

## Citotoxicidad del 1-O-undecilglicerol sobre células de mama humanas mediante análisis de células en tiempo real

### Cytotoxicity of 1-O-undecylglycerol in human breast cells by Real Time Cell Analysis

Marian Hernández-Colina, Grisel Del Toro García

Departamento de Farmacia. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba

#### Artículo original Original Article

##### Correspondencia

Correspondence

Marian Hernández-Colina.  
Departamento de Farmacia. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana. Calle 222 No. 2317, entre 23 y 31, La Lisa, La Habana, Cuba.  
marianhc@ifal.uh.cu

##### Financiación

Fundings

Trabajo financiado por convenio entre la Universidad de la Habana y universidades españolas.

##### Agradecimientos

Acknowledgements

Al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, de la Universidad Autónoma de Madrid, por el uso de las instalaciones y recursos, especialmente a los Dres. Federico Mayor Jr y Petronila Penela.

##### Conflicto de interés

Competing interest

No existen.

Received: 05.04.2016

Accepted: 05.05.2016

#### RESUMEN

<http://dx.doi.org/10.4321/S2340-98942016000200004>

**Objetivos:** Estudiar el efecto del 1-O-undecilglicerol sobre la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 y de mama normales 184B5.

**Métodos:** Se realizó seguimiento a tiempo real de la viabilidad de ambas líneas celulares, con empleo del analizador de células en tiempo real. Se determinó la densidad celular apropiada para el estudio, y se trataron las células con dos concentraciones de 1-O-undecilglicerol durante 48 horas. Se compararon las pendientes del índice celular en cada experimento.

**Resultados:** El 1-O-undecilglicerol redujo significativamente la proliferación de las células MCF-7, mientras que fue poco citotóxico sobre las células 184B5 hasta 75µM. A la concentración de 150µM fue citotóxico para ambas líneas, pero invirtió la pendiente del índice celular de las células de cáncer de mama.

**Conclusiones:** El 1-O-undecilglicerol podría ser candidato para futuros estudios en modelos *in vivo* de cáncer de mama, así como para la profundización en el mecanismo involucrado en este efecto.

**Palabras clave:** alquilgliceroles, análisis celular en tiempo real, MCF-7, 184B5

#### ABSTRACT:

**Aim:** To study the effect of 1-O-undecylglycerol on the proliferation of human breast cancer cells MCF-7 and 184B5 normal breast cells.

**Methods:** Real time following of both cell lines was performed, by Real Time Cell Analyzer. Appropriated cell density was selected, and cells were treated with two concentrations of 1-O-undecylglycerol for 48 hours. Cell index slopes were compared in each experiment.

**Results:** 1-O-undecylglycerol induced significant reduction of MCF-7 cell viability, and was less cytotoxic on 184B5 cells with 75µM. At 150µM was cytotoxic for both lines, but cell index slope of breast cancer cells was negative.

**Conclusion:** 1-O-undecylglycerol could be a candidate for future studies in *in vivo* models of breast cancer, and for further experiments about the mechanism involved in this effect.

**Keywords:** alkylglycerols, RTCA, MCF-7, 184B5



LICENSE 4.0 UNPORTED.

## INTRODUCCIÓN

El aceite de hígado de tiburón tiene actividad antineoplásica en varios tipos de células tumorales<sup>1</sup>, relacionada con el contenido de 1-O-alkilglicerol (AQG), que representan alrededor del 20% del aceite, donde el bajo contenido de AQG reduce la actividad antineoplásica en células transformadas<sup>2</sup>. Los AQG son alquil-éteres lipídicos, estructura para la que se ha descrito la inhibición selectiva de la proliferación de células neoplásicas, con muy pocos efectos en células normales<sup>3</sup>. Estudios previos muestran la acción antiproliferativa de AQG en células de cáncer de mama MCF-7<sup>1,4</sup>.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del 1-O-undecilglicerol (UDG) sobre la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama, en comparación con células de mama normales 184B5, mediante análisis celular en tiempo real (Real Time Cell Analyzer, RTCA).

## MÉTODOS:

### Células

Las células de adenocarcinoma de mama MCF-7 (ATCC, EUA) fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con suero fetal bovino 10%. Las células de mama normales 184B5 (ATCC, EUA) se cultivaron en medio DMEM/F12-HAMS, con suero equino 5%, insulina 10 µg/ml, EGF 20 ng/mL, toxina cólera 100 ng/mL, e hidrocortisona 0,5 µg/mL. Ambas fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

El 1-O-undecilglicerol se sintetizó en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, con 95% de pureza, mediante síntesis de Williamson, como se describe previamente<sup>5</sup>. Se preparó una solución madre 50 mM en etanol absoluto, la cual fue diluida en cada experimento en medio completo hasta 150 µM como solución de trabajo.

### Análisis celular en tiempo real

La cinética de crecimiento en tiempo real de las células MCF-7 y 184B5, en presencia o ausencia de UDG se estudió en un analizador celular en tiempo real (xCELLigence System®, Roche Applied Science, Alemania). El sistema RTCA emplea una placa que contiene microelectrodos interdigitados, integrados en el fondo. El número de células, viabilidad, morfología y grado de adherencia de las células en contacto con los electrodos afecta el ambiente iónico local, y conlleva a incremento de la impedancia. Esto se representa como índice celular (IC) y refleja el cálculo, mediante un algoritmo interno del sistema, de la impedancia dependiente de frecuencia, en ausencia o presencia de células adheridas a la superficie de los pocillos. Para cada experimento se

añadió 100 µL de medio a las placas para lectura de fondo. La suspensión celular se adicionó en 100 µL de medio. Luego de añadir el tratamiento a las 24 h, el volumen final fue 200 µL. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, y monitoreadas en el Sistema RTCA a intervalos de 15 minutos, hasta las 72 horas.

El IC se determinó por sustracción del valor de pocillos con medio del IC de pocillos con medio y células. Se realizaron tres repeticiones de cada condición experimental. La pendiente de las curvas de IC se determinó mediante la fórmula: IC = pendiente \* tiempo + intercepto. Los valores de IC se registraron por el equipo y al análisis se realizó mediante el software RTCA versión 1.2.1. Se consideraron diferentes los valores de pendiente para  $p < 0,01$ .

## RESULTADOS

Con el propósito de seleccionar la densidad celular apropiada, se ensayaron 6000 y 12000 células/pocillo con la línea MCF-7. Las curvas fueron registradas automáticamente (Figura 1A). El IC para 6000 células/pocillo no creció por encima de 1.0, lo que indica insuficiente cantidad de células para demostrar citotoxicidad. Al tratar esta densidad celular con UDG no se observaron cambios en el IC. Ambos tipos de células (12000 células) se trataron con UDG a 75 y 150 µM, según muestra la figura 1B y C. UDG provocó disminución del IC en las células MCF-7 luego de 12 horas, pero las células normales recuperaron la viabilidad alrededor de las 6h después del tratamiento con 75 µM. Sólo las células MCF-7 exhibieron IC negativo.

La pendiente de las curvas se calculó y comparó, y se apreciaron diferencias significativas con los respectivos controles celulares (Figura 2). La pendiente del IC de la línea MCF-7 se redujo significativamente, y estuvo por debajo de -1.0 a 150 µM de UDG. Esto indica que UDG es más activo en las células de cáncer de mama con respecto a las normales, que no alcanzaron citotoxicidad absoluta.

## DISCUSIÓN

Los AQG tienen impacto como inmunoestimulantes<sup>6</sup>, antineoplásicos<sup>7</sup>, promotores de la absorción en la barrera hemato-encefálica<sup>8</sup>, entre otras acciones reportadas<sup>9</sup>. Aunque su acción selectiva se ha basado en su similitud estructural con los alquilfosfolípidos<sup>1</sup>, su toxicidad sobre células normales ha sido apenas estudiada.

La acción citotóxica de los AQG en células MCF-7 ha sido reportada como dependiente de concentración<sup>4</sup>, lo cual coincide con los resultados del estudio. Las células normales fueron mucho menos afectadas por el tratamiento con UDG. Un posible mecanismo para explicar estas diferen-

cias es el mayor contenido de AQQ en células neoplásicas en comparación con las normales, debido a la ausencia de la enzima responsable de la escisión del enlace éter de los AQQ, alquilglicerol monooxigenasa (AGMO)<sup>10</sup>, que está presente en tejidos normales, pero en muy bajos niveles en células neoplásicas<sup>11</sup>. Según el Atlas Humano de Proteínas, no existe expresión detectable de AGMO en las células MCF-7, y hay muy baja concentración en células mioepiteliales de mama normal<sup>12</sup>.

La pendiente del IC permite diferenciar efectos citotóxicos en líneas celulares<sup>13</sup>, con la variación de este parámetro posterior a tratamiento. Esto es una ventaja del sistema xCELLigence sobre ensayos tradicionales de punto final, que son invasivos y se miden a tiempos fijos<sup>14</sup>. Las células MCF-7 mostraron pendiente significativamente diferente respecto a las células normales, lo que sugiere acción citotóxica selectiva del UDG sobre células neoplásicas. El seguimiento continuo del IC mostró que luego de la adición de UDG, las células MCF-7 dejaron de proliferar. Sin embargo, las células normales 184B5 se recuperaron luego del tratamiento con UDG.

## CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos permiten concluir que el UDG provoca efecto selectivo de inhibición de la proliferación sobre las células MCF-7 con respecto a células normales de mama. El UDG podría ser candidato para futuros estudios en modelos *in vivo* de cáncer de mama, así como para la profundización en el mecanismo involucrado en este efecto.

## REFERENCIAS

1. Krotkiewski M, Przybyszewska M, Janik P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). *Med Sci Monit*. 2003; 9(11):PI131-PI135.
2. Davidson B, Rottanburg D, Prinz W, Cliff G. The influence of shark liver oils on normal and transformed mammalian cells in culture. *In Vivo*. 2007; 21:333-338.
3. Mollinedo F, Fernández-Luna JL, Gajate C, *et al.*. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid Et-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): Molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*. 1997; 57:1320-1328.
4. Sotomayor H, Kasem MI, Brito V, *et al.*. Citotoxicidad de 1-O-decilglicerol y 1-O-dodecilglicerol Sintéticos sobre carcinoma humano de mama MCF-7. *Acta Farm Bonaerense*. 2006; 25(3):339-343.
5. León J, Merchán F, Bilbao M, Nils A. Síntesis del 1-O-dodecilglicerol. *Rev Cub Farm*. 2002; 36(Supl Esp 1):127-129
6. Qian L, Zhang M, Wu S, Zhong Y, Van Tol E, Cai W. Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes. *PLoS ONE*. 2014; 9(4):e96207.
7. Deniau A, Mosset P, Le Bot D, Legrand AB. Which alkylglycerols from shark liver oil have anti-tumour activities? *Biochim*. 2011; 93(1):1-3.
8. Erdlenbruch B, Kugler W, Schinkhof C, Neurath H, Eibl H, Lakomek M. Blood-brain barrier opening with alkylglycerols: Biodistribution of 1-O-pentylglycerol after intravenous and intracarotid administration in rats. *J Drug Target*. 2005; 13(3):143-150.
9. Iannitti T, Palmieri B. An update on the therapeutic role of alkylglycerols. *Mar Drugs*. 2010; 8:2267-2300.
10. Watschinger K, Werner E. Alkylglycerol Monooxygenase. *IUBMB Life*. 2013; 65(4):366-372.
11. Soodsma JF, Piantadosi C, Snyder F. The biocleavage of alkyl-glyceryl ethers in Morris hepatomas and other transplantable neoplasms. *Cancer Res*. 1970; 30:309-311.
12. Cell line expression of AGMO - RNA Summary - The Human Protein Atlas. [internet] The human protein atlas v.14; [actualizado 26 de febrero 2016; citado 26 de febrero 2016]. Disponible en: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000187546-AGMO/cell>.
13. Kustermann S, Boess F, Bunes A, *et al.*. A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicol in Vitro*. 2013; 27(5):1589-1595.
14. Atienzar F, Gerets H, Tilmant K, Toussaint G, Dhalluin S. Evaluation of impedance-based label-free technology as a tool for pharmacology and toxicology investigations. *Biosensors*. 2013; 3:132-156.

FIGURAS

Figura 1. Efecto del 1-O-undecilglicerol (UDG) en el índice celular de células MCF-7 y 184B5. (A) Efecto de la densidad celular de la línea MCF-7 en la citotoxicidad del UDG, mostrada como Índice celular, de 0 a 72 horas, obtenida en analizador de células en tiempo real. (B) Efecto del UDG en el Índice celular de células MCF-7 (12000 células/pocillo) a las concentraciones indicadas, por 48 horas. (C) Efecto del UDG en el Índice celular de células 184B5 (12000 células/pocillo) a las concentraciones indicadas, por 48 horas.

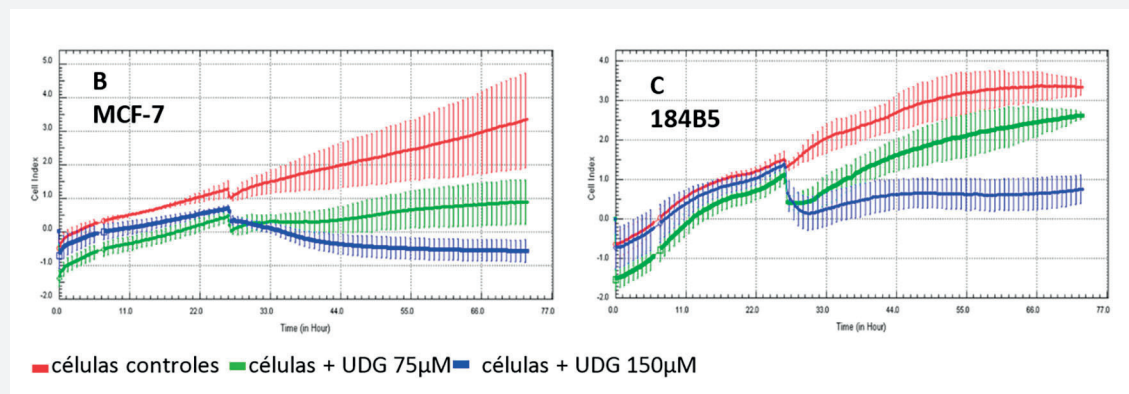
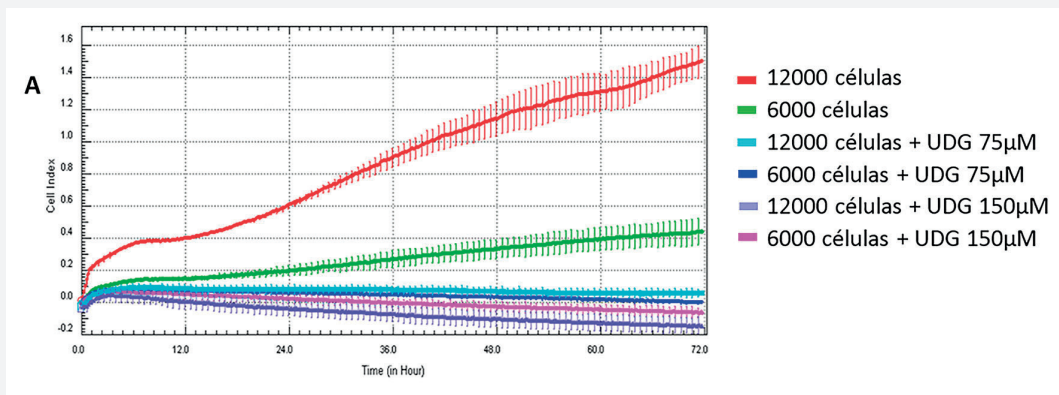


Figura 2. Pendiente de las curvas de índice celular determinada luego de 48 horas de tratamiento con UDG en células MCF-7 y 184B5, mediante software RTCA versión 1.2.1. \*† p<0.01 en comparación con el control correspondiente.

