

## ARTICULO ORIGINAL

### **Apoptosis: el metotrexate y sus efectos como agente inductor.**

Eugenia M. Altamirano (\*), Eduardo Dreizzen (\*\*), Félix J. Corrons (\*), Pedro H. Gonzalez (\*) y Osvaldo M. Spinelli (\*)

(\*) Cátedra de patología "B". (\*\*) Laboratorio de Trasplante de órganos.  
Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Calle 60 y 120 1900, La Plata, Argentina

#### INTRODUCCIÓN

La muerte celular puede adoptar dos patrones diferentes tanto desde el punto de vista morfológico como bioquímico. La necrosis o muerte celular accidental, es la resultante de la acción de una noxa letal (Ej. Isquemia prolongada, agentes químicos y físicos, etc). Se observa sólo en condiciones patológicas, afectando a un gran número de células, en forma pasiva, sin requerir de energía. Morfológicamente ocasiona un importante edema celular, con pérdida de la integridad de la membrana plasmática y posterior pasaje del contenido intracitoplasmático al espacio extracelular, hecho que determina una reacción inflamatoria que aumenta el daño tisular (1). Por otro lado, la apoptosis o muerte celular programada, es un proceso observable tanto en condiciones fisiológicas (Ej. embriogénesis, durante el desarrollo del tejido linfoide, etc.) como patológicas (Ej. enfermedades neurodegenerativas, injuria isquémica, S.I.D.A, cáncer), afectando a células aisladas o a grupos de células. El proceso se desarrolla en forma activa, ya que requiere de energía trifosfato de adenosina (ATP) y en algunos casos de expresión génica.

Se debe destacar que las mismas noxas que ocasionan necrosis también pueden llevar a la apoptosis cuando actúan en dosis o concentraciones subletales, permitiendo esto, el desarrollo de diferentes modelos experimentales no sólo in vivo (2) sino también in vitro. Morfológicamente, el proceso apoptótico es dinámico, consistiendo en la producción de cambios celulares resultantes de la activación de un grupo de proenzimas citoplasmáticas denominadas caspasas (cisteinproteasas) (3). Estas son las responsables de cambios tales como: retracción celular, protrusiones citoplasmáticas de diversos tamaños (blebs, blisters y ballons), condensación de la cromatina, fragmentación internucleosomal del ADN y segmentación nuclear, dando como resultado final la formación de cuerpos apoptóticos por fragmentación de la célula. Dichos cuerpos se hallan rodeados por membrana plasmática indemne que impide la salida del contenido citoplasmático al espacio extracelular, evitando así, una reacción inflamatoria que sería perjudicial (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

La apoptosis tiene una doble importancia en oncología, por un lado su desregulación interviene en la génesis del cáncer y por otro lado estas mismas alteraciones hacen resistentes a las células tumorales al tratamiento radioterápico y quimioterápico (las dos modalidades más importantes en el tratamiento del cáncer). Las células con un trastorno en los mecanismos apoptóticos poseen una capacidad reducida para responder a los agentes que dañan al ADN, al citoesqueleto, o que afectan la progresión del ciclo celular.

Muchos agentes quimioterápicos actúan en fases específicas del ciclo celular y en consecuencia tienen afinidad sólo en células que se encuentran en el pool proliferativo (células en división). Al mismo tiempo las neoplasias más susceptibles al tratamiento quimioterápico son aquellas que

tienen una gran fracción de crecimiento, es decir, un alto porcentaje de células en proceso de división (10).

De los diversos quimioterápicos que actúan como antimetabolitos el Metotrexate (MTX) es una droga citotóxica ampliamente utilizada en el tratamiento del cáncer, con especial actividad contra la leucemia, linfoma, cáncer de mama, coriocarcinoma, etc. El mecanismo de acción más conocido de este agente consiste en la inhibición de la dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima encargada de mantener una concentración intracelular adecuada de folatos en su forma reducida (11, 12,13).

Para que el folato funcione como cofactor en reacciones en las que se realiza la transferencia de moléculas con un átomo de carbono (monocarboxilicas) debe sufrir un proceso de reducción por la enzima (DHFR) que lo convierte en tetrahidrofolato (FH4). La depleción de folatos reducidos (FH4) que ocasiona la inhibición de la enzima DHFR por el MTX, determina una interrupción en la síntesis del ADN y ARN. Al mismo tiempo se interfiere con la capacidad celular para reparar los daños a las cadenas de ADN llevando esto a una ruptura de las mismas.

Es importante resaltar que en toda la bibliografía examinada hasta la fecha, tanto internacional como nacional, no se hace referencia a los cambios en la morfología de las células neoplásicas expuestas al MTX. Sería útil el conocimiento de este último aspecto ya que permitiría aclarar conceptos básicos, tales como la vía de muerte celular (necrosis o apoptosis), utilizada por este agente quimioterápico.

## OBJETIVO

La finalidad del presente trabajo es describir los hallazgos morfológicos provocados por el efecto citotóxico del MTX sobre un cultivo celular, es decir, mediante técnicas de investigación "in vitro".

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Células y medio de cultivo:** Para el desarrollo de este modelo se utilizó el cultivo celular HeLa (sub-línea Hep-2) (14,15) correspondiente a un adenocarcinoma de cuello uterino. Las células fueron mantenidas en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY) con RPMI Médium 1640 (Roswell Park Memorial Institute Culture Médium 1640) suplementado con suero bovino fetal (5%), Gentamicina 50 microgramos/ml y 0,005 M de buffer (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulphonic acid) (HEPES) (Hyclone ®) en atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% y 95% de aire a 37° C. Para el examen microscópico se sembraron aproximadamente 35 x10<sup>4</sup> células en cubreobjetos de vidrio de 24mm cubiertos con Polilisisina y colocados en discos de Petri de 35mm de diámetro.

**Droga e inducción de apoptosis:** Como agente inductor se utilizó MTX (Metotrexate ®, Lederle, Buenos Aires, Argentina) el cuál se adicionó al medio de cultivo en una concentración de 1 mg/ml durante 48 horas. Como controles se utilizaron cultivos sin el agregado de agente inductor.

**Preparación de las muestras:** Después de 48 horas de tratamiento, las células adherentes a los cubreobjetos fueron fijadas con cytospray y coloreadas con la técnica de Papanicolaou modificada para la evaluación morfológica mediante microscopía óptica convencional.

**Procedimiento de coloración:** Después de la fijación, los cubreobjetos fueron transferidos sin dejarlos secar desde el alcohol 96° al agua destilada, pasando por alcohol 70°,50° y agua

corriente. Posteriormente se los coloreó durante 1 minuto con Hematoxilina modificada para Papanicolaou (Biopur, Rosario, Argentina), luego se los colocó en agua corriente y agua destilada por 2 minutos, y se los transfirió a través de alcohol 50%, 70% y 96% sucesivamente. Los cubreobjetos fueron posteriormente coloreados con Orange G6 (Biopur, Rosario, Argentina), durante 3 minutos, lavados en 3 cambios de alcohol 96%, coloreados con Eosina-Alcohólica (EA) (EA 36, Biopur, Rosario, Argentina) por 2 minutos y luego lavados en 3 cambios de alcohol 96°, 2 cambios de alcohol absoluto y 2 cambios de xilól. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos usando Bálsamo natural de Canadá.

**Exámen citológico:** Los portaobjetos se examinaron mediante un microscopio óptico (Leitz Wetzlar, Germany) usando objetivos de 40 y 100 x, las células fueron analizadas de acuerdo con los criterios morfológicos clásicos de Kerr y colaboradores (16).

**Evaluación:** Para evaluar el proceso de inducción de apoptosis, se contaron aproximadamente 1200 células en ambos grupos, tratado y control, donde se identificaron los siguientes tipos celulares: Células sin afectación morfológica, células en mitosis, células apoptóticas y células multinucleadas. Como método estadístico se utilizó el Test de Chi<sup>2</sup> (x<sup>2</sup>).

## RESULTADOS

El desarrollo de este modelo nos permitió un análisis no sólo cualitativo sino también cuantitativo.

Los hallazgos cualitativos mostraron además de la morfología clásica de la apoptosis, la presencia de grandes masas de material cromatínico condensado y acúmulos eosinofílicos intranucleares e intracitoplasmáticos de naturaleza incierta (Fig 1, 2 3 y 4).

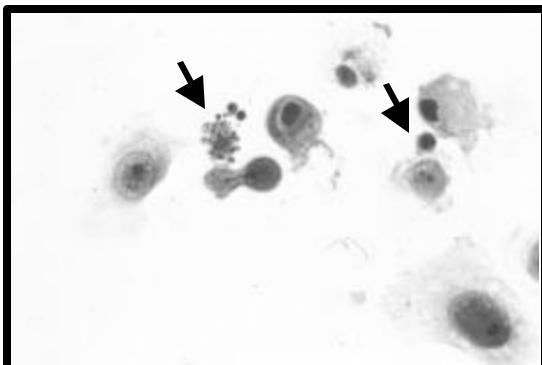


Fig 1. Células Hep-2 apoptóticas. Nótese la presencia de las típicas protrusiones citoplasmáticas y cuerpos apoptóticos (flechas).

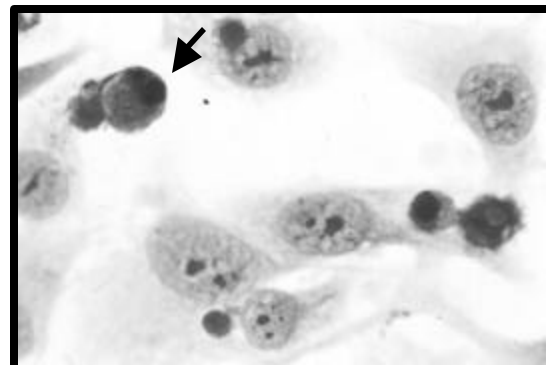


Fig 2. Células Hep-2 apoptóticas. Presencia de material cromatínico condensado e inclusiones intracitoplasmáticas (flecha).

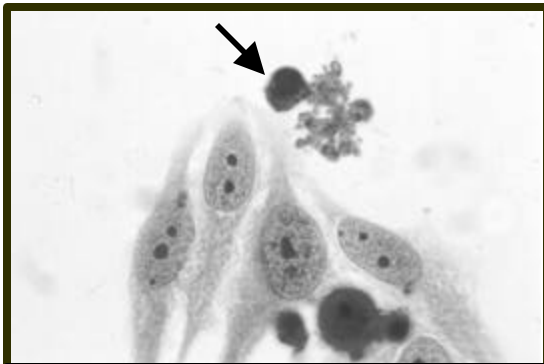


Fig 3. Células Hep-2 apoptóticas. Presencia de protrusiones citoplasmáticas y formación de cuerpo apoptótico (flecha).

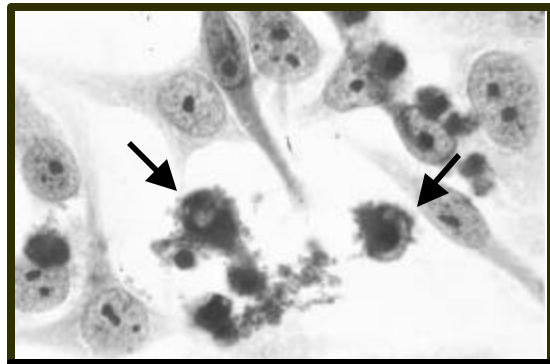
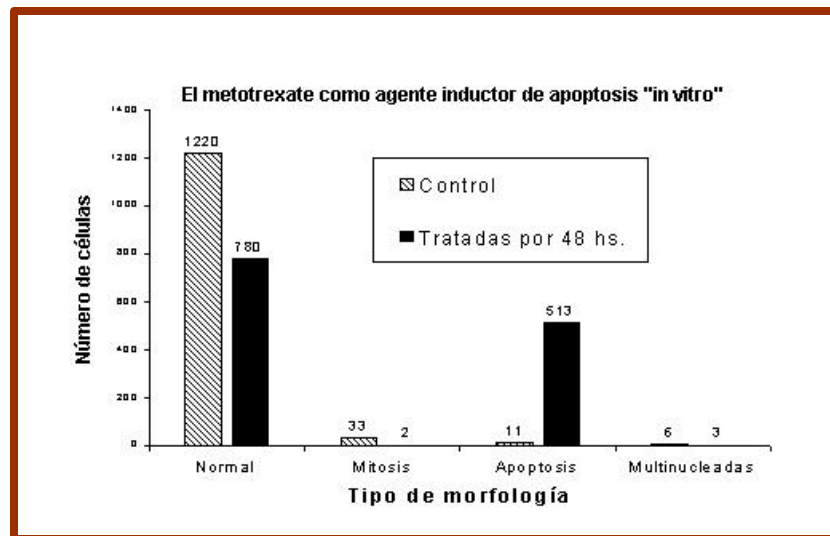


Fig 4. Células Hep-2 apoptóticas. Presencia de protrusiones citoplasmáticas y acúmulos eosinofílicos intranucleares (flechas)

Por otro lado, desde el punto de vista cuantitativo la observación microscópica reveló en el grupo control, 96% de células no afectadas; 2,6% de células en mitosis; 0,9 % de células apoptóticas y 0,5 % de células multinucleadas, mientras que en el grupo tratado con metotrexate los porcentajes fueron 60,1 %; 0,2 %; 39,5 % y 0,2 % respectivamente. Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).



## CONCLUSIÓN

El desarrollo de nuestro modelo experimental de inducción de apoptosis In Vitro en células HeLa (sub-línea Hep-2) de un adenocarcinoma de cuello uterino humano nos permitió observar que:

Si bien el mecanismo por el cuál el metotrexate induce citotoxicidad sigue siendo tema de continua investigación, se sabe que sus efectos ocurren durante la fase S del ciclo celular, induciendo daño al DNA. Nuestros hallazgos morfológicos correspondientes a la acción

citotóxica del metotrexate In Vitro nos permiten concluir que esta droga no es la excepción con respecto a otros agentes quimioterápicos y que su mecanismo de acción consistiría en el daño del ADN y posterior activación de la vía apoptótica.

La morfología apoptótica observada presenta características distintivas, de fácil determinación mediante el uso de microscopio óptico y técnicas de coloración de rutina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. Patología Celular 1: Lesión y Muerte Celulares.2000, Robbins.,Patología Estructural y Funcional.,Cap. 1:1-31.
2. R. G. Goya, G. M. Cónsole, O. M. Spinelli, M. H. Carino, F. Riccillo and F. J. Corrons. Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoid organs is associated with a delayed increase in circulating deoxyribonucleic acid. Apoptosis. 2003 Mar;8(2):171-7.
3. Douglas R. Green and Gerard I. Evan; A matter of life and death. Febrero del 2002, Cancer Cell; 1:19-30.
4. Spinelli, O. M. Y Vinay, C., Apoptosis: una forma diferente de morir. 1996, Pren. Med. Argent.,83. 18-27.
5. Corrons,F. J., Fittipaldi, M. e., Sidoti Hartmann, A. N. y Spinelli, O. M.,Modelo experimental de apoptosis prostática inducida por castración en la rata. 1997, Quirón, 28 : 67-72.
6. Spinelli, O. M., Sidoti Hartmann A., Fittipaldi, M. y Corrons, F. J., Modelo experimental de apoptosis dinámica inducida por dexametasona en rata. 1998, Quirón. 29 : 78-83.
7. Spinelli, O. M., Corrons, F. J., Reigosa, M. y Carri, N., Apoptosis: suicidio celular ante la injuria subletal. Su morfología y detección en células de cultivo. Trabajo Científico presentado en el XXXIV Congreso Argentino de Patología. Rosario, Pcia. De Santa Fé. 5 al 8 de Noviembre de 1997.
8. Spinelli, O. M., Corrons, F. J., Reigosa, M., and Carri, N. G., Apoptosis of neuronal PC12 cells in short term microassay, a study of path to apoptosis (apopath). 1997, FASEB Journal, 11 , A 425.
9. Spinelli, O. M. y Corrons, F. J.,Modelo experimental de apoptosis "in vitro" inducida por etanol en células PC12. 1998, Quirón, 29: 79-83.
10. Goodsell, D. S.,The Molecular Perspective: Methotrexate. 1999, The Oncologist., 4: 340-341.
11. Allegra, C. J. And Grem, J. I., Antimetabolites. Methotrexate. 1997, De Vita: Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5th ed. Chapter 19.6: 432-452.
12. Allegra, C. J.,Antifolates: The Next Millennium.1999, Seminars in Oncology, 26, Suppl 6:1-2.
13. Calvert Hilary., An Overview of Folate Metabolism: Relevant to the Action and Toxicities of Antifolate Anticancer Agents. 1999, Seminars in Oncology, 26, Suppl 6:3-10.
14. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nat Rev Cancer. 2002 Apr;2(4):315-9.
15. ATCC:American Type Culture Collection.<http://www.atcc.org/>
16. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. 1972, Br. J. Cancer 26, 239-257.