

Caracterización de diferentes cepas de células Caco-2 para su uso en ensayos de permeabilidad *in vitro*

Characterization of different Caco-2 cell strains for their use in *in vitro* permeability tests

Andrés Mauricio Cogollo Carvajal, Luz Marina Restrepo
Múnera, Adriana María Ruiz Correa

Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la línea de células Caco-2 es la más utilizada para la evaluación de la permeabilidad gastrointestinal *in vitro*; sin embargo, se han encontrado diversos factores que causan variaciones en los valores de permeabilidad para un mismo compuesto.

Objetivo: establecer la idoneidad de cepas diferentes de células Caco-2 en la determinación de la permeabilidad de fármacos.

Métodos: se evaluó la morfología de los cultivos de células con microscopio invertido, su velocidad de crecimiento, actividad de fosfatasa alcalina, resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y permeabilidad del amarillo de lucifer, propranolol y furosemida a través de ellas. **Resultados:** el seguimiento a través de microscopio demostró que HTB-37 forma monocapas, mientras que MF y el clon D5-G12 presentan estructuras que indican la formación de multicapas. En las tres cepas la fosfatasa alcalina fue detectada desde el día 5 de cultivo. HTB-37 creció lentamente y presentó los valores más altos de TEER ($908 \pm 33 \Omega \cdot \text{cm}^2$) y la

menor cantidad transportada de amarillo de lucifer ($0,29 \pm 0,07\%$). Esta línea también mostró mayores diferencias entre la permeabilidad de propranolol (marcador de alta permeabilidad) y furosemida (marcador de baja permeabilidad).

Conclusiones: los resultados indican que la cepa HTB-37 es la más idónea para uso en ensayos de permeabilidad en nuestro laboratorio y por lo tanto puede ser empleada para la validación del modelo celular para la aplicación del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

Palabras clave: caco-2; cepa; clon; monocapas; permeabilidad; paracelular; ATCC.

ABSTRACT

Introduction: Caco-2 cell line is the most used to evaluate *in vitro* gastrointestinal permeability, but it has been found that different factors cause variations permeability values for the same compound.

Objective: To establish the suitability of different Caco-2 cells in determining the drug permeability.

Methods: The morphology of the cell cultures, the growth rate, the activity of alkaline phosphatase, transepithelial electrical resistance (TEER) and lucifer yellow, propranolol and furosemide permeability were all evaluated on microscopy for each strain.

Results: On the microscopic analysis, HTB-37 strain formed cell monolayers, whereas multi-layer structures were observed in MF and in D5-G12 clone. Alkaline phosphatase was detected from the 5th day of culturing in all tested strains. HTB-37 line showed slow growth, with the highest values of transepithelial electrical resistance ($908 \pm 33\Omega * \text{cm}^2$) and the lowest transported amount of lucifer yellow ($0.29 \pm 0.07\%$). At the same time, the major differences were found between the permeability of propranolol (high permeability marker) and that of furosemide (low permeability marker).

Conclusions: the results indicate that the HTB-37 strain is the most suitable for use in permeability testing in our laboratory and therefore can be used to validate the cell model for the biopharmaceutical classification system.

Keywords: Caco-2; strain; monolayers, permeability; paracelular; ATCC.

INTRODUCCIÓN

El modelo de células Caco-2 se utiliza para la evaluación de la permeabilidad gastrointestinal *in vitro*. Las experiencias obtenidas con esta línea celular muestran tanto éxitos como falencias en su capacidad predictiva y señalan que factores como la fuente u origen de las células, el número de pase, entre otros son causa de variabilidad en los resultados de permeabilidad para un mismo compuesto.^{1,2}

Desde su descubrimiento, a mediados de los años 70, esta línea se ha utilizado en diferentes laboratorios, en diversas condiciones de cultivo y mantenimiento que a su vez generan presiones de selección convirtiéndola en una línea de carácter heterogéneo.¹ Esto puede ser causa de variación de los resultados intra e interlaboratorio y constituye una desventaja del modelo cuando va a utilizar como herramienta para la clasificación de fármacos dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB).

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes cepas de esta línea celular para establecer su idoneidad en la determinación de la permeabilidad de fármacos.

MÉTODOS

Cultivos celulares: se emplearon las siguientes células: Caco-2 MF, cepa originaria de la *American Type Culture Collection* -ATCC- (*Manassas, VA*), donada por la profesora Marta Fontanilla, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (pase 60); Caco-2 D5G12, clon obtenido a partir de la cepa anterior por el método de diluciones limitantes (pase 8), y Caco-2 HTB-37, lote 58471889, obtenida de la ATCC (pase 13).

Las diferentes cepas se sembraron en frascos T25 (SPL) a una concentración de 5×10^5 células por frasco con 7 mL de medio de cultivo DMEM (*Lonza*) alto en glucosa, suplementado con SBF (*GIBCO*) al 10 % sin inactivar, L-glutamina (*Lonza*) 1 % y mezcla de penicilina-estreptomicina 1 % (*Lonza*). Las células se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂, 95 % de aire y 90 % de humedad relativa, hasta una confluencia del 90 %. El medio se reemplazó cada 3 días.

Para los estudios de permeabilidad, las células provenientes de cultivos en frascos T25 (6×10^4 células/cm²) se sembraron en insertos *Transwell*[®] de polietilentereftalato (PET) con cambios de medio cada tres días. Las capas obtenidas se observaron por microscopía invertida y la velocidad de crecimiento se estableció como el tiempo que requirió cada cepa para alcanzar la confluencia.

Resistencia eléctrica transepitelial (TEER): se midió con un equipo *Millicell-ERS (Millipore Corp. Bedford, MA., USA)*. Las medidas se realizaron sobre seis insertos de cada cepa a los 5, 9, 13, 17 y 21 días de cultivo. A los valores de TEER obtenidos para los insertos con células, en *buffer* de transporte (*BT, HEPES 25 mM en HBSS*), se les restó el valor registrado en un inserto con BT y sin células. El resultado se multiplicó por el área efectiva de la membrana para obtener el valor final de TEER. Sólo se emplearon aquellas monocapas con valores de TEER superiores a $250 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Permeabilidad al amarillo de lucifer (AL): a seis insertos de cada una de las cepas se les adicionó una solución 25 mM de AL (*GIBCO*) en BT a la cámara apical en cada *Transwell*[®] con agitación a 50 rpm durante 120 minutos a 37 °C, 90 % de humedad relativa y 5 % de CO₂. Se extrajeron muestras de 500 µL de BT de la cámara basolateral a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos y el volumen extraído fue compensado con la adición del mismo volumen de BT. Las lecturas se realizaron en un espectrofluorómetro *SPECTRAMax GEMINI XS*, a una longitud de onda de excitación de 428 nm y una de emisión de 536 nm, usando BT como blanco.

Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina: a seis pozos de cada una de las cepas, cultivados en platos PET de 24 pozos, se les retiró el medio de cultivo y se les adicionó 400 µL de p-nitrofenol fosfato (1 mg/mL) en *buffer* de glicina 0,1 M, pH 10,4. Los platos se incubaron a 37 °C por 1 hora en oscuridad. La reacción se detuvo adicionando 100 µL de NaOH 3 N. De cada pozo se retiraron 250 µL de la mezcla y se transfirieron a un plato de 96 pozos. Se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de microplacas para *ELISA Stat Fax*[®] 2100. La concentración de p-nitrofenol liberado, se determinó por interpolación en una curva de calibración (0,05-2,00 ppm). La actividad de fosfatasa alcalina se expresó como los µg/mL de p-nitrofenol generado en 60 minutos. Se emplearon fibroblastos 3T3, que no expresan esta enzima, como control negativo.

Permeabilidad de propranolol y furosemida: se emplearon tres monocapas por fármaco, de la cepa HTB-37, con 20 a 21 días de cultivo sobre insertos *Transwell*[®]. Estas se incubaron con el BT durante 15 minutos a 37 °C y 50 rpm y se les midió la TEER. Posteriormente, se removió el BT y se aplicaron 0,4 mL de la solución donadora de fármaco, en el compartimento apical y 1,2 mL de BT libre de fármaco en el compartimento basolateral. Los insertos se incubaron nuevamente durante 120 minutos. Se mantuvieron las condiciones "*sink*" durante todo el ensayo.

Cuantificación de los fármacos por HPLC: las cantidades transportadas de cada fármaco se cuantificaron en un *HPLC Agilent (Hewlett Packard 1100, Waldbronn, Germany)*, con un inyector

manual de 20 μL (*Mod. Rheodyne*) 1328A y un detector *UV-Vis G1314A*. La cuantificación de propranolol se realizó en una columna *Agilent Eclipse Plus* (150 x 4,6 mm-5 μ), usando como fase móvil una mezcla (50:50) de *buffer* fosfato 15 mM pH 2,75, metanol, a un flujo de 1,5 mL/min y una longitud de onda de 320 nm. Para la cuantificación de furosemida se utilizó una columna *Lichrospher C₁₈* (250 x 4,6 mm-5 μ) de *Merck*, empleando como fase móvil una mezcla (47:40:13) de *buffer* fosfato 15 mM, pH 2,0, acetonitrilo y metanol, a un flujo de 1,0 mL/min y una longitud de onda de 300 nm.

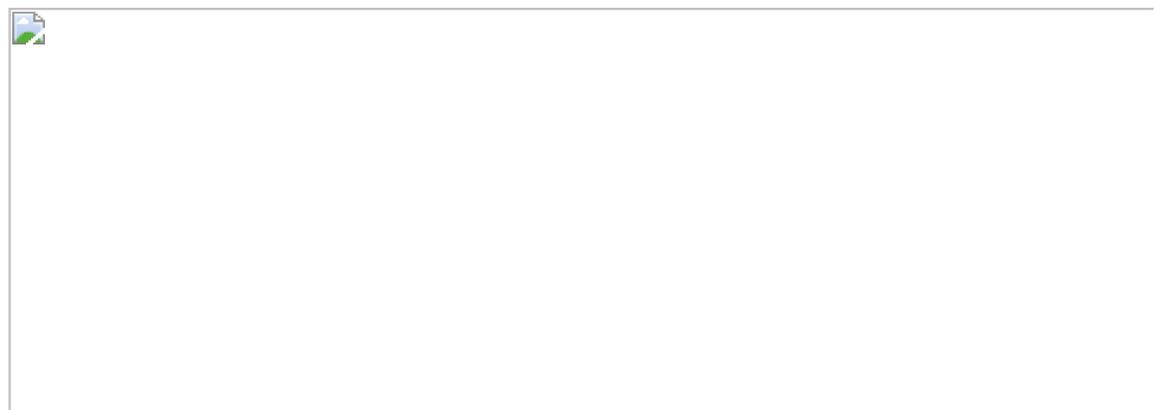
El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) se calculó

mediante la ecuación:  donde, VR: volumen de medio en el lado basolateral (mL); A: área superficial del filtro (1,13 cm²); C₀: concentración inicial en la solución donadora y dC/dt: pendiente de la curva de concentración acumulada de fármaco vs tiempo.

Los resultados de los diferentes ensayos se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar (D.S). Para el análisis comparativo de los datos se empleó una prueba t de *Student* para muestras independientes usando una hoja de cálculo *MS Excel* 2010. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Cultivos celulares: la evaluación microscópica, el día 21 de cultivo, mostró la formación de monocapas con HTB-37; mientras que MF y D5-G12 formaron agregados celulares tipo "*cluster*". Otro hallazgo importante fue la formación de domos en el cultivo de HTB-37 ([figura 1](#)). Esta cepa presentó un crecimiento lento, la confluencia se alcanzó el día 14, mientras que en D5G12 y MF se logró los días 9 y 5, respectivamente.



Resistencia eléctrica transepitelial : los valores de TEER fueron semejantes para MF y D5G12 y no superaron los 250 $\Omega \times \text{cm}^2$. De

otro lado, en HTB-37 estos aumentaron paulatinamente hasta el día 21 de cultivo, con valores finales de $908 \pm 33 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (figura 2).



Permeabilidad al amarillo de lucifer: el coeficiente de permeabilidad aparente para AL y el porcentaje permeado de este marcador de permeabilidad paracelular fueron significativamente menores en HTB-37 ($0,12 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $0,29 \pm 0,07 \%$) en comparación con los obtenidos para D5G12 ($2,98 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $5,53 \pm 0,72 \%$) y MF ($2,06 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $3,82 \pm 0,81 \%$).

Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina: la actividad de fosfatasa alcalina se muestra en la figura 3; fue notoria a partir del día cinco de cultivo y máxima el día 17 en HTB-37 y el día 21 en D5G12 y MF. El día 21 de cultivo la actividad de esta enzima, no mostró diferencias significativas ($p=0,05$) entre HTB-37 y MF, pero en D5G12 se evidenció una menor actividad.



Permeabilidad de propranolol y furosemida: los coeficientes de permeabilidad para propranolol y furosemida (tabla) solo fueron evaluados en HTB-37 y MF por la semejanza en la actividad de fosfatasa alcalina que presentaron ambas cepas. El cociente entre los valores de permeabilidad del propranolol y furosemida demuestra una mayor capacidad de discriminación de la cepa HTB-37.

Tabla. Resultados de permeabilidad de propranolol y furosemida sobre monocapas de células Caco-2

Fármaco	Caco-2 MF*	Caco-2 HTB-37*
	P_{app} (10^{-6} ; cm/s)	P_{app} (10^{-6} ; cm/s)
Propranolol (PROP)	148,14±20,94	45,60±0,56
Furosemida (FUR)	37,50±1,55	3,72
$(P_{app} PROP)/(P_{app} FUR)$	3,95	12,26

* Número de insertos=3

DISCUSIÓN

La formación de monocapas representa una ventaja para la realización de ensayos de permeabilidad, ya que se asegura una barrera homogénea y reproducible para el paso de las sustancias. Esta propiedad se encontró con la cepa HTB-37 que además presentó formación de domos, una característica morfológica propia de la línea celular Caco-2. Los domos muestran la capacidad

de estas células para realizar el transporte de fluidos en dirección apical-basolateral y son signo de diferenciación enterocítica.^{3,4,5}

La alta velocidad de división para MF y D5G12 también ha sido observada por otros autores⁶, parece estar asociada a la diferencia en el número de pase de las cepas utilizadas (MF pase 60, D5G12 pase 8, pero derivado de MF, HTB 37 pase 13). Caco-2 es una línea celular heterogénea formada por sub-poblaciones con diferentes velocidades de crecimiento, por lo que las siembras consecutivas favorecen la selección de subpoblaciones de crecimiento rápido.¹

La TEER permite evaluar indirectamente la expresión adecuada de las uniones intercelulares y el factor estructural más decisivo que se relaciona con cambios en los valores de este parámetro es el perfil y niveles de las diferentes claudinas expresadas por la línea celular en sus uniones intercelulares.⁷ La claudina-1 parece jugar un papel importante en la morfología y conducta de células de carcinoma de colón.⁸ Los valores bajos de TEER en las capas formadas por MF y D5G12 revelan una escasa unión célula-célula lo que hace pensar en cambios en la expresión de las claudinas relacionados con el número de pase. Posiblemente por esta razón HTB-37, con menor número de pase, muestra valores altos de TEER; sin embargo, este hallazgo es contrario a lo observado por Lu et al.⁶

El ensayo con AL confirma estos hallazgos. El AL es una molécula fluorescente hidrofílica, utilizada como marcador de permeabilidad paracelular para determinar la integridad de las uniones intercelulares entre las células que forman una monocapa.^{9,10} Valores bajos de P_{app} para este marcador, como los encontrados con HTB-37, sugieren uniones celulares idóneas, contrario a lo que insinúan los valores obtenidos para D5G12 y MF.

La expresión y actividad de fosfatasa alcalina es de ayuda para determinar el grado de diferenciación y el tiempo utilizado por cada línea celular para alcanzarlo. Los resultados demuestran que HTB-37, aunque tardó más en alcanzar la confluencia, presenta una actividad de fosfatasa alcalina comparable a MF, con un crecimiento más acelerado. Lo que no ocurrió con D5G12 que a pesar de crecer rápidamente expresó los niveles más bajos de esta enzima, sugiriendo una velocidad de diferenciación más lenta en este clon.

La evaluación de permeabilidad de furosemida y propranolol probó que ambas cepas diferencian entre fármacos de alta (propranolol) y baja (furosemida) permeabilidad. Sin embargo, HTB-37 se destaca por su mayor capacidad de discriminación.

La actividad de fosfatasa alcalina permitió evidenciar la diferenciación de las cepas utilizadas. La calidad de las uniones

entre células, reflejadas por los altos valores de TEER, bajos niveles de AL permeados y capacidad de discriminación entre fármacos de alta y baja permeabilidad indican que HTB-37 es la cepa más idónea para ensayos de permeabilidad bajo nuestras condiciones experimentales, por lo que será utilizada para la validación del modelo.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Gestión Tecnológica de la Universidad de Antioquia y a *Humax Pharmaceutical S.A.*, por brindarnos el apoyo económico para desarrollar este proyecto. A la IPS-Universitaria, Servicios de Salud Universidad de Antioquia por facilitar el espacio del laboratorio de terapia celular y biobanco para los cultivos celulares.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en relación con los resultados obtenidos en este trabajo y las fuentes de financiación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walter E, Kissel T. Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. *Eur J Pharm Sci* 1995;3:215-230.
2. Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, Dehertogh P et al. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur J Pharm Sci* 2008;35:383-396.
3. Ramond MJ, Martinot-Peignoux M, Erlinger S. Dome formation in the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Influence of ouabain and permeable supports. *Biol Cell* 1985;54:89-92.
4. Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol* 1984;247(3 Pt 1):C260-267.
5. MacCallum A, Hardy SP, Everest PH. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. *Microbiology* 2005;151:2451-2458.
6. Lu S, Gough AW, Bobrowski WF, Stewart BH. Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened

TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. J Pharm Sci 1996;85:270-273.

7. Anderson JM y Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;1:a002584.

8. Hou Q, Kinugasa T, Wang L, Huang J, Zhao J, Shibaguchi H et al. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. Anticancer Res 2009;29:851-858.

9. Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Zerrouk N, Mura P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. Eur J Pharm Sci 2006; 27:354-362.

10. Uchida M, Fukazawa T, Yamazaki Y, Hashimoto H, Miyamoto Y. A modified fast (4 day) 96-well plate Caco-2 permeability assay. J Pharmacol Toxicol Methods 2009;59:39-4.

Recibido: 12 de octubre de 2015

Aprobado: 2 de marzo de 2016

Andrés Mauricio Cogollo Carvajal. Calle 67 No. 53-108, Bloque 1, laboratorio 311. Facultad de Química Farmacéutica. Teléfono (574) 2195478. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.