



Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de tumores del sistema nervioso central

Tutor: Eduardo Fernández Jover

Co-tutoras: Elisa Checa Chavarría

Gema Martínez Navarrete

Instituto de Bioingeniería

Departamento de Biología celular

Área de neuroprótesis y rehabilitación visual

Beatriz García Alonso

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

2014/2015

Índice

Resumen.....	2
Introducción	3
Glioblastoma Multiforme.....	6
Barrera hematoencefálica.....	8
Tratamientos actuales y futuros	9
Antecedentes y objetivos.....	11
Materiales y métodos	12
Resultados.....	21
Discusión	32
Conclusiones y proyección futura	34
Bibliografía	35



Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica para tratar tumores como el glioblastoma multiforme.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), previendo que el número de nuevos casos podría aumentar hasta en un 70% en los próximos 20 años. Concretamente en este trabajo nos centraremos en el Glioblastoma Multiforme (GBM), el tumor cerebral más común en adultos. Actualmente, el quimioterapéutico más utilizado para tratar el GBM es la Temozolomida, pero dada la resistencia que genera el tumor a este tratamiento, se están investigando otros fármacos contra el GBM. Una alternativa a la Temozolomida que se ha estudiado en este trabajo, es el tratamiento del GBM con el uso de un derivado de Camptotecina (CPT). Dadas las dificultades que presenta este compuesto para pasar la barrera hematoencefálica y llegar a las células tumorales, la CPT se ha combinado con una molécula directora con potencial de traspasar la barrera hematoencefálica. Debido a su alto grado de hidrofobicidad, el profármaco se disolvió en DMSO, pero este disolvente mostró alta toxicidad en ensayos *in vitro*. Por este motivo, el principal objetivo de este trabajo es continuar con la caracterización del derivado de la CPT, optimizar técnicas para la identificación de apoptosis neuronal y probar un disolvente alternativo al DMSO. En este trabajo se demuestra que el etanol presenta menor toxicidad que el DMSO *in vitro*. Por otro lado, se optimizaron técnicas como la citometría de flujo y ensayos de apoptosis para la medición de la viabilidad celular empleando CPT disuelta en DMSO como modelo de apoptosis en cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata.

World Health Organization (WHO) affirms that cancer is the main cause of mortality in the world. It estimates that new cases will increase a 70% next 20 years. In this work we will focus on Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common cerebral cancer in adults. Currently, Temozolomide is the most widely chemotherapeutic to treat GBM, due to the fact that GBM generates resistance to the treatment, there are many investigations to check other drugs as a treatment. One alternative to this treatment could be a Camptothecin (CPT) derivatives. Nevertheless, this chemotherapeutic has difficulties to pass the hemato-encefalic barrier and raise cancer cells, so the prodrug has been combined with a molecule which lets the pass through Hemato-encefalic barrier. Due to the prodrug hydrofobicity, it was dissolved in DMSO. However, previous investigations showed DMSO toxicity in *in vitro* assays. Finally, the main goal of this report is continue with CPT derivatives characterization, improve neuronal apoptosis identification techniques and check a dissolvent less toxic than DMSO. This report shows that the ethanol is less toxic than DMSO in *in vitro* assays. On the other hand, Flow Cytometry and apoptosis assays had been improving in order to analyze cellular viability administrating CPT dissolve in DMSO as an apoptosis model in rat cerebral cortex primary culture.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (*World Health Organization* (WHO)) en 2012 se diagnosticaron 14 millones de nuevos casos y provocó 8,2 millones de muertes. Se prevé que el número de nuevos casos aumente hasta un 70% en los próximos 20 años.

Esta enfermedad es el resultado de un conjunto de alteraciones que promueven que las células proliferen descontroladamente e invadan los tejidos normales. Los genes que participan en la carcinogénesis están implicados principalmente en: la progresión del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN, la adherencia entre células vecinas y la capacidad de migración [1,2].

Para mantener la homeostasis en el organismo durante estos procesos, las células deben mantener su diferenciación celular, así como, dividirse y morir cuando sea necesario. En cambio, si la célula sufriera una modificación genética que le permitiera sobrevivir y dividirse de forma descontrolada, se produciría una alteración en la organización del tejido por la expansión de células anormales, dando lugar a un cáncer [1,2,3]. Las principales características de las células cancerígenas son:

- Independencia de las señales internas y externas que regulan la proliferación celular.
- Presentan inestabilidad genética y un alto grado de división, lo que hace que la eficacia de reparación del ADN disminuya, aumentando la tasa de mutaciones y produciendo un cariotipo anormal e inestable.
- Suelen tener la capacidad para evitar la apoptosis (muerte celular programada), lo que les permite proliferar ilimitadamente.
- Carecen de moléculas de adhesión celular específicas, con lo que poseen la capacidad para migrar de sus tejidos de origen (invasión) y proliferar en tejidos distantes, originando una metástasis.
- Inducción de la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) para que la masa tumoral reciba el oxígeno y los nutrientes necesarios para su crecimiento.

Generalmente las mutaciones que originan el cáncer no perjudican a las células que las poseen, sino que les proporciona una ventaja selectiva sobre las normales ya que les permite dividirse más que sus vecinas dando como resultado el desarrollo de células cancerosas que afectan a las normales alterando su estructura y función. Normalmente, estas mutaciones van

apareciendo de forma gradual, lo que hace que el cáncer sea una enfermedad más común en edades avanzadas.

Las principales mutaciones causantes de tumores ocurren en genes que intervienen en el ciclo celular, como aquellos que codifican proteínas para regularlo positiva o negativamente.

Los genes que regulan positivamente el ciclo celular se denominan protooncogenes, ya que sus productos activan la proliferación celular, un fallo en su regulación puede originar un tumor debido a una proliferación descontrolada de las células. Llegados a este punto de sobreactivación, el protooncogén pasa a denominarse oncogén. Entre ellos están aquellos genes que codifican ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdk, *Cycline dependent of kinases*), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*), el Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo 1 (IGF-1, *Insuline-like Growth Factor-1*) o la Interleuquina 3 (IL-3, *Interleukin 3*). Muchas mutaciones en protooncogenes alteran las vías de señalización del ciclo celular de forma que envían una señal de proliferación cuando no es necesaria, activando el crecimiento, replicación y división celular. Las mutaciones que activan los complejos ciclina-Cdks provocarán que el ciclo celular no se detenga en los momentos establecidos, ocasionando una división descontrolada de la célula afectada (Figura 1).

Los genes que regulan el ciclo celular negativamente son genes supresores de tumores. Estos genes aseguran que el ciclo no continúe si en un punto del mismo se ha producido una alteración del proceso normal. Las regiones concretas donde se realizan estas comprobaciones son los *puntos de verificación*, los cuales se encuentran normalmente en la fase del ciclo celular G1 tardía, que previene la entrada en fase S, y en G2 tardía que evita la entrada en mitosis. La principal función de los productos de estos genes es asegurar que el ciclo celular se lleva a cabo correctamente. Entre estos genes encontramos p53, Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN, *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate 3-phosphatase*) o Rb (Retinoblastoma). El factor p53 controla la proliferación y la respuesta celular frente a un daño en el ADN, activando la apoptosis. Una pérdida de función de p53 provoca la continuación del ciclo celular, evitando la apoptosis y aumentando la inestabilidad genética, permitiendo futuras mutaciones que malignicen la célula. [1-5] (Figura 1).

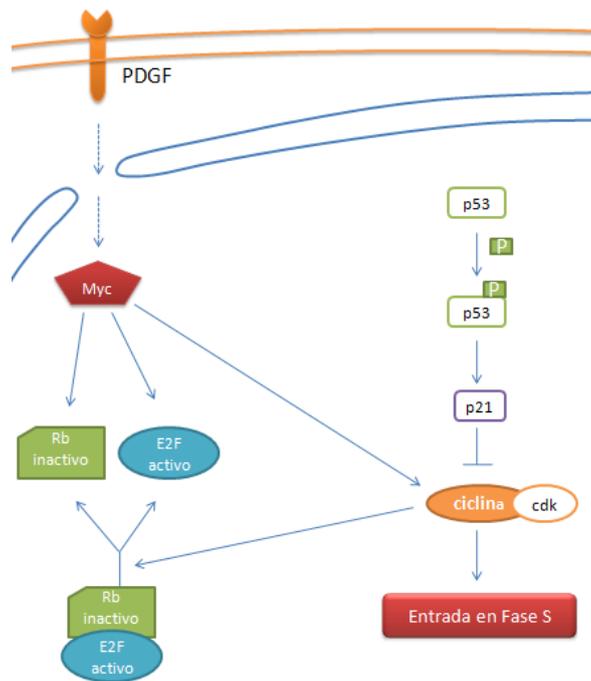


Figura 1. Vías de señalización y factores involucrados en el ciclo celular.

Se han realizado muchos estudios con el fin de determinar los principales genes y mutaciones responsables del desarrollo del cáncer. A medida que avanzan estos estudios sobre las células cancerígenas, cómo sobreviven, proliferan y diseminan, mejoran los tratamientos para combatir la enfermedad. Es una tarea difícil debido, por un lado, a la gran variedad de mutaciones que pueden sufrir las células cancerígenas, y por otro lado a que estas mutaciones pueden generar resistencia a los tratamientos administrados [1,2].

En este trabajo, nos centraremos en los cánceres del Sistema Nervioso Central (SNC), concretamente en el Glioblastoma Multiforme (GBM), un tumor procedente de células gliales. La OMS clasifica los tumores del SNC en una escala según la malignidad del mismo que se basa en el tipo de efecto o daño citológico que producen y la tasa de supervivencia esperada (Tabla 1).

Grado OMS	Daños citológicos	Tasa de supervivencia
I	Tumor benigno, sólo necesita la resección quirúrgica para eliminarlo	
II	Atipia citológica	5 años
III	Anaplasia y actividad mitótica.	2-3 años
IV	Atipia citológica, anaplasia, actividad mitótica, proliferación microvascular y necrosis	1 año

Tabla 1. Clasificación de gliomas según la OMS [6].

Los gliomas son aquellos tumores desarrollados a partir de las células gliales. Dentro de las células de la glía se encuentran la microglía, los astrocitos y los oligodendrocitos. En concreto nos centraremos en los astrocitomas, tumores provenientes de los astrocitos, ya que en este trabajo se ha estudiado un fármaco para el tratamiento del GBM. Los astrocitomas se clasifican en: astrocitoma difuso de grado II, astrocitoma anaplásico de grado III y glioblastoma multiforme de grado IV, siendo este último el más agresivo y para el cual se ha desarrollado el profármaco que se ha estudiado durante este trabajo [6].

GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El Glioblastoma Multiforme es el tumor cerebral más común en adultos, teniendo una incidencia anual en España de 13 casos por cada 100.000 habitantes.

La incidencia del GBM es más frecuente en edades avanzadas, en torno a los 60-70 años y afectando predominantemente a hombres, siendo la edad avanzada un factor negativo en el pronóstico de dichos pacientes. Los síntomas de esta enfermedad suelen ser convulsiones, pérdida de memoria, cambios de comportamiento o dolores de cabeza, ya que a medida que crece el tumor, aumenta la presión intracraneal [7].

El GBM se desarrolla a partir de los astrocitos y está clasificado como un astrocitoma grado IV, se puede distinguir entre glioblastoma primario y secundario. El glioblastoma primario, el más común, se desarrolla *de novo* sin presencia de una lesión maligna precursora. Mientras que el glioblastoma secundario es aquel que progresa desde un astrocitoma de bajo grado hasta el Glioblastoma Multiforme de grado IV. Ambos tipos de glioblastomas son indistinguibles entre sí histológicamente, para diagnosticarlos se deben analizar sus perfiles genéticos y epigenéticos [8].

El GBM es el tumor cerebral más común y maligno ya que suele generar resistencia a quimioterapia y radioterapia. Por este motivo, este tumor es uno de los más estudiados e investigados actualmente, lo que ha permitido identificar constituyentes moleculares y celulares y así poder identificar dianas terapéuticas que permitan generar tratamientos más efectivos para poder mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes afectados por este tumor.

En el GBM aparecen alteraciones en vías de señalización y expresión genética. Entre las alteraciones más importantes en las vías de señalización encontramos una sobreactivación de vías de proliferación como las mediadas por el Receptor de Tirosín Quinasa (RTK, *Tyrosin Kinase Receptor (TKR)*), Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (RFCE, *Epidermal*

Growth Factor Receptor (EGFR)) y Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FCF, *Fibroblast Growth Factor (FGF)*), así como la inhibición de factores de activación de apoptosis y del control de ciclo celular como son p53 y PTEN, un supresor tumoral que impide la activación de AKT1 (*v-akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1*). Estas alteraciones activan la proliferación e incrementan su resistencia a quimioterapéuticos. Las mutaciones en p53, PTEN, Isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1, *Isocitrate dehydrogenase 1*) o la sobreexpresión del EGFR, son algunos de los marcadores moleculares para el diagnóstico del glioblastoma [8].

El diagnóstico y tratamiento precoz del GBM es importante para aumentar la supervivencia del paciente, muchas veces esta tarea es complicada ya que las técnicas de diagnóstico presentan un alto coste económico, algunas son muy invasivas y en algunos casos, cuando se detecta el tumor, éste está muy avanzado en su desarrollo. Por ello, el uso de biomarcadores tumorales, podría ser una herramienta eficaz, cómoda y más barata para el diagnóstico que las técnicas de diagnóstico tradicionales. Los biomarcadores son semicuantificables e indican si los procesos biológicos son normales o patogénicos, y además proporcionan información acerca de la respuesta farmacológica. Algunos de los biomarcadores más estudiados para detectar GBM son:

- Detección de mutaciones en la enzima metabólica isocitrato deshidrogenasa (IDH). Esta enzima es una buena herramienta para el diagnóstico clínico, ya que si las concentraciones de IDH mutada son altas en suero, orina o fluido cerebroespinal podría ser un indicio de padecer un GBM.
- Por otro lado, los pacientes que muestran alta expresión de EGFR, YKL-40 (también conocida como *Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1)*) [9] o mutaciones en el gen PTEN, pueden ser indicadores de padecer algún tipo de cáncer, como el GBM. Además, estos marcadores también están relacionados con un aumento de la angiogénesis, un mayor grado de agresividad y peor pronóstico.

Una fuente de biomarcadores potenciales podrían ser las vesículas extracelulares, ya que contienen proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y metabolitos, se pueden analizar a partir de muestras de saliva, suero u orina y serviría como una fuente de biomarcadores ya que sus constituyentes nos darían información acerca del origen celular [10].

BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Una de las mayores dificultades que se encuentran a la hora de administrar un fármaco para tratar una enfermedad del SNC, es la barrera hematoencefálica (BHE). Esta estructura garantiza un ambiente seguro en el entorno del SNC y está formada principalmente por células endoteliales y astrocitos. El transporte a través de la BHE es muy selectivo debido a la presencia de uniones estrechas (*tight junctions*) entre las células endoteliales adyacentes. Estas uniones permiten el paso de moléculas gaseosas como O_2 y CO_2 , moléculas lipofílicas de bajo peso molecular como el etanol. Sin embargo, la entrada de fármacos hidrofílicos o moléculas grandes está limitada debido a la presencia de las uniones estrechas (Figura 2).

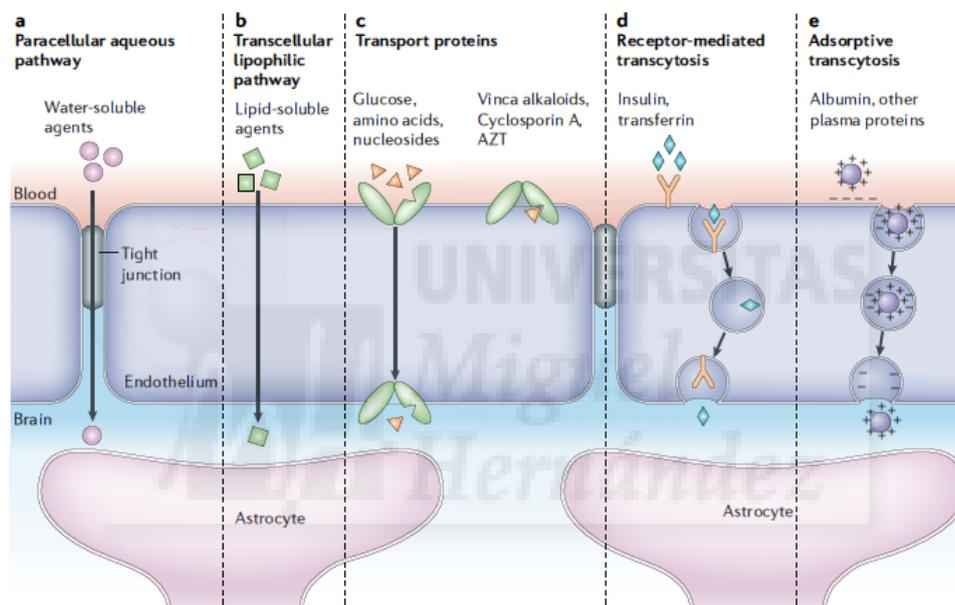


Figura 2. Vías transporte a través de la barrera hematoencefálica [11].

Las uniones estrechas son más complejas en el endotelio cerebral, conforman una red de filamentos formadas por partículas intramembranas ocluyendo la hendidura intercelular más eficazmente. Las moléculas más importantes que contribuyen en la estructura de las uniones estrechas son las proteínas transmembrana Ocludina y Claudina. Las uniones estrechas tienen una importante función restringiendo la permeabilidad celular y segregando dominios apical y basal en la membrana celular, obteniendo el endotelio propiedades de polarización (apical-basal). Un ejemplo de ellas es el complejo PAR3 y 6, el cual regula la formación de las uniones estrechas y establecen la polaridad de la célula (Figura 3).

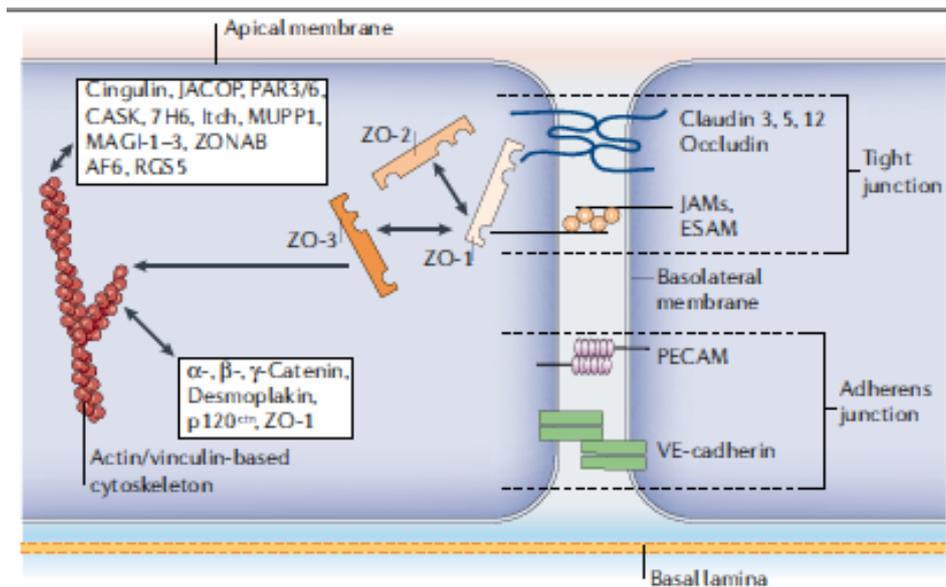


Figura 3. Composición molecular de las uniones estrechas endoteliales [11].

La BHE puede abrirse por las uniones estrechas debido a una inflamación o por la alteración de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, produciendo un aumento en la permeabilidad de la BHE, que podría aprovecharse para la administración de fármacos en el SNC. En muchas patologías, la función y estructura de la BHE se ve alterada, modificando su permeabilidad. Concretamente, los capilares de muchos tumores gliales son más permeables que los de tejido cerebral normal, debido a la desregulación de proteínas de las uniones estrechas en tumores cerebrales y a la rápida proliferación de los astrocitos.

Hay que tener en cuenta los factores que afectan a la BHE para poder desarrollar estrategias de liberación del fármaco, y así poder mejorar el tratamiento de enfermedades del SNC [11].

TRATAMIENTOS ACTUALES Y FUTUROS

En la actualidad, el tratamiento más común contra el GBM consiste en la combinación de la cirugía con radioterapia y quimioterapia. Mientras que la cirugía se encarga de extirpar el tumor, la radioterapia y quimioterapia tratan de eliminar los restos tumorales que hayan podido quedar. La supervivencia del paciente aumenta cuando la resección del tumor es mayor y al combinar la cirugía, quimioterapia y radioterapia. No obstante, a pesar de la agresividad de este tratamiento la supervivencia media del paciente suele ser de 18 meses [7].

Actualmente, el fármaco más utilizado en el tratamiento del GBM es la Temozolomida (Figura 4). Su mecanismo de acción consiste en metilar las posiciones N-7 u O-6 de los residuos de Guanina y la posición N-3 de los de Adenina. El silenciamiento génico impide la expresión de las proteínas celulares, lo que ocasiona la inducción de la apoptosis en la célula [12].

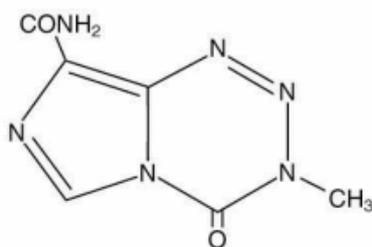


Figura 4. Estructura de la Temozolomida [12].

Debido a las dificultades que presentan algunos quimioterapéuticos para tratar el GBM, se está estudiando el uso de otros tratamientos, como por ejemplo la Camptotecina (CPT) (Figura 5) y sus derivados. Algunos de estos derivados se están utilizando en la actualidad como tratamiento para otros tipos de tumores, ya que inducen la apoptosis celular al interferir en la replicación de ADN. La Topoisomerasa I de ADN es un enzima que cataliza la ruptura de una cadena simple de ADN y la vuelve a unir de tal manera que relaja las vueltas superhelicoidales en el ADN durante el avance de la horquilla replicación. La CPT se une al complejo Topoisomerasa I de ADN-ADN una vez que se ha producido la ruptura en la hebra simple de ADN, de forma que se interrumpiría la replicación y se desestabilizaría el ADN parando el ciclo celular en la fase S y ocasionando finalmente la apoptosis [13,14].

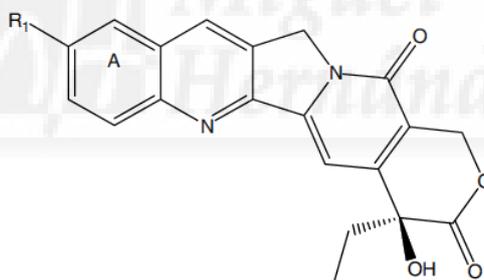


Figura 5. Estructura de la Camptotecina [13].

Dadas las propiedades anticancerígenas de la Camptotecina, se sintetizó un profármaco de CPT desarrollado por el grupo del Dr. Pablo Botella del Instituto de Tecnología Química, Centro mixto de la Universidad Politécnica de Valencia y Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El profármaco consta de una molécula de CPT unida a un ligando que facilitaría el paso del anticancerígeno por la barrera hematoencefálica. Esta mejora incrementaría la cantidad de fármaco que puede llegar al tumor, lo que posibilitaría su uso como quimioterapéutico para el tratamiento del GBM. Las características y estructura de este ligando están bajo secreto industrial por lo que no se podrán comentar en este trabajo.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La CPT se utiliza como quimioterápico para el tratamiento de cáncer de colon, pulmón y mama. Sin embargo, hasta el momento no se ha empleado para tratar el GBM ya que tiene dificultades para pasar la barrera hematoencefálica. Actualmente, el quimioterápico más común para tratar el GBM es la Temozolomida, pero se están investigando otros fármacos para su tratamiento debido a que el GBM genera resistencia a la Temozolomida y su tratamiento no es muy efectivo.

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar el profármaco de Camptotecina con potencial de atravesar la barrera hematoencefálica y, de esta manera, poder mejorar el tratamiento del Glioblastoma Multiforme.

Anteriormente, el grupo del Dr. Eduardo Fernández ha trabajado en el estudio de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de la CPT disuelta en DMSO. Dicho disolvente mostró una elevada toxicidad en las diferentes líneas celulares de Fibroblastos, Glioblastoma, Neuroblastoma y HeLa, así como en los animales tratados.

Por este motivo, en este trabajo nos hemos marcado, tres objetivos específicos:

1. Optimizar técnicas para la identificación de apoptosis neuronal en cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata empleando CPT disuelta en DMSO como modelo de apoptosis para concluir los experimentos con este disolvente y determinar su toxicidad.
2. Determinar el efecto del fármaco CPT en las distintas poblaciones del cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata.
3. Probar un disolvente alternativo al DMSO para disolver la Camptotecina y comprobar su toxicidad.

Palabras clave: GBM, CPT, DMSO, apoptosis, *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL ETANOL COMO DISOLVENTE

Para estudiar la toxicidad del etanol como disolvente del profármaco de CPT, en las líneas celulares de Fibroblastos, Glioblastoma, Neuroblastoma y HeLa, se empleó el ensayo de MTT para cuantificar su toxicidad.

1. Mantenimiento de las líneas celulares

Las células tienden a crecer ocupando toda el área disponible, aumentando la densidad celular en la placa, hasta el punto en el que comienzan a ocurrir problemas en el cultivo debido a la acumulación de células, metabolitos tóxicos o cuerpos apoptóticos. Esto envejece el cultivo y ocasiona problemas en el resto de las células sanas ya que si hay una excesiva cantidad de células en la placa se levantará la monocapa de células ocasionando la muerte celular. Por este motivo, para mantener las líneas celulares se deben realizar pases, que consisten en transferir una cantidad del cultivo celular tripsinizado a un nuevo recipiente junto a medio de cultivo. De esta forma conseguiremos expandir la línea celular y disminuir la densidad celular en la placa cultivo.

Para hacer un pase, los flask se lavaron 2 veces con Tampón Fosfato Salino (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) (Sigma), para después añadir Medio de Tripsinización 0,05%+EDTA durante 5-15 minutos a 37°C. Cuando las células estuvieron tripsinizadas, se añadió Medio Neutralizante (Tabla 2), para parar la reacción de tripsinización. Posteriormente, todas las líneas de cultivo tripsinizadas se sembraron a una menor densidad celular en un nuevo flask. Las líneas celulares empleadas en este trabajo con sus correspondientes medio de cultivo se muestran en la Tabla 2.

Línea celular	Medio de cultivo
Fibroblastos (D63T3)	90% DMEM, 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Biowest), penicilina-streptomicina 1:100
Neuroblastoma (SHSY5S)	90% 1:1 DMEM+HAM (F12), 10% FBS (Biowest), penicilina-streptomicina 1:100
Glioblastoma (42MGBA)	80% 1:1 (MEM (Earles) y RPMI), 20% FBS (Biowest), penicilina-streptomicina 1:100
HeLa (línea celular humana de cérvix)	90% MEM (Earles), 10% FBS (Biowest), penicilina-streptomicina 1:100

Otros medios:	
Medio Neutralizante	10% suero, 90% RPMI
Medio de Tripsinización 0,05%+EDTA	Tripsina 0,05%+EDTA (Gibco)

Tabla 2: Líneas celulares y medios de cultivo correspondientes.

A continuación, se muestran los componentes principales de los medios de cultivo mencionados en la Tabla 2:

- DMEM (1x) + GlutaMax TM-1 (Dulbecco's modified Eagle Medium; 4,5 g/L D-glucose, 25 mM Hepes, -pyruvate. Gibco-Life Technologies)
- F-12 Nut Mix (1x) + GlutaMax TM-1 (F-12 Nutrient mixture. Gibco-Life Technologies)
- HBSS (1x) (Hanks'balanced salt solution, CaCl₂, MgCl₂. Gibco-Life Technologies)
- MEM (1x) + GlutaMaxTM-1 (Minimum essential medium, Earle's salts, 25 mM Hepes. Gibco-Life Technologies)
- RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMaxTM-1 (Gibco-Life Technologies)
- Penicilina-estreptomina (Gibco-Life Technologies)

Por otro lado, para el ensayo de toxicidad del etanol, las células tripsinizadas se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células/ml de Neuroblastoma, 20.000 células/ml de HeLa y 50.000 células/ml de Glioblastoma y Fibroblastos. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂.

2. Tratamiento del cultivo celular y ensayo de toxicidad por el método MTT

Para probar la toxicidad del etanol, se trataron placas de las diferentes líneas celulares con concentraciones crecientes de dicho disolvente. En primer lugar se prepararon disoluciones de Etanol absoluto (Panreac) con el correspondiente medio de cultivo a las siguientes concentraciones: 50 µl/ml, 25 µl/ml, 10 µl/ml, 5 µl/ml, 2,5 µl/ml, 1,25 µl/ml, 0,5 µl/ml, 0,25 µl/ml, 0,125 µl/ml, 0,05 µl/ml.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

El ensayo de viabilidad de MTT es un ensayo colorimétrico que mide la actividad del enzima succínico deshidrogenasa, presente en las mitocondrias celulares. El MTT (bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico) es captado por las células viables y reducido por el enzima a formazán, un compuesto con capacidad de absorber a 595 nm (Figura 6). Éste queda retenido en las células y, mediante un espectrofotómetro, se mide la absorbancia a una

longitud de onda de 595 nm. La absorbancia medida será proporcional al número de células viables del cultivo.

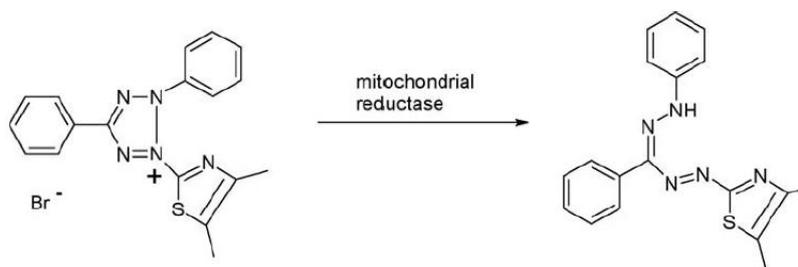


Figura 6: Reducción de MTT a formazán.

Para realizar el ensayo MTT, se disolvieron 0,6 mg/ml de MTT (Sigma) en el medio de cultivo para que la concentración final fuera de 0,3 mg/ml. Se reservó un pocillo para cada condición del tratamiento con etanol a modo de control negativo para considerar la absorbancia que pudiera tener el propio cultivo. Se mantuvo el MTT durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se retiró el MTT y los cristales de formazán se disolvieron en 100 µl de DMSO. La absorbancia se midió a 595 nm con un lector de placas 1681130 iMark™. El cálculo de la viabilidad celular se llevó a cabo con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad (\%) = \frac{x \cdot 100}{y}$$

Siendo x el promedio de la absorbancia a una determinada concentración e y el promedio de la absorbancia en el control.

3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático MATLAB mediante el test Two- simple Kolmogorov-Smirnov.

ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVO PRIMARIO DE CORTEZA CEREBRAL DE EMBRIONES DE RATA EN TRATAMIENTO CON CPT

Para poder comprobar la viabilidad celular después del tratamiento con CPT disuelta en Dimethyl Sulfoxide Minimum (DMSO; Sigma D2438), se trató un cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata (Sprague dawley) empleando el fármaco como modelo de apoptosis y posteriormente se midió la viabilidad celular de dichos cultivos primarios por distintos métodos: inmunocitoquímica, ensayos de apoptosis y citometría de flujo.

1. Cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata

El paso previo a la siembra del cultivo primario fue el tratamiento de las placas de cultivo. Para ello se colocó un cubreobjetos de cristal en cada uno de los pocillos de la placa, se añadió poli-D-Lisina (PDL, Sigma) (0,01 mg/ml) en cada pocillo y se incubó overnight a 37°C. El PDL es un polímero empleado que mejora la fijación de las células al producir un revestimiento de matriz extracelular. Posteriormente, se añadió laminina (Sigma) (100µl/12ml) a cada pocillo y se incubó durante 3 h a 37°C. La laminina es un componente mayoritario de la lámina basal que presenta regiones de unión para el colágeno, integrinas, dominios celulares y proteoglicanos. Todo este proceso permitirá la adhesión de las neuronas y las células gliales a la placa de cultivo.

Para obtener células de cultivo primario de neuronas, se aisló corteza cerebral de embrión de rata de 18 días. El tejido se disgregó mecánicamente y se le añadieron 1,5 ml por cerebro de Medio de Tripsinización 0,25% + Glucosa (Tabla 3) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se retiró el Medio de Tripsinización y se añadió 11 ml de Medio Neutralizante de cultivo primario de corteza cerebral (Tabla 3). A continuación, el disgregado se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de Medio de Cultivo primario de Corteza (Tabla 3). Se contabilizaron las células con un contador automático Adam MC-Digital Bio. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos a una densidad de 125.000 células/ml.

Otros medios	
Medio de Tripsinización 0,25%+Glucosa	50% de HBSS (Gibco) y Glucosa 33 mM (Panreac) y 50% de tripsina 0,25% (Gibco)
Medio Neutralizante de cultivo primario de corteza cerebral	50% de HBSS (Gibco), 2% de FBS (Biowest) y 48% de Glucosa 33 mM (Panreac)
Medio de Cultivo primario de Corteza	95% Neurobasal Medium (1X) (-L-glutamina, -phenolred; Gibco), 2% B27 Supplement (Gibco), 2% FBS (Biowest), 0,5% Glutamax (Gibco) y 0,5% penicilina-estreptomicina (Gibco)

Tabla 3: Medios para el tratamiento del cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata.

2. Modelos inducidos de apoptosis

Para analizar la viabilidad celular se emplearon diferentes modelos de apoptosis como el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), la radiación UV y el DMSO.

El Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) produce especies reactivas del oxígeno y este estrés oxidativo induce la apoptosis celular. Se aplicó a las células en las concentraciones de 100 mM, 200 mM y 500 mM durante 5 y 20 minutos a $37^\circ C$ y $5\% CO_2$ para cada una de las concentraciones.

La radiación UV produce daños en el ADN como mutaciones C-T que si no son reparadas producen la apoptosis, se aplicó sobre las células durante 1, 2 y 4 horas.

El DMSO aumenta la permeabilidad celular en tal grado que induce la apoptosis, se aplicó a las concentraciones de $0,4 \mu g/ml$ y $1,6 \mu g/ml$ en las células durante 3 días a $37^\circ C$ y $5\% CO_2$, para cada una de las concentraciones.

3. Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica basada en la unión específica de un anticuerpo a su antígeno (Figura 7). Esta técnica, nos ha permitido en este caso detectar proteínas relacionadas con la apoptosis celular así como determinar qué célula está afectada. Este ensayo se realizó con diferentes modelos de apoptosis: células tratadas con CPT, modelos inducidos con peróxido de hidrógeno y con radiación UV.

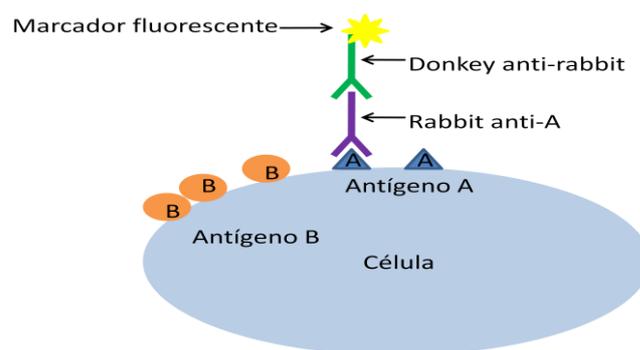


Figura 7: Esquema del complejo que forma el anticuerpos primario y secundario sobre el antígeno.

Para realizar, se realizó una inmunocitoquímica en el cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata tratado con DMSO para producir la apoptosis.

Tras tratar el cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata con los diferentes modelos de apoptosis:

- Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) a las concentraciones de 100 mM, 200 mM y 500 mM durante 5 y 20 minutos a 37°C y 5%CO₂.
- Radiación UV durante 1, 2 y 4 horas.
- El DMSO a las concentraciones de 0,4 µg/ml y 1,6 µg/ml durante 3 días a 37°C y 5% CO₂.
- CPT a las concentraciones de 0,4 µg/ml y 1,6 µg/ml durante 3 días a 37 °C y 5% CO₂.

Se fijaron las células para realizar la inmunocitoquímica. Para ello, se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno, después se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA; Sigma) durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados de PBS durante 5 minutos cada uno, y se bloqueó con Bovine Serum Albumin 10% (BSA; Sigma) durante una hora con el fin de evitar los posibles lugares de unión inespecífica de los anticuerpos. Posteriormente se incubaron con una mezcla de anticuerpos primarios en PBS+BSA 3% en cámara húmeda, a 4 °C overnight. Después, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios específicos durante 1 hora en cámara húmeda y a 4°C.

Los anticuerpos primarios y secundarios que se emplearon en la inmunocitoquímica aparecen en la Tabla 4 y 5 respectivamente.

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Detecta
Mouse ant-MAP2	1:200	Millipore	Microtúbulos en neuronas
Rabbit anti-MAP2	1:200	Millipore	Microtúbulos en neuronas
Goat anti-Anexina V	1:50	Abcam	Anexina V en células apoptóticas
Rabbit anti-Anexina V	1:100	Abcam	Anexina V en células apoptóticas
Mouse anti-β-tubulina	1:100	Sigma	Subunidad β de la Tubulina en neuronas

Tabla 4: Anticuerpos primarios empleados en la inmunocitoquímica.

MAP-2 (*Microtubular associated Protein*) es una proteína de la familia de proteínas asociadas a microtúbulos de tipo II específica de neuronas. La Anexina V es una proteína que se une a la Fosfatidilserina (PS), una proteína intracelular que se externaliza en la apoptosis. Por último, la β-Tubulina es una proteína esencial para formar los microtúbulos, los cuales están involucrados en el citoesqueleto y el huso mitótico celular.

Anticuerpo secundario	Dilución	Origen
Donkey Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	1:100	Invitrogen
Donkey Alexa Fluor 555 anti-mouse IgG	1:100	Invitrogen

Tabla 5: Anticuerpos secundarios empleados en la inmunocitoquímica.

Junto a los anticuerpos secundarios también se añadió Trihydroclorado Trihidrato (HOECHST) (Sigma), un marcador nuclear y cromosómico, ya que se une en las regiones AT del ADN, emitiendo en la longitud de onda 461 nm y marcando el núcleo de azul.

Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron sobre un portaobjetos con medio antifading (Carbonato Sódico 0,1M (Sigma), 1:2 glicerol (Panreac)). Las muestras fueron analizadas bajo un Microscopio Confocal Láser Leica TCS SPE (Leica, Microsystems GmbH, Germany).

4. Ensayo de apoptosis y muerte celular

Por otro lado, para analizar la viabilidad de cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata, se realizó un ensayo de apoptosis con un Kit de Detección de apoptosis (Biotool) que consta de distintos reactivos: Anexina V-FITC, Yoduro de propidio (IP) y Binding Buffer. Este ensayo de apoptosis se llevó a cabo para detectar las apoptosis producida por la CPT y DMSO en cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata.

En primer lugar, se trató la placa de cultivo con 0,4 µg/ml y 1,6 µg/ml de CPT y se dejó el tratamiento durante 3 días a 37°C y 5%CO₂ para que tuviera lugar el ciclo celular en la mayor parte de las células y así pudiera actuar la CPT, ya que interrumpe la replicación celular. Transcurrido este período se hicieron 3 lavados con PBS y se añadieron 45 µl por muestra de la Solución Kit, cuya composición es 92,6 % de Binding Buffer, 3,7 % de IP y 3,7 % de Anexina V-FITC, que se dejó incubar durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó otro lavado con PBS y se fijaron las células con PFA 4% (Sigma) durante 15 minutos, se volvió a lavar con PBS y se empezó con el proceso de montaje descrito en la inmunocitoquímica, añadiendo HOECHST para marcar los núcleos. Las imágenes de este marcaje fueron tomadas por el Microscopio Confocal Láser Leica TCS SPE (Leica, Microsystems GmbH, Germany).

5. Citometría de flujo

Para comprobar la viabilidad celular tras el tratamiento con CPT se usó el citómetro de flujo, ya que es capaz de medir la cantidad de células que hay en la disolución y diferenciarlas según su marcaje, tamaño y complejidad.

Inicialmente se prepararon las suspensiones celulares para medir en el citómetro. Para ello, en primer lugar, se añadió Tripsina 0,25%+EDTA (Gibco) (Tabla 2), y se incubó durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se añadió solución fría de Medio Neutralizante a cada pocillo (Tabla 7) para detener la tripsinización. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 500 g. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de la Solución ST fría (Tabla 7), a cada muestra, para resuspender suavemente el pellet. Se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 500 g, se eliminó el sobrenadante y se fijaron las células con 1 ml de 2% PFA (Sigma) frío para mantener las características celulares que presentaban cuando estaban vivas, se resuspendió y se dejó a 4°C en agitación durante 15 minutos. Después, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 500 g y se eliminó el sobrenadante.

Para permeabilizar la membrana de las células, las muestras se incubaron a 4°C durante 10 minutos con una Solución de Saponina 0,05% fría (Tabla 7). La saponina permeabiliza las células provocando poros en las membranas celulares, facilitando así la entrada del anticuerpo. Se volvió a centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 500 g y se eliminó el sobrenadante.

A continuación, las muestras se incubaron durante 1 hora a 4°C y agitación suave con el anticuerpo primario (Tabla 6) diluido en Saponina 0,01% (Tabla 7). Después se añadió 1 ml de la Solución ST fría, se volvió a centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 500 g, se retiró el sobrenadante y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 6), durante 30 minutos a 4°C y en agitación suave. Finalmente, se añadió 1 ml de la Solución ST, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 500 g y se eliminó el sobrenadante para añadir 1 ml de solución ST.

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	Detecta
Rabbit anti-MAP2	1:200	Millipore	Microtúbulos en neuronas
Mouse anti-GFAP	1:200	Millipore	Astroцитos
Anticuerpo secundario	Dilución	Origen	Detecta
Donkey Alexa Fluor 633 anti-rabbit IgG	1:100	Invitrogen	Alexa 633 se une al anticuerpo primario rabbit
Donkey Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG	1:100	Invitrogen	Alexa 488 se une al anticuerpo primario mouse

Tabla 6: Anticuerpos primario y secundario empleados en la citometría.

Por otro lado, para la preparación de muestras con el Kit de detección de apoptosis se añadieron 45 µl de la mezcla de Solución Kit por muestra, cuya composición se encuentra

explicada en el apartado anterior *Ensayo de apoptosis*, se incubó durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 400 µl de Binding Buffer para detener la reacción y se midieron las muestras en el Citómetro de Flujo FACSCanto II (BectonDickinson).

Otros medios	
Medio Neutralizante	90% de Neurobasal Medium, 10% de suero
Solución ST	98% PBS, 2% FBS (Biowest) y 1:2000 de FE fenoxietanol (ACROS organics)
Solución de Saponina 0,05%	99,8% PBS (Sigma), saponina 0,05% (Panreac) y BSA 0,1% (Sigma)
Solución de Saponina 0,01%	99% PBS (Sigma), saponina 0,01% (Panreac), BSA 1% (Sigma)

Tabla 7: Medios para tratar las muestras para el citómetro.



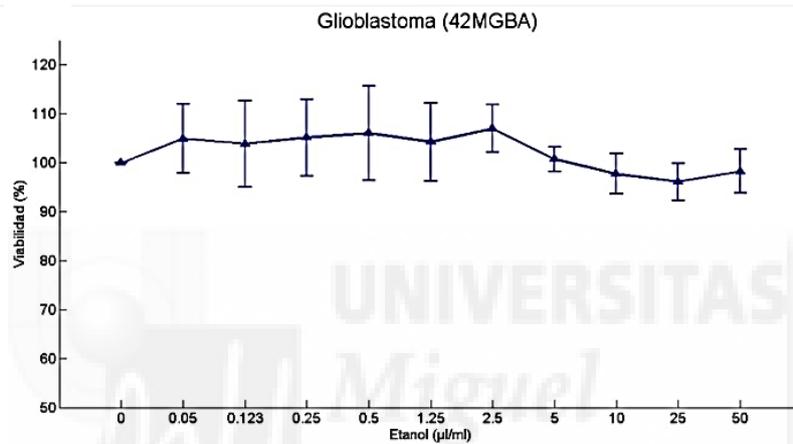
RESULTADOS

ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL ETANOL COMO DISOLVENTE DE LA CPT ALTERNATIVO AL DMSO

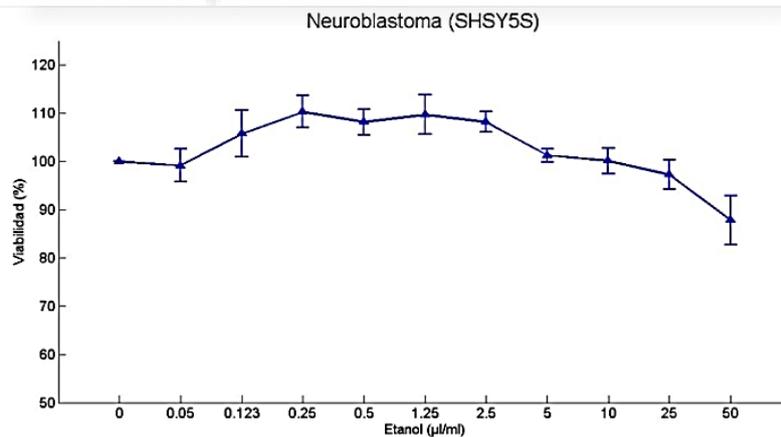
Ensayo de toxicidad y MTT

Los ensayos de toxicidad del etanol llevados a cabo mediante el ensayo MTT, no mostraron alta toxicidad *in vitro*. Como se puede comprobar en las siguientes gráficas, la viabilidad celular se mantuvo muy próxima a la viabilidad del control en todas las concentraciones de etanol.

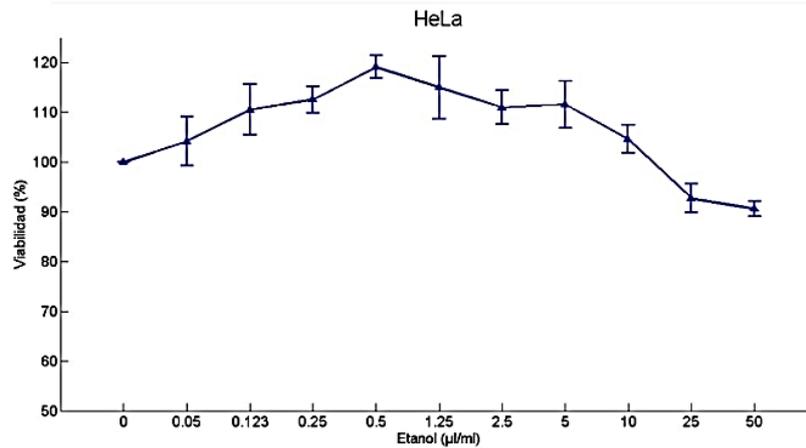
A



B



C



D

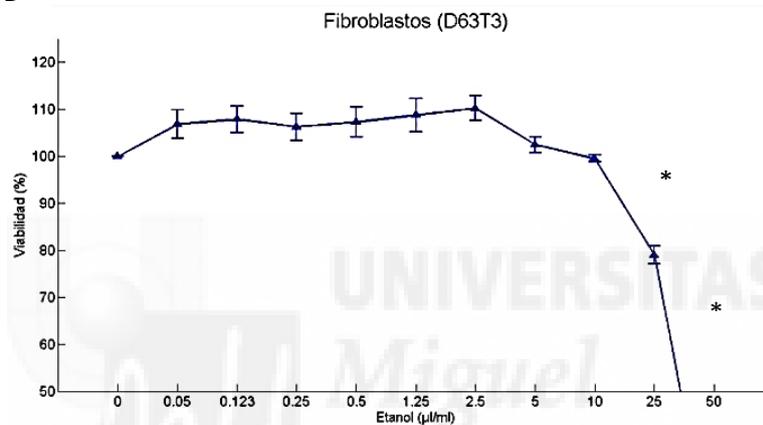


Figura 7: Porcentaje de viabilidad celular en distintas concentraciones de etanol en las líneas celulares de: a) Glioblastoma b) Neuroblastoma c) HeLa d) Fibroblastos. Test Kolmogorov-Smirnov $\leq 0,05$ representado como *. Las barras de error muestran el S.E.M. (n=4)

Se realizó el test Two- simple Kolmogorov-Smirnov para analizar estadísticamente los resultados de la viabilidad y las barras de error corresponden con el S.E.M. La hipótesis nula determinaría que la viabilidad sería alta tras realizar el tratamiento y la hipótesis alternativa que ésta sería baja. Al calcular el p-valor, éste fue superior a 0,05 en todos los puntos de la gráfica respecto al control sin tratamiento con etanol de su línea celular, correspondiendo cada punto a la media de viabilidad de cada concentración. Por tanto, se acepta la hipótesis nula. Sin embargo, los datos correspondientes a la concentración 25 µl de etanol/ml y 50 µl de etanol/ml de la línea celular de Fibroblastos, al contrastarlos con su control, se determinó un p-valor de 0,011. Por tanto, se aceptaría la hipótesis alternativa en estos dos casos. Aún así, las concentraciones en las que se rechazaba la hipótesis nula en la línea celular de Fibroblastos estarían fuera de los márgenes de las concentraciones que se usarían *in vivo*.

En las gráficas se observa que los porcentajes de viabilidad superaron el 100%, esto podría deberse a que el cultivo celular siguió proliferando a pesar del tratamiento con etanol.

En las gráficas se puede observar que, a excepción de la línea celular de Fibroblastos, en el resto de líneas celulares la viabilidad celular no alcanza el 50%, por lo que no se puede determinar el IC50, que es la Concentración máxima Inhibitoria que reduce, en este caso, la viabilidad celular a la mitad. Este parámetro es importante para aproximar la concentración del fármaco que se puede administrar. Para poder determinarlo en este ensayo, se tendría que repetir a mayores concentraciones, lo cual no es necesario ya que produce el efecto deseado en las concentraciones a las que se administrará *in vivo*.

ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVO PRIMARIO DE CORTEZA CEREBRAL DE EMBRIONES DE RATA EN TRATAMIENTO CON CPT.

La viabilidad celular tras el tratamiento con CPT disuelta en DMSO se determinó mediante inmunocitoquímica y ensayos de apoptosis.

1. Inmunocitoquímica

Respecto las inmunocitoquímicas que se llevaron a cabo, los resultados no fueron concluyentes debido a que las muestras, incluidos los controles, no mostraron marcaje para la Anexina V, por lo que se continuó optimizando la técnica con otros modelos de apoptosis como el Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) y la radiación UV.

Sin embargo, las técnicas de inmunocitoquímica realizadas en estos otros ensayos de apoptosis inducida tampoco fueron decisivas para mostrar apoptosis mediante la detección de Anexina V en neuronas o astrocitos.

2. Ensayo de apoptosis

Por ese motivo, se cambió el modelo de apoptosis por la CPT disuelta en DMSO para tratar cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata y se utilizó el Kit de Apoptosis (Biotool) para analizar la viabilidad celular (Figura 8 y Figura 9).

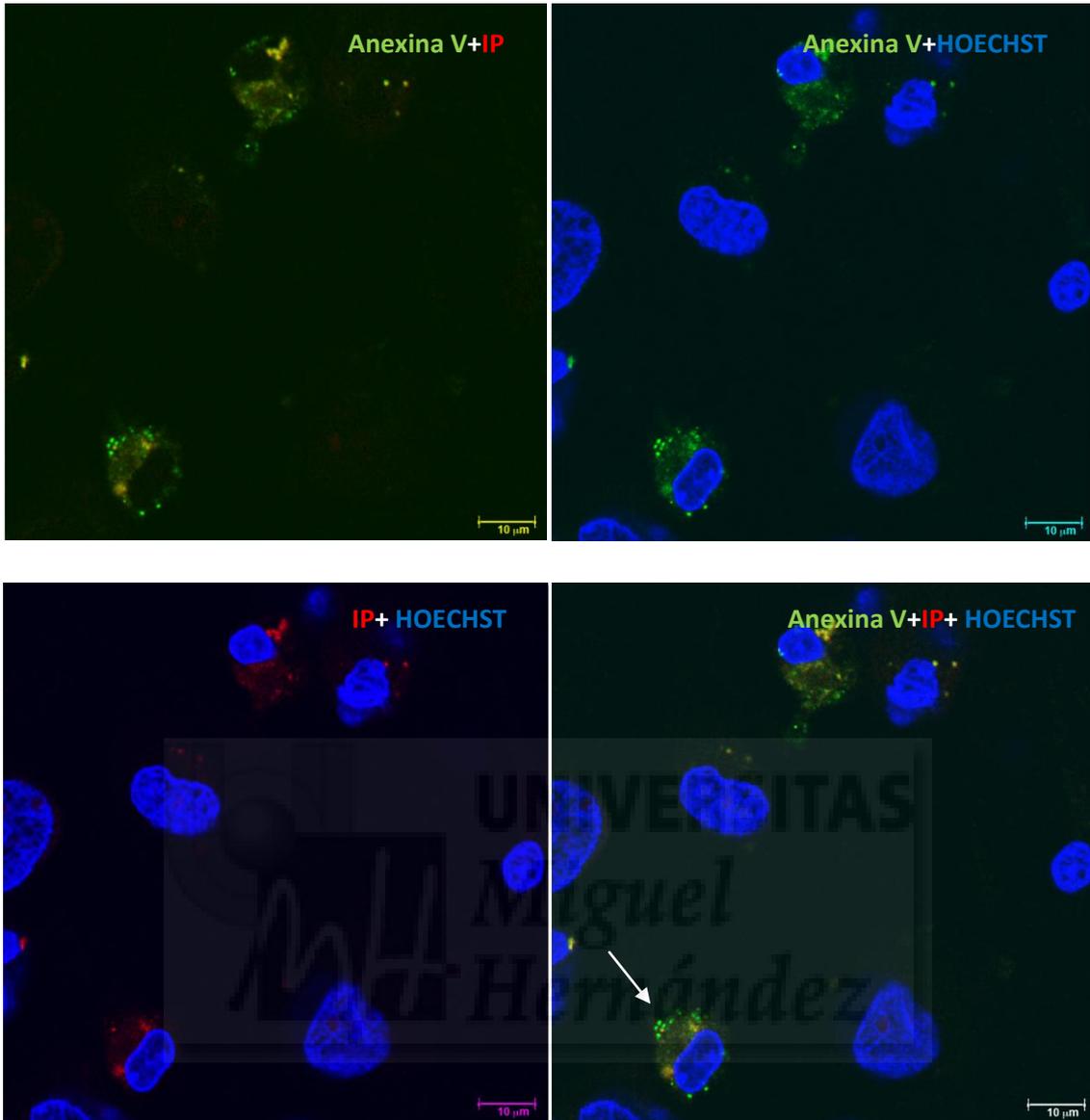


Figura 8: Resultados del ensayo de apoptosis. Imágenes de fluorescencia con la condición 0,4 µg/ml de CPT. La flecha blanca señala células con cuerpos apoptóticos en verde. IP en rojo, Anexina V en verde y HOECHST en azul.

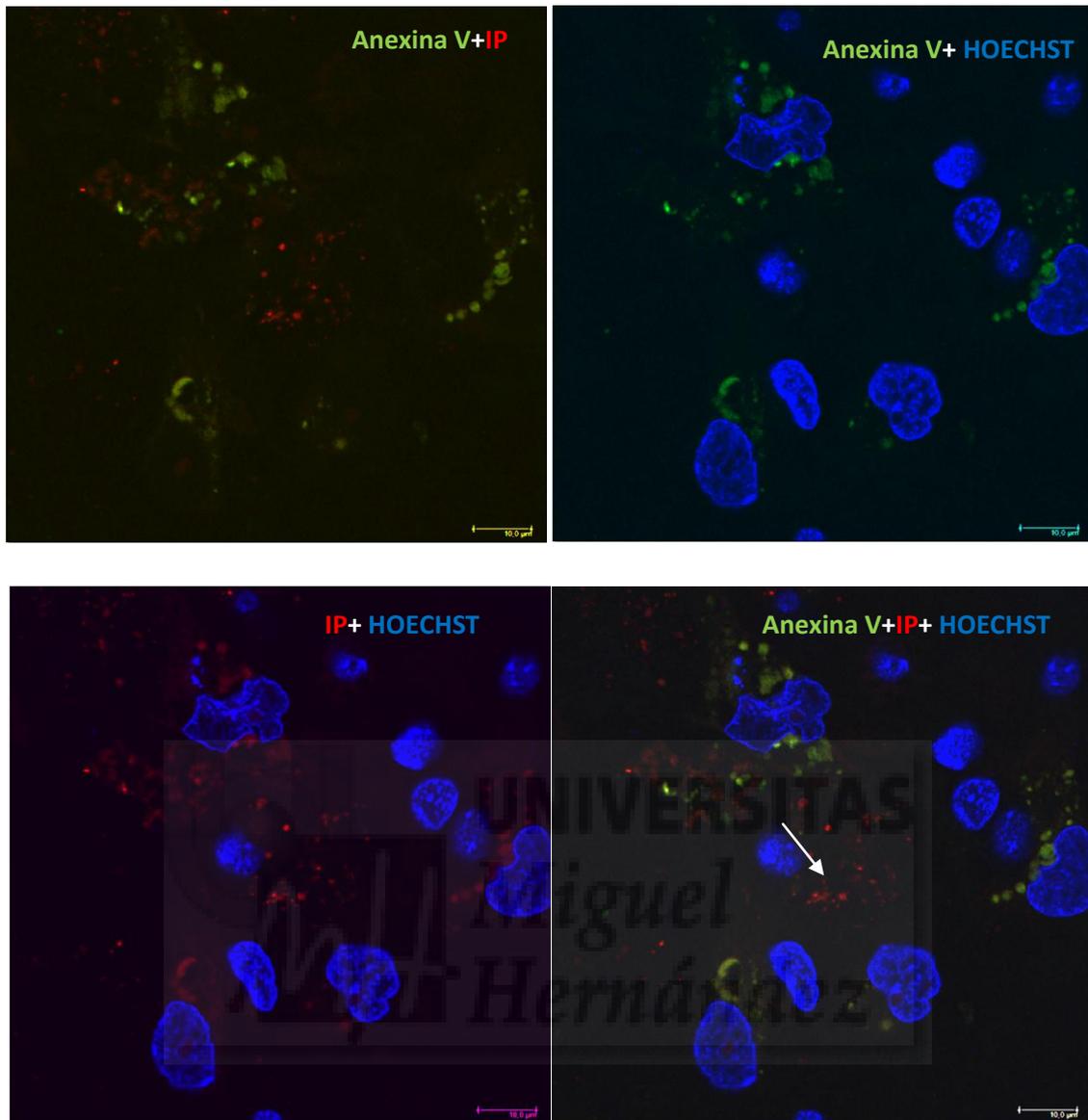


Figura 9: Resultados del ensayo de apoptosis. Imágenes de fluorescencia con la condición 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de CPT. La flecha blanca señala restos celulares marcados con IP en rojo. IP en rojo, Anexina V en verde y HOECHST en azul.

Como se observa en la Figura 8, a la concentración de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de CPT hay mayor intensidad y cantidad de Anexina V que de IP alrededor de los núcleos celulares. Sin embargo, a la concentración de 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de CPT (Figura 9) se observa mayor intensidad de IP que de Anexina V. Por tanto, a la menor concentración de CPT se observa mayor grado de apoptosis, ya que la Anexina V marca las células en este estado, y a la mayor concentración se observa mayor grado de muerte celular, estado que marca el IP.

3. Citometría de flujo

También se analizó la viabilidad celular del cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata con CPT disuelta en DMSO mediante citometría de flujo. Otro objetivo en este trabajo fue estudiar la viabilidad de la población neuronal tras la administración de la CPT en cultivo.

En los primeros ensayos de citometría realizados se obtuvieron datos con una baja o nula viabilidad celular para todas las poblaciones celulares y para todas las condiciones, incluido el control. Uno de los principales motivos que podría afectar la integridad celular sería el protocolo llevado a cabo para realizar la citometría de flujo, por ello se introdujeron diferentes modificaciones. En concreto, se eliminó la fijación así como la permeabilización con saponina y disminuimos la velocidad y tiempo de cada una de las centrifugaciones. Es decir, las muestras se analizaron sin fijar y sin lavar, con el fin de evitar posibles cambios en las poblaciones por el protocolo descrito anteriormente.

Para la detección del Kit de apoptosis se utilizaron dos filtros distintos para los dos fluorocromos. Uno es el filtro FITC (longitud de onda de excitación a 494 nm y emisión a 519 nm) que se utilizó para detectar la Anexina V. Y el otro, es el PE (longitud de onda de excitación a 488 nm y emisión a 578 nm) para identificar el IP. Se realizó un inmunomarcaje en una muestra control sin CPT con los anticuerpos MAP 2 y GFAP (Tabla 6) para diferenciar las poblaciones de neuronas y astrocitos respectivamente. Los resultados de la citometría separaron la población en dos, P2 y P3, siendo P2 la población correspondiente a astrocitos y P3 la población correspondiente a neuronas, con distinto tamaño y complejidad, así como distintos niveles de autofluorescencia (Figura 10).

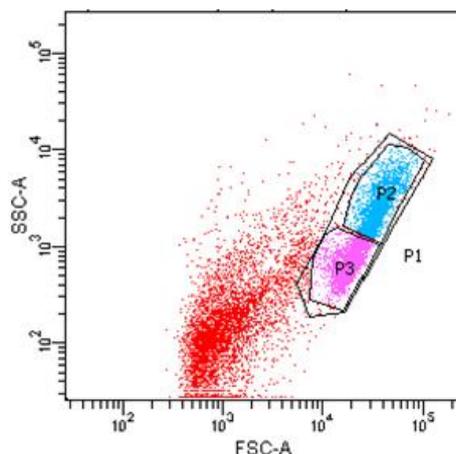


Figura 10: Gráfica de la citometría de flujo representando los eventos totales y discerniendo las poblaciones P1, P2 y P3 según su complejidad y tamaño.

Posteriormente, se llevó a cabo un tratamiento del cultivo primario con CPT a la concentración de 1,6 µg/ml disuelta en DMSO. Tanto las muestras tratadas con el fármaco como los controles fueron procesadas con y sin el Kit de apoptosis (Tabla 8).

	Viabilidad (%)		Media FITC		Media PE	
	P2	P3	P2	P3	P2	P3
Control	43,8	52,7	280	67	6.387	1.307
Control con kit	63,7	33,2	335	70	6.477	1.174
1,6 µg/ml DMSO	37,4	58,5	289	66	6.575	1.240
1,6 µg/ml DMSO con kit	61,9	34,5	382	100	7.430	1.648
1,6 µg/ml CPT	63,3	23,2	446	118	6.785	2.515
1,6 µg/ml CPT con kit	52,9	36,8	835	283	8.344	3.375

Tabla 8: Resultados de la citometría de flujo.

A continuación, se muestran las gráficas de la primera citometría realizada correspondientes al promedio de la intensidad del FITC y del PE para cada una de las poblaciones P2 y P3, tratadas con y sin el Kit de apoptosis.

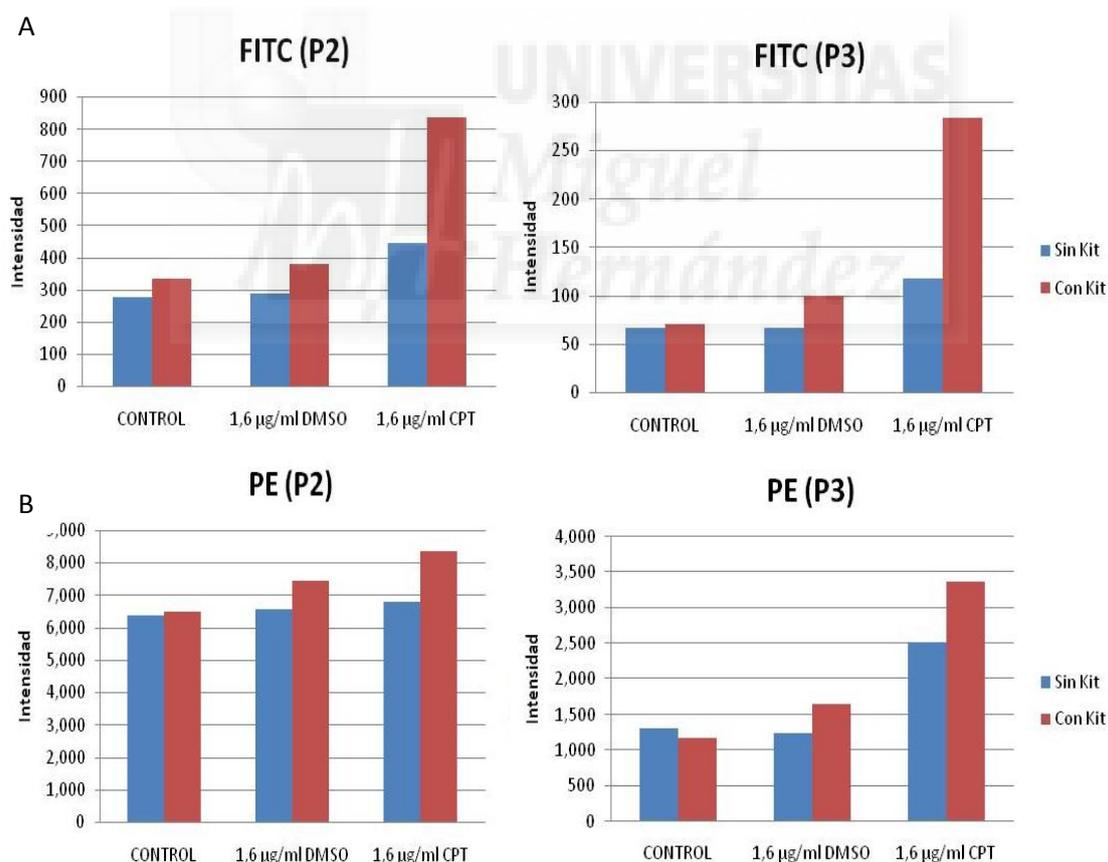


Figura 11: Niveles de fluorescencia para FITC y PE en los cultivos primarios de corteza cerebral de corteza de embriones de rata en las condiciones de control, sólo DMSO y sólo CPT a 1,6 µg/ml. Las barras de color azul corresponden a las condiciones sin añadir Kit de apoptosis y en rojo al añadirlo. a) Intensidad de FITC en la población P2 y P3 b) Intensidad de PE en la población P2 y P3. (n=1)

Los resultados de la primera citometría muestran que los niveles de FITC, correspondientes a la emisión de Anexina V, son muy similares en las muestras controles y en las células tratadas sólo con DMSO (sin CPT) para ambas condiciones de marcaje, con y sin el Kit de apoptosis (Tabla 8) (Figura 11A y 11B). Sin embargo, las células tratadas con CPT muestran un aumento de los niveles de intensidad de FITC para ambas poblaciones, especialmente en presencia del Kit de apoptosis.

Respecto al láser PE, correspondiente a la emisión de IP, se observa valores muy similares entre las muestras controles y las células tratadas sólo con DMSO con y sin Kit de apoptosis (Tabla 8) (Figura 11A y 11B). Además, las células tratadas con CPT en ambas poblaciones muestran un aumento de los niveles de intensidad de PE en presencia y ausencia del Kit de apoptosis.

Posteriormente, se realizaron réplicas del ensayo anterior pero aumentando el rango de concentraciones de DMSO y CPT para determinar la concentración óptima de CPT (Tabla 9).

a) Experimento 1

Placa 1	Viabilidad (%)		Media FITC		Media PE	
	P2	P3	P2	P3	P2	P3
Control	26,50	65,8	741	168	1.366	290
Control+kit	31,1	60,3	853	220	1.397	324
0,4 µg/ml DMSO	34,3	63,2	723	165	1.275	274
0,4 µg/ml DMSO+Kit	27,0	70,1	931	224	1.307	291
1,6 µg/ml DMSO	21,6	73,7	627	143	1.101	240
1,6 µg/ml DMSO+Kit	29,1	67,5	839	196	1.270	275
0,4 µg/ml CPT	23,0	23,1	1.188	275	1.940	462
0,4 µg/ml CPT+Kit	26,3	35,7	3.277	819	3.228	658
1 µg/ml CPT	14,7	26,9	920	282	1.700	531
1 µg/ml CPT+Kit	18,4	37,0	2.082	563	2.265	561
1,6 µg/ml CPT	22,6	16,8	1.130	303	1.975	573
1,6 µg/ml CPT+Kit	32,1	18,4	2.222	692	3.090	684

b) Experimento 2

Placa 2	Viabilidad (%)		Media FITC		Media PE	
	P2	P3	P2	P3	P2	P3
Control	22,4	73,1	638	152	1.139	257
Control+kit	27,4	67,2	716	168	1.185	248
0,4 µg/ml DMSO	24,8	71,6	665	149	1.163	246
0,4 µg/ml DMSO+Kit	28,2	66,3	892	213	1.367	297
1,6 µg/ml DMSO	29,4	67,4	719	163	1.256	274
1,6 µg/ml DMSO+Kit	28,1	67,7	761	177	1.181	254
0,4 µg/ml CPT	35,5	38,2	1.264	254	2.157	439
0,4 µg/ml CPT+Kit	35,6	40,9	1.828	395	2.693	522
1 µg/ml CPT	36,6	39,2	1.460	267	2.501	466
1 µg/ml CPT+Kit	30,7	47,3	1.661	414	2.117	512
1,6 µg/ml CPT	52,1	21,5	1.659	314	2.837	559
1,6 µg/ml CPT+Kit	49,8	19,7	1.899	598	2.821	669

c) Resultados del promedio y desviación estándar del experimento 1 y 2

Promedio	Viabilidad (%)		Media FITC		Media PE	
	P2	P3	P2	P3	P2	P3
Control	24,45	69,45	689,5	160	1252,5	273,5
Control+kit	29,25	63,75	784,5	194	1291	286
0,4 µg/ml DMSO	29,55	67,4	694	157	1219	260
0,4 µg/ml DMSO+Kit	27,6	68,2	911,5	218,5	1337	294
1,6 µg/ml DMSO	25,5	70,55	673	153	1178,5	257
1,6 µg/ml DMSO+Kit	28,6	67,6	800	186,5	1225,5	264,5
0,4 µg/ml CPT	29,25	30,65	1226	264,5	2048,5	450,5
0,4 µg/ml CPT+Kit	30,95	38,3	2552,5	607	2960,5	590
1 µg/ml CPT	25,65	33,05	1190	274,5	2100,5	498,5
1 µg/ml CPT+Kit	24,55	42,15	1871,5	488,5	2191	536,5
1,6 µg/ml CPT	37,35	19,15	1394,5	308,5	2406	566
1,6 µg/ml CPT+Kit	40,95	19,05	2060,5	645	2955,5	676,5

Desviación estándar del promedio	Viabilidad (%)		Media FITC		Media PE	
	P2	P3	P2	P3	P2	P3
Control	±2.9	±5.2	±72.8	±11.0	±161.0	±23.3
Control+kit	±2.7	±4.9	±96.9	±37.0	±150.0	±53.7
0,4 µg/ml DMSO	±6.8	±5.9	±41.0	±11.0	±79.0	±19.8
0,4 µg/ml DMSO+Kit	±0.9	±2.7	±27.6	±8.0	±42.0	±4.2
1,6 µg/ml DMSO	±5.6	±4.5	±65.1	±14.1	±109.6	±24.0
1,6 µg/ml DMSO+Kit	±0.8	±0.1	±55.2	±13.4	±62.9	±14.8
0,4 µg/ml CPT	±8.9	±10.7	±53.7	±14.8	±153.4	±16.3
0,4 µg/ml CPT+Kit	±6.6	±3.7	±1024.6	±299.8	±378.3	±96.2
1 µg/ml CPT	±15.5	±8.7	±381.8	±10.6	±566.4	±46.0
1 µg/ml CPT+Kit	±8.7	±7.3	±297.7	±105.4	±104.7	±34.6
1,6 µg/ml CPT	±20.9	±3.3	±374.1	±7.8	±609.5	±9.9
1,6 µg/ml CPT+Kit	±12.5	±0.9	±228.4	±66.5	±190.2	±10.6

Tabla 9: Resultados de la citometría de flujo. a) Resultados del experimento 1; b) Resultados experimento 2; c) Resultados promedio y desviación estándar del experimento 1 y 2. (n=2)

A continuación, se muestran las gráficas correspondientes al promedio de la intensidad de FITC y de IP (Figura 12).

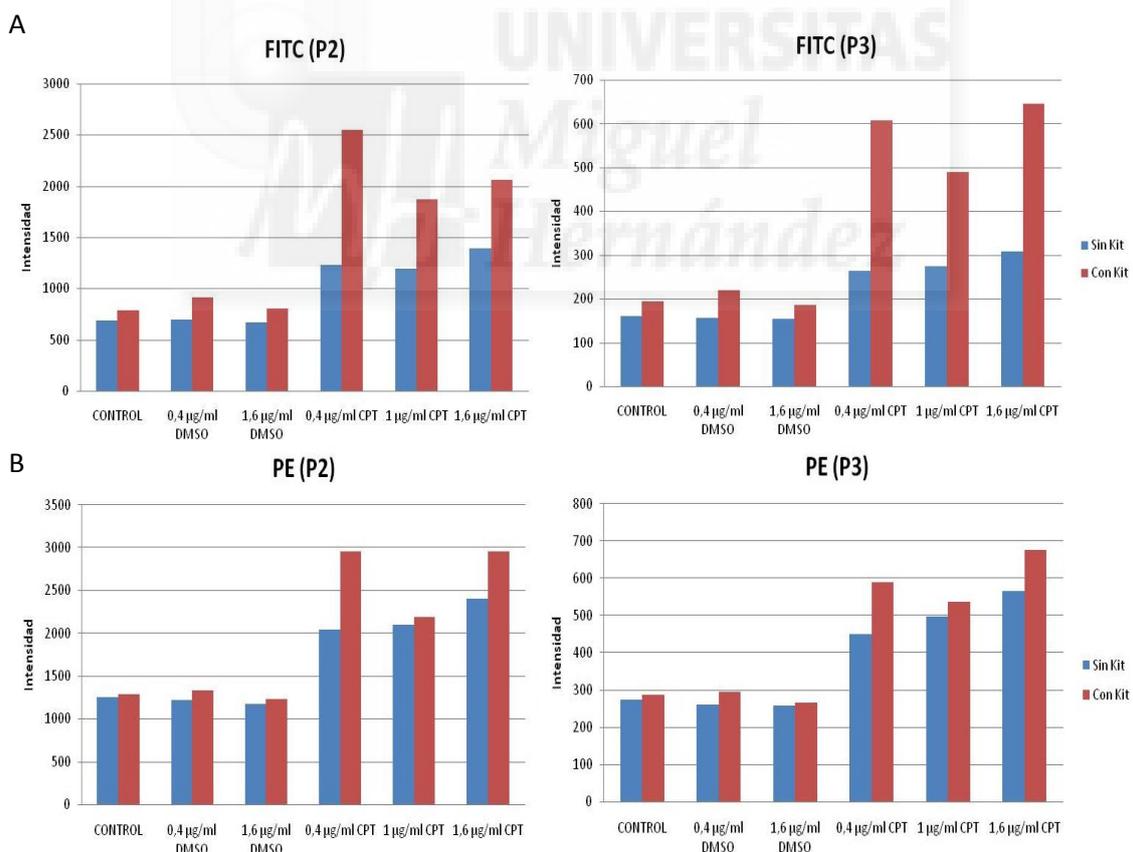


Figura 12: Niveles de fluorescencia para FITC y PE en los cultivos primarios de corteza cerebral de corteza de embriones de rata en las condiciones de control, sólo DMSO y sólo CPT en diferentes concentraciones. Las barras de color azul corresponden a las condiciones sin añadir Kit de apoptosis y en rojo al añadirlo. a) Intensidad de FITC en la población P2 y P3 b) Intensidad de PE en la población P2 y P3.

Los resultados de esta citometría muestran que los niveles de FITC son muy similares en las muestras controles y en las células tratadas sólo con DMSO con y sin el Kit de apoptosis. (Tabla 9) (Figura 12A y 12B). Sin embargo, las células tratadas con CPT muestran un aumento de los niveles de intensidad de FITC, especialmente en presencia del Kit de apoptosis. Respecto las poblaciones, en la P2 (astrocitos) se observa mayores niveles de intensidad que en la P3 (neuronas). La concentración de 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CPT presenta mayor intensidad en el FITC, esto indicaría un mayor grado de apoptosis respecto la concentración 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CPT, la cual muestra mayor intensidad en el filtro PE.

Respecto al láser PE se observan valores muy similares en las muestras controles y en las células tratadas sólo con DMSO con y sin Kit de apoptosis (Tabla 9) (Figura 12A y 12B). Sin embargo, las células tratadas con CPT en la P3 (neuronas) muestran un aumento de los niveles de intensidad de PE en presencia y en ausencia del Kit de apoptosis. Respecto las poblaciones, en la P2 (astrocitos) se observa mayores niveles de intensidad que en la P3 (neuronas).



DISCUSIÓN

En anteriores investigaciones, se probó el DMSO como disolvente para la CPT, pero tras los resultados obtenidos, se observó una alta toxicidad del disolvente *in vitro*. Por ello, en este trabajo se quiso probar otro disolvente para el profármaco de CPT, el etanol. Los resultados obtenidos indican que el etanol podría ser un buen candidato para disolver la CPT, ya que mantiene una óptima viabilidad celular, para su posterior estudio de toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados obtenidos en las inmunocitoquímicas no fueron concluyentes ya que los controles dieron falsos marcajes y la optimización de la técnica respecto al modelo de apoptosis y los anticuerpos empleados aun no ha llegado a término. Por otro lado, los resultados obtenidos con el Kit de apoptosis (Biotool) fueron óptimos tanto en los controles como en el resto de condiciones del ensayo. El marcaje obtenido era coherente con el tratamiento aplicado ya que en presencia de CPT aumentaba la intensidad del marcaje de Anexina V e IP. Por otro lado, se observó mayor grado de apoptosis en la concentración más baja de CPT disuelta en DMSO al haber mayor intensidad de Anexina V, mientras que en la concentración más alta se observó mayor grado de muerte celular ya que la intensidad de IP era mayor. Esto podría deberse a que al aplicar la concentración más alta, el fármaco afectaría en mayor grado al cultivo, provocando una mayor muerte celular en lugar de apoptosis.

Por otro lado, la citometría de flujo aportó información acerca de la viabilidad celular tras los tratamientos con CPT y DMSO mediante el marcaje con el Kit de apoptosis. Uno de los objetivos marcados al inicio de este trabajo fue la determinación del efecto del fármaco CPT en las distintas poblaciones del cultivo primario. Hemos observado que la población más afectada es la de astrocitos, lo cual es positivo, ya que el daño neuronal por el efecto del fármaco sería más irreversible que en la glía.

Metodológicamente se ha conseguido mejorar el protocolo para la obtención de muestras de citometría durante este trabajo. En los primeros experimentos de citometría realizados se veía afectada la viabilidad y la integridad celular. Ello podría estar relacionado con el propio protocolo de citometría llevado a cabo, o por posibles afectaciones del cultivo ajenas al tratamiento con el fármaco. Por ello, se realizaron cambios en el protocolo que nos permitieron finalmente obtener una viabilidad celular aceptable y descartar otros factores que afectarían al cultivo.

Nuestros resultados demuestran que el DMSO como disolvente no afecta negativamente a ninguna población del cultivo, ya que la intensidad de Anexina V es muy similar entre los controles y el DMSO con y sin el Kit de apoptosis, mostrando así una menor toxicidad del DMSO en cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata que en estudios anteriores de MTT en diferentes líneas celulares tratadas en las mismas condiciones. Estos resultados son relevantes ya que el modelo *in vitro* más similar al cerebro humano sería el cultivo primario de corteza cerebral de embriones de rata [15].

También hemos observado que los niveles de fluorescencia FITC y PE aumentan al aumentar la concentración de CPT. Esta señal podría deberse a la autofluorescencia causada por la acumulación de grupos Hemo en los astrocitos, ya que su ruta de síntesis está muy activa en estas células [16].

Adicionalmente, hemos observado que la viabilidad de la población de astrocitos disminuye al administrar el tratamiento, reproduciendo lo que sucedería en el foco tumoral durante el tratamiento con quimioterapéuticos en humanos afectados con cáncer.

Cabe destacar que las intensidades de fluorescencia de la citometría de flujo coinciden con los resultados obtenidos en la inmunocitoquímica. El análisis de las intensidades de la Anexina V y el IP de la segunda citometría muestra una mayor intensidad de IP que de Anexina V en la concentración de 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de CPT, lo que indica mayor grado de muerte celular para esta concentración. Sin embargo, a la concentración de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de CPT se observa mayor intensidad de Anexina V que de IP, por lo que hay mayor grado de apoptosis a dicha condición. Este último dato es relevante ya que la concentración de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de CPT es la más idónea para continuar el estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento con CPT, por el aumento de apoptosis y no de muerte celular. Además, la población más afectada por el tratamiento vuelve a ser la de los astrocitos (P2), lo que aporta buenos indicios para continuar la investigación de la CPT como tratamiento para el GBM.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

1. El etanol presenta baja toxicidad en las líneas celulares de Glioblastoma, Neuroblastoma, HeLa y Fibroblastos, un buen indicio para continuar la línea de investigación con este disolvente.
2. Las inmunocitoquímicas no fueron concluyentes y se debe seguir optimizando la técnica.
3. Los ensayos de apoptosis con el Kit fueron óptimos para detectar apoptosis aplicando CPT disuelta en DMSO como modelo apoptótico.
4. La citometría de flujo fue una herramienta importante para analizar la viabilidad celular tras el tratamiento con CPT disuelta en DMSO como modelo de apoptosis, demostrando menor toxicidad del DMSO que en estudios anteriores de MTT.
5. Se observó mediante citometría de flujo que la población mayormente afectada por el tratamiento con CPT fueron los astrocitos.

En base a los resultados obtenidos, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

Después de concluir los experimentos con la CPT disuelta en DMSO se realizarán con el profármaco de CPT y se repetirán dichos experimentos con el disolvente etanol, ya que este disolvente mostró menor toxicidad.

Para analizar la apoptosis producida por la CPT y el profármaco de CPT se empleará el Kit de apoptosis (Biotool) y la citometría de flujo, ya que los resultados fueron óptimos.

En colaboración con otros grupos se testeará el profármaco de CPT en un sistema *in vitro* que simule el microentorno del tumor *in vivo*, para lo cual se encuentra en desarrollo una cámara de cultivo en 3D que permite recrear las condiciones de hipoxia y la densidad celular en el tumor [17].

Si los resultados de toxicidad del profármaco no fuesen muy altos *in vitro*, las condiciones serían óptimas para empezar los ensayos *in vivo* en modelos animales de GBM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science, 2002, 4th ed: 1313-1314.
2. Ricardo Paniagua. *Citología e histología vegetal y animal*. Biología celular. Editorial McGraw-Hill-Interamericana, 4th ed.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer, *Cell* 2000; 100: 57-70.
4. Sherr C, McCormick F. the RB and p53 pathways in cancer. *CancerCell* 2002; 2: 103-112.
5. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-231.
6. Takashi Komori. Pathology and genetics of diffuse gliomas in adults. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 55,28-37, 2015.
7. D.S. Tsang, L. Khan, J.R. Perry, H. Soliman, A. Sahgal, J.L Keith, T.G. Mainprize, S. Das, L. Zhang, M.N. Tsao. Survival outcomes in elderly patients with glioblastoma. Elsevier, *Clinical oncology*, 2014.
8. Hiroko Ohgaki and Paul Kleihues. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 2013.
9. Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, Nielsen D, Price PA. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006; 194-202.
10. Stylianos Nicolaidis. Biomarkers of glioblastoma multiforme. Elsevier, *metabolism*, 2015.
11. N. Joan Abbott, Lars Rönnbäck and Elisabeth Hansson. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews, neuroscience*, volume 7, 2006.
12. Aalya Fatooh, Michael J. Nanaszko, Baxter B.Allen, Christina L. Mok, Elena N. Bukanova, Robel Beyene, Jennifer A. Moliterno, John A. Boockvar. Understanding the role of tumor stem cells in glioblastoma multiforme: a review article. *Neurooncol*, 2010.
13. Obaid Afzal, Suresh Kumar, Md Rafi Haider, MdRahmat Ali, Rajiv Kumar, Manu Jaggi, Sandhya Bawa. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. Elsevier, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014.
14. Erick J. Morris, Herbert M.Geller. Induction of neuronal apoptosis by Camptothecin, and inhibitor of DNA Topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *The journal of cell biology*, volume 134, number 3, 1996.
15. Dale Purves, George J. Aufustine, David Fitzpatrick. *Neurociencia*. Panamericana, 2008, 3era Ed.

16. H.M. Schipper, L.Small, X.Wang, J.R. Brawer. Role of porphyrin sequestration in the biogenesis of iron-laden astrocytic inclusions in primary culture. *Developmental neuroscience* 2002, 2,4:169-176.
17. J.M Ayuso, R Monje, G Llamazares, M Moreno, M Agirregabiria, J Berganzo, M Doblaré, Iñaki Ochoa, L. J Fernández. SU-8 based microdevices to study self-induced chemotaxis in 3D microenvironments. *Frontiers in Materials*, 2015.

