

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CLOROQUINA SOBRE LA AUTOFAGIA EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA Y SU POSIBLE UTILIDAD COMO FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO

Evaluation of Chloroquine Effect in Autophagy of Breast Cancer Cells and its Possible Use in Chemotherapy

Claudia ORALLO LUNA; Rogelio GÓNZALEZ SARMIENTO

Centro de investigación del Cáncer (CIC). Laboratorio 14. Campus Miguel de Unamuno. Salamanca. Teléf.: 637054833

Correo electrónico: claudiaoralloluna@gmail.com

RESUMEN: La autofagia es un proceso celular que se encarga de la degradación de orgánulos dañados y de la obtención de nutrientes en condiciones de ayuno. Este proceso tiene un papel muy importante en la regulación del cáncer. En fases iniciales impide el desarrollo de células tumorales; mientras que, en fases finales del cáncer, promueve las metástasis y la resistencia a la quimioterapia. Cloroquina es un fármaco antipalúdico al que, en estudios recientes, se le han atribuido propiedades antineoplásicas debido a un mecanismo de inhibición de la autofagia. El objetivo de este trabajo es comprobar, por un lado, el efecto citotóxico de la cloroquina sobre la línea celular BT-549 de cáncer de mama mediante un ensayo MTT; y por otro, estudiar el efecto de la cloroquina sobre tres proteínas autofágicas: LC3, p62 y Beclin-1 por medio de un Western Blot. Los resultados obtenidos indican que la cloroquina inhibe el crecimiento celular a 50 μM y que la cloroquina aumenta la expresión de las proteínas estudiadas, lo que se podría considerar un mecanismo compensador de la célula ante la inhibición de la autofagia producida por cloroquina. En conclusión, la cloroquina podría ser un fármaco con utilidad en el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: cloroquina; autofagia; cáncer de mama; quimioterapia.

ABSTRACT: Autophagy is a cellular mechanism which is in charge of destroying damaged organelles and obtaining nutrients in fasting periods. This process has a very important role in cancer regulation. In early stages of cancer, autophagy prevents the growth of tumoral cells. However, in final stages, it promotes metastasis and resistance to chemotherapy. Chloroquine is an antipaludic drug which, according to recent research, might have antineoplastic properties due to inhibition of autophagy. The target of this research is to prove, in one hand, the cytotoxic effect of chloroquine in a breast cancer cell line (BT-549) by performing a MTT assay; and, in the other hand, to study the effect of chloroquine in the expression of three autophagic proteins (LC3, p62 and Beclin-1) using a Western Blot. The results indicate that chloroquine inhibits the growth of tumoral cells at 50 μ M and that chloroquine increases the expression of the proteins, which could indicate that chloroquine is inhibiting autophagy. In conclusion, chloroquine might be, in the future, a useful drug in breast cancer chemotherapy.

Key words: Chloroquine; Autophagy; Breast cancer; Chemotherapy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Epidemiología del cáncer de mama*

Según datos de la *Sociedad Española de Oncología Médica*, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente y con mayor mortalidad en las mujeres españolas, suponiendo un 29% de todos los cánceres. La supervivencia media relativa tras cinco años es del 89.2% pero el estadio en el que se diagnostica el cáncer influye en la supervivencia, descendiendo al 24% de supervivencia a partir del estadio III. Ferlay, Soerjomataram *et al.* (2012).

Además, el *National Cancer Institute (NCI)* estima que el 12,3% de las mujeres estadounidenses serán diagnosticadas con cáncer de mama en algún punto de su vida.

A la vista de la alta frecuencia e incidencia de este tipo de cáncer, es importante el desarrollo de nuevos anticancerígenos más efectivos que puedan ayudar a disminuir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

1.2. *Autofagia y cáncer*

La autofagia es un proceso celular que se encarga de la degradación y reciclaje de componentes celulares. Existen varios tipos de autofagia entre los que se encuentran

la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia. Mizushima, Levine *et al.* (2008).

La macroautofagia es la vía principal de degradación, por ello es a la que generalmente nos solemos referir al hablar de autofagia. Tiene 4 etapas: iniciación, elongación, fusión con lisosomas y degradación. La etapa de iniciación ocurre cerca del retículo endoplasmático e incluye la formación y el aislamiento de una membrana. En la segunda etapa, la membrana aislada cierra para formar un autofagosoma que engloba materiales citoplasmáticos y orgánulos completos. Durante la tercera etapa, el autofagosoma se fusiona con lisosomas y finalmente, en la cuarta etapa, los componentes del citoplasma celular se degradan mediante enzimas lisosomales.

La autofagia tiene un papel esencial en la obtención de nutrientes en condiciones de ayuno y en la degradación de orgánulos dañados, por lo que juega un papel fundamental en el cáncer y su regulación. Maycotte, Thorburn (2014).

En etapas iniciales del cáncer la autofagia ejerce un papel protector sobre el organismo. Ayuda a prevenir que se forme el tumor y evita su progresión mediante la degradación de orgánulos, disminuyendo la inestabilidad del genoma y promoviendo la muerte de células cancerosas.

Por otro lado, en etapas finales, la autofagia favorece la proliferación de las células tumorales. Inactiva estas células como mecanismo de rescate frente al estrés celular, promoviendo la resistencia a la quimioterapia y el desarrollo de metástasis.

1.3. La cloroquina como inhibidor de autofagia

La cloroquina fue descubierta en 1934 y ha sido utilizada como antimalárico desde esa fecha. Debido a sus efectos antiinflamatorios, cloroquina y su derivado hidroxicloroquina también se han usado para tratar enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso. Solomon, Hoyun *et al.* (2009).

En los últimos años se están realizando estudios *in vitro* e *in vivo* Jiang, Zhao *et al.* (2010) en los que la cloroquina parece tener también efecto antitumoral mediante la supresión de autofagia (normalmente en combinación con otros anticancerígenos). Su mecanismo de acción se basa en bloquear la fusión de autofagosomas con lisosomas, impidiendo así la formación del autolisosoma e induciendo la acumulación del autofagosoma.

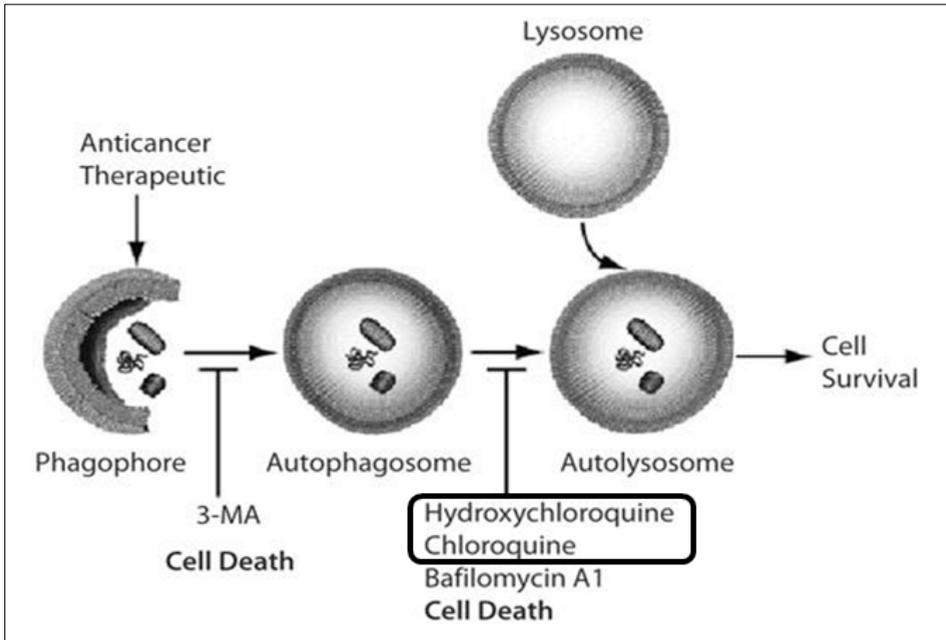


IMAGEN 1: Mecanismo de inhibición de la autofagia mediado por la cloroquina.
Stephenson (2013).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis planteada en este trabajo es que el tratamiento de la línea celular BT-549 con el fármaco cloroquina modifica la viabilidad celular y que este efecto podría ser mediado por cambios en la autofagia.

A partir de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto citotóxico de la cloroquina sobre la línea celular BT-549 de cáncer de mama, así como la mínima concentración a la que este fármaco es eficaz inhibiendo el crecimiento celular.
- Evaluar el efecto de la cloroquina sobre tres proteínas relacionadas con la autofagia (LC3, p-62 y Beclin-1) con el fin de observar su posible actividad como inhibidor de autofagia en esta línea celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Cultivos celulares*

Realizamos los cultivos celulares a partir de la línea celular BT-549. Esta línea procede de un tejido de glándula mamaria con patología de carcinoma ductal, el tipo celular es epitelial, y el almacenamiento de se debe hacer en nitrógeno líquido.

El medio de cultivo utilizado fue DMEM suplementado con 10% de FBS (suero fetal bovino), glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina. El crecimiento de la línea se realizó a 37°C y 5% CO₂.

3.2. *Ensayo MTT*

§ *Fundamento teórico*

El MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), una sal de tetrazolio amarilla en disolución acuosa.

En células vivas el MTT es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales formándose cristales de formazán, un precipitado de color azul-morado soluble en dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia de esta disolución a 540 nm es directamente proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas (viables).

Este método permite medir supervivencia y proliferación celular, así como determinar los efectos citotóxicos in vitro de potenciales agentes terapéuticos. Meerloo, Kaspers *et al.* (2011).

§ *Procedimiento*

El MTT se realizó en 4 placas de 24 pocillos a cuatro tiempos: 0h, 24h, 48h y 72h. Se partió de la concentración de 10.000 células/ml y se incubaron las placas a 37°C.

En las placas de 24, 48 y 72 h se añadió por triplicado las 6 concentraciones a las que se estudió el efecto del fármaco. Para ello se realizaron diluciones del fármaco en 10 ml de medio. En los seis primeros pocillos no se añadió fármaco ya que actuaron como el blanco y el control negativo. En la placa de 0 h no se añadió fármaco para que sirviera como control.

Una vez transcurrido el tiempo necesario, se añadió a todos los pocillos 110 µl de MTT diluido en PBS excepto en los tres primeros pocillos que correspondieron al blanco. Se incubó la placa durante 1 hora a 37°C, se aspiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de DMSO a cada pocillo para que solubilizaran los cristales.

Por último se midió la absorbancia a 570 nm mediante un detector de microplacas que trasladó los datos al software *Xfluo4*®.

3.3. Western Blot

§ *Fundamento teórico*

Western Blot es una técnica analítica para el estudio de proteínas. Este método permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad del Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Así se pueden estudiar cambios o modificaciones en las proteínas de una muestra celular. Towbin, Staehelin (1979).

§ *Procedimiento*

Nuestro objetivo fue analizar la expresión de tres proteínas: LC3, p62 y Beclin-1. Para ello se realizaron los siguientes procedimientos:

- Extracción y recuento de proteínas de la muestra.
Se trató la línea BT-549 con cloroquina 25 μ M a 0, 24, 48 y 72 h. Posteriormente se extrajeron las proteínas. Mediante el software *Nanodrop*® se calculó la cantidad de proteína por ml y se realizaron 3 réplicas a los distintos tiempos.
- Electroforesis y transferencia gel-membrana.
Las proteínas fueron separadas en función de su tamaño mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Una vez separadas por tamaño, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) utilizando el sistema de transferencia semiseca.
- Bloqueo, hibridación de anticuerpos y revelado.
Las membranas fueron bloqueadas en una solución de leche en polvo al 5% en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primarios y secundarios correspondientes. Para la detección de las proteínas marcadas con los anticuerpos se utilizó el sistema de quimioluminiscencia y se expusieron las membranas a películas fotosensibles de autorradiografía. Se repitió el proceso para realizar el control con β -actina.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayo MTT

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en el MTT a los diferentes tiempos y concentraciones, calculamos el porcentaje de supervivencia celular con cada dosis mediante la siguiente ecuación:

$$\text{media abs dosis} - \text{media abs blanco} / \text{media abs control negativo} - \text{media abs blanco}$$

Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente gráfico:

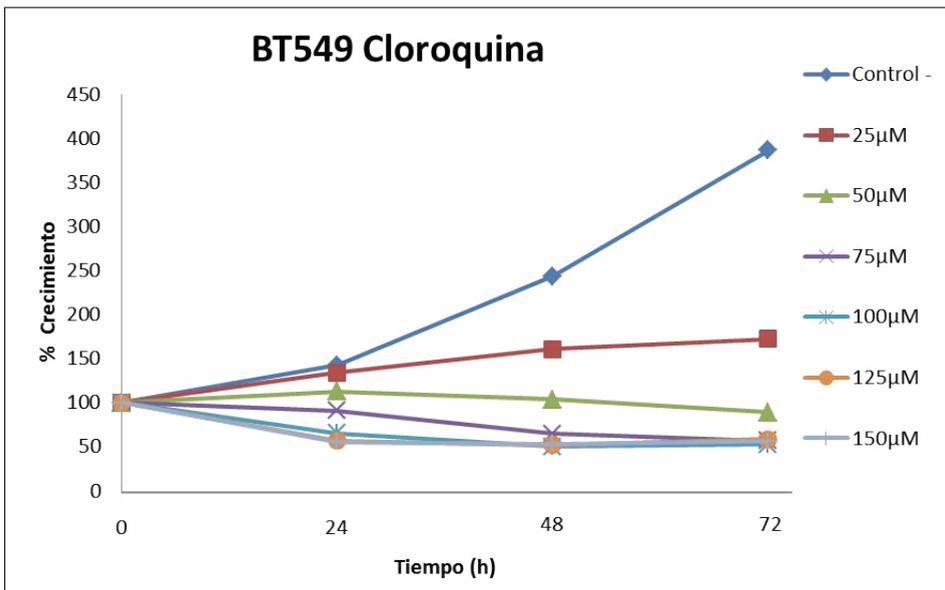


GRÁFICO 1: Evolución temporal del crecimiento celular (%) en las distintas concentraciones de cloroquina.

Como podemos observar en el gráfico, existe una clara diferencia entre las células control (sin fármaco) y las células expuestas al fármaco a distintas concentraciones. Mientras que en las células control existe un crecimiento celular exponencial a medida que transcurre el tiempo, en las células tratadas con cloroquina ese crecimiento se detiene o incluso disminuye.

A la vista de los resultados se podría concluir que la concentración mínima inhibitoria del fármaco es 50 µM. Este es el punto donde observamos que el

crecimiento celular a las 72 h disminuye respecto al crecimiento celular inicial, ambos expresados en tanto por ciento.

A pesar de que en nuestros resultados la concentración mínima inhibitoria de la cloroquina es 50 μM , en otros experimentos se ha visto que esta concentración es demasiado tóxica para las células, por lo que para la extracción de proteínas y su posterior electroforesis se utilizó la concentración 25 μM .

4.1. *Western Blot*

§ *Proteína LC3*

LC3 es una proteína con dos isoformas, que en el Western Blot se ven representadas mediante dos bandas. LC3-I es conjugada con fosfatidiletanolamina para formar un conjugado de LC3-fosfatidiletanolamina (LC3-II), el cual es reclutado a la membrana del autofagosoma donde se degrada. En consecuencia, LC3-II se considera un marcador de autofagia. Tanida, Ueno *et al.* (2008).

En nuestro experimento se observa un incremento de la expresión de la proteína a medida que aumenta el tiempo de contacto de las células con el fármaco. Esto puede deberse a un mecanismo compensador de la célula: la cloroquina inhibe la autofagia en sus fases finales (la formación del autolisosoma) y la célula responde produciendo más proteína para contrarrestar esa inhibición e incrementar la autofagia. De esta forma se puede deducir que la cloroquina sí tiene un papel como inhibidor de la autofagia.

§ *Proteína p62*

La proteína p62 reconoce, durante la autofagia, a proteínas poliubiquitinadas y forma complejos de unión a LC3 que se degradan en los autolisosomas. Por lo tanto, cuando la autofagia se induce, el nivel de p62 disminuye, mientras que la proteína se acumula cuando se inhibe la autofagia. Moscat, Díaz-Meco *et al.* (2009).

En nuestro experimento se observa un aumento de la expresión de p62 a las 24 y 48h de contacto con el fármaco. Esto puede ser señal de que la cloroquina está inhibiendo la autofagia y por ello aumenta la expresión de p62. En este caso, a las 72 h disminuye la expresión, pudiendo deberse a un mecanismo compensador de la célula. La célula está aumentando la autofagia y p62 se degrada.

§ *Proteína Beclin-1*

Beclin-1 interviene en todos los pasos de la autofagia, teniendo un papel especialmente importante en la formación del complejo responsable de la nucleación de

la vesícula autofágica. De esta forma, un aumento en la expresión de esta proteína indica un aumento de autofagia. Sinha, Levine *et al.* (2008).

En nuestro caso se observa un aumento de la expresión de proteína a lo largo del tiempo. Esto lo podemos interpretar, al igual que en el caso de LC3, como un mecanismo compensador de la célula que aumenta la autofagia ante la inhibición producida por la cloroquina.

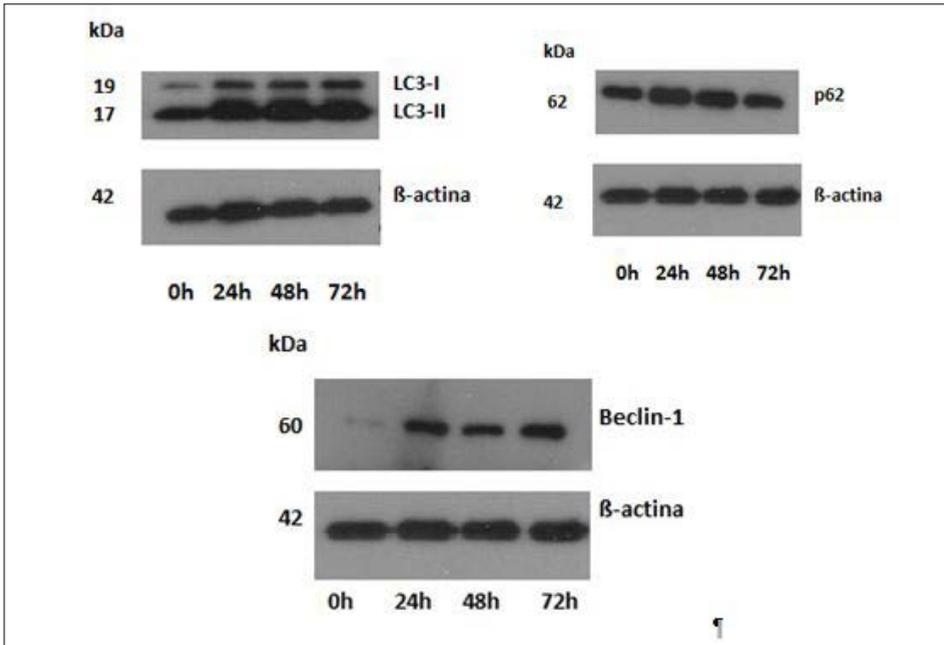


IMAGEN 2: Revelado del Western Blot correspondiente a las proteínas LC3, p62 y Beclin-1.

A partir de nuestros datos podríamos pensar en la cloroquina como un futuro fármaco antineoplásico. Se están realizando ensayos clínicos para estudiar su eficacia en humanos, tanto con la cloroquina como único fármaco como con la cloroquina en combinación con quimioterapia clásica utilizada para el tratamiento del cáncer de mama, como son los taxanos. Algunos estudios sugieren que la cloroquina podría no ser un fármaco antineoplásico por sí solo, sino que en un futuro podría utilizarse como coadyuvante en combinación con otros anticancerígenos.

Además de esto, se ha visto en estudios *in vitro* que la cloroquina también puede ayudar a vencer la resistencia creada por las células a tratamientos previos, haciendo que estos puedan volver a ser efectivos. Cufí, Vázquez-Martín (2013).

5. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- La cloroquina inhibe el crecimiento celular de la línea BT-549 a una concentración de 50 μM y a concentraciones superiores.
- La cloroquina aumenta la expresión de las tres proteínas estudiadas: LC3, p62 y Beclin-1, por lo que actúa como inhibidor de autofagia en la línea celular BT-549.

Teniendo en cuenta estos resultados y otros estudios existentes, la cloroquina podría ser un fármaco de gran utilidad en el tratamiento del cáncer de mama, bien como único fármaco o en combinación con los antineoplásicos clásicos.

Por otra parte, serían necesarios más estudios para observar el efecto de la cloroquina sobre otras líneas celulares derivadas de tumores de mama. También sería necesario evaluar sus efectos y toxicidad en humanos a partir de ensayos clínicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- CUFÍ, S., VÁZQUEZ-MARTÍN, A., OLIVERAS-FERRAROS, C., COROMINAS-FAJA, B., CUYAS, E., LÓPEZ-BONET, E. *et al.*: The anti-malarial chloroquine overcomes primary resistance and restores sensitivity to Trastuzumab in HER-2 positive breast cancer. *Sci Rep.* 2013; 3:2469.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C. *et al.*: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. *Globocan* [Revista en Internet] 2012 [acceso 4 de abril de 2015]; 11. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.
- JIANG, P. D., ZHAO, Y. L., DENG, X. Q., MAO, Y. Q., SHI, W., TANG, Q. Q. *et al.*: Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2010; 64 (2010): 609-614.
- MAYCOTTE, P. y THORBURN, A.: Targeting autophagy in breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014; 5(3): 224-240.
- MEERLOO, J. V., KASPERS, G. J. L. y CLOOS, J.: Cell Sensitivity Assays: the MTT Assay. En: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: methods in molecular biology.* 2ª ed. Portsmouth: Humana Press; 2011, pp. 237-245.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO, A. M. y KLIONSKY, D. J.: Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451(7182): 1069-1075.
- MOSCAT, J. y DÍAZ-MECO, M. T.: P62 at the crossroads of autophagy, apoptosis and cancer. *Cell.* 2009; 137(6):1001-1004.
- SOLOMON, V. R. y HOYUN LEE, H.: Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol.* 2009; 625(2009): 220-233.
- STEPHENSON, L.: Autophagy in Cancer Promotes Therapeutic Resistance. *Biofiles.* 2013; 8(9).

- SINHA, S. y LEVINE, B.: The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene*. 2008; 27(1):48-137.
- TANIDA, I., UENO, T. y KOMINAMI, E.: LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008; 445: 77-88.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. y GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(9): 4350-4.

