004) Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 23:4681-4689.
- Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W (2002) Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Engineering* 18:149-262.
- Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH. (2001) Integrin  $\beta 1$  engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 262:180-196.
- Desoize B, Jardillier JC (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 36:193-207.
- Minchinton AI, Tannock IF. (2006). Drug penetration in solid tumors. *Nat Rev Cancer* 6:583-592.
- Kim K, Wilson SM, Abayasiriwardana, et al (2005) A novel in vitro model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Resp Cell Mol Biol* 33:541-548.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9:273-85.
- Walker J, Martin C, Callaghan R (2004) Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *Eur J Cancer* 40:594-605.
- Wartenberg M, Budde P, De Marees M, Grunheck F, Tsang SY, Huang Y, Chen ZY, Hescheler J, Sauer H (2003) Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix metalloproteinase expression in confrontation cultures- of embryoid bodies and tumor spheroid by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Lab Invest* 83:87-98.
- Green SK, Francia G, Isidoro C, Kerbel RS (2004) Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. *Mol Cancer Ther* 3:149-159.
- Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Schaub LB, Roth JA. (1993) A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 53:4129-4133.
- De Graaf M, Pinedo HM, Oosterhoff D, van der Meulen-Muileman IH, Gerritsen WR, Haisma HJ, Boven E (2004) Pronounced antitumor efficacy by extracellular activation of a doxorubicin-glucuronide prodrug after adenoviral vector-mediated expression of a human antibody-enzyme fusion protein. *Hum Gene Ther* 15:229-238.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Res* 65:5506-5511.
- Enmon RM, O'Connor KC, Lacks DJ, Schwartz DK, Dotson RS. (2000) Dynamics of spheroid self-assembly in liquid overlay culture of DU 145 human prostate cancer cells. *Biotechnol Bioeng* 72:579-591.
- Rasey JS, Cornwell BJ, Maurer DJ, et al. (1996) Growth and radiation response to cells grown in macroporous gelatin microcarriers (CultiSpher-G). *Br J Cancer Suppl* 27:S78-S81.
- Qiu Q, Ducheyne P, Gao H, Ayaswamy P. (1998) Formation and differentiation of three-dimensional rat marrow stromal cell culture on microcarriers in a rotating-wall vessel. *Tissue Eng* 4:19-34.
- Tsukikawa S, Matsuoka H, Kurahashi Y, et al. (2003) A new method to prepare multicellular spheroids in cancer cell lines using a thermo-reversible gelation polymer. *Artif Organs* 27:598-604.
- Pawlik TM, Souba WW, Sweeney TJ, Bode BP. (2000) Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J Surg Res* 9:15-25.
- Timmins E, Dietmar S, Nielsen LK. (2004) Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 7:97-103.